



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto del Tamaño de Partícula, Temperatura y
pH en la Extracción y Evaluación de Antocianinas
de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

Melody Cinthya Vicuña Gómez

ASESORA: Dra. Marta Elvia Rosas Mendoza

COASESORA: Dra. Rosalía Meléndez Pérez

Cuatitlán Izcalli, México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto del Tamaño de Partícula, Temperatura y pH en la Extracción y Evaluación de Antocianinas de Jamaica (Hibiscus sabdariffa).

Que presenta la pasante: **Melody Cinthya Vicuña Gómez**

Con número de cuenta: 309299756 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Luis Arjona Román	
VOCAL	M. en C. María de Jesús Cruz Onofre	
SECRETARIO	Dra. Marta Elvia Rosas Mendoza	
1er. SUPLENTE	M. en C. Víctor Manuel Avalos Avila	
2do. SUPLENTE	M. en C. Pedro López Fajardo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre Norberto Vicuña Castillo, gracias por aceptarme y por darme tu apellido que camino con los tuyos desde el sur del continente hasta llegar a donde ahora nos encontramos, con orgullo puedo decir que soy la tercer generación Vicuña que lleva tú sangre, me temo que mientras escribía esto no pude mantenerme estoica pero cada lagrima que he derramado en mi computadora, me inspira a seguir adelante y como te dije aquel día que fue un catorce “no hay nada que no te haya dicho en vida”, me hubiera gustado escribirte esto mientras aún seguías conmigo, lástima que no me esperaste un par y un pedacito más de años para que pudiera ponerte esto en tus manos, mi cariño más sincero donde quiera que vos te encuentres, ÉSTA VA POR TI (☺ ^▽^).

AGRADECIMIENTOS

Hoy, después de lo que me pareció una eternidad por fin concluyó mis estudios profesionales y con esto me gustaría agradecer de manera general a todo ser vivo con el que me he encontrado hasta el día de hoy, porque de todo se aprende un poco y es lo que nos va forjando.

Agradezco a mi familia que a pesar de sus “diferencias políticas” siempre me han apoyado de manera incondicional, Luz por todas las oportunidades que me has brindado, por la comprensión y el cariño que muy a su peculiar modo siempre han mostrado, gracias por las sabías críticas, por la confianza que han depositado en mí y por el orgullo que siempre he sentido de ser parte de, y un punto a mi madre por darme la vida y hacerle al mundo la maldad.

A mis colegas gracias por hacer equipo conmigo, a Beca, Itzel, Clara, por estar conmigo 4.5 años de la carrera, a Eli que llegó después, gracias pequeñas mías por aguantar mis siestas, por acompañarme en el transcurso de esto, las quiero mil.

A mis 7 maravillas, que más que mis amigos son mis friends, (¡Jajajajaja! siempre quise decir eso) hermanos míos gracias por hacerme **uno** más de ustedes, los adoro, aunque por su culpa perdí mi capacidad de asombro y “a pesar de que su pequeña ya creció no quiere decir que no los necesite”

Doy gracias a los profesores que he tenido a lo largo de toda mi trayectoria escolar, a todos aquellos de los cuales aprendí en las aulas y otros que a pesar de que nunca me dieron clases me enseñaron mucho, a la ingeniera Dulce Oliver por su apoyo, confianza y por ayudarme a reencontrar mi camino. A los doctores Rosalía Meléndez Pérez, Marta Elvia Rosas Mendoza y José Luis Arjona Román, por volver posible este proyecto, por hacerme pensar por no dejarme caer en el conformismo por los buenos consejos y por volver el taller un segundo hogar.

Un agradecimiento DGAPA-UNAM por el apoyo financiero al
proyecto financiero IT201417

A MI HONORABLE JURADO

Dr. José Luis Arjona Román

M. en C. María de Jesús Cruz Onofre

Dra. Marta Elvia Rosas Mendoza

M. en C. Víctor Manuel Avalos Avila

M. en C. Pedro López Fajardo

Mau gracias gracias por ser tan estricto conmigo ya que eso me ha llevado por el camino correcto.

Por apoyarme mientras estuve en campo 1 por nunca fallarme, y estar a mi lado me disculpó por ser tan obstinada y por hacerte enojar. Siempre te he considerado una parte muy importante de vida y aunque no lo creas te quiero mucho

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
CAPÍTULO I ANTECEDENTES	3
1. Extracción sólido-líquido (Lixiviación)	3
1.1. Extracción de compuestos bioactivos (Antocianinas)	4
1.1.1. Métodos de extracción	5
1.1.2. Eficiencia	8
1.1.3. Rendimiento	9
1.1.4. Cinética y energía de activación	9
1.1.5. Difusión en la extracción de pigmentos	11
2. Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	15
2.1. Compuestos que generan el color	16
2.1.1. Antocianinas	16
3. Espectroscopia UV/vis	22
3.1. Cuantificación por absorbancia	23
3.2. Cuantificación de antocianinas	24
4. Microscopia electrónica de barrido	25
4.1. Aplicaciones de Microscopio electrónico de barrido	26
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	27
1. Objetivos	27
2. Descripción metodológica	28
2.1. Caracterización de materia prima	28
2.2. Caracterización del proceso de extracción	28
2.3. Determinación del tipo de antocianina	30
2.4. Selección de tamaño de partícula, temperatura y pH del solvente	31
2.5. Análisis en microscopia electrónica de barrido	33
2.6. Determinación del coeficiente de difusión (Dex)	34
2.7. Energía de activación	35

CAPÍTULO III RESULTADOS Y CONCLUSIONES	36
1. Caracterización de materia prima	36
2. Caracterización del proceso de extracción	36
3. Selección de tamaño de partícula	40
3.1. Concentración de antocianinas monoméricas totales	41
3.2. Eficiencia y rendimiento	42
4. Selección de temperatura y pH del solvente	43
4.1. Concentración de antocianinas monoméricas totales	44
4.2. Comportamiento cinético y energía de activación	48
4.3. Eficiencia y rendimiento	51
4.4 Difusión	56
5. Aumento del volumen del solvente	58
6. Conclusiones	62
REFERENCIAS	65

Índice de figuras

Figura 1 Célula vegetal	12
Figura 2 Estructura general de las antocianinas	17
Figura 3 a) 3-hidroxibenzaldehído y b) ácido p-cumárico	19
Figura 4 Transformaciones moleculares por efecto de pH	19
Figura 5 Equilibrio de las antocianinas en función al pH	20
Figura 6 Copigmentación generada a través de la apilación	21
Figura 7 Espectro electromagnético visible	23
Figura 8 Contenedor de muestras	29
Figura 9 Montaje para la extracción	30
Figura 10 Esquema del montaje de muestras para su medición en el microscopio electrónico de barrido	34
Figura 11 Eficiencia obtenida en la caracterización de proceso	37
Figura 12 Curva espectrofotométrica de la caracterización de proceso a los 120 min	38
Figura 13 Gráfica comparativa de absorbancia a todos los tiempos de extracción	39
Figura 14 Gráfica comparativa de absorbancia en la extracción de antocianinas con los solventes elaborados a 1% y 2% de ácido cítrico	40
Figura 15 Gráfico obtenido por el método de pH diferencial de las muestras extraídas con los dos tamaños de partícula	41
Figura 16 Sólidos restantes	43
Figura 17 Gráfico obtenido por el método de pH diferencial de las muestras extraídas con los dos disolventes a una temperatura de 40 °C y 120 min de extracción	44
Figura 18 Gráfico de cajas efecto del tiempo por cada una de las temperaturas (pH=2.3)	47
Figura 19 Gráfico de cajas efecto del tiempo por cada una de las temperaturas (pH=1.9)	48
Figura 20 Gráfico de la cinética de extracción a 35°C con un solvente con 1% de ácido cítrico (pH=2.3)	49

Figura 21 Gráfico de la cinética de extracción a 40°C con un solvente con 2% de ácido cítrico (pH=1.9)	49
Figura 22 Comparación de los resultados de eficiencia	51
Figura 23 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 2% de ácido cítrico	52
Figura 24 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 1% de ácido cítrico	53
Figura 25 Comparación de los resultados de rendimiento	54
Figura 26 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 1% de ácido cítrico	55
Figura 27 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 1% de ácido cítrico	55
Figura 28 Gráfico de cajas del efecto del tiempo sobre la concentración	59
Figura 29 Imagen obtenida a los 0 min de extracción	60
Figura 30 Imagen obtenida a los 45 min de extracción	60
Figura 31 Imagen obtenida a los 75 min de extracción	61
Figura 32 Imagen obtenida a los 120 min de extracción	62

Índice de tablas

Tabla 1 Longitud de onda de las antocianinas según su tipo y color	25
Tabla 2 Absorbancia total	45
Tabla 3 Concentraciones promedio	46
Tabla 4 Velocidades de extracción	50
Tabla 5 Coeficientes de difusión	56
Tabla 6 Resultados obtenido con el aumento del volumen del solvente	58

INTRODUCCIÓN

Los extractos de plantas se utilizan ampliamente en las industrias alimentarias, farmacéutica y cosmética ya que contienen una amplia gama de compuestos bioactivos tales como lípidos, fitoquímicos y pigmentos. Las nuevas técnicas de extracción buscan conservar las propiedades de las antocianinas ya que son muy inestables y son susceptibles a la degradación debido a la temperatura, la luz y el disolvente utilizado, a diferencia de los métodos tradicionales, tales como extracción Soxhlet, que son muy laboriosas y requieren cantidades relativamente grandes de disolventes (Wang y Weller, 2006; Dai et al., 2016).

Las antocianinas son de interés particular para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad para impartir colores atractivos. Su incorporación es benéfica para nuestra salud; ya que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, son antioxidantes, atrapan radicales libres y actúan como agentes quimioprotectores, controlan la cantidad de lípidos en sangre, y ayudan a la secreción de insulina y son vasoprotectivas (Aguilera-Ortiz et al., 2011).

Los métodos de cuantificación de las antocianinas tienen como fundamento que la predominancia de coloración roja se produce a pH ácido debido a la formación del catión flavilio y con un pH de intervalo 3 a 6 se forman las pseudobases carbinol incoloras (Blanco-Vega, 2013), dichas diferencias se miden espectrofotométricamente y las concentraciones se obtienen con la diferencia entre las absorbancias del pico máximo de la muestra llevada con una solución buffer de pH=1 y una solución buffer a pH=4.5.

El objetivo general del trabajo es la evaluación del efecto del tamaño de partícula, temperatura, y pH en el rendimiento, eficiencia, difusión y energía de activación de extracción de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), utilizando el método de cuantificación por pH diferencial.

RESUMEN

La flor de la Jamaica es el interés de esta tesis, por las antocianinas siendo éstas últimas, un beneficio particular para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad de dar una coloración atractiva a la vista.

Las nuevas técnicas de extracción de las antocianinas, buscan conservar sus propiedades, dado que son muy inestables y susceptibles a la degradación debido a la temperatura, la luz y el disolvente utilizado.

Se utilizó un método de extracción basado en el uso de disolventes naturales con características iónicas para la obtención de las antocianinas.

Los factores más importantes para la extracción son el tamaño de la partícula, tipo de solvente, temperatura y agitación, considerando que el método debe aumentar al máximo la recuperación del pigmento.

En el presente trabajo, muestra los efectos del tamaño de partícula, pH y temperatura en la extracción de antocianinas de flor de Jamaica. Se seleccionó el tamaño de partícula que generó, la menor degradación posible, disminuyendo los efectos de *copigmentación* y que generó el mayor rendimiento.

Con el tamaño de partícula seleccionado se modificó el pH del solvente y la temperatura con el fin de obtener las mejores condiciones para la extracción de las antocianinas, utilizando aquellas que proporcionaban mayor concentración, eficiencia, rendimiento, así como las condiciones que mantuvieran el color rojo característico de la flor de Jamaica. Además, se determinaron el coeficiente de difusión y la energía de activación en dicho proceso.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1. Extracción sólido-líquido (Lixiviación)

La lixiviación se define como un proceso de separación, con base en diferencias en solubilidad y en el transporte molecular, en el que las moléculas pasan de una fase a otra bajo el efecto de una diferencia de potencial químico. El transporte molecular se basa en tres partes, el equilibrio, balance de materia y energía y la cinética:

- a) Equilibrio: es cuando el potencial químico de la sustancia en cuestión es el mismo en todas las fases en contacto entre sí. A medida que transcurre el tiempo, la velocidad de transferencia de la fase sólida a la líquida disminuye, mientras que la de transferencia de la fase líquida a la sólida aumenta. En algún momento, ambas velocidades se igualan y se establece un equilibrio dinámico entre las fases y no existirá una transferencia visible del componente de una fase a otra.
- b) Balance de materia y energía: Cada etapa del proceso debe satisfacer las leyes de conservación de la materia y la energía.
- c) Cinética: Determina la velocidad a la que se alcanza el equilibrio del transporte molecular entre las fases.

El método más sencillo de operación se da cuando la mezcla original está en fase sólida y se pretende separar de ella un componente (solute) de otro (inerte) mediante su contacto con una fase líquida (disolvente) que lo disuelve selectivamente, esto significa separar el soluto de otros materiales con menor solubilidad en dicho disolvente; las dos fases se ponen en contacto durante un cierto periodo de tiempo, durante el cual se produce la transferencia de masa entre las fases donde el material de interés que se encuentra a una alta concentración migra a una zona donde la concentración es menor desde el interior de las partículas sólidas a su superficie, y la dispersión de los solutos dentro de la mayor parte del

disolvente que rodea a las partículas sólidas por difusión y agitación (Berk, 2013; Price 2003).

En algunos casos, la etapa de solubilización puede incluir cambios químicos promovidas por el disolvente, tales como la hidrólisis de biopolímeros insolubles. El éxito de una lixiviación y la técnica que se va a utilizar dependen con mucha frecuencia de cualquier tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido y los factores extrínsecos que pueden influir sobre él, los ejemplos más importantes son el tamaño de partícula, la afinidad del disolvente, temperatura, y la agitación (Berk, 2013; Treybal, 1987):

- a) Tamaño de las partículas sólidas. Cuanto más pequeña sea la superficie interfacial mayor es la transferencia, sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción
- b) Tipo de disolvente. El disolvente debe de ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad
- c) Temperatura. Un aumento de la temperatura favorece la solubilidad y aumenta la transferencia
- d) Agitación del disolvente-soluto. Favorece la transferencia por aumento de coeficientes de transferencia de materia en la interface S/L.

1.1. Extracción de compuestos bioactivos (Antocianinas)

Un compuesto bioactivo es una sustancia química que cumple funciones en el cuerpo que benefician la salud (antioxidantes, suplementos alimenticios, vitaminas o auxiliares en los tratamientos contra cáncer) y pueden ser flavononas, flavonas, catequinas y antocianinas (Drago-Serrano, López-López y Sainz-Espuñes, 2006), siendo estas últimas las de interés para este trabajo

El carácter polar de las antocianinas permite su solubilidad en muchos solventes diferentes como el alcohol, acetona, dimetilsulfóxido y el agua. La elección para el método de extracción debe maximizar la recuperación de pigmento con una

cantidad mínima de adjuntos y la degradación mínima o alteración del estado natural del compuesto. La extracción de las antocianinas se lleva a cabo comúnmente teniendo en cuenta varios parámetros (Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001) los cuales se mencionarán como factores de su estabilidad.

Los disolventes más comúnmente usados son el metanol y el etanol ya que contienen una pequeña cantidad de ácido el cual favorece al hidrólisis parcial de las antocianinas aciladas con ácidos dicarboxílicos como ácido malónico (Cissé et al., 2012). El interés por la obtención de estos compuestos se debe a su capacidad antioxidante y para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad para impartir colores atractivos (Sindi, Marshall y Morgan, 2014; Aguilera-Ortiz et al., 2011)

La extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales se ve influido principalmente por las condiciones en que se lleva a cabo el proceso, la elección de un disolvente y la composición del producto natural ya que todos sistemas muestran un comportamiento diferente, que no se puede predecir (Pinelo, Sineiro y Núñez, 2006).

1.1.1. Métodos de extracción

La destilación por arrastre con vapor de agua, es la técnica más utilizada para la obtención de aceites esenciales. Consiste en vaporizar dos líquidos inmiscibles a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen se enfrían hasta condensar y los dos líquidos inmiscibles: agua y aceite esencial, finalmente, se separan por diferencia de densidades. La inyección del vapor se da por la parte inferior del recipiente que contiene el material vegetal.

Extracción por Soxhlet o hidrodestilación consiste en evaporar una suspensión acuosa del material vegetal que durante toda la operación se encuentra sumergido en agua y en constante agitación para evitar aglomeración o sedimentación que pueden degradar térmicamente al compuesto (Armijo et al., 2012). La recirculación

de los vapores condensados se da con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo las sustancias encontradas en la materia prima contenida en un cartucho de celulosa desechable. La velocidad del reflujo depende directamente de la eficiencia y el tamaño del condensador. El método garantiza que durante la extracción no exista la posibilidad de degradar las moléculas de colorante por efecto de temperatura debido a que se emplean bajas temperaturas durante la operación, además de permitir el uso de distintos disolventes según convenga (Rojas-Lobato, Maldonado y Pérez, 2008).

La extracción supercrítica utiliza sustancias que se encuentra a condiciones de presión y temperatura más altas que su punto crítico. En esta región no existe una interacción entre fases sino solo existe una fase, que exhibe propiedades tanto de gas como de líquido. Una de las características más deseadas que exhiben los fluidos supercríticos es su alto poder de solvatación, con lo cual puede interactuar con una gran cantidad de solutos, y como otras propiedades de estos (Valverde-García, 1999). La extracción supercrítica con dióxido de carbono (SCFE-CO₂) no deja residuos de disolvente en el extracto y con él es posible extraer compuestos particulares que son sensibles a condiciones extremas porque tiene una temperatura crítica (T_c) de 31.1 ° C y una presión crítica (P_c) de 7.38 Mpa (Anggrianto et al., 2014).

La extracción con disolvente (SE) se utiliza para obtener determinados compuestos (polares y no polares) de diferentes materiales como sedimentos, suelos, polímeros, bacterias, hongos, algas, microalgas y plantas. Consiste en exponer a la materia prima a diferentes disolventes, que absorben compuestos de interés. Algunos de los disolventes más utilizados en los procedimientos de extracción son hexano, éter, cloroformo, acetonitrilo, benceno, etanol y son comúnmente utilizados en diferentes proporciones con el agua al final el extracto debe separarse del disolvente (Gil-Chavez et al., 2013).

Una de las propuestas más recientes para la extracción de compuestos bioactivos se basa en la combinación de metabolitos primarios (azúcares, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, aminoácidos, y aminos) unidos entre sí por interacciones

intermoleculares; a estos líquidos se les conoce como NADES del inglés Natural Deep Eutectic Solvents. De acuerdo con sus componentes, se puede dividir en cuatro grupos:

- a) Líquidos iónicos (ácido o base)
- b) Compuestos neutros (azúcar + ácido)
- c) Azúcar +base
- d) Azúcar + ácido amino.

Las diferentes composiciones resultan en una amplia gama de propiedades físicas, las cuales se seleccionan de acuerdo al compuesto de interés, con el fin de aumentar la estabilidad, la eficiencia, el rendimiento, la difusión etc. (Dai et al., 2016).

La extracción asistida por microondas(MAE) está basada en la capacidad de las microondas para que su energía puede ser absorbida y convertida en energía térmica. La humedad del material se calienta aumentando la presión, en el interior lo que modifica las propiedades físicas de los tejidos biológicos (disruptor de la pared celular y de los organelos) mejorando la porosidad de la matriz biológica. Esto permitiría una mejor penetración de la extracción con disolvente a través de la matriz y un rendimiento mejorado de los compuestos deseados.

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) se ha propuesto como una alternativa tímida a la extracción con solventes, proporcionando una mayor recuperación de los compuestos con un menor consumo de disolventes. Su eficiencia de extracción está relacionada con la cavitación acústica. Cuando la intensidad del ultrasonido es suficiente, el ciclo de expansión puede crear cavidades o microburbujas en el líquido, la extracción de antioxidantes como los compuestos fenólicos ha sido especialmente dirigida a optimizar su recuperación sobre la base de su rendimiento y capacidad antioxidante (Gil-Chavez et al., 2013).

1.1.2. Eficiencia

Existen dos tipos de eficiencia, la primera que es la termodinámica la cual se emplea para comparar el proceso real con el proceso adiabático reversible. Por consiguiente, la eficiencia es la relación entre el resultado real y el isoentrópico, teniendo como valor límite la unidad (Howell y Buckius, 1990). Y la eficiencia Murphree la cual está relacionada los procesos de separación complejos como la destilación donde el cociente entre el cambio real de concentración en las fases líquida y gaseosa se encuentra en equilibrio (Coulson, Richardson y Backhurst, 1981; Judson, 2003). Berk (2013) dice que la eficiencia Murphree varía con el proceso en cuestión ya que esta se encuentra en todos los procesos de contacto, en la ecuación 1 se tiene la expresión de acuerdo al proceso donde X_0 es la concentración del extracto inicial, X es la concentración a un tiempo, X^* es la concentración al equilibrio y η es la eficiencia.

$$\eta = \frac{X_0 - X}{X_0 - X^*} \quad (1)$$

Esta relación se da tomando en cuenta que la eficiencia en la lixiviación depende del tiempo de contacto entre el sólido y la disolución, así como de la velocidad de difusión del soluto desde el sólido hacia el líquido antes de llegar al equilibrio. Si las partículas del sólido no son porosas y el soluto solamente está contenido en la película de líquido que rodea a las partículas, la transferencia de materia es rápida y un tiempo de contacto razonable conducirá al equilibrio.

Cuando la mayor parte del soluto está inicialmente disuelto en los poros de un sólido poroso, o presente en una fase separada en el interior de partículas sólidas, la velocidad de difusión desde el interior hacia la superficie del sólido generalmente es la etapa controlante de la velocidad global de lixiviación. Una vez que las partículas están suspendidas en el líquido, el aumento de la agitación tiene poco efecto sobre la velocidad de transferencia de materia, pero en cambio la velocidad aumenta considerablemente si el sólido está finamente dividido (McCabe, Smith y Harriot, 1998).

1.1.3. Rendimiento

El rendimiento está influenciado principalmente por el proceso de extracción con una solución acuosa y / o disolvente orgánico. La concentración de cada compuesto en el tejido de la planta alcanza un equilibrio con la concentración disuelta en el disolvente y este se describe por su distribución de equilibrio. El proceso también depende de lo rápido que el compuesto se disolverá y llegará a la concentración de equilibrio en el líquido. Cuatro pasos de transferencia de masa están involucrados, que son la disolución de los compuestos al interior del material, la difusión del compuesto al disolvente, el equilibrio entre las concentraciones al interior y en el líquido y la difusión de la materia seca restante del material, siendo la difusión el paso limitante (Cacace y Mazza, 2003).

El rendimiento para la extracción de compuestos bioactivos se puede equiparar con una reacción química ya que un método efectivo se basa en la obtención máxima del compuesto con una mínima degradación (Cai et al., 2016); la relación para la eficiencia se basa en la cantidad teórica y la obtenida experimentalmente (Atkins y Jones, 2006) como se muestra en la ecuación 2.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{concentración experimental}}{\text{concentración teorica}} * 100 \quad (2)$$

1.1.4. Cinética y energía de activación

El estudio de la cinética de extracción da una idea del comportamiento del proceso, la observación de la respuesta del sistema versus la temperatura, concentración de solvente y tiempo, para relacionarla con las ecuaciones adecuadas. Ello nos permite obtener coeficientes que describen el fenómeno para fabricar el modelo matemático que se ajusta al proceso y más adelante optimizar el mismo. Además, permiten determinar puntos de control en el proceso de extracción, ya que ofrece un panorama de las variables que afectan directamente el proceso (Segovia-Gómez, Corral y Almajano, 2013).

En química las cinéticas tienen como objeto de estudio es medir velocidades de las reacciones y encontrar ecuaciones que relacionen la velocidad de una reacción con variables experimentales. En las reacciones simples, sólo la concentración de los reactivos afecta la velocidad de reacción, pero en reacciones más complejas la velocidad también puede depender de la concentración de uno o más productos. Las reacciones se pueden clasificar en homogéneas y heterogéneas (Levenspiel, 2002)

Se habla de una cinética de orden cero cuando, la concentración del producto es directamente proporcional al tiempo transcurrido, una de primer orden cuando la velocidad depende de la concentración de reactivo elevado a la primera potencia. y una de segundo orden cuya velocidad depende de la concentración de uno de los reactivos elevado al cuadrado, o bien de la concentración de dos reactivos distintos elevados cada uno de ellos a la primera potencia.

La velocidad de una reacción depende de la temperatura a la que tiene lugar la cual se explica con la teoría de colisiones, que se basa fundamentalmente en postular que las reacciones químicas ocurren como el resultado de las colisiones entre las moléculas reaccionantes. En un sistema formado por los reaccionantes A y B es lógico pensar que para que la reacción se produzca las moléculas de A y B han de chocar entre sí. Sin embargo, no todos los choques son efectivos, si así fuera la reacción tendría lugar de forma instantánea. Para que la reacción tenga lugar es necesario superar una barrera energética mínima. Esta barrera energética se conoce como energía de activación (Atkins y De Paula, 2006; Mendoza-Patiño, 2008).

La energía de activación es la energía que necesita un sistema antes de poder iniciar un determinado proceso ésta suele utilizarse para denominar la energía mínima necesaria para que se produzca una reacción química dada. Para que ocurra una reacción entre dos moléculas, éstas deben colisionar en la orientación correcta y poseer una cantidad de energía mínima.

Arrhenius sugirió que las moléculas deben poseer una cantidad mínima de energía para reaccionar. Esa energía que proviene de la energía cinética de las moléculas que colisionan sirve para originar las reacciones, pero si las moléculas se mueven muy lento, las moléculas solo rebotarán al chocar con otras moléculas y la reacción no sucede. Para que reaccionen las moléculas, éstas deben tener una energía cinética total que sea igual o mayor que cierto valor mínimo de energía llamado energía de activación representada en la ecuación 3 (Atkins y De Paula, 2006).

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (3)$$

Donde R, es la constante de los gases, $8.3145 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ y E_a es la energía de activación en J/mol, T es la temperatura absoluta en K. A es el factor pre-exponencial o la frecuencia de las colisiones entre las moléculas de reactivo y k es la constante de la velocidad de una reacción (Levenspiel, 2002).

1.1.5. Difusión en la extracción de pigmentos

La transferencia de masa es uno de los aspectos más relevantes en los organismos vivos, puesto que es un proceso básico e indispensable para la vida. Resultan tan importantes, que, si bien se ven afectados por las condiciones externas, son determinados principalmente por el propio organismo. El transporte pasivo es determinado por las propiedades estructurales del organismo, mientras que el transporte activo se halla determinado por la actividad metabólica (Vázquez-Duhalt, 2002). Se habla de una difusión en la extracción de los pigmentos como las antocianinas debido a la estructura celular que tiene las plantas, siendo la membrana y la vacuola las de mayor relevancia debido a sus funciones celulares específicas (figura 1).

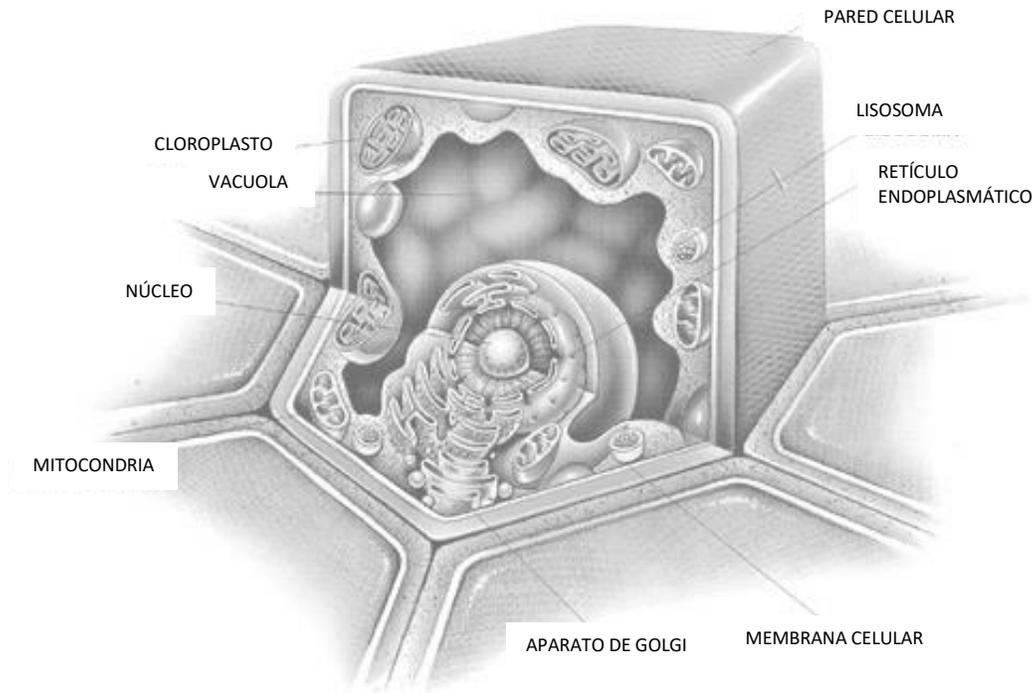


Figura 1 Célula vegetal (Uribe-Mejía, 2011)

La membrana plasmática es una estructura conformada por lípidos, proteínas y glúcidos, que actúa como barrera semipermeable impidiendo la entrada de la mayor parte de las moléculas al interior de la célula. La difusión es el movimiento neto de una sustancia (líquida o gaseosa) de un área de alta concentración a una de baja concentración. Eventualmente las moléculas llegan a un estado de equilibrio en el cual se encuentran distribuidas homogéneamente en el sistema (Raisman y Gonzales, 2000).

Las vacuolas son compartimentos cerrados que contienen diferentes fluidos, tales como agua o enzimas, aunque en algunos casos puede contener sólidos. Las vacuolas que se encuentran en las células vegetales son regiones rodeadas por el tonoplasto; esta membrana es selectivamente permeable, e interviene especialmente en el mantenimiento de la turgencia celular y en el crecimiento.

Una célula joven posee numerosas y pequeñas vacuolas, que luego se unen formando una vacuola grande que se ubica en el centro de la célula, llegando a

ocupar el 90% de la célula adulta, y desplazando al citoplasma y al núcleo hacia las paredes. La vacuola cumple numerosas funciones relacionadas a la protección de la vida celular. El jugo celular consiste en una solución acuosa de diversas sustancias llamadas sustancias ergásticas que son productos de secreción y/o reserva en el vegetal: proteínas, enzimas, aceites, taninos, inulina, gomas, mucílagos, cristales, sílice y antocianinas que de acuerdo al pH del jugo celular de la vacuola otorgan a las flores colores que van desde el rojo hasta el azul. En las vacuolas también se encuentran las flavonas y flavonoles que dan aspecto traslúcido a los pétalos (Raven, Evert y Eichhorn, 1999).

Hablamos de un equilibrio en la transferencia de masa cuando no existe fuerza directriz y la transferencia neta cesan. A medida que transcurre el tiempo, la velocidad de transferencia de la fase sólida a la líquida disminuye, mientras que la de transferencia de la fase líquida a la sólida aumenta ya no existe una transferencia medible del componente de una fase a otra, la velocidad de difusión de ese paso puede ser descrita por la segunda ley de Fick en la ecuación 4 (Rastogi et al., 2002).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{es} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (4)$$

Donde C es la concentración del soluto, t es el tiempo(s), Dex es el coeficiente de difusión (m^2s^{-1}), y x,y, z son la dirección de la difusión (m),

Los modelos más simplificados consideran a la difusión en un sistema homogéneo. Donde se plantean los balances para el sistema a partir de la solución analítica y de datos experimentales como el modelo Azuara et al., (1992) representado en la ecuación 5. El cual es un modelo que describe el proceso de la deshidratación osmótica donde se tiene que considerar, el aumento de la concentración de soluto en la solución osmótica, el tiempo de inmersión, la temperatura, la relación de la solución osmótica al alimento, la superficie expuesta y la baja presión en el sistema

$$\frac{t}{WL} = \frac{1}{S_1(WL_{\infty})} + \frac{t}{WL_{\infty}} \quad (5)$$

Donde S_1 es una constante relacionada con la pérdida de agua, t es el tiempo, WL es la fracción de agua perdida al tiempo t , y WL_∞ es la fracción de agua perdida en el equilibrio. Los términos provienen un balance de materia que implica el movimiento del agua dentro de los productos alimenticios donde se consideró que WL = fracción de agua perdida por el alimento cuando se alcanza el equilibrio al tiempo t , WL_∞ = fracción de agua perdida por el alimento en equilibrio y WS = fracción de agua que puede difundirse, pero que sigue siendo el alimento en el tiempo t , se describe como (ecuación 6):

$$WL = WL_\infty - WS \quad (6)$$

Se considera que WL_∞ tiene un valor fijo para las condiciones establecidas mientras que WL y WS están en función al tiempo y son inversamente proporcionales entre sí; esto sugiere a un parámetro denominado K el cual está en función del tiempo y de la pérdida de agua (ecuación 7).

$$WS = \frac{WL}{K} \quad (7)$$

$$K = S_1 t \quad (8)$$

La pérdida de agua al estar relacionada al tiempo, temperatura y la concentración de la solución osmótica, por fines prácticos se supone sólo en función del tiempo. Basándose en esto, es posible proponer una función simple para K en término de tiempo y a una constante relacionada con la pérdida de agua S_1 (ecuación 8). Por lo que el modelo de difusión de Azuara et al., es una ecuación que asocia el agua perdida con el tiempo, por medio de dos constantes, (S_1 y WL) las cuales pueden ser obtenidos con una regresión lineal.

En el otro extremo, existen modelos muy elaborados que combinan la difusión multicomponente con la existencia de elementos estructurales (pared celular, membrana protoplasmática, espacios intercelulares), a través de los cuales deben difundir los componentes, y que implican resistencias adicionales y generan la

aparición de numerosos coeficientes, difíciles de calcular o medir (Spiazzi y Mascheroni, 2001). La transferencia de masa en la extracción de pigmentos, en las células vegetales se da principalmente en la membrana plasmática y en la vacuola.

2. Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta anual perteneciente a la familia Malvaceae, con un período vegetativo de cuatro a cinco meses. Las flores, abren un solo día y después de un corto tiempo la corola se marchita y cae quedando sólo los cálices adheridos al fruto, los pétalos miden de 8 a 10 cm de diámetro y son amarillos con una mancha rojo oscura en el centro; durante su fructificación los cálices se alargan, tornándose carnosos y al final del ciclo vegetativo son cosechados y deshidratados (Vaidya, 2000).

Su origen se ubica en los países tropicales de Asia, particularmente India y Malasia, de donde se dispersó hacia algunos países africanos con climas tropicales y subtropicales, así como a Centro y Sudamérica. Los principales países productores son China e India siendo la de mejor calidad la de Sudán (Galicia-Flores et al., 2008).

La demanda en el mercado de los cálices varía de acuerdo a sus aplicaciones potenciales en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética. Sus principales características para la selección son la integridad, pureza física, aroma floral característico, sabor ácido, humedad máxima del 12 %, y el color rojo oscuro. Los cálices son exportados a países de América del Norte y Europa como colorantes y por su alto contenido de compuestos fitoquímicos, dentro de los que se encuentran: antocianinas, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, ácido dihidroxibenzoico y flavonoides como la gopipetina, hibiscetina y sabdaretina (Ramírez-Cortés et al., 2011; Mohamed et al., 2012).

2.1. Compuestos que generan el color

El color de los cálices deshidratados de esta planta varía desde verde amarillento hasta rojo intenso, y se encuentra relacionado con el contenido de los compuestos encontrados en las variedades de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), los cálices oscuros poseen mayor contenido de antocianinas que los cálices claros (Salinas-Moreno et al., 2012). Los pigmentos vegetales potencian el valor estético y son un parámetro de la calidad dentro de la selección de los alimentos; los cuatro predominantes son (Vaclavik y Christian, 2002):

- a) La clorofila (verde),
- b) Los carotenoides (rojo, naranja y amarillo)
- c) Los dos flavonoides antoxantina (blanco) y antocianina (rojo, púrpura y azul).

2.1.1 Antocianinas

Las antocianinas (Anthos griego = flor y ky'aneos = azul) son consideradas como sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y solubilidad en el agua, que permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos (Aguilera-Ortiz, 2009). Estas pertenecen al grupo flavonoides, que son los responsables del color rojo y azul de órganos de las plantas tales como frutas, flores y hojas. El color depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos.

La molécula de antocianina se produce naturalmente en las plantas como un glucósido donde el antocianidina se une a un grupo azúcar: glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa o arabinosa. Hay aproximadamente 17 antocianidinas que se encuentran en la naturaleza y sólo 6 son ampliamente distribuidas: cianidina (CY), delphinidina (dp), petunidina (pt), peonidina (PEO), pelargonidina (pl) y malvidina (mv) (Pojer et al., 2013).

Su esqueleto típico corresponde al catión flavilio (figura 2) que contiene dobles enlaces conjugados responsables de la absorción de la luz, es decir, que presentan un espectro de absorción característico con bandas alrededor de 250, 370 y 500-545 nm (Ortega y Guerra, 2006) y generalmente se encuentran penta-sustituidas en las posiciones 3,5,7,3', 4' o hexa-sustituidas en las posiciones 3,5,7,3', 4', 5'; donde R1 y R2 pueden ser H o azúcares; R pueden ser OH o H.

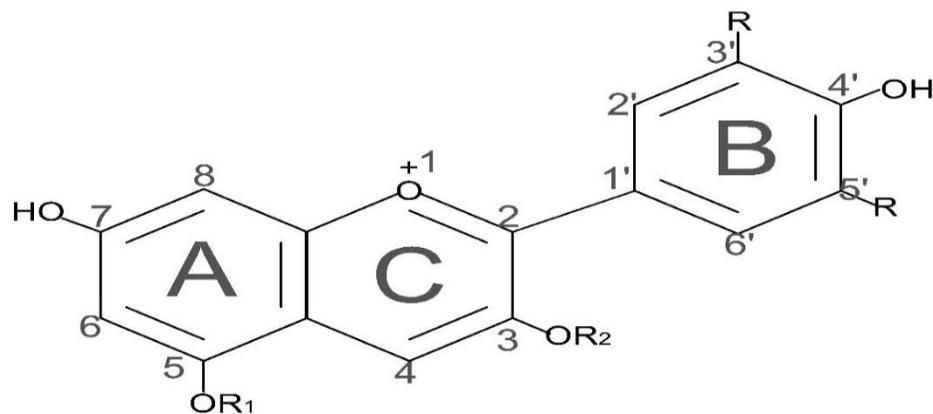


Figura 2 Estructura general de las antocianinas formadas por un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B) (Blanco-Vega, 2013; Rein, 2005 y Aguilera-Ortíz et al. 2011)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 (figura 2) con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. A parte de los sacáridos glicosilantes mencionados con anterioridad, se encuentran: rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos que pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico (Garzón, 2008).

Estabilidad

La estabilidad de la molécula aumenta con el número de metoxilos debido al impedimento estérico; al aumentar las hidroxilaciones (OH) el efecto se invierte y se ve favorecida por el aumento de glicosilaciones (azúcares). La presencia de acilación (ácidos orgánicos) aumenta la resistencia a la temperatura, a la luz y a la decoloración por SO₂ en el caso de los vinos. Se cree que esto es debido a la conformación plegada que adoptan las antocianinas con sustituyentes de gran tamaño y la posición del resto de azúcar y su disposición en el espacio (Blanco-Vega, 2013).

Se ha mostrado que la degradación y polimerización son influenciadas por el oxígeno, luz, temperatura y pH (Aguilera-Ortiz, 2009), para minimizar estas modificaciones indeseables de las propiedades se deben tomar en cuenta:

a) Oxígeno y luz

El oxígeno aumenta el impacto de los demás procesos de degradación de las antocianinas, en combinación con el ácido ascórbico se pierde la estabilidad y color, esto también tienen su efecto con el pH, cuando este es muy elevado el proceso de degradación es más rápido dependiendo del estado molecular del oxígeno y los mecanismos de oxidación pueden ser directos o indirectos; cuando los compuestos se oxidan puede producir compuestos con bajas coloraciones o productos cafés. La luz, aunque ayuda a la biosíntesis, de las antocianinas también aumenta el proceso de degradación el cual es diferente debido a la excitación del catión flavilio y está ligado con la exposición de las antocianinas al oxígeno del ambiente (Zamora-Marín, 2013).

b) Temperatura

Los incrementos de temperatura provocan pérdidas de los azúcares glicosilantes cuando estas se encuentran en la posición 3 del anillo C (ver figura 2); seguido de la apertura del mismo, formando chalconas incoloras; cuando se mantiene constante una temperatura elevada por largos periodos de tiempo la estabilidad en el color disminuye. Cuando las antocianinas se encuentran en una solución acuosa

con pH entre 2-4 la pérdida de los grupos unidos al catión flavilio se da por hidrólisis, generando el color café si esto se combina con una exposición con el oxígeno; también se pueden formar diferentes derivados del ácido benzoico, los cuales se presentan en la figura 3 (Rein, 2013 y Jettanapornsumran, 2009).

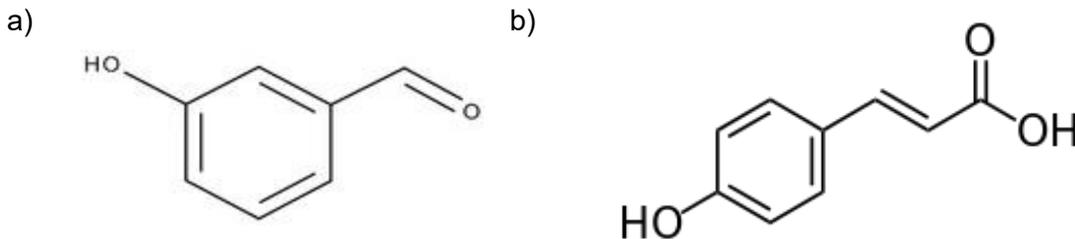


Figura 3 a) 3-hidroxibenzaldehído y b) ácido p-cumarico (Rodríguez, 2014)

c) pH

En medios acuosos las antocianinas sufren transformaciones estructurales que son dependientes del pH, son más estables en un medio ácido que en soluciones alcalinas; sin embargo, las antocianinas existen en un intervalo de pH 1-14; la estructura iónica de las antocianinas presenta modificaciones como se muestra en la figura 4; “a” es la estructura típica de una antocianidina la cual con el incremento de pH en “b” pierde un hidrógeno en el carbono 4' del anillo B, lo que provoca la formación de un doble enlace en la unión entre el anillo B y C, si se vuelve a aumentar el pH, el doble enlace formado entre los anillos cambia su conformación para estabilizarse y eso genera que la molécula pierda un hidrógeno en el carbono 3' del anillo B en “C”.



Figura 4 Transformaciones moleculares por efecto de pH (Espino-Ordoñez, 2014)

Cuando no existen modificaciones en el pH los extractos en medios acuosos también tienden a tener diferentes coloraciones según sea la antocianina presente. En el caso de pelargonidina y/o cianidina las coloraciones son entre naranja- rojo, la peonidina son rojo profundo, y la delphinidina, petunidina y/o malvidina exhiben coloraciones azulada-rojiza (Blanco-Vega, 2013).

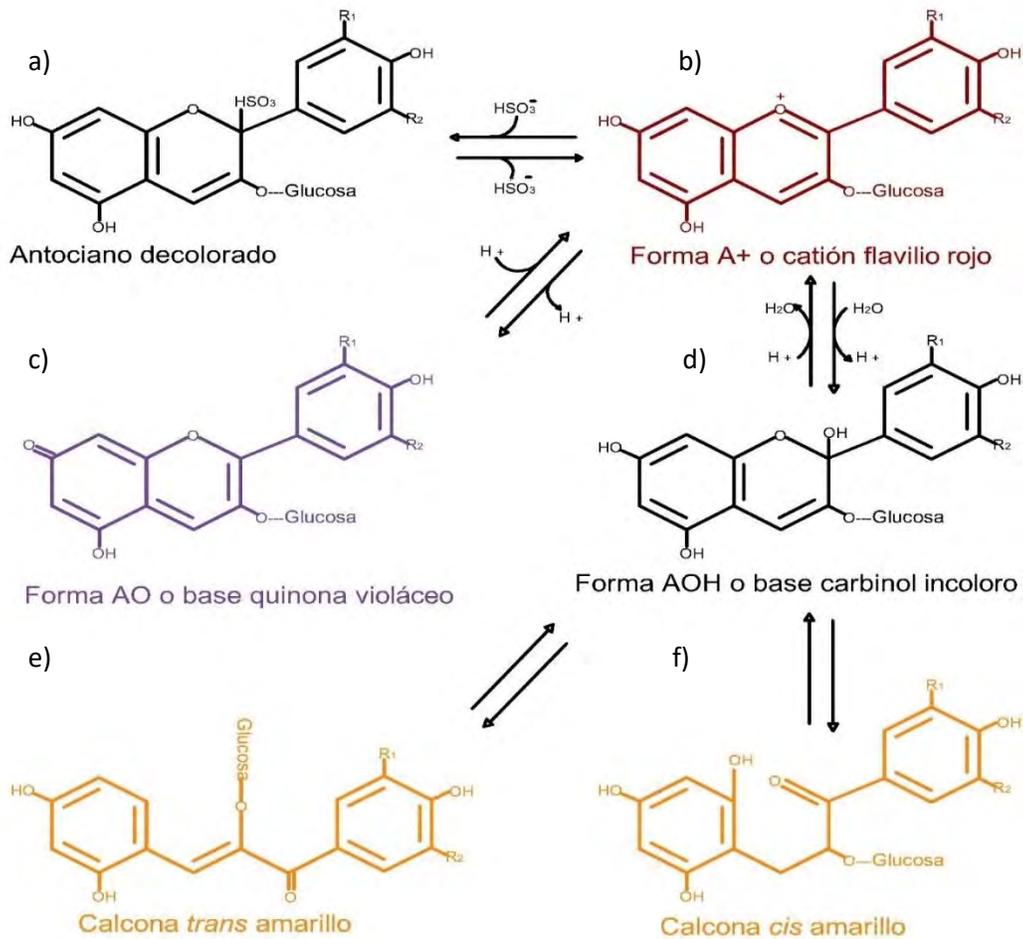


Figura 5 Equilibrio de las antocianinas en función al pH (Zamora-Marín, 2013)

En la figura 5a se muestra la estructura química de una antocianina decolorada por efecto del HSO_3^- el cual es un proceso de degradación exclusivo de los vinos (Zamora-Marín, 2013). Cuando se encuentran en equilibrio en un medio ácido predomina el catión flavilio (A^+) figura 5b que produce la coloración roja; en un medio básico la forma que predomina es la anhidrobase quinoidal (A) de color azulado y/o violáceo (figura 5c). Cuando el pH se encuentra de 3 a 6 se forman las pseudobases carbinol incolora (figura 5d) y éstas pueden formar las pseudobases

calconas que son incoloras o ligeramente amarillentas (figura 5e y 5f), al oxidarse producen compuestos fenólicos produciendo una destrucción total del color (Rein, 2005).

Copigmentación

La copigmentación es un fenómeno que se da típicamente en medio acuoso y que afecta a las antocianinas monoméricas en el catión flavilio a la vez que a otros compuestos fenólicos no pigmentados. Desde un punto de vista molecular, el complejo de copigmentación se forma cuando se apilan las estructuras entre los anillos aromáticos de ambos y se forman puentes de hidrógeno.

En la naturaleza se ha sugerido como un mecanismo de estabilización en las plantas con el fin de proteger al catión flavilio de un ataque nucleofílico producido por las moléculas de agua (Blanco-Vega, 2013). Kopjar y Piližota (2009) estudiaron el efecto de los compuestos fenólicos, (catecol, 4-metil, (+) - catequina y ácido gálico) sobre la estabilidad de las antocianinas en grosellas rojas y encontraron que se trataba de una copigmentación intermolecular, natural en un medio acuoso. En la figura 6 se muestra el mecanismo del complejo en el que un compuesto denominado copigmento se superpone a la antocianina modificando su configuración espacial y uniéndose a ella por puentes de hidrógeno entre sus grupos funcionales.

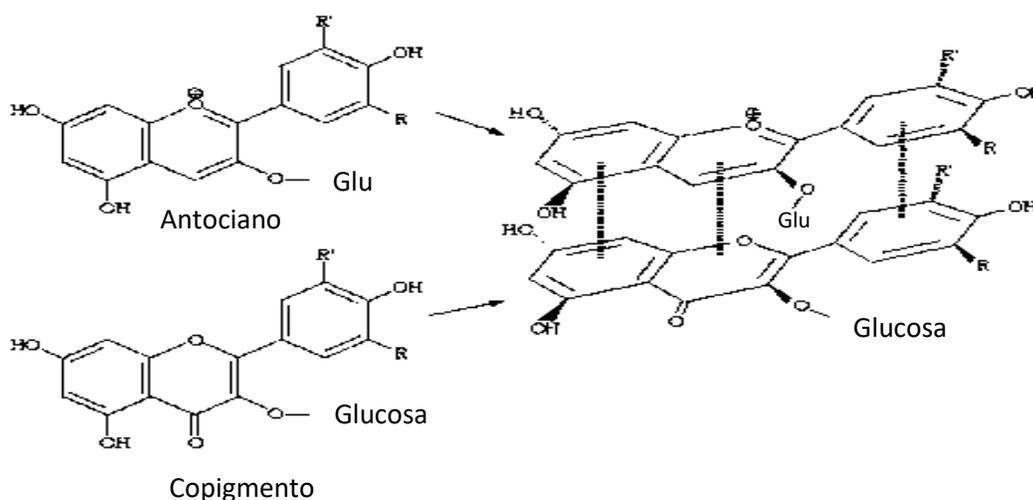


Figura 6 Copigmentación generada a través de la apilación (Blanco-Vega,2013; Pérez, 2011)

La copigmentación es en el cambio del color que genera un efecto hiperacrómico el cual es un aumento en la intensidad del color o un efecto batocrómico el cual puede ser el viraje hacia tonalidades azules o la pérdida parcial del color. Los complejos de copigmentación forman estructuras verticales antociano-copigmento que se estabilizan por uniones tipo puentes de hidrógeno; la copigmentación puede dividirse en tres categorías, según la naturaleza del copigmento implicado (Ferrer-Gallego et al., 2013; Jettanapornsumran, 2009; Pérez, 2011).

- a) Copigmentación intermolecular, en el cual el copigmento es una molécula de naturaleza distinta al antociano monomérico, como por ejemplo una molécula de flavonol. Esto supone un aumento de la absorbancia en el espectro visible (efecto hiperacrómico) y, en ocasiones, un desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorción (efecto batocrómico).
- b) Copigmentación intramolecular, en el cual el copigmento es una porción de la propia molécula de antociano monómero, este efecto es muy común en las antocininas que tienen cumarilo como sustituyente.
- c) Autoasociación, que en este caso el copigmento es otra molécula de antociano monómero.

Para cuantificar las antocianinas y los efectos mencionados el método más usado es la medición por espectroscopia.

3. Espectroscopia UV/vis

La espectroscopia estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. En esta interacción la radiación puede comportarse como onda o como partícula, aunque no se ha observado ningún fenómeno físico en el que ambos comportamientos se den simultáneamente. El espectro electromagnético clasifica las diferentes radiaciones electromagnéticas según su longitud de onda o frecuencia. Las ondas de radio son las de mayor longitud de onda y menor frecuencia, en el otro extremo encontramos los Rayos gamma, siendo la radiación de menor longitud de onda y mayor frecuencia (Fernández, 2014).

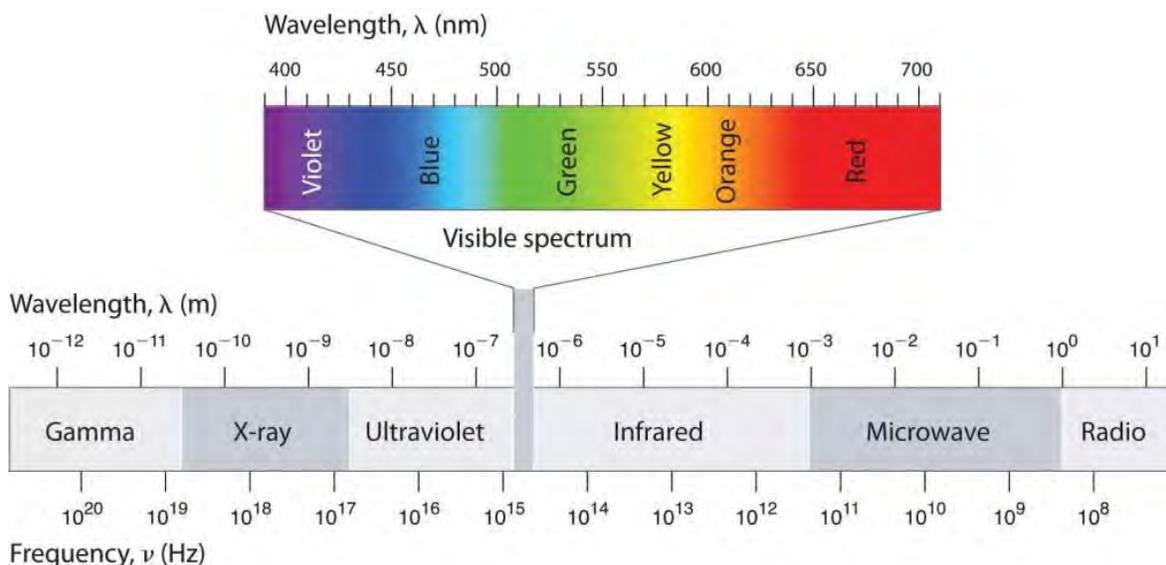


Figura 7 Espectro electromagnético visible (Leditgrow, 2015)

La parte del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir se denomina espectro visible, luz visible o simplemente luz. La luz visible está compuesta por radiaciones de longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm (figura 7). La sensibilidad del ojo humano depende de la longitud de onda y tiene un máximo en 550 nm. Algunas personas son capaces de percibir desde 380 hasta 780 nm (Pérez, 2012).

La espectroscopia se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de iones metálicos de transición, compuestos orgánicos muy conjugados y disoluciones con color. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua, o el etanol ya que los disolventes pueden tener una absorbancia significativa que afecte las mediciones en el espectro (Thomas y Cerda, 2007; Faraldos y Goberna, 2002; Pérez, 2012).

3.1. Cuantificación por absorbancia

Las dos leyes fundamentales que rigen el comportamiento de la fracción de radiación absorbida al pasar a través de la materia son la ley de Lambert que se

refiere al espesor de muestra y al efecto sobre la radiación que se absorbe, y la ley de Beer que está relacionada con el efecto de la concentración de la muestra sobre la absorción. (Serrano-Martínez, 2003)

- a) Ley de Beer: Indica la relación directa entre la absorbancia de un analito y su concentración en disolución, que a su vez está relacionada linealmente a la longitud del camino óptico. Cuando se usan unidades molares se llama absortividad molar (ϵ) y se expresa en $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Arenas-Sosa y López-Sánchez, 2004)
- b) Ley de Lambert: Establece que la fracción de luz absorbida por un medio transparente es independiente de la intensidad de luz incidente, y cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual de la luz pasada a través de él. (Martínez-Estrada y Moctezuma-Gonzales, 2006).

3.2. Cuantificación de antocianinas

El método pH-diferencial es un procedimiento para la cuantificación de las antocianinas monoméricas basada en el efecto que tiene el pH en su color (pH= 1 el color que predomina es el rojo y A pH=4.5 se forman bases incoloras) por lo que permite una medición precisa y rápida de las antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y otros compuestos que interfieren (Guisti y Wrolstad, 2001). En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos por una medición directa en el espectrofotómetro de los seis tipos de antocianinas más comunes donde y la longitud de onda que tiene su pico máximo y el color que tienen.

Tabla 1 Longitud de onda de las antocianinas según su tipo y color

Antocianinas	λ (nm)	Color
Pelargonidina	494	Naranja
Cianidina	506	Naranja-rojo
Delfinidina	508	Azul-rojo
Peonidina	506	Naranja-rojo
Petunidina	508	Azul-rojo
Malividina	510	Azul-rojo

(Santacruz-Cifuentes, 2011)

4. Microscopia electrónica de barrido (MEB/SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que sirve para analizar la morfología de materiales sólidos. La resolución permite estudiar características de los materiales a una escala muy pequeña; proporciona imágenes y datos de la superficie de cuerpos generalmente opacos por medio de un haz de electrones que se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y, de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de la pantalla. La señal de electrones secundarios se forma en una delgada capa superficial, del orden de 50 a 100 Å. Son electrones de baja energía (menos de 50 Ev), que pueden ser desviados fácilmente de su trayectoria emergente inicial y permiten obtener información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad otorga a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve”. (Almansa-Carrascosa, Amorós-Rodríguez y López-Belmonte, 2015)

El microscopio electrónico de barrido, permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus

características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales (Vázquez-Nin, 2000).

4.1. Aplicaciones del Microscopio electrónico de barrido

La aplicación de la microscopia electrónica de barrido en la extracción de se basa principalmente en la caracterización morfológica de los compuestos extraídos, Domínguez-Fernandez et al. (2012) utilizaron un microscopio electrónico de barrido en el gel de Aloe Vera con el fin de conocer la estructura y microestructura de la planta, así como para la selección de métodos para el procesamiento del gel y la preservación de los componentes bioactivos responsables de su actividad biológica.

Morán, Vázquez y Cyras (2008) realizaron un estudio sobre la extracción de celulosa a partir de fibra sisal y caracterizaron los productos obtenidos por cada uno de los dos procedimientos diferentes, los cuales se basaron en tratamientos químicos usuales tales como hidrólisis ácida, cloración, extracción alcalina y decoloración por medio de Análisis Termogravimétrico (TGA), Espectroscopía Infrarroja (FTIR), Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

Objetivo general

Evaluar el efecto del tamaño de partícula, temperatura, y pH en el rendimiento, eficiencia, difusión y energía de activación de extracción de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), utilizando el método de cuantificación por pH diferencial.

Objetivo particular 1

Evaluar el efecto de tamaño de partícula, temperatura y pH en el rendimiento y la eficiencia en la extracción de antocianinas aplicando la técnica de pH diferencial para su cuantificación.

Objetivo particular 2

Determinar del efecto de la temperatura y pH en el comportamiento de la energía de activación y difusión en la extracción de antocianinas en flor de Jamaica.

2. Descripción metodológica

2.1. Caracterización de materia prima

La materia prima consistió en 7 kg de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) proveniente de Sudán, la cual se utilizó durante toda la experimentación. Esta contiene 1448 mg de antocianinas en 100 g lo cual es una cantidad superior a las nacionales y a la proveniente de China (Salinas et al., 2012).

Se realizó la molienda en un molino de cuchillas; se determinó el % de humedad de acuerdo a la NMX-F-083-1986. La Jamaica (HS) molida se dividió en cuatro lotes y se secaron 2 g de cada uno a 75° C durante 1 h en un horno de secado 9023 A (ECOSHEL) y después se colocaron en un desecador durante 30 min; la operación se repitió hasta que llegó a peso constante. Con la ecuación 9 se obtuvo la humedad, donde P es el peso del recipiente con la muestra húmeda (g), P₁ es el peso del recipiente con la muestra seca (g) y P₂ es el peso de la muestra (g).

$$\% \text{Humedad} = \frac{P - P_1}{P_2} \quad (9)$$

Con el fin de determinar el tamaño de partícula que sería ocupado durante la experimentación se separó a la Jamaica en tres mallas con aperturas de 1.25, 0.595 y 0.300 mm. Con el fin de conocer si algún tamaño facilitaba la disolución de los ácidos orgánicos de la Jamaica se determinó el pH con 3 g de cada uno de los tamaños de partículas obtenidos y se les agregó agua destilada, la medición se realizó con un pH-metro de pluma ATC.

2.2 Caracterización del proceso de extracción

Se prepararon dos solventes con una relación 1:4 (V/V) etanol agua con 1% y 2% de ácido cítrico (pH=2.3 ± 0.2 y pH=1.9 ± 0.2 respectivamente) con el fin de mantener una solución no tóxica y que conservara las condiciones de acidez necesarias para

extraer las antocianinas. También se prepararon 2 soluciones de 1 L de soluciones buffer de pH=1 (0.1M HCl) y otro de pH=4.5 (19.6ml ácido acético, 4.8 g acetato de sodio), necesarios para el método de cuantificación de antocianinas monoméricas totales por el método de pH diferencial, utilizado para la determinación de la concentración cuando no se tiene una curva patrón.

Para facilitar la recolección de los residuos sólidos de la Jamaica se elaboraron una serie de contenedores cilíndricos con medidas de 1.75 cm de radio por 1.75 cm de alto hechos de polipropileno, con capacidad para 5 g de Jamaica molida como se muestra en la figura 8.

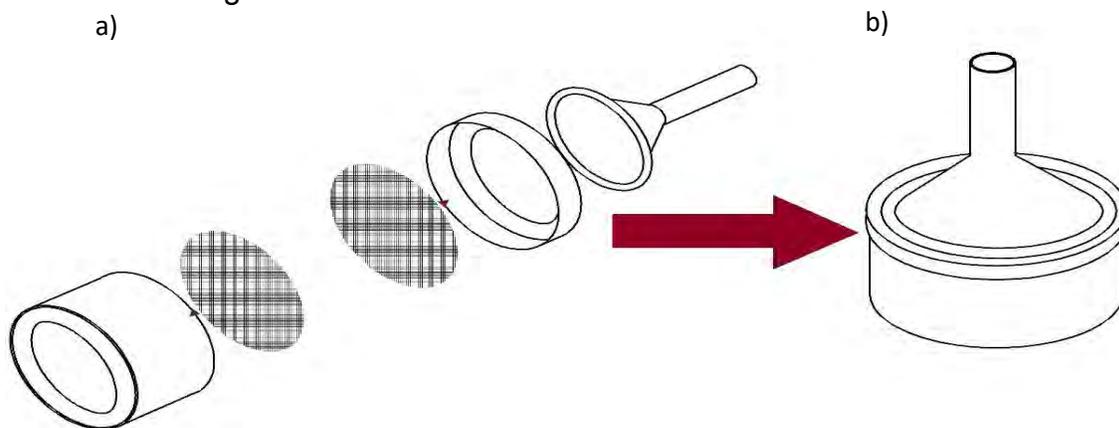


Figura 8 Contenedor de muestras a) las partes que conforman el contenedor la base cubierta por una malla de acero inoxidable, la tapa y el soporte sin el tubo; b) se presenta el diagrama del contenedor armado

Los contenedores tenían dos aperturas en las caras planas, las cuales estaban cubiertas por una malla de acero inoxidable para evitar que los sólidos de la Jamaica se salieran y permitir su contacto con el solvente; la parte superior contaba con un soporte unido a un tubo plástico sostenido en una malla de 5 mm.

Para el montaje experimental se utilizó un vaso de vidrio de 1 L con 200 ml de agua a una temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ en el cual se colocó un vaso de 250 ml de vidrio con el solvente, cubierto de papel aluminio para disminuir el contacto con la luz (figura 9).

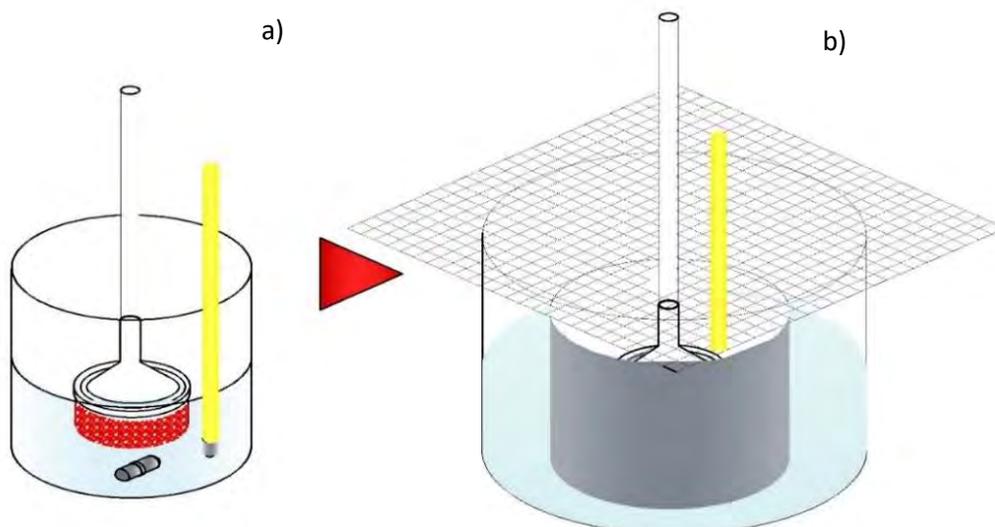


Figura 9 Montaje para la extracción a) vaso de 250 ml de vidrio en el que se realizaba la extracción b) vaso de vidrio de 1L con 200 ml, útil para el control de la temperatura

Para determinar el tiempo máximo de extracción se extrajo por 3 h y se obtuvieron siete muestras para determinar el tipo de antocianina; la selección se realizó con la mayor eficiencia.

2.3. Determinación del tipo de antocianina

Con el fin de determinar el tipo de antocianina presente se realizó una extracción a 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 min a 30°C con el solvente elaborado con 1% de ácido cítrico, etanol y agua a una relación 1:4 V/V (volumen/volumen), con agitación constante a 350 rpm, a 5 g de Jamaica con los dos tamaños de partícula y los dos solventes.

Posteriormente se realizó un barrido de 420-700 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Cary 8454 (AgilentTechnogies, USA) con 100 μ l de lo extraído y 3.2 ml de blanco en unas celdas de cuarzo con capacidad de 3.5 ml, una vez obtenidas las lecturas se procedió a verificar la longitud de onda a la cual se daba la mayor absorbancia (Guisti y Wrolstad, 2001) para obtener el peso molecular de la antocianina y la absortividad molar.

El factor de dilución es necesario para la cuantificación de la concentración de antocianinas monoméricas totales (AMT) del método de 2005.02 de la AOAC. De lo extraído se tomó una alícuota de 10 ml y se aforo en un matraz de 50 ml (1:4 V/V) con una solución buffer de pH=1 (0.1M HCl) y se midió el pH con un pH-metro de pluma ATC hasta que el extracto alcanzó el pH del buffer; esta operación se repitió con la solución buffer de pH=4.5 (19.6ml ácido acético, 4.8 g acetato de sodio), con la ecuación 10 se determinó el factor y la relación (A=alícuota(ml), v= volumen de aforo (ml)) que debían cumplir todas las muestras.

$$FD = \frac{V}{A} \quad (10)$$

2.4. Selección de tamaño de partícula, pH del solvente y temperatura en la extracción.

Se realizó una extracción por triplicado con los tamaños que se escogieron durante la caracterización de la materia prima al tiempo máximo determinado a una temperatura de 30°C con el solvente a 1% de ácido cítrico con agitación constante a 350 rpm, en una relación con solvente de 1:20 m/V (masa/ volumen).

Se seleccionó un tamaño adecuado para la extracción basado en la mayor concentración de antocianinas monoméricas totales extraídas, así como en el valor porcentual de eficiencia y rendimiento más altos.

Con el tamaño de partícula seleccionado se realizó una extracción por triplicado a diferentes tiempos a tres temperaturas 30, 35 y 40 ° C con los solventes al 1 y 2% de ácido cítrico con agitación constante a 350 rpm, en una relación de solvente 1:20 m/V.

Se seleccionó la combinación de temperatura y concentración porcentual de ácido cítrico, para la extracción de antocianina basadas en la mayor concentración, en la mayor eficiencia y rendimiento obtenidos.

La cinética de extracción, para la selección de temperatura y concentración porcentual de ácido cítrico, se obtuvo al graficar las concentraciones obtenidas de las AMT_{ex} en gramos y el tiempo de extracción.

a) Eficiencia y rendimiento

El papel filtro es utilizado para separar los sólidos después de la extracción; posteriormente se metieron a un horno de secado 9023 (A ECOSHEL) a $60^{\circ} C$ durante 120 min; estos se volvieron a pesar hasta antes de ser requeridos.

Se filtró la solución, se realizó un lavado de los restos sólidos con la misma cantidad de solvente para extracción; se envolvieron y se llevaron a secar a $75^{\circ}C$ en un horno de secado siguiendo el procedimiento utilizado para determinar humedad; hasta peso constante. Con la ecuación 11 se obtuvo el peso de la muestra seca donde, M_t es el peso de la muestra una vez que llegó a peso constante (g), P_s es peso en del papel filtro seco (g) y la ecuación 12 que define la eficiencia porcentual del proceso donde R_{ex} son residuos de la extracción (g) y ST son los sólidos totales obtenidos durante la determinación de humedad en (g).

$$R_{ex} = M_T - P_s \quad (11)$$

$$\%E = \frac{R_{ex}}{ST} * 100 \quad (12)$$

Para obtener el rendimiento se utilizaron los valores de concentración de antocianinas monoméricas totales obtenidas y se utilizó la ecuación 13 para obtener su valor porcentual donde AMT_{ex} son las antocianinas monoméricas totales obtenidas (g) y AMT_t son las antocianinas monoméricas reportadas por Salinas et al., 2012 para HS proveniente de Sudán

$$\%R = \frac{AMT_{ex}}{AMT_t} * 100 \quad (13)$$

b) Concentración de antocianinas monoméricas totales (AMT)

Posteriormente al determinar el tipo de antocianina se estableció la determinación de cianidina como antocianina monoméricas para lo cual se tomaron 500 μ l de cada uno de los extractos y se diluyeron con las soluciones buffer de pH=1 y pH=4.5 de acuerdo a la relación obtenida con el factor de dilución. Posteriormente se realizó un barrido de 420-700 nm en el espectrofotómetro UV/VIS. La ecuación 14 determina la absorbancia en la dilución conocida como A donde $A_{\lambda_{\text{vismax}}}$ es el valor de absorbancia en el pico más alto y $A_{\lambda_{700}}$ es el valor de absorbancia a 700 nm. Una vez obtenido el valor se sustituye en la ecuación 15 para determinar la cantidad de antocianinas monoméricas totales (AMT) en mg/L, donde A es la absorbancia total de la muestra, PM es el peso molecular de la antocianina, ϵ es la absortividad molar (Guisti-Wrolstad, 2001), y FD es el factor de dilución (AOAC, 2005).

$$A = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH4.5}} \quad (14)$$

$$\text{AMT} = \frac{A * \text{PM} * \text{FD} * 1000}{\epsilon * 1} \quad (15)$$

2.5. Análisis en microscopía electrónica de barrido

Para confirmar lo obtenido durante la extracción de manera estructural, se secaron sin luz a 40°C durante 48 h las muestras sólidas de tres tiempos y una muestra de la flor de Jamaica con el mismo tamaño de partícula; posteriormente se hizo una medición en el microscopio electrónico de barrido JSM-6010LA (JEOL, USA). A las muestras se les colocó tinte de plata y se ionizaron con oro a 7mAmp durante 300 s (figura 10a, b); posteriormente se colocaron las cuatro muestras en una placa (ver figura 10c) que se introduce en microscopio las capturas se hicieron a 800X y 2500X.

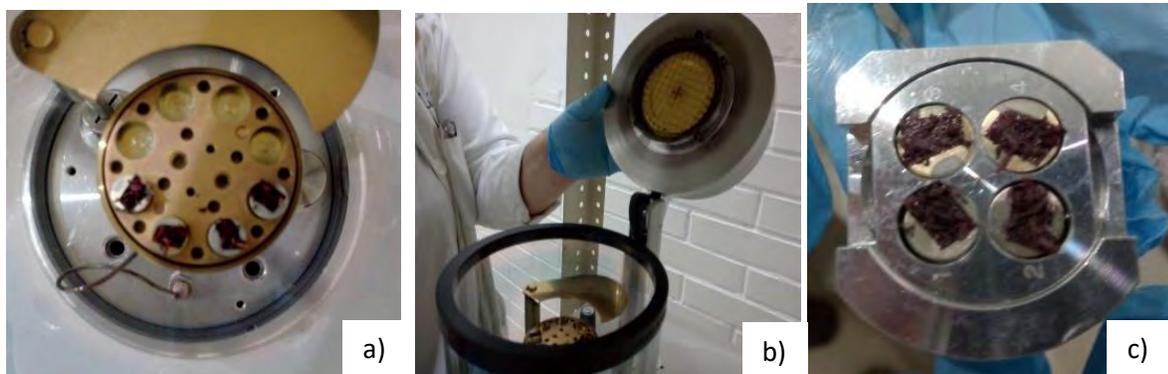


Figura 10 Esquema del montaje de muestras para su medición en el microscopio electrónico de barrido a) muestras acomodadas en el ionizador, b) el ionizador, c) la placa donde se colocan las muestras para su posterior medición

2.6. Determinación del coeficiente de difusión (Dex)

Se determinó si la extracción se daba en tiempo largos o cortos según los valores de $\frac{M_t}{M_\infty}$ y “Y” (ecuaciones 16 y 17) reportadas por Martínez-Navarrete et al., (1999) donde M_∞ es la cantidad en el equilibrio extraída de antocianinas en g; M_t son la cantidad de antocianinas que quedan en el sólido a cada tiempo en g, M_0 es la cantidad de antocianinas totales en el sólido en g, el procedimiento fue útil para aplicar una solución a la segunda ley de Fick y obtener un coeficiente de difusión.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{M_t - M_\infty}{M_0 - M_\infty} \quad (16)$$

$$Y = 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \quad (17)$$

Debido a la conformación de la geometría en la que se utilizó para la extracción se ocupó una relación de un cilindro finito de diámetro $2r$ y altura $2L$ la cual se pueden resolver mediante la superposición de la solución para un cilindro infinito y una lámina semi infinita como se muestra en la ecuación 18 (Rastogi et al., 2002). Ya que la difusión se da por el largo del cilindro por lo que la ecuación se reduce para un solo término.

$$Sr = \frac{St - S_{\infty}}{S_0 - S_{\infty}} = \sum_{n=1}^{\infty} C_{pn}C_{cn} \exp \left[-D_{es}t \left(\frac{q_{pn}^2 + q_{cn}^2}{A^2} \right) \right] \quad (18)$$

$$Sr = C_{pn}C_{cn} \exp \left[-D_{es}t \left(\frac{q_{pn}^2 + q_{cn}^2}{A^2} \right) \right] \quad (19)$$

Se utilizó el modelo cinético de Azuara et al (1992) para la obtención del coeficiente de difusión experimental, dando como resultado la ecuación 20.

$$D_{ex} = -\ln \left(\frac{S_1 t (EX_{1\infty})}{(1 + S_1 t) EX_{2\infty} C_{pn} C_{cn}} \right) * \left(\frac{A^2}{q_{pn}^2 + q_{cn}^2} \right) \quad (20)$$

Donde A es la superficie de transferencia (m) y EX es la relación dada entre la cantidad máxima de antocianinas extraídas (g) y la cantidad extraída a cada tiempo (g), q_{pn} , q_{cn} , se obtuvieron usando datos reportados en tablas, tomando en cuenta que $q_{pn} = -\alpha q_{cn}$ y que $\alpha q_{cn} J_0(q_{cn}) + 2J_1(q_{cn}) = 0$ (Ávila, Trigeros y Chinchilla, 2014; Crank, 1975; Rastogi et al., 2002).

2.7. Energía de activación

Se graficó la concentración obtenida por el método de cuantificación de pH diferencial contra el tiempo de extracción por cada una de las temperaturas y concentraciones de ácido cítrico en el solvente. Se ajustó a un modelo matemático adecuado para obtener la velocidad de extracción (k) y determinar la energía de activación por medio de la ecuación de Arrhenius (ecuación 21).

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (21)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (22)$$

Se linealizó la ecuación de Arrhenius (ecuación 22) y se obtuvo la energía de activación.

CAPITULO III RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. Caracterización de materia prima

Como caracterización de la materia prima (molida) se determinó el % humedad, la medición se hizo al principio de la experimentación, el promedio para humedad fue de 11.69 ± 0.75 %; Mohamed et. al (2012) reporta que la humedad de la Jamaica proveniente de Sudán de la variedad roja es del 11%, la norma internacional de humedad en la Hibiscus Sabdariffa es de 12% (Saldaña-Trinidad e Interiano-Zapata, 2012) por lo que los valores obtenidos en la experimentación se encuentran dentro de valores aceptables.

De la separación por tamaños se obtuvieron las partículas cuya medida era de 1.25 mm y 0.595 mm un tamaño inferior a los 0.300 mm se descartó.

El pH se midió para los dos tamaños de partícula teniendo como valor promedio 2.70 ± 0.1 , observando que el tamaño de partícula no afecta a la disolución de los ácidos orgánicos que posee la Jamaica naturalmente, como el ácido ascórbico, ácido málico, ácido protocatecuico, ácido esteárico, ácido gálico, etc. (Galicia-Flores et al., 2008) Salinas et al. 2012, reporta un pH de 2.4- 2.65 estando dentro de los parámetros aceptables.

2. Caracterización del proceso de extracción

Con el fin de poder determinar la concentración de antocianinas el factor de dilución es una parte importante del método para antocianinas monoméricas totales (2005.02 de la AOAC). Una vez que la muestra llega a un pH=1 se puede asegurar la presencia del catión flavilio, a pH=4.5 la pseudo base carbinol, por lo que el factor

de dilución se tomó como el adecuado una vez que la alícuota de la muestra alcanzó el pH del buffer, siendo para ambos de 6.4. Basado en la relación presentada en la ecuación 8 de la metodología, se determinó que se utilizarían 100 μ l con 6.4 ml de solución buffer para las muestras utilizadas en la selección del tamaño de partícula para la extracción, y 50 μ l de muestra con 3.2 ml de solución buffer para las muestras que extraerían con cambio en el % de ácido cítrico y temperatura. Para confirmar si el tiempo máximo de extracción sería de 120 min, se determinó la eficiencia de extracción. Los resultados se muestran en la figura 11 donde la eficiencia a los 90 min fue de 37.94%, 120 min de 37.49% y de 38.17% a los 180 min.

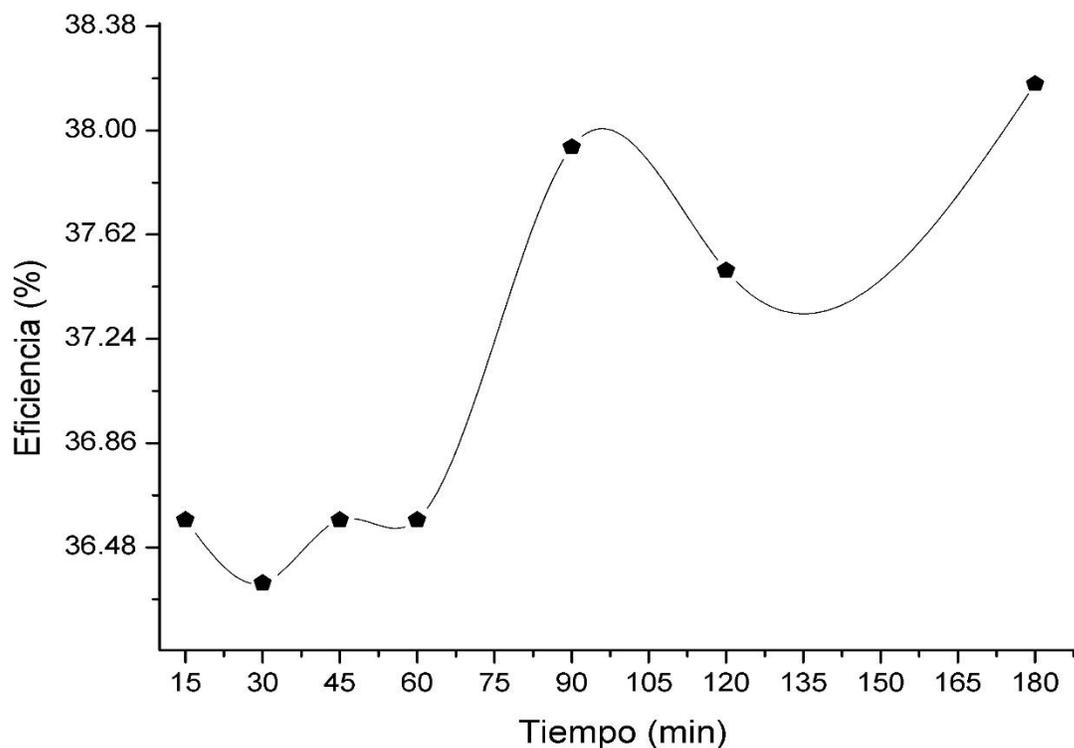


Figura 11 Eficiencia obtenida en la caracterización de proceso; por cada uno de los tiempos de extracción 15, 30,45,60,90,120 y 180 min

2.1. Determinación del tipo de antocianina

Se realizó un barrido desde 190 nm a 1100 nm y se obtuvieron las gráficas de absorbancia contra longitud de onda de cada uno de los tiempos de extracción; en la figura 12, se muestra el tiempo de 120 min de extracción, donde se puede observar que existen varios picos a 227, 232, 280, 318 y 524 nm.

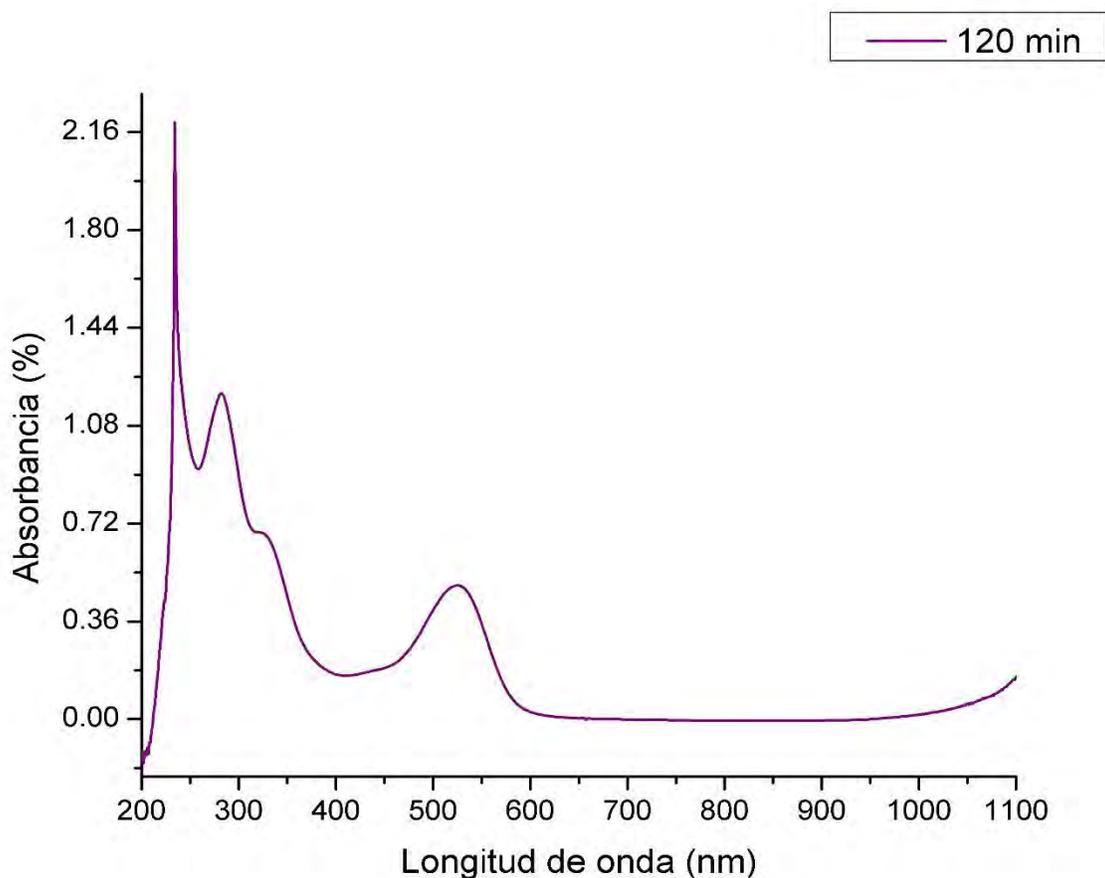


Figura 12 Curva espectrofotométrica de la caracterización de proceso a los 120 min

Estos picos se asocian con el ácido gálico, cuya absorbancia se da 280 nm (Isaza et al. 2005) y flavonas, que su absorbancia máxima esta entre 250 - 350 nm (Sotero et al., 2011). Entonces, el área de interés en la curva se delimitó de los 400 hasta los 700 nm y se compararon los espectros a cada uno de los tiempos de extracción, siendo para todos el de 524 nm el pico máximo (figura 14). De acuerdo a Giusti y Wrolstad (2001) esto corresponde a una cianidina 3- soforosido-5-glucósido 647

g/mol y con 37150 de absorptividad molar. Está no es una de las cianidina común en alimentos, pero lo es a las flores según los estudios de Saito et al. (2008) y Tatsuwawa et al. (2013).

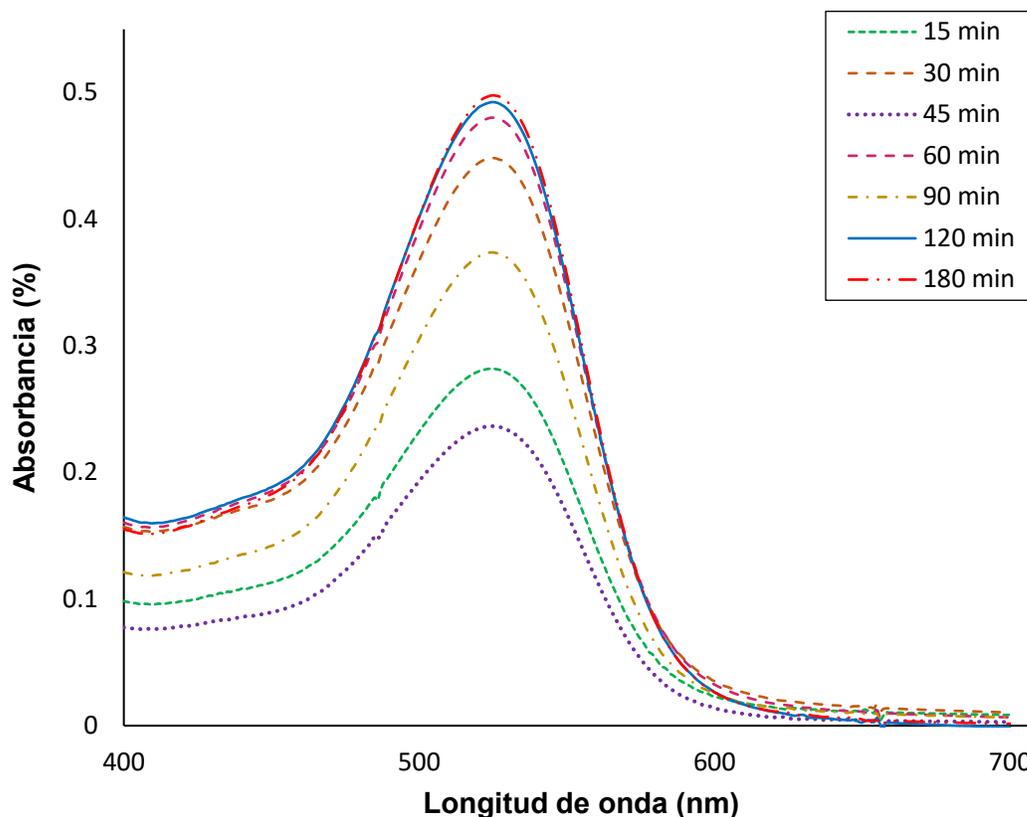


Figura 13 Grafica comparativa de absorbancia a todos los tiempos de extracción

En la figura 13 también se puede observar que la absorbancia comienza a llegar a un cierto límite a los 120 min con 0.4925% abs, por lo que se decidió que fuera el tiempo máximo de extracción. Una vez determinado este tiempo, se extrajo con el solvente preparado al 2% de ácido cítrico y se midió la absorbancia; la curva obtenida se muestra en la figura 14, donde se puede observar que la máxima absorbancia no cambia sin importar el cambio de pH, debido a que las sustancias que componen al solvente son las mismas; una de las diferencias más notorias entre las gráficas se debe a que aquella preparada al 2% de ácido cítrico tiene una

absorbancia menor a la de 1%, ya que las antocianinas se encuentran en menor proporción.

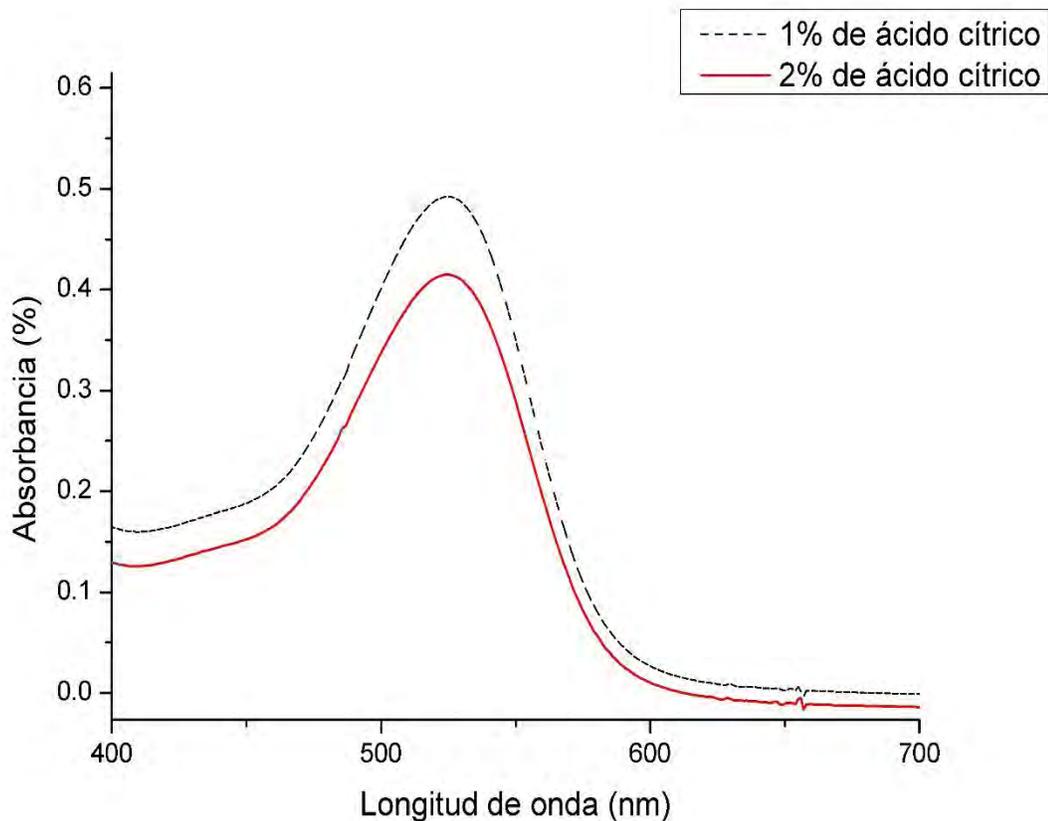


Figura 14 Grafica comparativa de absorbancia en la extracción de antocianinas con los solventes elaborados a 1% y 2% de ácido cítrico

3. Selección de tamaño de partícula

Tomando en cuenta las actividades preliminares, se procedió a la experimentación, con el fin de seleccionar el tamaño de partícula más adecuado. Se realizaron extracciones con el tamaño de partícula de 1.25 mm y 0.595 mm por 120 min; la selección de tamaño se basó en la mayor concentración de antocianinas monoméricas totales extraídas, y en los valores porcentuales más altos de eficiencia y rendimiento.

3.1. Concentración de antocianinas monomericas totales

De los extractos obtenidos se tomaron 500 μ l de cada uno y se diluyeron con 6.4 ml las soluciones buffer, con pH=1 y con pH=4.5, para determinar la concentración.

En la figura 15 se muestra la curva típica del método de pH diferencial para obtener el valor experimental de la absorbancia total del sistema (A) para ambos tamaños de partícula, el cual se toma en cuenta para calcular la concentración de antocianinas monomericas totales reportadas como cianidina 3-soforosido-5 - glucósido.

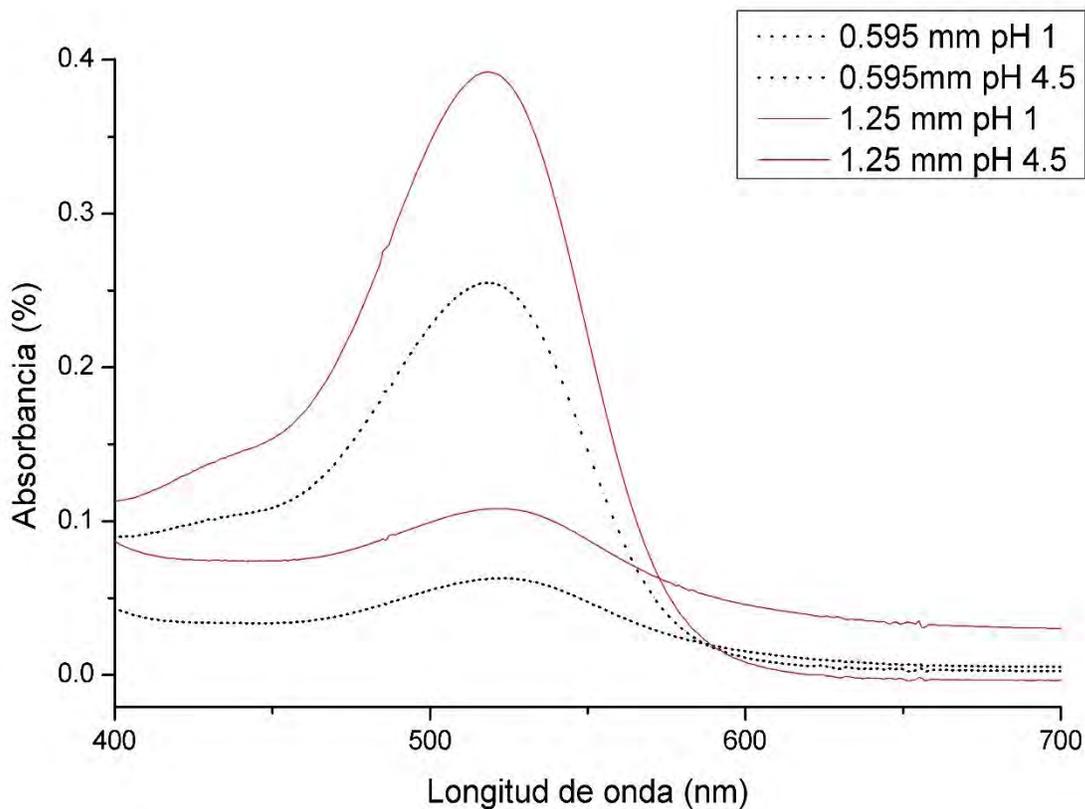


Figura 15 Gráfico obtenido por el método de pH diferencial de las muestras extraídas con los dos tamaños de partícula

En la curva con un tamaño de partícula de 0.595 mm a pH=1 su absorbancia máxima promedio es de 0.2391% y a pH=4.5 es de 0.0663%, mientras que con 1.25 mm a pH=1 su absorbancia máxima promedio es 0.3710% y a pH=4.5 de 0.0977%;

al realizar la diferencia entre espectros obtenemos un valor promedio de la absorbancia total de 0.1949% y 0.3177 % respectivamente, con la diferencia entre el pico más de cada uno de los pH de la solución y la longitud de onda a los 700 nm (ecuación 14) se obtuvo la absorbancia total y se determinó la concentración para cada tamaño de partícula con la ecuación 15 del método de pH diferencial, siendo de 217.52 ± 4.66 mg/L para un tamaño de partícula de 0.595 mm y una concentración promedio de 354.18 ± 5.30 mg/L para la partícula de 1.25 mm. La disminución en la concentración de las antocianinas obtenidas se debe a que, al aumentar el área de contacto, los compuestos quedan más expuestos a luz. En las plantas las antocianinas forman parte del fotosistema II (PSII) y de los complejos de disipación energética en los casos de toxicidad por luminosidad (Del Valle-Leguizamón, González-León y Báez-Sañudo, 2005). Como se ha mencionado anteriormente su función primordial es la de absorber energía lumínica; cuando no todos los fotones son absorbidos las plantas comienzan un proceso fotoquímico que resulta en un blanqueamiento de la hoja con la consecuente reducción o pérdida de la capacidad fotosintética (Manrique-Reol, 2003).

3.2. Eficiencia y rendimiento

Tomando la ecuación 11 y el procedimiento experimental presentado en la metodología, se obtuvo que para el tamaño de partícula de 0.595 mm la eficiencia del proceso fue de 34.62 ± 1.24 % y con el tamaño de partícula de 1.25 mm fue de 48.96 ± 0.65 %.

Con la concentración obtenida para cada uno de los tamaños de partícula, se tuvo un rendimiento de 27.27 ± 2.37 % y otro de 44.05 ± 5.00 %. Tomando en cuenta que a pesar de que la reducción del tamaño aumenta el área de contacto, para la extracción de antocianinas en flor de Jamaica el proceso disminuye su rendimiento cuando la partícula es menor a 1mm, debido a que al tener más expuesta la estructura se ven favorecidas las reacciones de copigmentación y oxidación.

Como se mostró la figura 12 en la página 38 las antocianinas no son los únicos compuestos extraídos. por lo que la copigmentación es muy común ya que es un fenómeno en los compuestos fenólicos se unen por puentes de hidrogeno a las antocianinas (Pérez 2011). De acuerdo a lo obtenido en espectrofotómetro se puede decir que el efecto es batocrómico (Jettanspornsumran, 2009). Debido a que los sólidos restantes de la partícula de 0.595 mm tenían una coloración marrón (figura 16b) se puede hablar también de la presencia de una fotoxidación, la cual se pudo dar de manera directa y/o indirecta, de acuerdo a lo reportado por Rein, 2005.



Figura 16 Sólidos restantes a) tamaño de partícula 1.25 mm y b) tamaño de partícula de 0.595 mm

4. Selección de temperatura y pH del solvente

Con el tamaño de partícula de 1.25 mm seleccionado, se realizó la extracción cada 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min a 30, 35 y 40 ° C con los solventes al 1% y 2% de ácido cítrico, con agitación constante a 350 rpm, en una relación de solvente 1:20 m/V. La selección se basó en la mayor concentración de antocianinas monoméricas totales extraídas, y en los valores porcentuales más altos de eficiencia y rendimiento, así como su estabilidad.

4.1. Concentración de antocianinas monomericas totales

En la figura 17 se muestra un gráfico representativo del método de pH diferencial para obtener el valor experimental de la absorbancia total del sistema, teniendo en cuenta que se obtuvieron 36 gráficos entre las condiciones experimentales y las tres réplicas; se presentan los espectros para los disolventes al 1% y 2% de ácido cítrico a 40°C a 120 min. Como se puede observar, las líneas punteadas pertenecen al solvente con menor cantidad de ácido cítrico y su absorbancia máxima a pH 1 es 0.4713%, la cual es mayor con respecto a las del 2 % de ácido cítrico cuya absorbancia máxima es de 0.3447%.

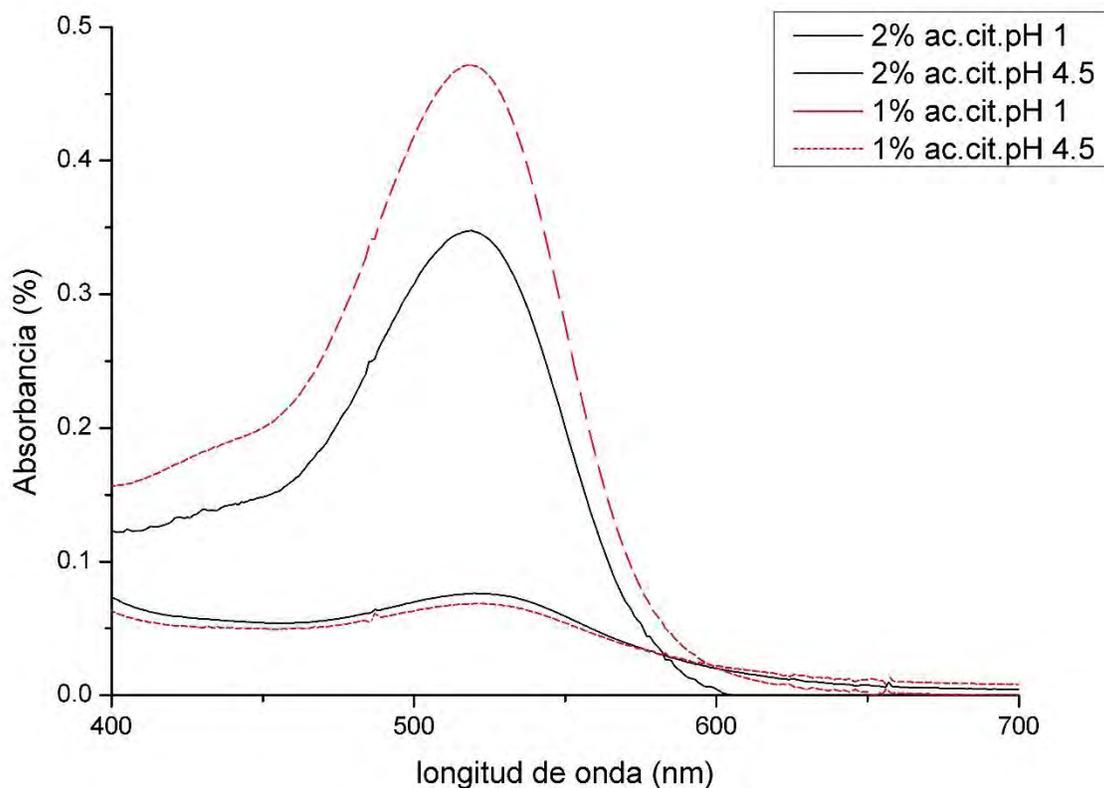


Figura 17 Gráfico obtenido por el método de pH diferencial de las muestras extraídas con los dos disolventes a una temperatura de 40 °C y 120 min de extracción

Los valores de la absorbancia total que se muestran en la tabla 2 son únicamente para el tiempo de extracción a los 120 min a todas las condiciones de experimentación. Los coeficientes de variación de las muestras extraídas a una

temperatura de 30° y 35° C, cuando el pH del solvente es de 1.9, son menores con respecto a las del solvente cuyo pH es de 2.3. Una causa de lo anterior es la copigmentación la cual se ve favorecidas cuando el pH del medio esta entre 2-5 (Blanco-Vega, 2013) y no se tiene una velocidad de reacción constante, por lo que la variación aumenta. Comparando ambos solventes cuando la temperatura aumenta a 40° C, no existe gran variación ya que los puentes de hidrogeno que unen la molécula de agua se debilitan y permiten que otros compuestos se unan y disminuyen el pH del medio acuoso dificultando la formación de copigmentos.

Tabla 2 Absorbancia total

1 % ácido cítrico pH=2.3					
30 °C		35 °C		40 °C	
Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)	Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)	Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)
0.3484	19.92	0.4807	15.27	0.4012	5.24
2 % ácido cítrico pH=1.9					
30 °C		35 °C		40 °C	
Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)	Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)	Absorbancia total (%)	Coefficiente de variación (%)
0.3243	5.05	0.3072	1.64	0.3512	6.32

Con la absorbancia total del sistema se obtuvieron las concentraciones de antocianinas monomericas totales durante la experimentación a todas las condiciones (Tabla 3), reportadas como cianidina 3-soforido-5-glucósido. Con el disolvente con la menor cantidad de ácido cítrico, a todas las temperaturas de extracción, se obtienen los mayores resultados. Considerando la teoría clásica, la pureza del solvente aumenta la capacidad de éste, ya que el agua y el etanol forman puentes de hidrógeno, al unirse con una cantidad mayor de ácido cítrico tienen menos enlaces libres para poder asociarse con las antocianinas; cuando la concentración de ácido cítrico es de 1% existe una copigmentación hipercromica

(Blanco-Vega, 2013), la cual aumenta la absorbancia total del sistema aumentando la concentración obtenida.

Tabla 3 Concentraciones promedio

1 % ácido cítrico pH=2.3			
Tiempo (min)	30° C	35°C	40°C
Concentración mg/L			
15	226.72	260.23	245.65
30	233.58	323.35	302.02
45	273.85	324.39	297.63
60	328.74	336.59	321.05
90	284.69	373.45	355.04
120	356.00	470.60	447.20
2 % ácido cítrico pH=1.9			
Tiempo (min)	30° C	35°C	40°C
Concentración mg/L			
15	212.11	192.74	239.64
30	178.58	251.88	259.03
45	239.04	304.18	284.70
60	288.63	349.45	270.15
90	272.85	270.33	305.57
120	337.15	342.45	391.50

Se utilizó una ANOVA de una vía para verificar el efecto del tiempo por cada una de las temperaturas de extracción y se realizó una comparación con respecto a la concentración de ácido cítrico en el solvente. Con el disolvente al 1% de ácido cítrico (pH =2.3), en la figura 18 se observa, para las tres temperaturas, que el tiempo de extracción es fundamental: a los 120 min la concentración aumenta con respecto a la primera hora de extracción (15,30,45 y 60 min) y la mayor variación se da cuando

la temperatura de extracción es de 35°C. Con esto se puede decir que a estas condiciones las reacciones de copigmentación y ruptura de los puentes de hidrogeno del solvente, por aumento de la temperatura, se dan de una manera simultánea provocando una mayor variabilidad entre las tres replicas.

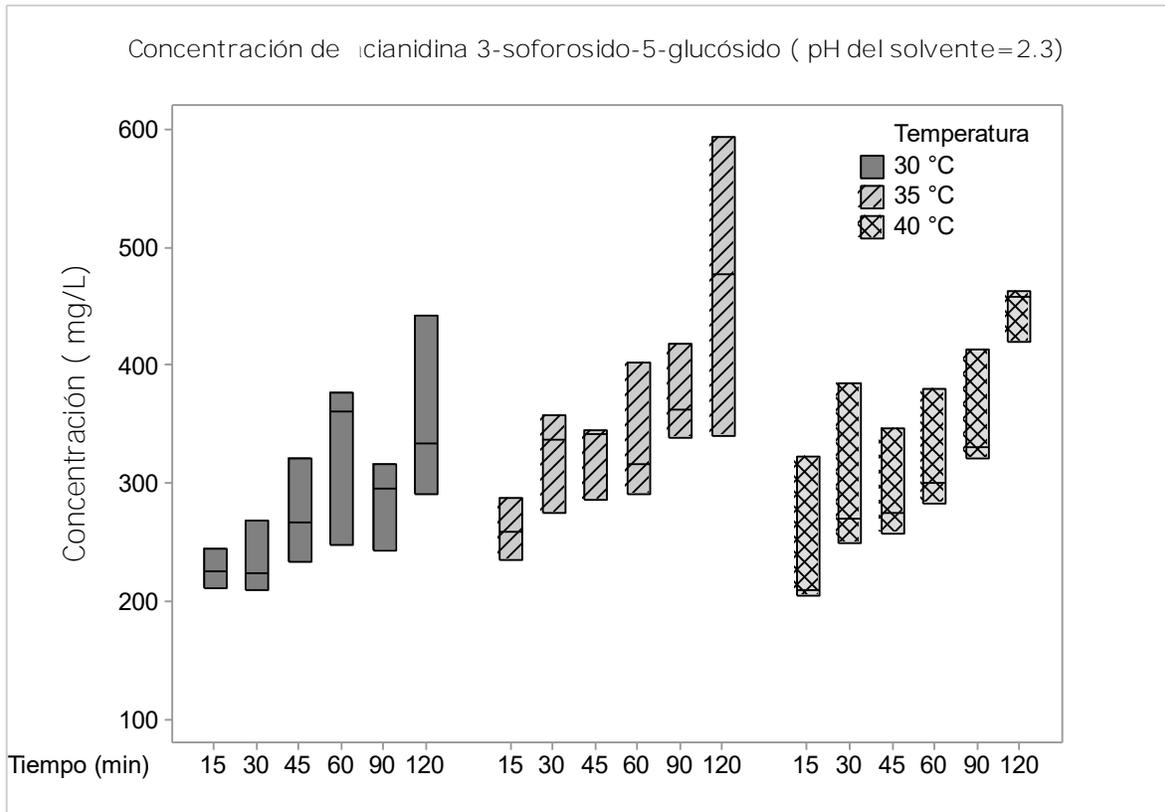


Figura 18 Gráfico de cajas efecto del tiempo por cada una de las temperaturas (pH=2.3)

Con el solvente que tenía 2 % de ácido cítrico (pH =1.9), en la figura 19 se observa, para las tres temperaturas, que el tiempo de extracción es fundamental para las temperaturas de 30 y 40 °C; a los 120 min la concentración aumenta y la variación entre las réplicas disminuye ya que predomina el catión flavilio. Cuando la temperatura es de 35°C las condiciones nuevamente favorecen a la formación de copigmentos batocromicos o productos oxidados debido a la disminución en la concentración de antocianinas. (Blanco-Vega, 2013),

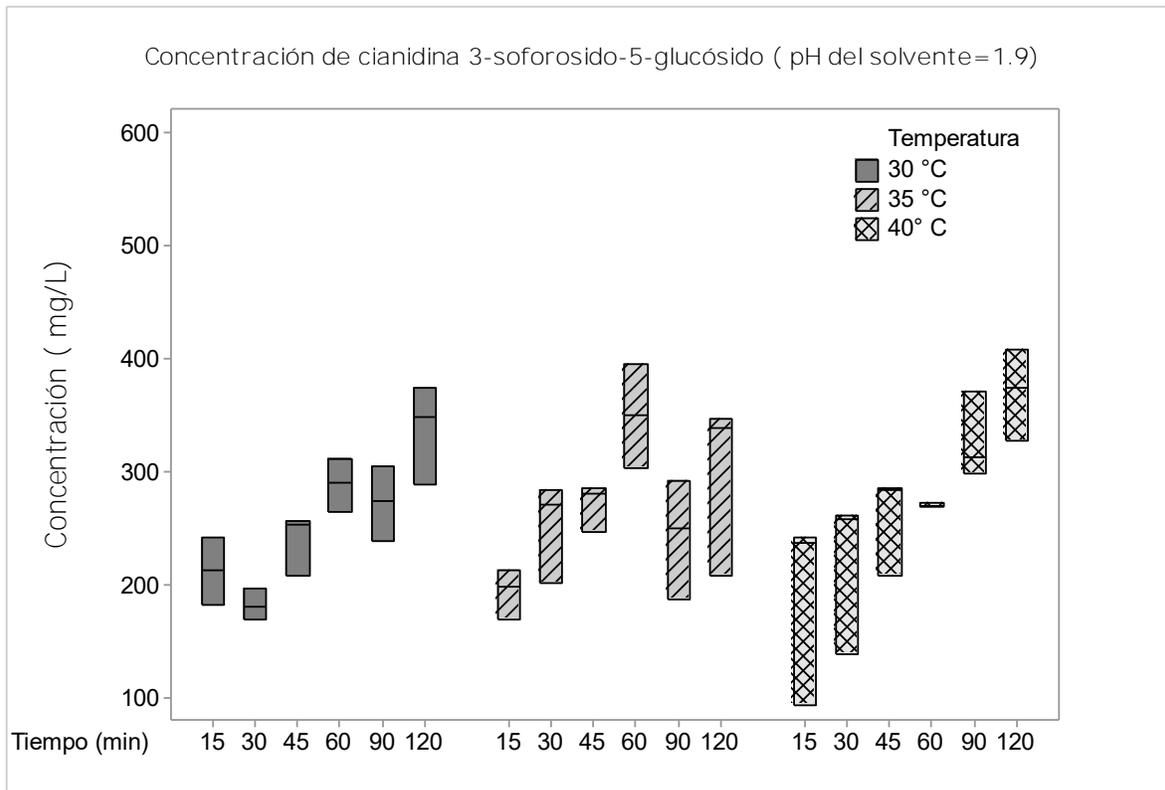


Figura 19 Gráfico de cajas efecto del tiempo por cada una de las temperaturas (pH=1.9)

4.2. Comportamiento cinético y energía de activación

Se graficó la concentración con respecto al tiempo y se ajustó a una cinética de primer orden para obtener la velocidad de extracción; en las gráficas 20 y 21 se muestran las condiciones que presentaron la mayor concentración de cianidina 3-soforosido-5-glucósido, de cada uno se los solventes.

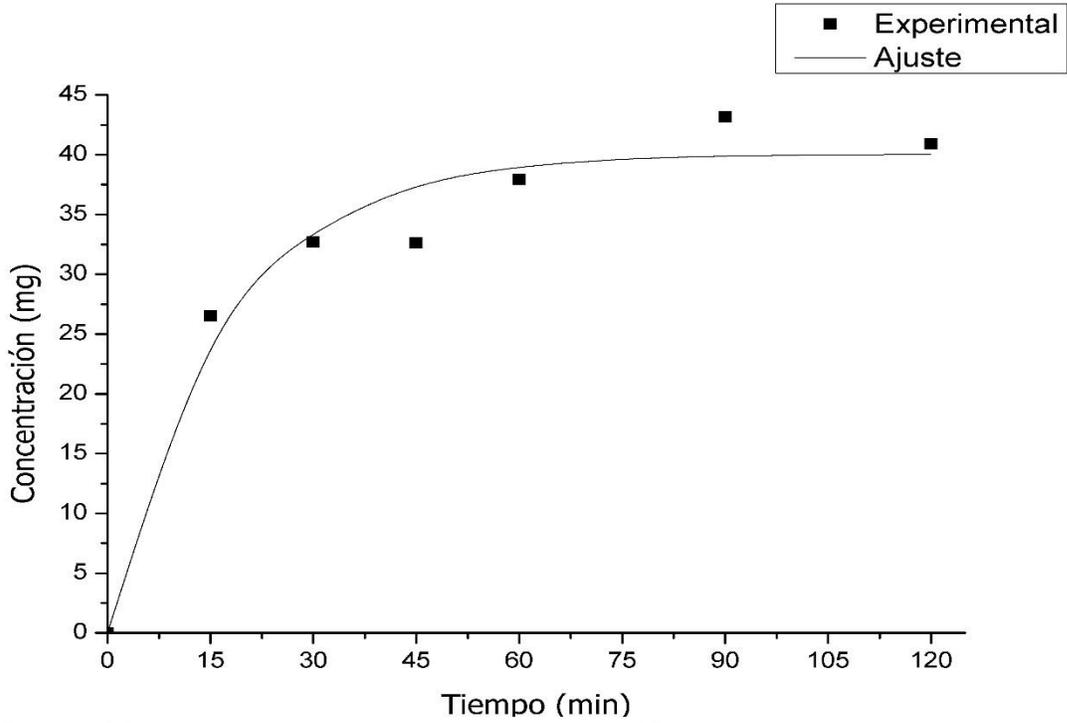


Figura 20 Gráfico de la cinética de extracción a 35°C con un solvente con 1% de ácido cítrico (pH=2.3)

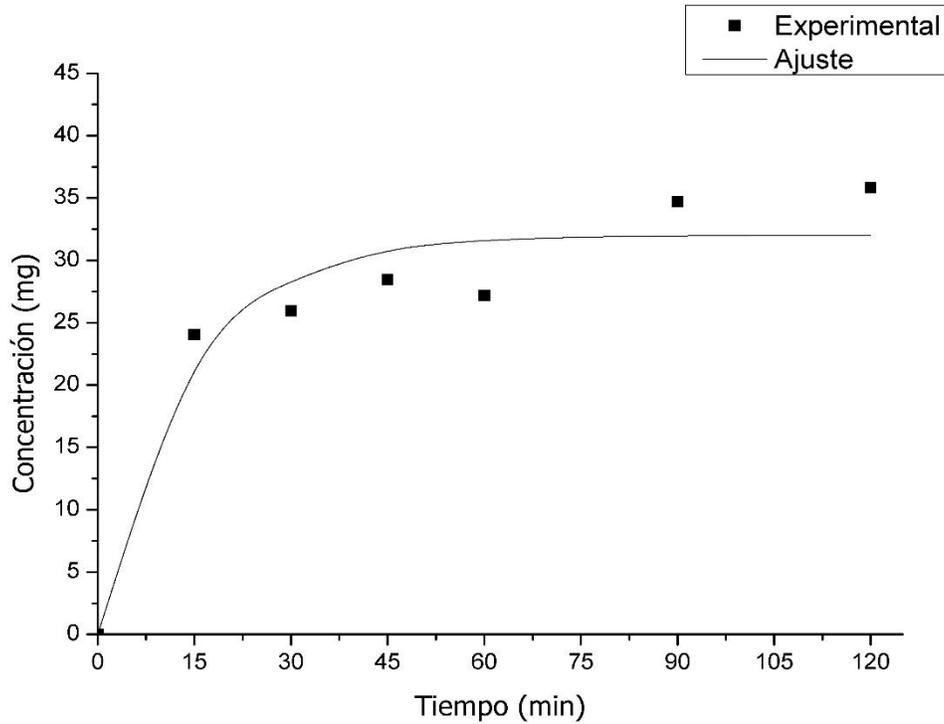


Figura 21 Gráfico de la cinética de extracción a 40°C con un solvente con 2% de ácido cítrico (pH=1.9)

Las velocidades obtenidas se muestran en la tabla 4, en estas se observa que la mayor velocidad de extracción es a los 35°C; cuando el pH del solvente es de 1.9, la velocidad es más constante debido a que la presencia de otras reacciones es nula y más lenta debido a la mayor concentración de ácido cítrico y a su conformación en él espacio (McMurry, 2012).

Tabla 4 Velocidades de extracción

Velocidad de extracción (mg min ⁻¹)		
Temperatura (°C)	1 % de ácido cítrico pH=2.3	2% de ácido cítrico pH=1.9
30	31.46	31.61
35	40.06	30.27
40	37.53	32.00

La energía de activación obtenida para el solvente con un pH=2.3 fue de 14.00 kJmol⁻¹ y para el solvente con un pH=1.9 fue de 13.34 kJmol⁻¹, la energía que se necesita para la extracción con ambos solventes es muy parecida, debido a que solo se cambiaron las concentraciones de ácido cítrico. Bucić-Kojić et al (2007) reportan una energía de activación de 7.70 kJmol⁻¹ para la extracción de polifenoles en uva con un tamaño de partícula de 0.2 mm con una temperatura de 80°C, acercándose a lo reportado, debiéndose la variación a los parámetros de experimentación y a los compuestos que se determinaron. Grandinaru et al (2003) reportan que se necesitan 14.1 kcalmol⁻¹ (58.99 kJmol⁻¹) para la degradación de antocianidina-3-sambuosido, con esto se puede decir que la energía necesaria para la extracción de antocianinas en *Hibiscus sabdariffa* es menor, a cualquiera de las concentraciones ácido cítrico (pH del solvente) utilizados.

4.3. Eficiencia y rendimiento

Retomando la ecuación 11 y el procedimiento experimental presentado en la metodología, se obtuvieron los valores de la eficiencia; con el solvente a 1 % de ácido cítrico el valor máximo obtenido fue a los 40° C siendo este de 49.57% a los 120 min de extracción; al 2% de ácido cítrico el valor máximo obtenido también es a la temperatura de 40° C a los 90 min con una eficiencia del 46.85%, la diferencia entre ambos es del 2.27%.

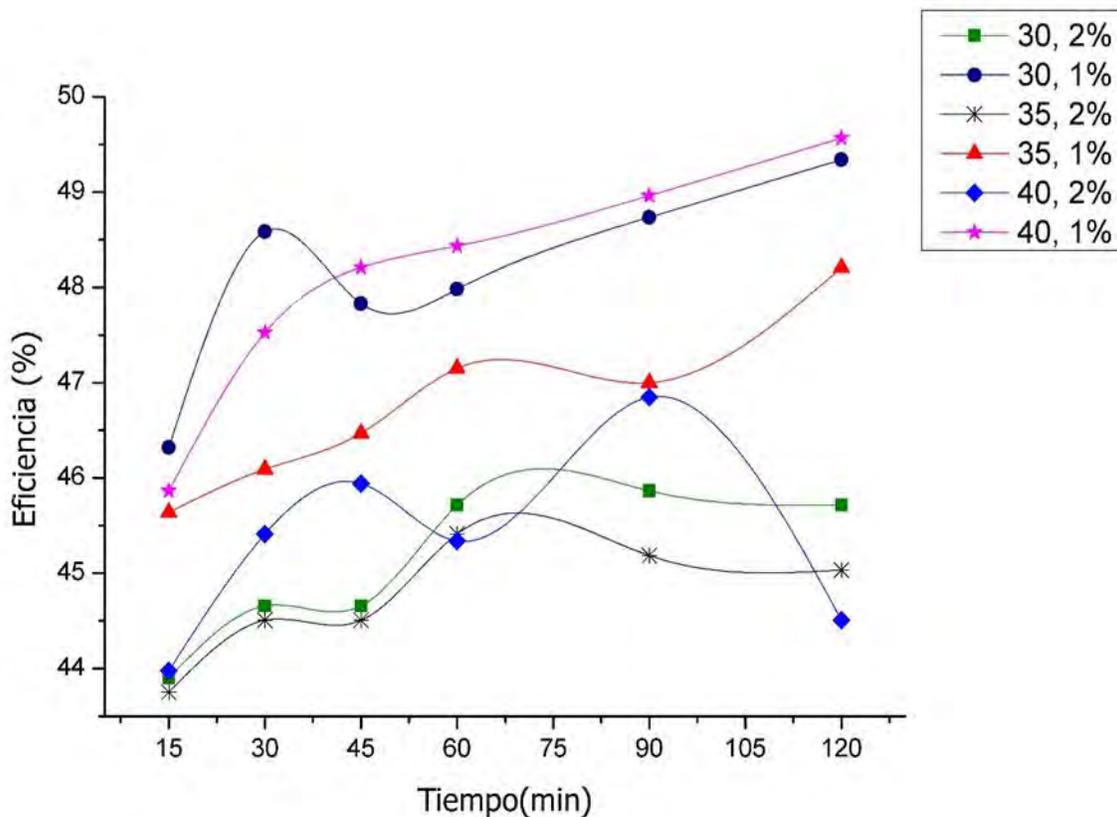


Figura 22 Comparación de los resultados de eficiencia (30, 35 y 40 representan la temperatura de extracción y 1% y 2% corresponden a la concentración de ácido cítrico en el solvente)

Cómo se puede observar en la figura 22, cuando la concentración de ácido cítrico es mayor existe una disminución en la eficiencia debido a que una alta concentración de sólidos disminuye la pureza. Se realizó un ANOVA de una vía para comparar del tiempo de extracción por cada una de las temperaturas y

posteriormente por el pH del solvente; a diferencia de los resultados obtenidos para la concentración de antocianinas cuando el ácido cítrico en el solvente tiene un pH de 2.3 (1% de ácido cítrico), se obtuvo que el tiempo no generaba diferencias significativas, sin embargo, la temperatura sí. Cuando el solvente se encuentra a 30°C la eficiencia aumenta (figura 23). Cuando el ácido cítrico en el solvente es del 2% la temperatura no genera diferencias significativas, sin embargo, el comportamiento es muy variable (figura 24) a los 40° C, una causa de esto pueden ser los rompimientos de los puentes de hidrogeno mencionados con anterioridad.

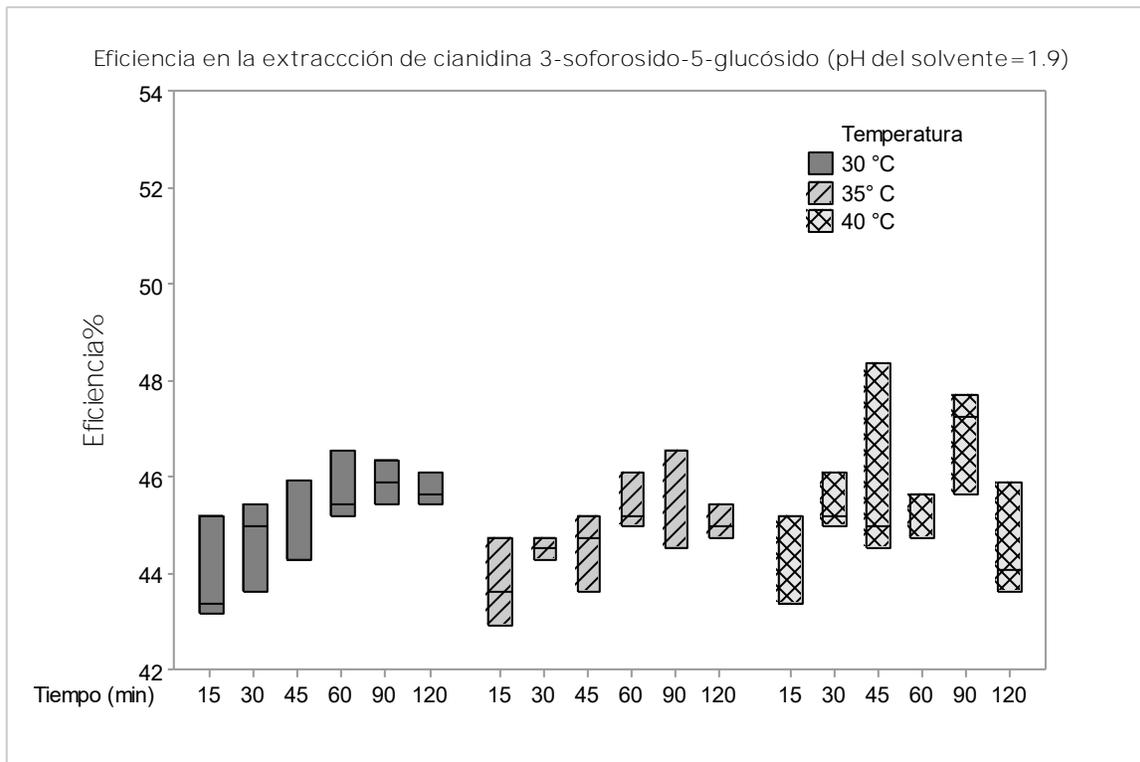


Figura 23 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 2% de ácido cítrico

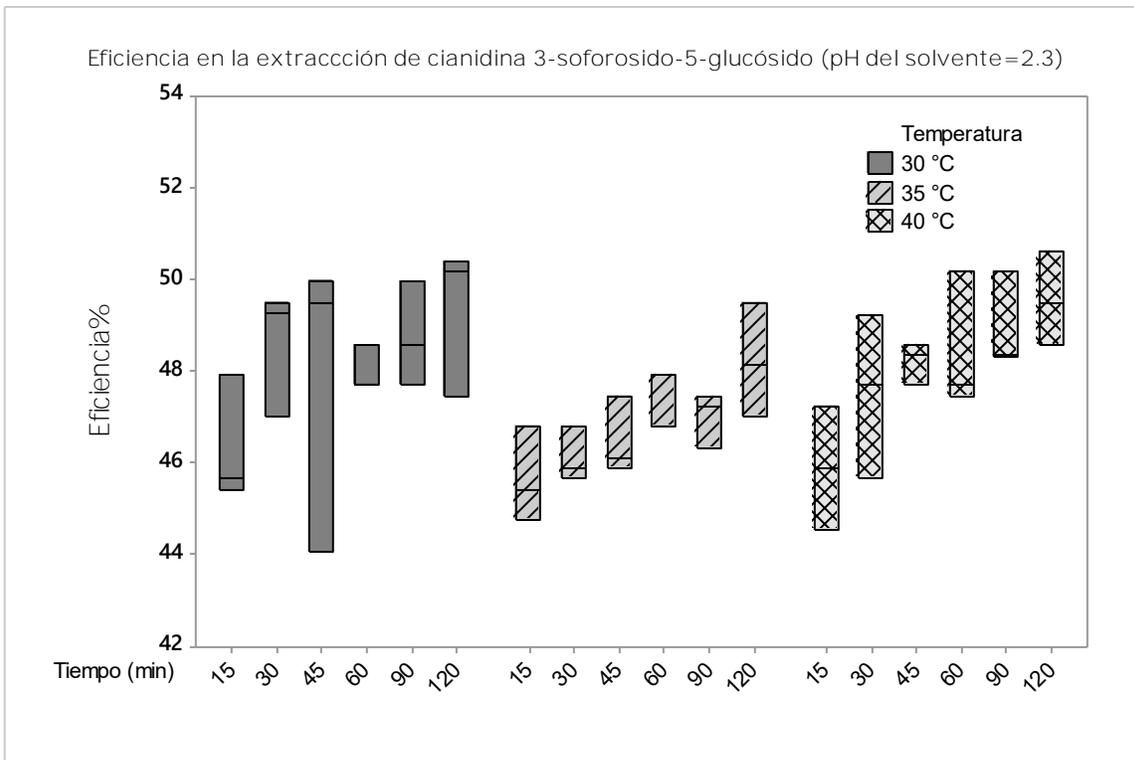


Figura 24 Gráfico de cajas de la eficiencia de extracción con el solvente al 1% de ácido cítrico

En la figura 25 se presenta la comparación del rendimiento en la extracción de antocianinas a todas las condiciones. Con el solvente al 1% de ácido cítrico es el máximo se encuentra a 35° con un 65% y al 2% el máximo se da a los 40 °C con un valor 56.58%. A los 30°C para ambas concentraciones de ácido cítrico en el solvente encontramos que la temperatura tiene el mismo efecto de extracción, inclusive la diferencia entre ambos rendimientos a los 120 es de 0.82% por lo que se puede decir que a estas condiciones la temperatura es la que rige el comportamiento.

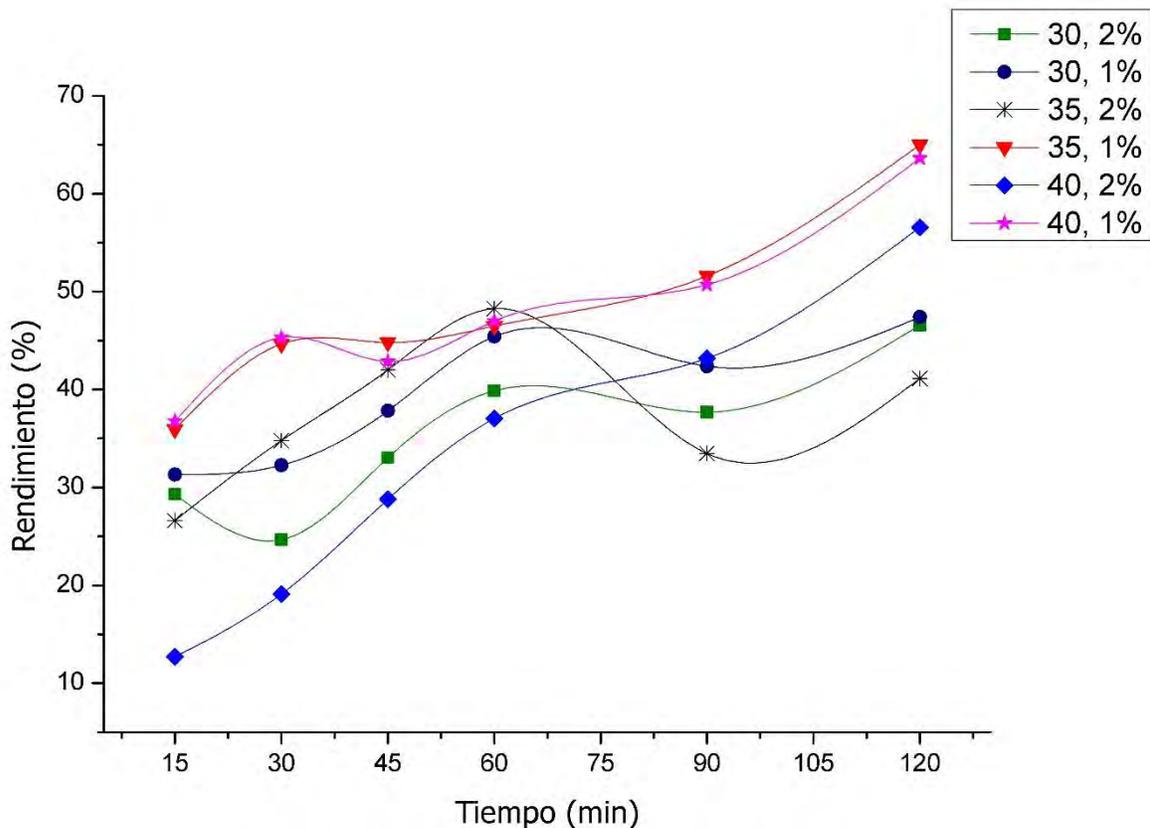


Figura 25 Comparación de los resultados de rendimiento (30, 35 y 40 representan la temperatura de extracción y 1% y 2% corresponden a la concentración de ácido cítrico en el solvente)

De acuerdo al análisis del ANOVA de una vía (figuras 26 y 27) se obtuvo que para el solvente al 1% de ácido cítrico la temperatura no tenía ningún efecto significativo y el tiempo presentaba diferencias hasta los 120 min esto es lo mismo para el solvente con 2% de ácido cítrico. Esto contradice lo reportado por Cacace y Mazza (2003) cuyos resultados obtenidos para el rendimiento dicen que alrededor de 30 a 35°C se da la mayor extracción y que el aumento de temperatura lo disminuye debido a la alta susceptibilidad de las antocianinas. Por lo que la conformación iónica del solvente utilizado para la extracción disminuye los efectos negativos de la temperatura.

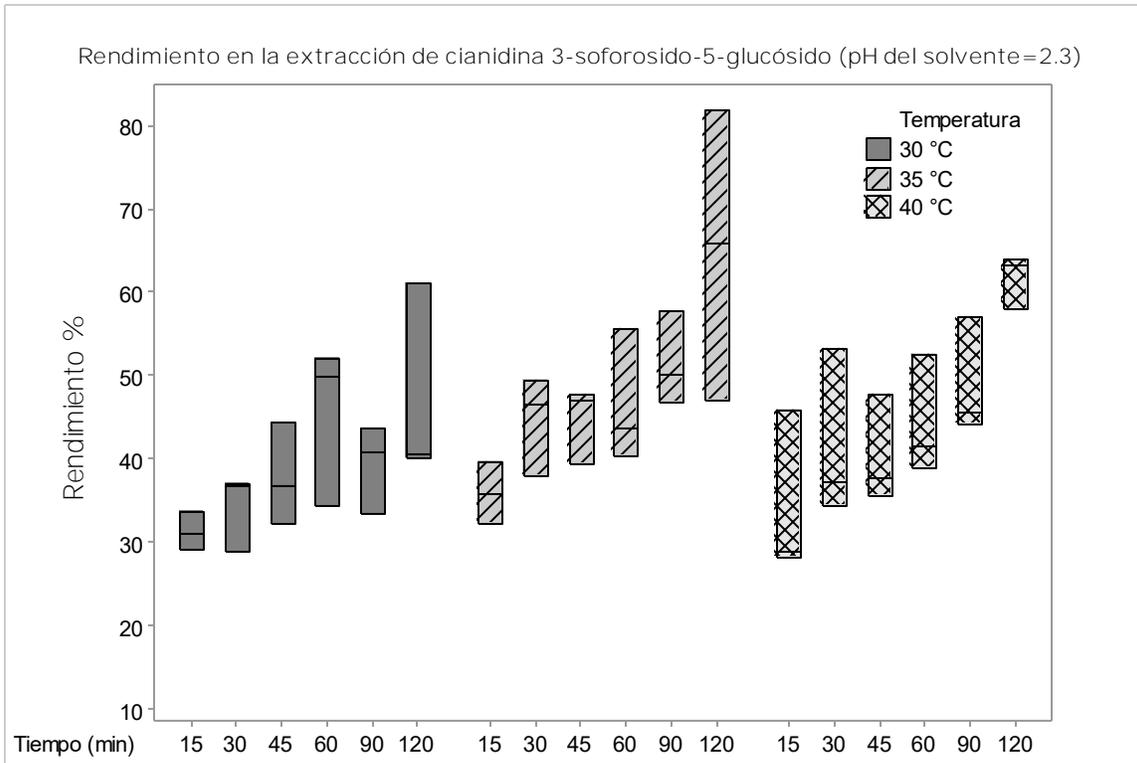


Figura 27 Gráfico de cajas del rendimiento de extracción con el solvente al 1% de ácido cítrico

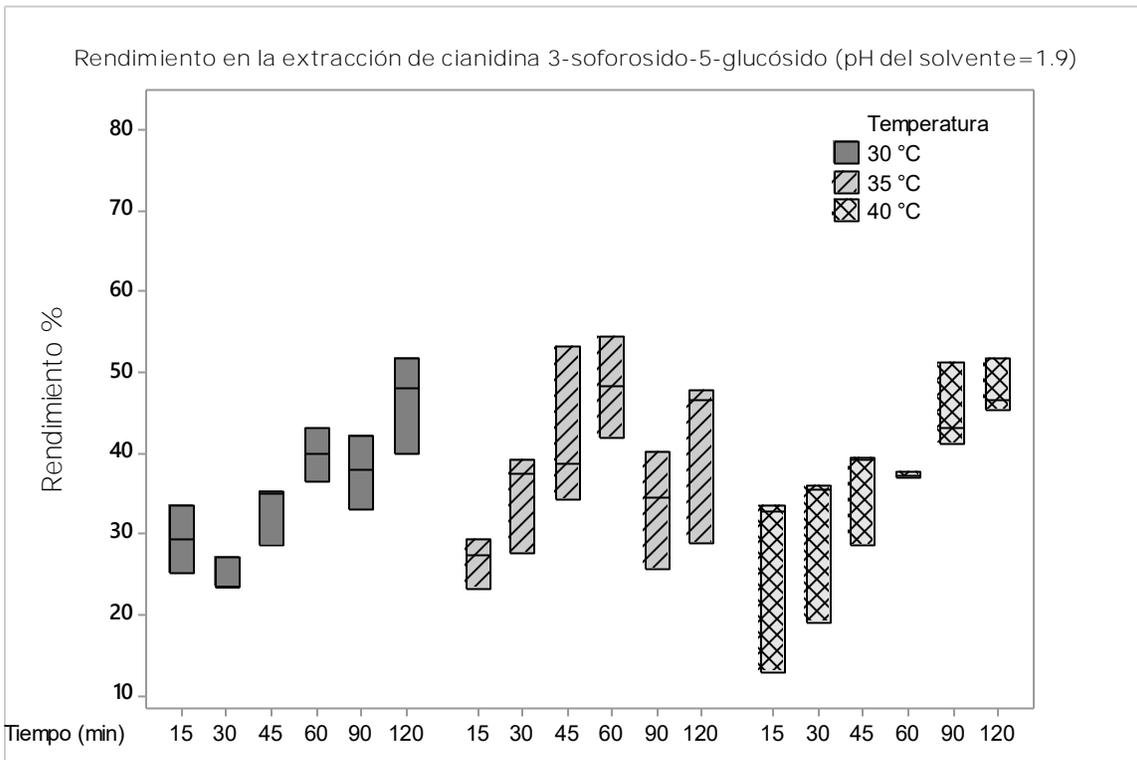


Figura 26 Gráfico de cajas del rendimiento de extracción con el solvente al 2 % de ácido cítrico

3.4. Difusión

Se determinó el tiempo de difusión en la extracción con los valores de $\frac{M_t}{M_\infty}$ experimentales que estaban entre 0.0329-0.3646, y los reportados por Martínez-Navarrete et al (1999) $\frac{M_t}{M_\infty} = 0-0.6$ para tiempos cortos y $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.4-1$ para tiempos largos. Los valores reportados de $Y = 1-0.4$ para tiempos cortos y de $Y = 0.6-0$ para tiempos largos; experimentalmente “Y” tuvo un intervalo entre 0.6354-0.9671 por lo que todos los valores obtenidos cumplen las condiciones para una difusión en tiempos cortos.

Tabla 5 Coeficientes de difusión

Coeficiente de difusión de la antocianidina-3-soforosido- 5 glucósido -Dex (m²s⁻¹) 10⁻⁹						
	1% de ácido cítrico pH=2.3			2% de ácido cítrico pH=1.9		
Tiempo (min)	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C
0	---	---	---	---	---	---
15	0.8128	2.3125	5.6337	1.5145	5.7997	4.8940
30	0.4600	1.1150	3.1243	1.2857	2.9485	2.5059
45	0.3187	0.7430	2.1561	0.9896	1.9766	1.6839
60	0.2436	0.5470	1.6453	0.7945	1.4866	1.2979
90	0.1654	0.3624	1.1160	0.5657	0.9938	0.8486
120	0.1252	0.2079	0.8443	0.4382	0.7464	0.6377

En la Tabla 5 se muestran los coeficientes de difusión obtenidos experimentalmente por cada una de las condiciones. A los primeros 15 min de extracción para todas las condiciones son los que tienen un coeficiente mayor debido a que el solvente se encuentra libre de antocianinas facilitando su extracción. Si comparamos con los datos obtenidos por Amor y Allaf (2009) en donde se muestran los valores de los coeficientes de difusión para la ciandina 3- sambuosido y la delfinidina 3- sambuosido, su coeficiente máximo es de $6.11 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ en agua. Cacaé y Mazza

(2003) reportan que las antocianinas y los compuestos fenólicos totales tienen una difusión de 1.2×10^{-11} a $25 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y de 1.0×10^{-11} a $34 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para una extracción con un solvente con agua y etanol; Cissé et al (2012) reportan que con una extracción con agua a 30°C obtiene un coeficiente de $4.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, a 35°C es de $4.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ y a 40°C es de $5.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, si se considera que se realizó una serie de selecciones con el fin de aumentar el rendimiento y el cual está altamente relacionado con la difusión, un valor máximo de difusión de cianidina 3-soforosido-5-glucosido $5.8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, se vuelve considerable, ya que se eligió el tamaño de partícula más adecuado y un solvente cuyo pH y composición se asemejan a las condiciones naturales a las cuales se encuentran las antocianinas, para estas se difundan mejor en el medio.

Cabe mencionar también que la geometría en la que se realizó la extracción son diferentes, así como las consideraciones del proceso que se tomaron en cuenta para su obtención de manera gráfica los coeficientes de difusión.

De acuerdo a lo obtenido con un porcentaje de ácido cítrico del 1 % (pH=2.3) , se obtiene la mayor concentración, eficiencia y rendimiento en el proceso, sin embargo, las antocianinas en solución cambian fácilmente del color rojo característico a uno violáceo tenue en cuanto se diluían en agua, a diferencia de las muestras que eran extraídas con el solvente al 2% (pH=1.9), ya que, en soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, el pigmento se encuentra en su forma más estable, ión oxonio o catión flavilio (Garzón, 2008). Con el fin de aumentar el rendimiento y mantener estable el color se realizó la extracción a diferentes tiempos a 40°C con el solvente al 2% de ácido cítrico a 350 rpm, en una relación de la Jamaica con el solvente de 1:40 m/V.

5. Aumento de volumen del solvente

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con aumento del volumen de solvente. La concentración de antocianinas monoméricas totales disminuye comparada con las muestras extraídas con 100 ml de solvente debido a que se encuentran en mayor dilución. La eficiencia aumenta en un 2.26% con respecto al máximo obtenido cuando el volumen del solvente es de 100 ml y el rendimiento llega a un máximo 80.76% esto supera a los obtenidos por Cissé et al., (2012) cuyo valor máximo de rendimiento fue menor al 70%. A los 90 min con 100 ml de solvente tenemos una eficiencia de 46.85% y un rendimiento 56.58% cuando se aumenta el volumen de solvente se obtiene una eficiencia de 46.92% y un rendimiento de 50.20%. El sistema no se comporta como un sistema ideal debido a la estructura fibrosa de la flor de Jamaica

Tabla 6 Resultados obtenidos con el aumento del volumen del solvente

Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Eficiencia (%)	Rendimiento (%)	Coef. de difusión (m^2s^{-1})
15	174.08	43.75	48.09	17.95×10^{-9}
30	162.51	45.86	44.89	9.10×10^{-9}
45	256.40	46.62	70.83	6.09×10^{-9}
60	243.48	47.00	65.50	4.58×10^{-9}
75	179.93	46.55	49.70	3.67×10^{-9}
90	184.58	46.92	50.20	3.06×10^{-9}
120	275.81	49.11	80.76	2.24×10^{-9}

En la figura 28 se observa el efecto del tiempo a los 45 min de extracción existe un aumento, el cual, casi se iguala con la extracción a los 120 min y la menor variación se da a los 75 min.

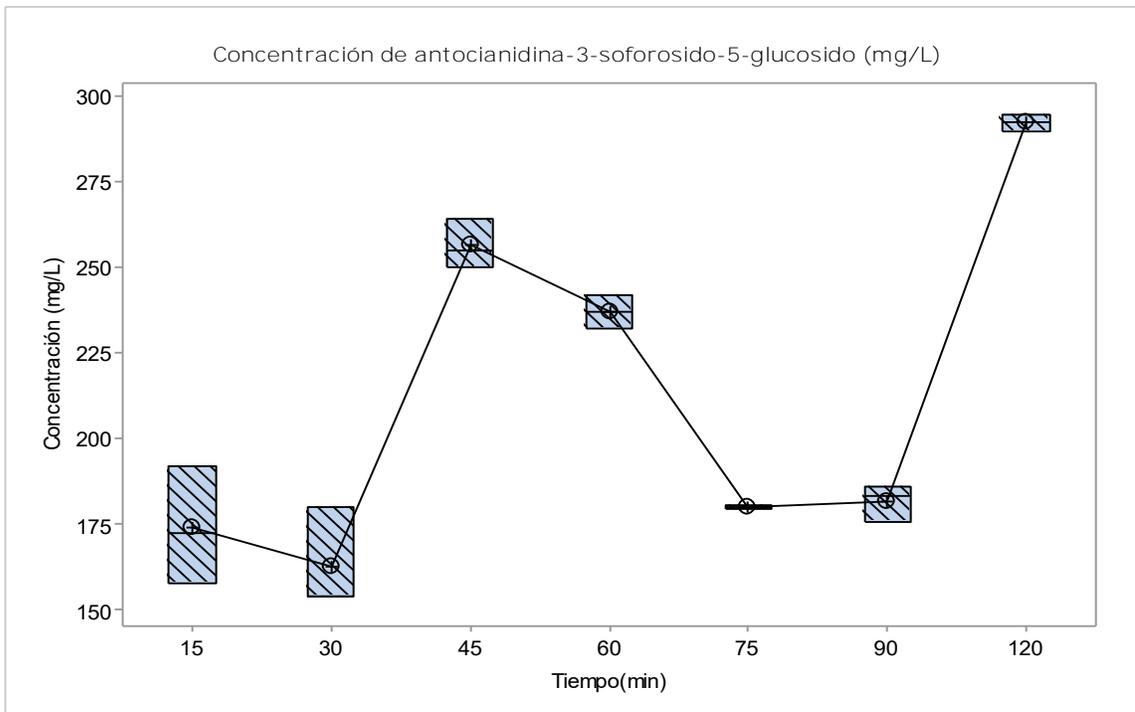


Figura 28 Gráfico de cajas del efecto del tiempo sobre la concentración

En las figuras 29, 30, 31 y 32 se muestran las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido a los 0, 45, 75 y 120 min de extracción a 800 X, para explicar el comportamiento en la concentración. La flor de Jamaica al ser una célula vegetal tiene la característica de tener un mecanismo de osmorregulación en el tonoplasto el cual es la membrana de las vacuolas (Taiz y Ziger, 2006).

En la figura 29, se observa la flor de Jamaica sin extraer, la cual solamente muestra la pared celular y la que es similar a un “muro”, recordando que su función es proteger y limitar los procesos de transporte, en términos generales se acepta como componente único la celulosa, sin embargo, también se pueden encontrar polisacáridos de alto peso molecular, los cuales aumentan la resistencia de esta (Sandoval et al., 2005).

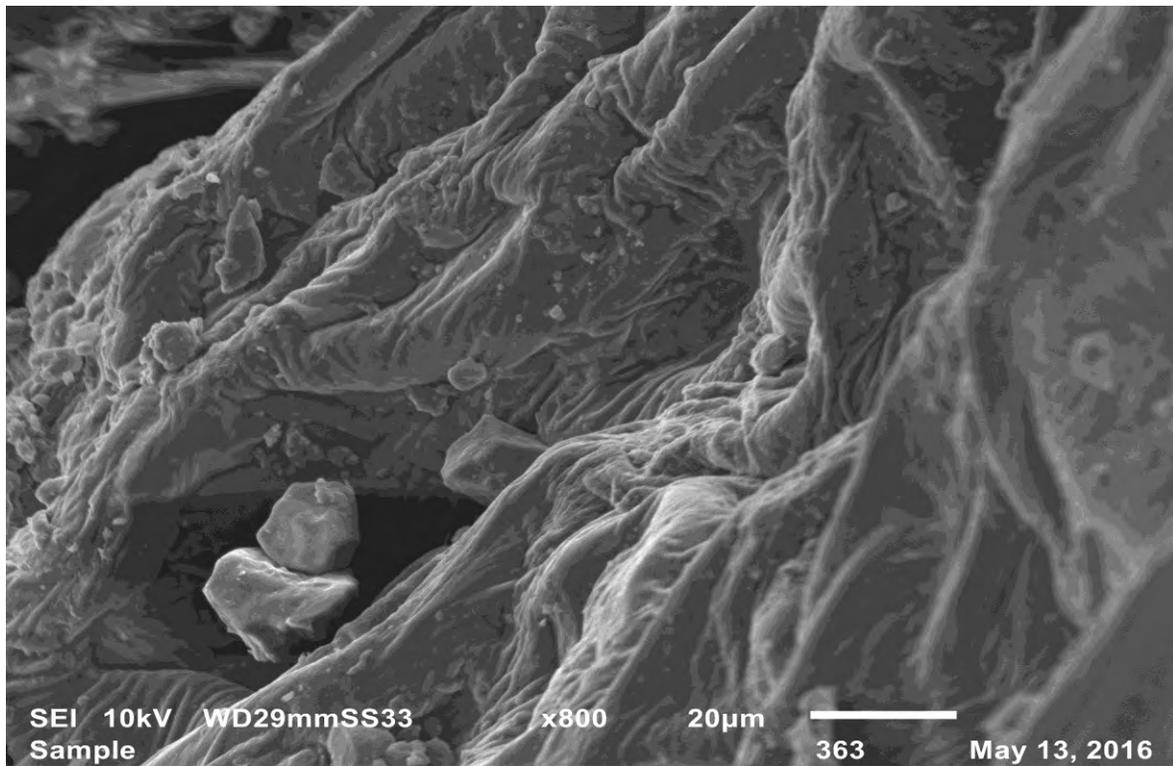


Figura 30 Imagen obtenida a los 0 min de extracción

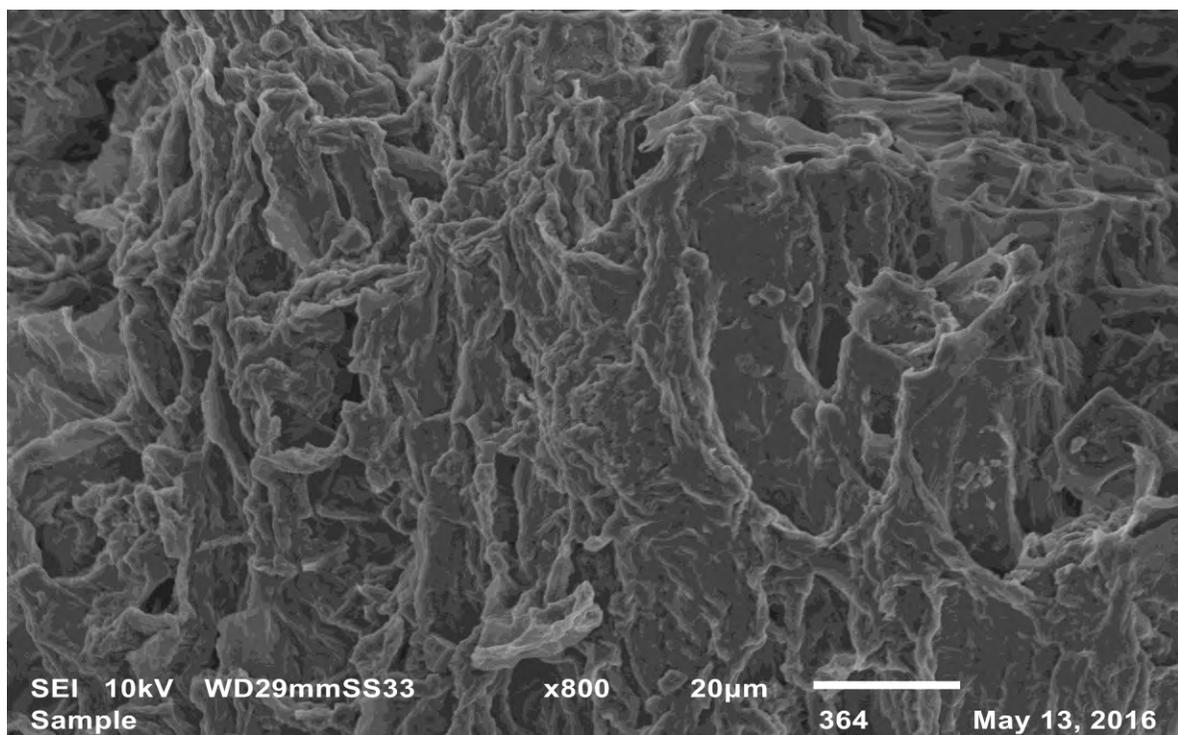


Figura 29 Imagen obtenida a los 45 min de extracción

Experimentalmente a los 45 min de extracción la concentración y el rendimiento aumentaron, esto se debe a que la estructura se vuelve porosa, permitiendo que los compuestos sean extraídos con mayor facilidad (figura 30).

A los 75 min (figura 31) la estructura se cierra y absorbe parte de los compuestos que se extrajeron con anterioridad evitando el paso de las antocianinas disminuyendo la concentración, debido a la plasmólisis el cual es un fenómeno en el que las células al perder agua se contraen, separándose el protoplasto de la pared celular, en la naturaleza este proceso se da cuando se amputa un órgano de la planta este se marchita en un determinado tiempo. También si la planta se encuentra un tiempo extendido a los rayos solares se produce un exceso de transpiración, provocando de esta manera la eliminación de vapor de agua al medio (Gama-Fuertes, 2004)

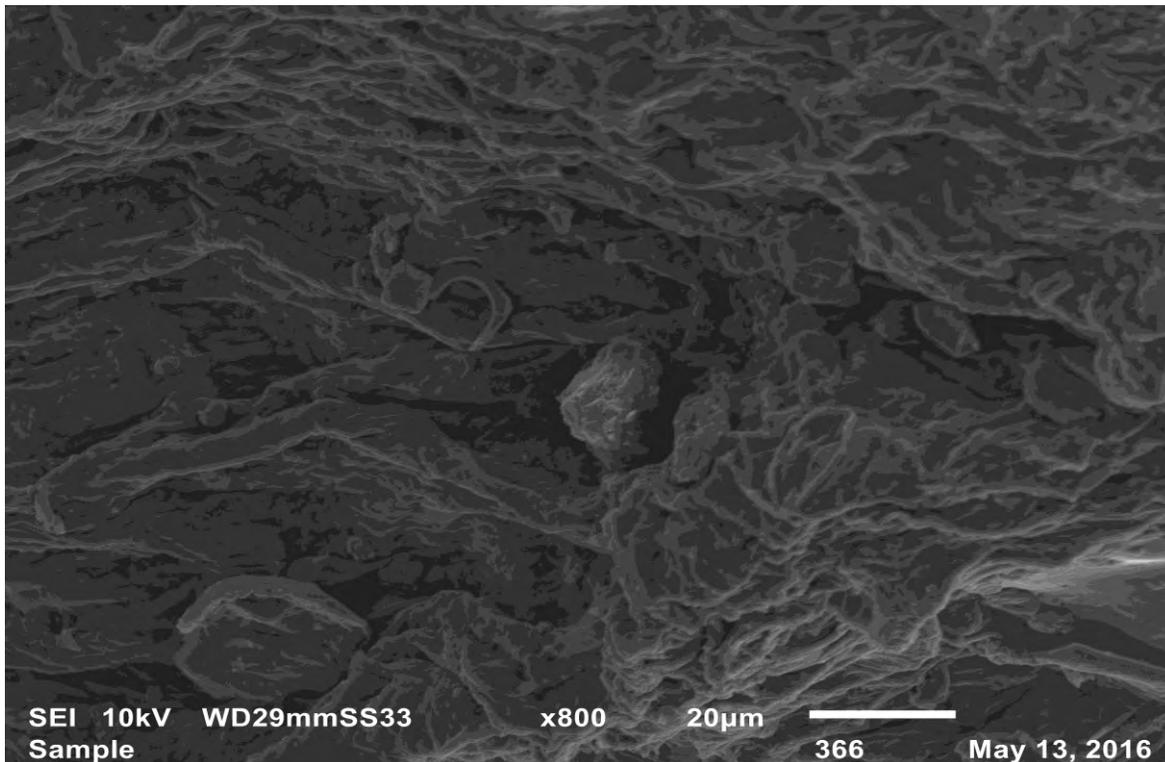


Figura 31 Imagen obtenida a los 75 min de extracción

A los 120 min la pared celular primaria se rompe, por un posible efecto de turgencia el cual es un fenómeno por el cual las células al absorber agua, se hinchan,

ejerciendo presión contra las membranas celulares, las cuales se ponen tensas, si la presión sobrepasa la elasticidad de las membranas estas se rompen dejando expuestas las partes de la célula (Gama-Fuertes, 2004) como lo son las fibras que se muestran en la figura 32 , las cuales pueden ser ceras hechas de suberina y cutina, los cuales son complejos compuestos por fenilpropanoides y alcoholes aromáticos, los cuales se acumulan en las paredes secundarias de las plantas (Robertis, Hib y Ponzio, 1996)



Figura 32 Imagen obtenida a los 120 min de extracción

6. Conclusiones

El solvente elaborado tenía como propósito ser una alternativa no dañina a la salud, Dai et al., 2016 denominaron como NADE a este tipo de solventes, su uso permitió que las antocianinas se extrajeran fácilmente y con resultados favorables. El método de extracción se buscó el más sencillo sin recurrir a los métodos tradicionales para

comprobar la funcionalidad del solvente iónico elaborado con agua, etanol y ácido cítrico.

El método de pH diferencial utilizado para la obtención de la concentración de antocianinas monoméricas totales, es muy útil cuando no se puede conseguir el pigmento puro para realizar una curva patrón, ya que al modificarse la estructura a su forma más estable el catión flavilio (pH=1) y la pseudo base carbinol incolora (pH=4.5), ésta no sigue reaccionando sin importar el tiempo que se deje almacenar.

Un tamaño de partícula de 1.25 mm disminuye los efectos de degradación química del color producida por la oxidación y la copigmentación batocrómica de las antocianinas, favoreciendo la extracción, permitiendo que la cianidina 3-soforósido-5-glucósido no se degradara y se obtuviera un rendimiento máximo de 44.05%.

Una concentración de ácido cítrico de 2% en el solvente produce una menor eficiencia y rendimiento, en comparación con el solvente que tiene 1%, no obstante, vuelve más estable a los pigmentos y evita que se degraden o modifiquen su color. A los 40°C se disminuye la copigmentación por la degradación de los compuestos fenólicos, produciendo una velocidad de extracción de 32 mgmin⁻¹ de cianidina 3-soforósido-5-glucósido.

Los coeficientes de difusión no tienen una relación directamente proporcional con la temperatura debido a las variaciones que tiene la cinética de extracción, al encontrar repetible el fenómeno se seleccionó la temperatura de 40°C con la cual se obtuvo un rendimiento de 56.58% con el solvente con una concentración de 2% de ácido cítrico al ser este el que mantuvo más estable el pigmento y se decidió aumentar el volumen del solvente para corroborar si dicho comportamiento tanto cinético como de coeficientes de difusión era el mismo y si existía una variable que no se había considerado hasta ese momento (la estructura celular).

El aumento de volumen del solvente acrecienta el rendimiento de un 56.58% a un 80.76 % en el proceso y mantiene a las antocianinas estables y de color rojo. Gracias a este aumento de volumen se pudo observar que existen similitudes en el comportamiento cinético de la extracción. Se produce la misma diferencia

significativa a los 45 min con 200 ml de solvente y a los 60 min con 100 ml de solvente, la cual es causada por la naturaleza del material de extracción y el comportamiento celular de este.

El gasto energético necesario para que las antocianinas comiencen a difundirse en el solvente es mínimo para cualquiera de las concentraciones de ácido cítrico que se requieran para su extracción. Al utilizar un solvente iónico a base de compuestos de origen natural favorecen la difusión en un máximo de $17.9501 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, lo cual supera a lo reportado con anterioridad.

Con las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido se encontró que las modificaciones en la concentración, la eficiencia, el rendimiento y la difusión son producto de las modificaciones que sufre la estructura celular a lo largo del proceso, los efectos de plasmólisis y turgencia, rigen el comportamiento en la extracción y son propias de los materiales biológicos.

REFERENCIAS

1. Aguilera-Ortíz, M. (2009) Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo *Ficus carica* variedad Misión, cultivado en ciudad lerdo Durango, México. (Tesis doctoral).
2. Aguilera-Ortíz, M., Reza-Vargas, M.C., Chew-Madinaveitia, R. G. & Meza-Velázquez, J.A. (2011) Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOTecnia*, XIII (2): 16-22.
3. Almansa-Carrascosa, C., Amorós-Rodríguez, A. & López-Belmonte,V. (2015) Microscopia electrónica de barrido. *Servicios Técnicos de Investigación*.
4. Amor,B.B & Allaf, K. (2009) Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscuss Sabdariffa*). *Food Chemistry* 115, 820-825.
5. Anggrianto, K., Salea, R., Veriansyah,B. & Tjandrawinat, R.R.(2014) Application of supercritical fluid extraction on food processing: black-eyed pea (*Vigna unguiculata*) and peanut (*Arachis hypogaea*) *Procedia Chemistry* 9, 265 – 272
6. Arena-Sosa, I. & López-Sánchez, J.L. (2004) ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN. Curso: MÉTODOS DE LABORATORIO. Maestría en Ciencias Biologicas
7. Armijo, J., Vicuña, E., Romero y Otiniano, P., Condorhuamán, C. & Hilario, B. (2012) Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. *Revista Peruana de Ingeniería química*15(2) 19-27.
8. Atkins, P.W. & De Paula J. (2006) *Physical Chemistry*, 8th ed Oxford University Press.
9. Atkins, P.W. & Jones, L. (2006) *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. Ed medica panamericana.

10. AOAC (2006) Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines
11. Ávila, S, Trigueros, O. & Chinchilla, R. (2014). Funciones de Bessel y Neumann, REVISTA DE LA ESCUELA DE FÍSICA, UNAH II (1), 62-65.
12. Azuara, E., Cortés R., García, H.S. & Beristain, C.I. (1992) Kinetic model for osmotic dehydration and its relationship with Fick's second law. International Journal of Food Science and Technology 27, 409-418.
13. Berk, Z. (2013) Extraction in Food Process Engineering and Technology 2 ed. 287-309.
14. Blanco-Vega, D. (2013) Formación y evolución de pigmentos de tipo pirantociano en la elaboración de vinos tintos y rosados. (Tesis doctoral).
15. Borrás-Linares, I., Fernández- Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P.A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernandez-Gutierrez, A., Gómez-Leyva, J.F. & Segura-Carreto, A. (2015) Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Industrial Crops and Products 69, 385-394.
16. Bucić-Kojić, A., Planić, M., Tomas, S., Bilić, M. & Velić, D. (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. Journal of Food Engineering 81, 236-242.
17. Cacace, J.E & Mazza G. (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering 59, 379–389.
18. Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P. & Li, P. (2016) Conventional, ultrasound-assisted, accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. Food Chemistry 197, 266-272.
19. Cissé M, Bohuon P., Sambe F., Kane C., Sakho M. & Dornier M., (2012) Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling Journal Food Engineering 109, 16-21
20. Coulson, J.M., Richardson, J.F. & Backhurst J.R. (1981) Ingeniería química: unidades SI. Operaciones básicas. Reverte.

21. Crank, J. (1975) *The mathematics of diffusion* 2da ed, Oxford:Clarendon Press
22. Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R. & Choi, Y.H. (2016) Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of chromatography*. 1434, 50-56.
23. Del Valle-Leguizamón, G., González León, A. & Báez-Sañudo, R. (2005) Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnica de México* 28 (4) 359-368.
24. Domínguez- Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona- Pérez, J.J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V. & Gutiérrez-López, G.F. (2012) El gel de aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(1) 23-43
25. Drago-Serrano, M.E., López-López, M. & Saíz-Espuñes, T.R. (2006) Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 37(4), 58-68.
26. Espino-Ordoñez, G. (2014) antocianinas, los otros pigmentos del reino vegetal. Facultad de Ciencias Universidad de Burgos obtenido 07, 2016 de UBUScientia.
27. Faraldos, M. & Goberna, C. (2002) *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. Consejo superior de investigaciones científicas
28. Fernández, G. (2014) *Espectroscopía visible-Ultravioleta*. Química orgánica.org
29. Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Heredia, F. J. & Escribano-Bailón, M. T (2013) Copigmentación de antocianos: estimación e influencia en el color de vinos tintos del cultivar Graciano, Libro de Actas del X Congreso Nacional del Color. Valencia p 344-347.
30. Galicia-Flores, L. A., Salinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B. M. & Sánchez-Feria C., (2008) Caracterización fisicoquímica y actividad

- antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2), 121-129.
31. Gama-Fuertes, M.A. (2004) *Biología biogénesis y microorganismos*. 2ed. Pearson.
 32. Garzón, G. A. (2008) Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colombia*, 13 (3) 27-36.
 33. Gil-Chávez, G.J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J. B., Sepulveda, D., Yahia, E.M. & González-Aguilar, G.A. (2013) Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12, 5-23
 34. Giusti M. M. & Wrolstad R. E. (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.2.1-F1.2.13
 35. Grandinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalas, C. & Garcia-Viguera, C. (2003) Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. Anthocyanins in solution and in solid state: effect of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry* 83, 423-436.
 36. Howell, J.R. & Buckius, R.O. (1990) *Principios de termodinámica para ingeniería* Mc Graw Hill.
 37. Isaza, J.H., Veloza, L.A., Guevara, C.A., Ávila, Y.P. & Díaz, O. (2005) Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia *Melastomataceae*. *Actual Biol* 27(Supl. 1) 75-79.
 38. Jettanapornsumran, M. (2009) copigmentation reaction of boysenberry juice. University, Albany, New Zeland (Master Degree).
 39. Judson-King, C. (2003) *Procesos de separación* Reverte.
 40. Kopjar, M. & Piližota, V. (2009) Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *roat. J. Food Sci. Technol.* 1 (2) 16-20.

41. Leditgrow (2015) Fotosíntesis Obtenido 11, 2016 de <http://www.leditgrow.cl/fotosintesis/>
42. Levenspiel, O. (2002) Ingeniería de las reacciones químicas 2 ed. Reverté
43. Manrique-Reol, E (2003) Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. Ecosistemas XII (1),
44. Martínez-Cruz N. S., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M.J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M. A. Morales-Rubio, M.E. (2011) Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 42 (4) 5-7.
45. Martínez-Estrada, M. T. & Moctezuma-González, C.L. (2006) ESPECTROFLUORIMETRÍA. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biotecnología.
46. Martínez-Navarrete N, Andrés-Grau A.M., Chiralt-Boix A.& Fito-Maupoy, P. (1999) Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Instituto Politécnico Nacional.
47. McCabe W.L, Smith J.C. & Harriot P., (1998) Operaciones unitarias de ingeniería química 4 ed. Mc Graw Hill.
48. McMurry, J (2012) Química Orgánica 8 ed Cengage Learning Editores.
49. Mendoza-Patiño, N. (2008) Farmacología médica. Ed. Médica Panamericana
50. Mohamed, B. B., Sulaiman, A. A. & Dahab, A. A (2012) Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, Cultivation and Their Uses. Bulletin of Environment. *Pharmacology and Life Sciences*, 1(6), 48-54.
51. Morán, J., Vázquez, A. & Cyras, V. P. (2008) Extracción de celulosa y obtención de nanocelulosa a partir de fibra sisal- caracterización. Asociación Argentina de Materiales.
52. Ortega, G. M. & Guerra, M. (2006) Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte II. ICIDCA. XL (3) 3-11.

53. Perez, G. (2012) Espectrometría ultravioleta-visible. Espectrometría.com
Obtenido 07,2016 de
http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible
54. Pérez V. (2011) Estudio sobre la influencia de 4-etilfenol y sus percursores, 4-vinilfenol y ácido p-cumárico, en la evolución del color de vinos tintos. Universidad Católica Portuguesa.
55. Pinelo, M., Sineiro, J. & Núñez, M.J. (2006) Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grapes by products. *Journal of food engineering* 77, 57-63.
56. Price, R.M. (2003) Leaching RMP Lecture Notes obtenido 08,2016
<http://facstaff.cbu.edu/rprice/lectures/>
57. Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D. & Stockley, C.S. (2013). The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review, *Food Science and Food Safety* 12, 483-508.
58. Raisman, J.S. & Gonzales, A.M. (2000) Transporte desde y hacia la célula. Facultad de Agroindustrias
59. Raven, P.H, Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. (1999). "Biology of Plants", 6th ed.
60. Ramírez-Cortés, B., Caro-Velarde, F.J., Valdivia-Reynoso, M. G., Ramírez-Lozano, M. H. & Machuca-Sánchez, M.L. (2011). Cambios en tamaño y características químicas de cálices de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) durante su maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XVII (2), 19-31.
61. Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Niranjana K. & Knorr, D. (2002) Recent developments in osmotic dehydration. Methods to enhance mass transfer *Trends in Food Science & Technology* 13, 48–59.
62. Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, (ACADEMIC DISSERTATION) University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology.
63. Robertis, E.M.F, Hib J. & Ponzio R (1996) *Biología Celular y Molecular*. Ed. El Ateneo
64. Rodríguez-Saona, L.E. & Wrolstad R.E. (2001). *Current Protocol in Food Analytical Chemistry* F1.1-F1.11.

65. Rodrigues, J.(2014) F*Ciências*, obtenido 07, 2016 de <http://www.fcencias.com>
66. Rojas-Lobato, A., Maldonado, F. E. & Pérez, O. A. (2008) Cinética y Extracción de Colorantes Naturales. Universidad de las Américas-Puebla 1-22
67. Saito N, Tatsuzawa F, Suenaga E, Toki K, Shinoda K, Shigihara A & Honda T. (2008) Tetra-acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from the flowers of *Iberis umbellata* L. (Cruciferae). *Phytochemistry*, 69(18), 39-50
68. Saldaña-Trinidad, S. & Interiano-Zapata. I. (2012) Determinación de humedad y elaboración de curvas isotérmicas de secado de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica.
69. Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Jiménez De la Torre, L.B., Serrano-Altamirano, V. & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (*hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18(3) 395-407.
70. Sandoval, Z.E., Rojas-Leal, A., Guzmán-Ramos, C., Ponce-Salazar, R. M., León-Gómez, C., Loyola-Blanco, C., Vallejo-Ze, M. A. & Medina-Avila, A. (2005) Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Universidad Nacional Autónoma de México Cuadernos 38
71. Santacruz-Cifuentes, L.A., (2011). Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Universidad Nacional de Colombia (Tesis de maestría).
72. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Dirección General del Fomento Ganadero, Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche, Compañía Nestlé, S.A. de C.V., Leche Industrializada CONASUPO S.A., Productos de Leche del Bajío S. A., Carnation de México, S. A. de C. V. & Kem Fuds, S.A. Determinación de humedad en productos alimenticios NMX-F-083-1986, México 1986

73. Segovia-Gómez, F., Corral, J.J. & Almajano, M.P. (2013) Estudio cinético de la extracción Sólido-Líquido de los compuestos polifenólicos del Residuo del Aguacate. Jornades de recerca EUETIB 131-138.
74. Serrano-Martínez, J.L. (2003) El espectro electromagnético. Absorción visible-ultravioleta. Curso Instrumentación y métodos de análisis químico. Posgrado en Ingeniería del agua y del terreno.
75. Sotero, V., Silva, L., Zegarra, C. M., Martha, M. A. C. O., Dávila, E., Ramírez, W., & García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante de seis frutales amazónicos: anona, castaña, chope, huasaí, huito y uvilla. *Folia Amazónica*, 20(1-2), 53-58.
76. Spiazzi, E.A. & Mascheroni, R.H. (2001) Modelo de deshidratación osmótica de alimentos vegetales. *MAT – Serie A* (4), 23-32.
77. Sindi, H.A., Marshall, L.J. & Morgan M.R.A. (2014) Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus Sabdariffa*. *Food chemistry*. 164, 23-29.
78. Taiz L. y Ziger E. (2006) *Fisiología vegetal*, 3 ed. Castello de la plana, Publicaciones de la Universidad Jaume.
79. Tatsuwawa F., Shun I., Motoki S., Hiroki M., Kasuhiza S., Yoshihito T. & Satoshi O. (2013). A tetra-acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside from the purple-violet flowers of *Moricandia arvensis* (L.) DC. (Brassicaceae). *Phytochemistry Letters*, 6(2) 170-173
80. Thomas, O. & Cerda, V. (2007) From spectra to qualitative and quantitative Results. Elsevier. 22-45.
81. Treybal, R.E. (1987) *Mass-Transfer Operations*, 3 ed. McGraw-Hill.
82. Uribe-Mejía, S.A (2011) Estructura anatomía celular Obtenido 11, 2016 de <http://samuribe.blogspot.mx/2011/01/estructura-anatomia-celular.html>
83. Vaclavik, V. A. & Christian, E. W. (2002). *Fundamentos de ciencia de los alimentos*. Editorial Ariba.

84. Vaidya, K. R., (2000). Natural cross-pollination in roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), *Genetics and Molecular Biology*, 23 (3), 667-669
85. Vázquez-Duhalt, R. (2002) *Termodinámica Biológica*, Editorial AGT Editor S.A.
86. Vázquez- Nin, G. (2000). *Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas*, 92-96
87. Wang L & Weller CL. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants *Trends in Food Science & Technology* 17, 300–312
88. Valverde-García, A. (1999) *Extracción con fluidos supercríticos: Principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*. Diputación provincial de Almería.
89. Zamora-Marín, F. (2013). *La química del color del vino*. *Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL)* Departamento de Bioquímica y Biotecnología Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili (URV).