

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“CARACTERIZACIÓN, EXTRACCIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COLORANTES
NATURALES PRESENTES EN EL CÁLIZ DE *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de jamaica)
COMO ALTERNATIVA DE CONSUMO DEL COLORANTE ARTIFICIAL
ROJO No. 40”

Irma Lucía Arriaga Tórtola

Química Farmacéutica

Guatemala, octubre 2007.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	4
3. Antecedentes.....	5
4. Justificación.....	15
5. Objetivos.....	16
6. Hipótesis.....	17
7. Materiales y Métodos.....	18
8. Resultados.....	24
9. Discusión de Resultados.....	33
10. Conclusiones.....	37
11. Recomendaciones.....	39
12. Referencias.....	40
13. Anexos.....	43

1. RESUMEN

El color es un elemento muy importante, ya que ayuda a identificar un producto y juzgar su calidad, siendo su función el proveer características estéticas o de presentación. Actualmente en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica se utilizan ampliamente los colorantes de tipo artificial, sin embargo, investigaciones recientes han informado sobre los efectos tóxicos que estos pueden provocar; es por esto que la tendencia hacia utilizar productos de tipo natural ha ido avanzando día a día.

La rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta cultivada en Guatemala, en los departamentos de Baja Verapaz, Santa Rosa, Huehuetenango, entre otros. Sus cálices son reconocidos por otorgar un vistoso color rojo a la infusión, debido a la presencia de derivados antociánicos, como la hibiscina y la gosipetina. Estos colorantes al ser de tipo natural, presentan riesgos nocivos mínimos o casi nulos, además, por su origen no requieren certificaciones internacionales y por lo tanto su uso puede considerarse de gran importancia.

La presente investigación pretendía realizar dos acciones fundamentales: a) identificar por medio de cromatografía en capa fina los pigmentos antociánicos característicos de la rosa de jamaica; b) realizar un estudio de estabilidad acelerada comparando el comportamiento de la rosa de jamaica contra el colorante artificial Rojo No.40, sometidos a ciertas condiciones de temperatura (30°C y 50°C) y pH (4, 5 y 6), con la finalidad de analizar si los colorantes naturales en estudio eran capaces de sustituir al colorante artificial en productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios. Utilizando la técnica ultravioleta-visible se midió la concentración diaria de cada una de las muestras. De los datos obtenidos se dedujo que la muestra de rosa de jamaica expuesta a 50°C y pH 6 disminuyó su concentración inicial hasta un 78% al día 17 de observación, las demás muestras mantuvieron su concentración por arriba del 80%. Las pruebas estadísticas determinaron que existe diferencia significativa en la concentración de rosa de jamaica versus Rojo No.40; siendo la rosa de jamaica la que tiende a tener menor concentración y mayor variabilidad. Así mismo se concluyó que existe diferencia significativa entre las

temperaturas, siendo la temperatura de 30°C en donde se obtiene mayor concentración que a 50°C. Con respecto a las variables de pH, se determinó que el pH 6 es en donde la concentración es significativamente menor comparado con los otros dos. También se analizaron las combinaciones de los factores muestra-temperatura, muestra-pH, y muestra-temperatura-pH, de lo cual se concluyó que las combinaciones presentan diferencias significativas o interacciones, con excepción de la combinación temperatura-pH que no presenta interacción. Por último, el modelo estadístico indicó que las condiciones óptimas de estabilidad para el colorante artificial Rojo No. 40 son a 30°C a cualquier pH y para la rosa de jamaica es a 30°C y pH 5.

Entonces, se puede decir que los colorantes presentes en la rosa de jamaica presentan una estabilidad similar a la que tiene el colorante artificial Rojo No. 40, por lo que puede ser utilizada como alternativa de consumo tanto en la industria farmacéutica, cosmética y/o alimenticia, siendo estos seguros. Al mismo tiempo, se espera fortalecer la agricultura, ya que éste podría llegar a ser un recurso económico de gran valor para nuestro país y que en algún momento se extendería a niveles internacionales.

2. INTRODUCCIÓN

Conocidos son los efectos carcinogénicos y embriotóxicos causados por los colorantes artificiales, sin embargo su uso sigue siendo sin duda de gran importancia en ciertos productos, ya que gracias al color se perciben sensaciones agradables a la vista, además de ser un factor estético.

En los últimos tiempos, las industrias cosmética, alimenticia y farmacéutica, se han preocupado por brindar al consumidor productos de alta calidad que sean seguros, es decir que posean los menores efectos secundarios y que a la vez proporcionen vitaminas, minerales y todos aquellos elementos capaces de mejorar la salud de la población.

Los colorantes naturales se han utilizado desde tiempos antiguos, pero es hoy en día cuando nuevamente han retomado un papel de gran importancia en dichas industrias, esto debido a la gran exigencia de la población por consumir productos seguros, eficaces y de calidad.

Guatemala es un país rico en variedad de flora capaz de brindar los elementos necesarios que sustituyan a los colorantes sintéticos, tal es el ejemplo de los cálices de la rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*), que contienen los pigmentos conocidos como antocianinas, responsables de proporcionar el color rojo intenso que la caracteriza, pero además del color, cabe mencionar las propiedades tan importantes que poseen, ya que pueden ser utilizados como antioxidantes, además de prevenir y combatir enfermedades del corazón y varias formas de cáncer.

En la presente investigación se realizó la caracterización de los pigmentos antocianínicos presentes en los cálices de la rosa de jamaica, para su posterior extracción utilizando una maceración en frío, por último se analizó la estabilidad de dichos extractos a temperaturas de 30°C y 50°C y a pH 4, 5 y 6, utilizando para esto la técnica espectrofotométrica ultravioleta-visible y comparando con un estándar de referencia del colorante artificial Rojo No.40.

3. ANTECEDENTES

3.1. GENERALIDADES

El color es un elemento muy importante para los humanos ya que ayuda a identificar un producto y juzgar su calidad; por estas razones no es sorprendente que por cientos de años el color haya jugado un papel predominante en tres áreas de interés comercial: alimentos, medicamentos y cosméticos (1).

Históricamente las primeras pinturas encontradas fueron en Egipto en el año 1500 a.C. En las escrituras de Plinio se menciona que el vino era coloreado artificialmente, y que hacía 500 años antes se conocía la capacidad de las especias y condimentos de colorear (1).

Hasta la mitad del siglo XIX, los colorantes usados en alimentos, medicamentos y cosméticos fueron fácilmente obtenibles de materias naturales, tales como animales, vegetales y minerales (1).

Sin embargo la importancia de los colorantes naturales disminuyó cuando en 1856 el inglés William Henry Perkin, en su intento de sintetizar quinina, oxidó sulfato de anilina con dicromato potásico y produjo el primer colorante sintético: la mauveína, de color púrpura. Posteriormente, los químicos alemanes perfeccionaron los colorantes derivados del alquitrán de hulla y fue así como los colorantes naturales perdieron su popularidad (2).

En 1987 se estimó que la producción mundial de colorantes era alrededor de 700,000 toneladas; de esta producción, un poco más del 50% fue destinada a la industria textil y un 2.2 % al sector de alimentos, medicamentos y cosméticos (2).

3.2. COLORANTES SINTÉTICOS Y SU RELACIÓN CON LA INDUSTRIA ALIMENTICIA, COSMÉTICA Y FARMACÉUTICA

Es indudable que en un producto destinado al consumo, sea cual fuere su naturaleza, los caracteres organolépticos tienen una importancia capital para su aceptación; uno de estos es el color. No basta con que un producto posea sabor y olor agradable, debe ser apetitoso por su aspecto para conseguir la plena aceptación del consumidor (2).

Gran número de productos alimenticios están desprovistos originalmente de color, como sucede con muchos productos elaborados, y otros los pierden con el tiempo, como es el caso de las conservas (2).

El uso de los colorantes alimenticios obedece a tres motivos fundamentales:

- Tipo técnico; subsanar pérdidas o deficiencias del color natural.
- Tipo estético o de presentación; de carácter comercial, y
- Tipo psicológico; en donde los caracteres organolépticos pueden producir en el público motivos de consumo (2).

3.2.2. Peligros de la tinción

Los abusos a que podría conducir la libre coloración de las sustancias destinadas al consumo han sido prevenidos por las autoridades sanitarias de los distintos países, y el uso de las materias colorantes sintéticas se ha venido regulando mediante disposiciones basadas en ensayos biológicos de toxicidad (2).

3.2.2. Regulación de los colorantes artificiales

Con el transcurso de los años se logró aumentar la eficiencia y garantizar la seguridad de los colorantes. Hoy en día, este tipo de aditivos que se incorporan a los alimentos están regulados mucho más estrictamente. La base de la legislación moderna es la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos (FD&C) de 1938 que otorga a la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) la autoridad legal sobre

los alimentos, sus ingredientes y define los requisitos que se deben cumplir en las etiquetas (3).

Las reacciones adversas que pueden ocasionar están desde una simple intoxicación aguda o subaguda, hasta casos de carcinogenicidad sin ser menos importantes las alergias; por lo que en general, las disposiciones legislativas han consistido en listas en las que se especifican los colorantes utilizables y sus exigencias de pureza (3).

3.3. COLORANTES NATURALES

Se les denomina así a todos aquellos compuestos que poseen coloraciones y que provienen de fuentes naturales como plantas superiores, algas, hongos y líquenes, así como de algunos organismos invertebrados (4).

Son muchas las plantas superiores que producen colorantes; a pesar de su universalidad no están lo suficientemente concentrados para permitir una rápida y económica extracción, y en consecuencia son relativamente escasas las que tienen gran importancia comercial como fuente de colorantes (4).

Las algas deben su color a las ficobilinas, las que se clasifican en ficocianinas y ficoeritrinas, de color azulado con fluorescencia roja y de color rojizo con fluorescencia naranja brillante, respectivamente (4).

Los hongos, particularmente la parte correspondiente al “cuerpo fructífero”, están fuertemente pigmentados. El número de pigmentos diferentes probablemente excede los 1000; aunque muchos de ellos son de naturaleza común a las plantas superiores, como por ejemplo betalaínas, carotenos y quinonas, muchos de ellos no han sido encontrados en algún otro organismo biológico (4).

Los líquenes han sido ampliamente utilizados, por poseer compuestos coloreados como las quinonas, xantonas, depsidos y desdidonas, carotenoides y xantofilas, así como fenoxazinas (4).

Dentro de los organismos marinos invertebrados, los crustáceos y moluscos quizás son los que proveen las más diversas fuentes de colorantes (4).

De los insectos se puede destacar la cochinilla por su contenido de ácido carmínico, así como el kermes que produce ácido kermésico, ambos de naturaleza antraquinónica (4).

3.4. CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA (2)

3.4.1. Colorantes Sintéticos

- Colorantes nitroso
- Colorantes nitro
- Colorantes azoicos
- Colorantes difenilmetánicos
- Colorantes trifenilmetánicos
- Colorantes xanténicos
- Colorantes quinónicos
- Colorantes quinoleínicos
- Colorantes indigoides

3.4.2. Colorantes Naturales

- Carotenoides
- Flavonoides
- Antocianinas
- Betalaínas
- Quinonas

3.5. COLORANTE AZÓICOS

Los colorantes azoicos deben su color a la presencia de un grupo *azo* ($-N=N-$) conjugado con anillos aromáticos por ambos extremos. Como en el caso de los demás colorantes artificiales, los colorantes azóicos autorizados para su utilización como aditivos alimentarios son todos solubles en agua, debido a la presencia de grupos sulfónicos (5).

Los colorantes azoicos se han cuestionado reiteradamente, debido a que muchos colorantes de esta familia (exceptuando los autorizados por la FDA)) han demostrado ser cancerígenos en experimentos con animales (5).

Una diferencia fundamental es que los colorantes cancerígenos son poco polares, solubles en grasas, y atraviesan con cierta facilidad la barrera intestinal, incorporándose al organismo. En cambio, los colorantes autorizados, que son muy polares y soluble en agua, no se absorben (5).

Pertenecen a este grupo los colorantes (5):

- Amarillo anaranjado
- Tartracina
- Azorrubina, carmoisina
- Amaranto
- Rojo cochinilla, rojo Ponceau
- Rojo 2G
- Negro brillante
- Marrón FK
- Marrón HT
- Litol Rubina BK
- **Rojo Allura AC**

3.5.1. Rojo No. 40 (Rojo Allura AC)

Este colorante se utiliza desde la década de 1980, sobre todo en Estados Unidos, (con el código FD&C Red #40), donde se introdujo para sustituir al amaranto, siendo el más utilizado en este país. Se ha introducido recientemente en las listas de la Unión Europea, para eliminar problemas comerciales. La “ingestión diaria aceptable” de este colorante es de 7 mg/kg de peso (5).

3.6. ANTOCIANINAS

El nombre de antocianina deriva del griego *antho* que significa flor y *kyanos*, que significa azul. Dicho término fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no sólo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de plantas, se deben a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat (4,6).

Las antocianinas están distribuidas ampliamente en plantas alimenticias, existiendo en 27 familias botánicas. El uso de estos pigmentos ha sido exitosamente aplicado en el tratamiento de varios tipos de desórdenes vasculares: fragilidad capilar, insuficiencia venosa crónica periférica y microangiopatía de la retina. También poseen actividad antioxidante y antiagregante plaquetaria. Estudios recientes muestran el efecto benéfico sobre las células cancerígenas y con actividad antiinflamatoria (7,8).

3.6.1. *Estructura*

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico $C_6-C_3-C_6$ y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro (4).

Hay seis antocianidinas comunes, es decir la aglicona de la antocianina, siendo la cianidina la más frecuente y responsable del color magenta, los colores rojo-naranja se deben a la pelargonidina, mientras que los colores violeta y azul a la

delfinidina. También son comunes tres metil-éteres: peonidina, petunidina y malvidina (4).

La diferencia entre cada una de las seis antocianidinas ocurre en la variación del tipo de azúcar, del número y de la posición en los que están unidas. Entre los monosacáridos comunes podemos mencionar a la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, y como disacáridos a la rutinosa, sambubiosa, soforosa, gentiobiosa y latirosa (4).

3.6.2. Factores que influyen en el color y la estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas sufren de una “inestabilidad inherente”, por lo que debe tenerse muchas precauciones durante su manipuleo o su procesamiento. Un conocimiento de los factores involucrados en su “inestabilidad” así como de los mecanismos de degradación es sumamente vital como colorante de alimento. Los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas son pH, temperatura, presencia de oxígeno, así como la interacción con otros componentes en los alimentos como el ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y copigmentos (4).

Algunos estudios han mostrado que:

- Las antocianidinas son menos estables que las antocianinas y menos solubles en agua, por lo que asume que la glicosidación confiere estabilidad y solubilidad al pigmento.
- A mayor grado de hidroxilación, decrece generalmente la estabilidad de la antocianina, mientras que un incremento en el grado de metoxilación o del grado de glicosilación, tiene el efecto opuesto.
- La naturaleza del azúcar enlazado influye en la estabilidad.
- La presencia de por lo menos dos grupos acilo estabiliza a la antocianina probablemente por la presencia del sistema aromático en el grupo acilo, encontrándose que hay diferencia también por el tipo de grupo presente.

- En presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina-3-glicosiladas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para las antocianidina-3,5-diglicosiladas lo es a pH 4.0-5.0.
- Las antocianinas son generalmente inestables cuando se exponen a la luz ultravioleta o a la luz visible.
- La presencia de ácido ascórbico produce decoloración de la antocianina, probablemente por la indirecta oxidación por el peróxido de hidrógeno que se forma durante la oxidación aeróbica del ácido ascórbico.
- Las concentraciones altas de azúcar (>20%) o de jarabe para preservar las frutas o jugos, tiende a ejercer un efecto protector sobre la antocianina.
- La formación de complejos con proteínas, taninos y otros flavonoides como quercetina y rutina, aumentan la estabilidad y el color de las antocianinas (4).

3.7. ROSA DE JAMAICA

3.7.1. *Nombre científico*

Hibiscus sabdariffa L. (9)

3.7.2. *Familia*

Malvaceae (9)

3.7.3. *Nombres populares*

Jamaica, karkadé, roselle, sorrel, viñuela, abutilón, hibisco, hibiscus, pampola, pampulha, papoula, vinagreira, azadinha (9,10).

3.7.4. *Historia*

La primera mención de uso medicinal y culinario fue a través de Bontius en 1668. El hibisco fue introducido en Jamaica en el siglo XVII, siendo allí muy popular como aromatizante ácido, para cuyo fin empleaban los cálices de las flores. En Europa se introdujo a fines del siglo XIX como bebida refrescante, aunque su color sanguinolento no lo ha popularizado

mucho. Sus flores características y su columna de estambres y estilo que sobresalen, representan uno de los símbolos de islas tropicales como las de Hawai. Actualmente forman parte de ceremonias de devoción en la India, siendo sagrada dentro de ese contexto (10).

3.7.5. Descripción botánica

Hierba leñosa, anual, erecta, 1-2 cm de alto, corteza roja, glabra. Hojas con peciolo cortos o largos, lóbulos angostos, borde aserrado; nervadura central; glándula grande cerca de la base en el envés. Flores con bracteolas unidas con el cáliz, acrescentes en la fructificación, forman una copa grande, carnosa, rojo oscura, pedículos cortos. Cáliz de 2 cm de largo y en número de 5; 5 pétalos, 4-5 cm de largo, amarillo pálidos, estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados, placentación axial. Fruto en cápsula densamente estrigosa más corta que el cáliz (9,10).

3.7.6. Descripción microscópica

Al examinar al microscopio con una solución de hidrato de cloral SP, la jamaica pulverizada (malla 3), de color rojo, presenta tricomas fusiformes largos, frecuentemente rotos, incoloros, de pared gruesa, pelos flexuosos incoloros, a veces muy contorneados, aislados o en pares; fragmentos de parénquima de color gris con numerosas maclas de oxalato de calcio. Puede también observarse la presencia de maclas aisladas de oxalato de calcio y de granos de polen equinulados (12).

3.7.7. Hábitat

Nativa de la India Oriental o Angola, naturalizada como maleza en América tropical, se cultiva en grandes extensiones de las partes secas del oeste de África Central, Sudán, México y la India. En Guatemala se cultiva en tierras bajas de Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Huehuetenango y Santa Rosa (8).

3.7.8. Agricultura

Crece en bosque seco y monte espinoso subtropical, clima cálido, terreno húmedo (200-450 cc/año), pH 4.0-5.8, suelo arenoso-arcilloso rico en materia orgánica; resiste la sequía, adaptable a lugares secos (8).

3.7.9. Acción Farmacológica

Vitamínico, aperitivo, digestivo, colagogo, demulcente, diurético, laxante, espasmolítico, vasoprotector, diurético, vasodilatador periférico, tranquilizante, antihelmíntico, antibacteriano, se utiliza en catarrros y resfríos. (11,13-14).

3.7.10. Farmacognosia

A los flavonoides y derivados antociánicos se les atribuye actividad diurética, colerética, disminuye la viscosidad de la sangre, reduce la presión sanguínea, estimula la peristalsis intestinal, sedante y laxante. La actividad antiflogística se atribuye al contenido de mucílago. La antocianinas (delfidina, delfidina 3-sambubiósido, cianidin 3-sambubiósido) son los responsables del color vino tinto característico de la infusión. La antocianidina conocida como hibiscina (delfinidin 3-xilosilglucósido) es un colorante de vinos y de diversas preparaciones farmacéuticas, presenta además otro colorante rojo (gosipetina), así como colorante amarillo, la gositrina (9-11).

3.7.11. Composición Química

Presenta polisacáridos mucilaginosos casi en un 50% constituidos por ácidos urónicos en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa. Ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido hibístico, ácido málico, ácido oxálico y ácido tartárico. Contiene vitamina C, pectina, fitoesteroles, derivados flavónicos (gosipetina), ácido protocaténico (ácido fenólico). La raíz contiene principalmente ácido tartárico y saponinas, mientras que las semillas contienen fitoesteroles.

Contiene otros polifenoles como flavonoides, por ejemplo: quercetina, miricetina, hibiscetina, hibiscitrina (8,10-11).

3.7.12. Usos Etnomedicinales

Las flores y cálices de hibisco en forma de infusión se emplea popularmente en uso interno como diurético, colerético, carminativo, antiescorbútico, laxante suave y antiespasmódico. Menos frecuente como facilitador del parto, antidisentérico, en casos de disurias y como antitusivo. La raíces en decocción para combatir el estreñimiento y las semillas como energizante (10-11).

3.7.13. Usos alimenticios

Se utiliza mucho como corrector organoléptico, ya que al incorporarla a infusiones otorga un vistoso color rojo y un agradable sabor ácido refrescante. Gracias su calidad de aromatizante ácido puede ser incorporado a vinos, jaleas y salsas. El extracto puede ser utilizado en alimentos acuosos de pH ácido manteniendo su estabilidad en relación con el color. Suele prepararse un té muy agradable al sabor y un colorante rojo para totalizar otras tisanas (10).

3.7.14. Otros usos

Los tallos proporcionan una fibra excelente muy similar al yute, conocida con el nombre de cáñamo de hibisco, la cual resulta útil para el amarre y la elaboración de cordeles. La gosipetina es un colorante rojo, la gositrina amarillo y la hibiscina también rojizo, empleándose para teñir vinos y en diversas preparaciones farmacéuticas. El aceite de las semillas presenta baja viscosidad, lo cual es apreciado por los fabricantes de cosméticos (10).

4. JUSTIFICACIÓN

Investigaciones recientes han proporcionado información acerca de los grandes peligros y daños a la salud que los colorantes sintéticos pueden causar, sin embargo el color es una de las características principales que la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica no puede dejar por un lado, ya que es un factor estético por medio del cual el consumidor puede identificar y juzgar la calidad de un producto; por estas razones es que dichas industrias han utilizado como alternativa a los colorantes naturales.

Se conoce que los cálices de *Hibiscus sabdariffa L.* (rosa de jamaica), poseen los pigmentos conocidos como antocianinas, los cuales son compuestos naturales que otorgan las coloraciones rojizas. Al ser de origen natural no requieren certificaciones internacionales, tanto de la Comunidad Económica Europea y de la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos (FDA) y además, los riesgos nocivos que presentan son casi nulos, por lo que pueden ser utilizados ampliamente.

Con esta investigación se pretende crear una nueva alternativa que pueda sustituir a los colorantes sintéticos, proporcionando productos de alta calidad y seguros, así como fortalecer una de las áreas más importantes para el país como lo es la agricultura, contribuyendo así a implementar un nuevo recurso económico.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Evaluar la estabilidad acelerada de los pigmentos antociánicos presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de jamaica) como alternativa de consumo del colorante artificial Rojo No.40.

5.2. ESPECÍFICOS

- 5.2.1. Obtener los pigmentos antociánicos presentes en la muestra de *Hibiscus sabdariffa* L., por medio de la técnica de extracción por maceración con solvente en frío.
- 5.2.2. Caracterizar los pigmentos antociánicos de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de jamaica), mediante cromatografía en capa fina.
- 5.2.3. Evaluar la estabilidad acelerada de los extractos obtenidos, a diferentes temperaturas (30°C y 50°C) y pH (4, 5 y 6), utilizando el método de espectrofotometría ultravioleta-visible, en comparación con el colorante artificial Rojo No. 40.

6. HIPÓTESIS

Los pigmentos antociánicos presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de jamaica) poseen las características de estabilidad necesarias para ser utilizados como alternativa de consumo del colorante artificial Rojo No.40.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. UNIVERSO Y MUESTRA

7.1.1. Universo: *Hibiscus sabdariffa L.* (rosa de jamaica)

7.1.2. Muestra: 1 Kg de cálices de *Hibiscus sabdariffa L.*, colectado en el municipio Jacaltenango, Huehuetenango.

7.2. MATERIAL Y CRISTALERÍA

- Común de laboratorio.

7.3. EQUIPO E INSTRUMENTOS

- Espectrofotómetro Genesys de región Ultravioleta-visible (UV-vis)
- Balanza semianalítica
- Balanza analítica
- Hornos calibrados
- Cromatofolio de sílica gel 60F₂₅₄

7.4. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 25 %
- Etanol 95%
- Metanol
- Solución buffer pH 4
- Solución buffer pH 5
- Solución buffer pH 6
- n-Butanol
- Cloroformo
- Ácido acético
- Estándar Rojo No. 40

7.5. MÉTODOS

7.5.1. OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA MUESTRA (16-19)

7.5.1.1 Colecta y secado de las muestras

- Observar las plantas de interés para determinar si pueden obtenerse suficientes muestras de ellas y que estén sanas.
- Con la ayuda de tijeras de podar o machete obtener al menos 5 ejemplares, para su determinación taxonómica y la cantidad necesaria para llevar a cabo la parte experimental.
- Realizar una selección cuidadosa del material vegetal, desechando las partes decoloradas, manchadas, enfermas o deterioradas por insectos y hongos. Hacer el lavado con agua potable en una canasta calada de modo que el agua penetre. Lavar y escurrir para eliminar el exceso de agua, esto debe hacerse por lo menos dos veces y una lavada de desinfección con 10 ppm de hipoclorito de calcio.
- Colocar el material vegetal en bandejas con papel kraft, mover eventualmente, secar evitando que el material vegetal reciba sol directo. Para el almacenamiento el material vegetal debe contener un porcentaje de humedad no mayor al 10%.
- Al menos 3 muestras deben ser herborizadas y sometidas a cuarentena, para su posterior determinación taxonómica.

7.5.2. PROCEDIMIENTO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) (20)

7.5.2.1. Preparación del extracto

Pulverizar 1 gramo de muestra y extraer con 6 mL de una mezcla de metanol/ácido clorhídrico al 25 % (9:1), agitar por 15 minutos. Filtrar y utilizar 25 μ L para llevar a cabo la cromatografía.

7.5.2.2. Soluciones de referencia

- Azul de metileno: Disolver 5 mg en 10 mL de metanol; y aplicar 10 μ L.
- Amarillo naftol/Rojo Sudán: Disolver 5 mg de amarillo naftol en 5 mL de metanol y 5 mg de rojo Sudán en 5 mL de cloroformo, mezclar y aplicar 5 μ L en la cromatoplaca.

7.5.2.3. Fase estacionaria

- Cromatofolios de aluminio de sílica gel 60F254

7.5.2.4. Fase móvil

- n-butanol - ácido acético glacial – agua (40:10:20)

7.5.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS (21)

Descongelar aproximadamente 200 g de la muestra, de los cuales se deben pesar 100 g de cálices. Macerar éstos utilizando 100 mL de solvente extractor (etanol 95%, ácido clorhídrico 0.1 N en proporción 85:15).

Transferir cuantitativamente 50 mL y hacer lavados del recipiente utilizando aproximadamente 50 mL de solvente extractor. Recibir el extracto en un beacker y medir; cubrir el beacker con parafilm y guardar durante toda la noche a 4°C, posteriormente se debe filtrar utilizando papel Whatman No.1, usando embudo Büchner.

Lavar, tanto el beacker y el papel filtro repetidamente con el solvente extractor, hasta obtener aproximadamente 450 mL de extracto. Transferir a un balón aforado de 500 mL y enrazar con el disolvente extractor, esta será la solución A.

7.5.4. PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD DE LOS COLORANTES NATURALES (22-25)

Evaluar la muestra a tres valores de pH (4, 5 y 6) y a dos temperaturas (30°C y 50°C), para ello utilizar hornos previamente calibrados para mantener dichas temperaturas. Estos deben permanecer conectados durante todo el proceso experimental. Analizar las muestras en el espectrofotómetro ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm.

Realizar el siguiente procedimiento: (26-28)

- Añadir 20 mL de solución buffer pH 4 a 4 tubos de 30 mL e identificar así:

Tubo A: T_1 , pH₁

Tubo A: T_2 , pH₁

Tubo B: T_1 , pH₁

Tubo B: T_2 , pH₁

- Añadir 20 mL de solución buffer pH 5 a 4 tubos de 30 mL e identificar de la siguiente manera:

Tubo A: T_1 , pH₂

Tubo A: T_2 , pH₂

Tubo B: T_1 , pH₂

Tubo B: T_2 , pH₂

- Añadir 20 mL de solución buffer pH 6 a 4 tubos de 30 mL e identificar de la siguiente manera:

Tubo A: T_1 , pH₃

Tubo A: T_2 , pH₃

Tubo B: T_1 , pH₃

Tubo B: T_2 , pH₃

Siendo los tubos identificados como A, los que contengan el extracto de la muestra (*Hibiscus sabdariffa L.*) y los identificados como B, los que contengan la solución estándar (Rojo No. 40); T_1 , será la temperatura de 30°C y la T_2 la temperatura de 50°C. Añadir una cantidad de extracto y estándar que brinde un valor de absorbancia entre 0.4 y 0.6 unidades.

Determinar las absorbancia para cada tubo diariamente (excepto sábado y domingo) durante un mes o hasta que una de las muestras disminuya en un 80% su concentración inicial.

7.6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La caracterización de los pigmentos se hizo en forma descriptiva. La cromatografía en capa fina se analizó por medio de mediciones del Rf y análisis iconográfico.

El análisis de estabilidad acelerada se hizo utilizando un diseño factorial (2x2x3) con medidas repetidas (las medidas repetidas serán las concentraciones a través del tiempo), en el que se evaluaron los colorantes de la rosa de jamaica y el colorante artificial Rojo No.40, dos temperaturas (30°C y 50°C) y tres pH (4, 5 y 6) realizándolo por duplicado. La respuesta se midió por el porcentaje de concentración y se determinó el día de corte, es decir el día en el que la concentración de alguna de las muestras sea $\leq 80\%$ (21).

Análisis Estadístico: consistió en un análisis de varianza con los porcentajes de concentración dependiente de los resultados experimentales de los días de corte. Se hicieron comparaciones múltiples por medio de la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (MDF). Se hizo un análisis de regresión, considerando las mejores condiciones de estabilidad concentración-tiempo de las muestras en estudio, con un intervalo de confianza del 95%.

8. RESULTADOS

8.1. Identificación taxonómica de la muestra colectada

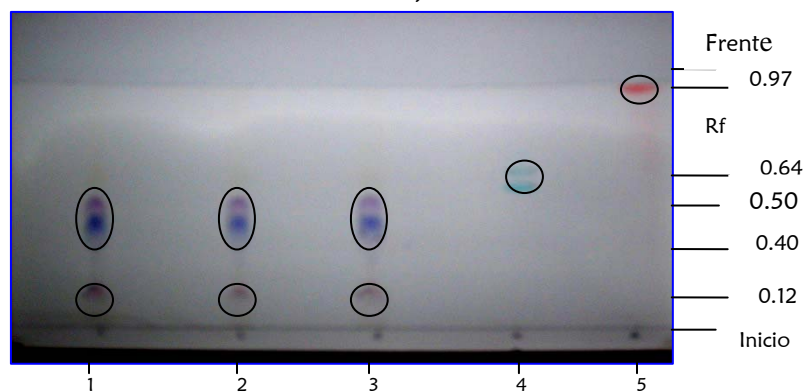
Se identificó que la muestra colectada en el municipio de Jacaltenango, Huehuetenango, efectivamente correspondía al género y especie *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de jamaica) y se registró en la Unidad de Investigación Herbario BIGU con número de identificación 33815.

8.2. Identificación de los pigmentos antociánicos presentes en los cálices de *Hibiscus sabdariffa* (rosa de jamaica) por medio de cromatografía en capa fina

Tabla No. 1
Cromatografía en capa fina del extracto de rosa de jamaica

Banda	Color Observado	Rf experimental
A	Rosado	0.12
B	Azul	0.40
C	Azul-violeta	0.50
Estándar ₁	Azul-celeste	0.64
Estándar ₂	Rojo	0.97

Fig. 1
Cromatograma de las bandas observadas del extracto de rosa de jamaica



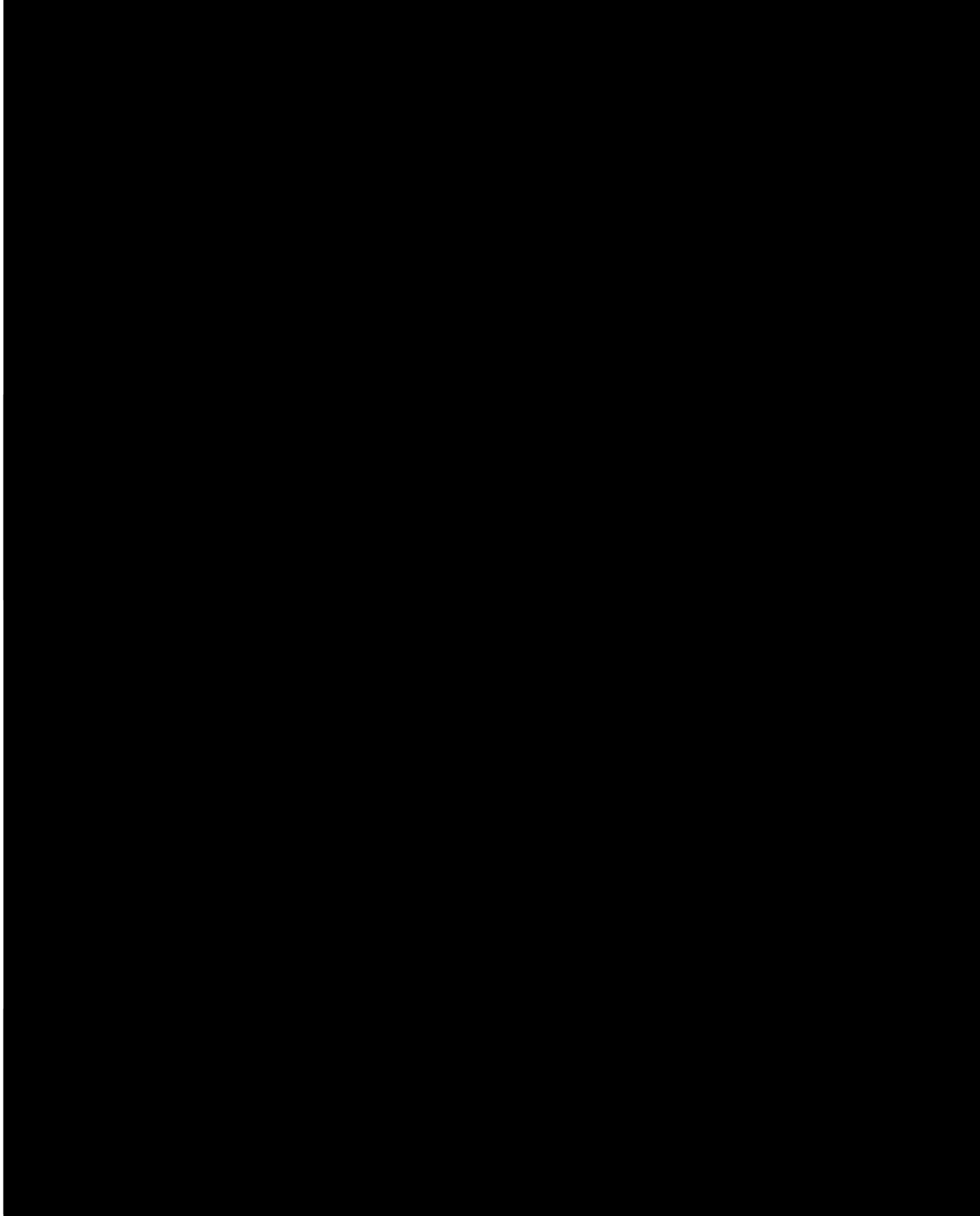
Detección: Sin tratamiento químico y en visible

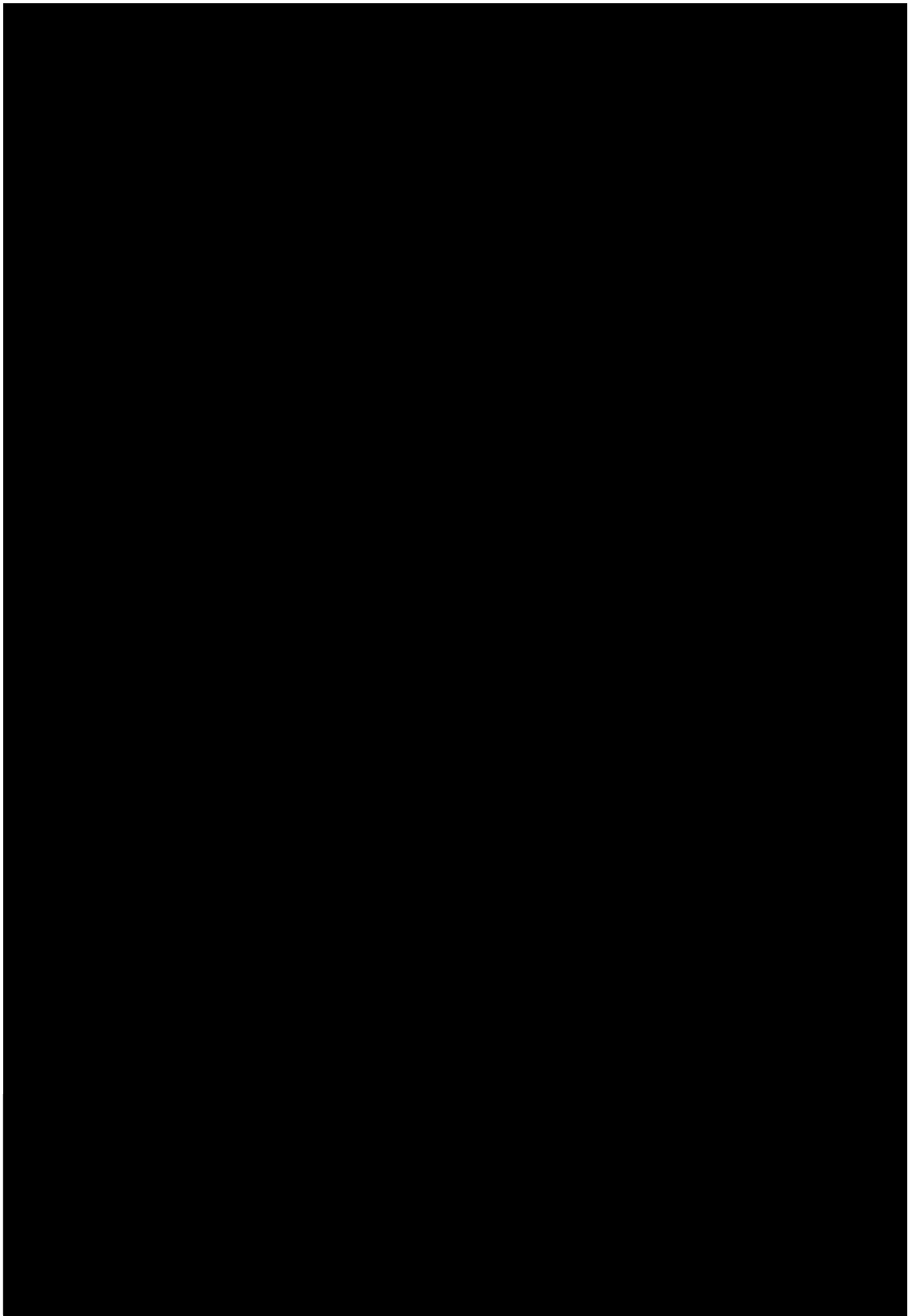
1,2 y 3 = Extracto de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* (rosa de jamaica)

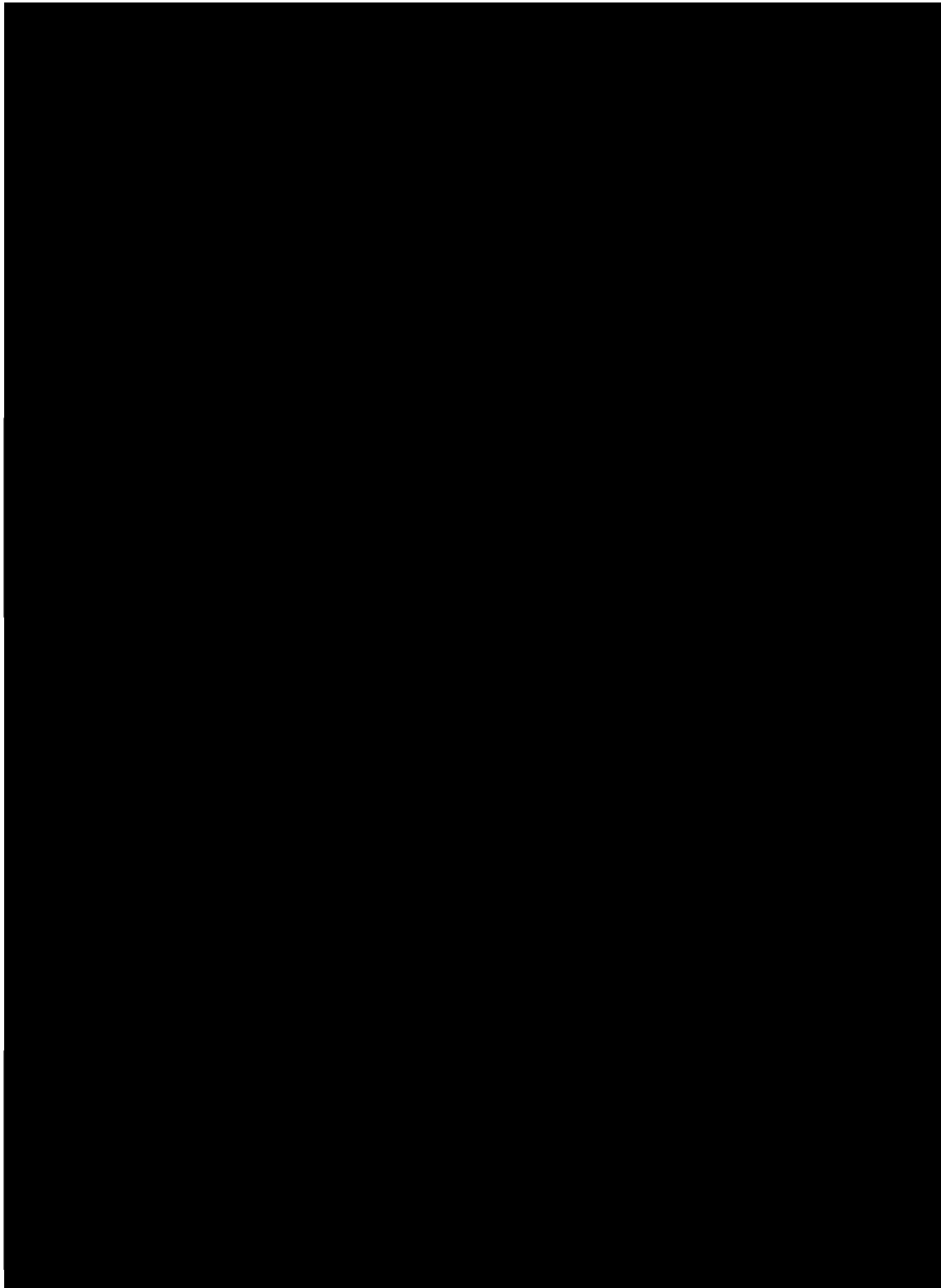
4 = Estándar azul de metileno

5 = Estándar rojo sudán/amarillo naftol

8.3. Estudio de estabilidad acelerada, por medio del método espectrofotométrico UV-Vis de los colorantes naturales de rosa de jamaica comparados con el colorante artificial Rojo No.40 bajo diferentes condiciones de temperatura y pH







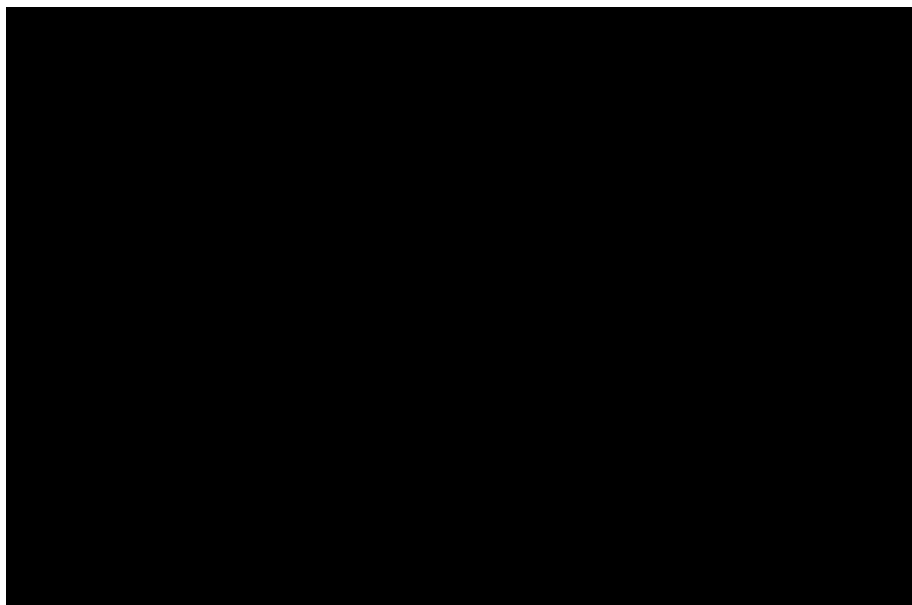
El cálculo de la concentración de las muestras se encuentra en el apartado de Anexos (Gráfica A)

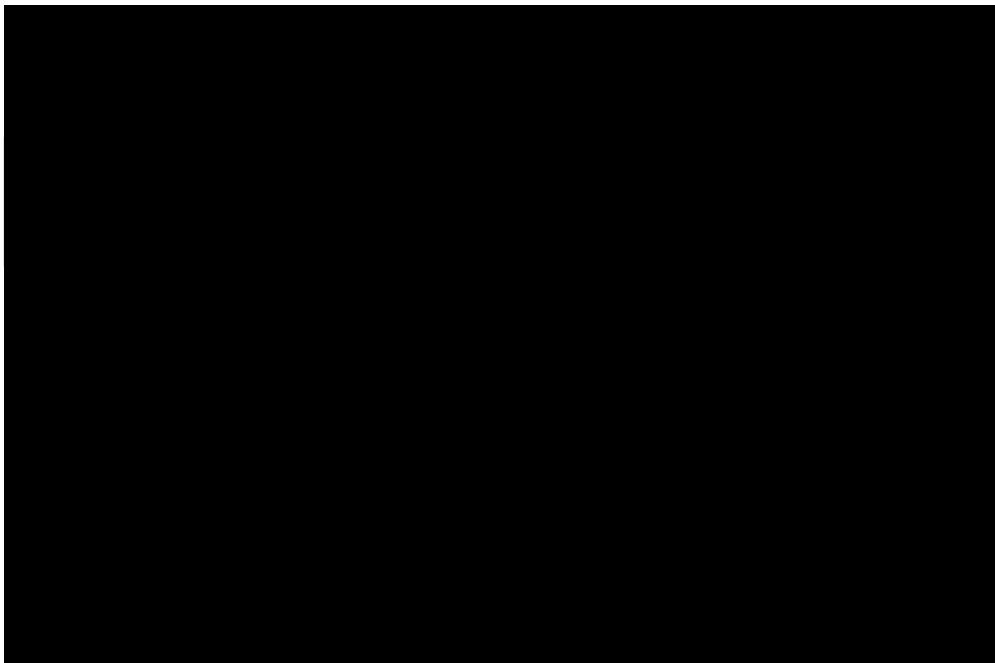
8.4. Análisis Estadístico

Tabla No.14
Análisis de Varianza

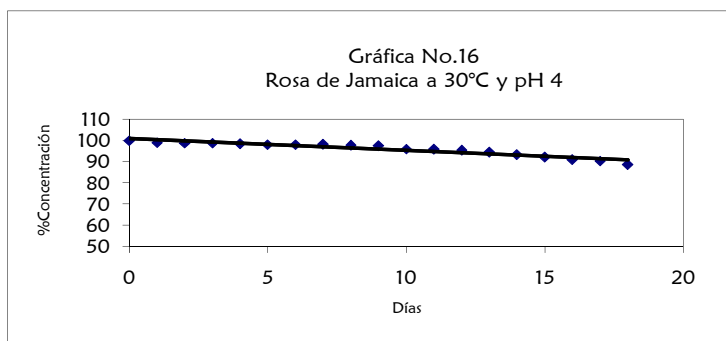
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob> F
Model	6790.66595	29	234.160895	80.88	0.0000
Muestra	761.464307	1	761.464307	263.01	0.0000
Temperatura	425.334002	1	425.332002	146.91	0.0000
pH	575.915613	2	287.957806	99.46	0.0000
Tiempo	4187.61659	18	232.645366	80.36	0.0000
Muestra*Temperatura	281.785338	1	281.785338	97.33	0.0000
Muestra*pH	497.900309	2	248.950155	85.99	0.0000
Temperatura*pH	1.92546603	2	962.733015	0.33	0.7175
Muestra*Temp*pH	58.7243264	2	29.3621632	10.14	0.0001
Residual	573.237567	198	2.89513923		
Total	7363.90352	227	32.4401036		

Observaciones=228 R-cuadrado = 0.9222
MSE = 1.70151 Adj R-cuadrado =0.9108





8.5. Análisis de regresión lineal



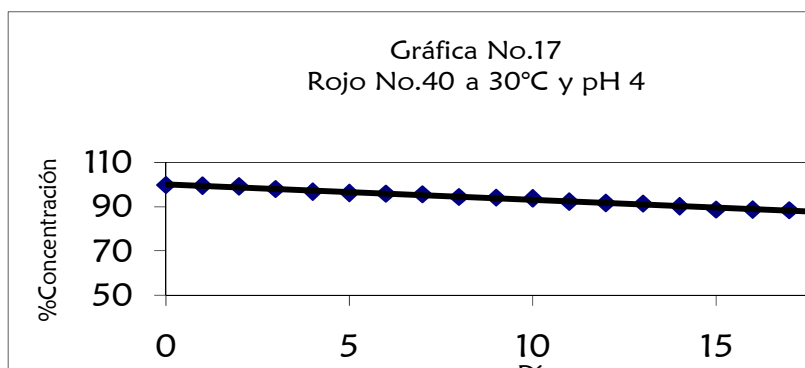
Ecuación: $y=100.956173 - 0.55998742x$

Coefficiente de determinación (R^2): 0.89499933

La regresión lineal es significativa ($p<0.0001$)

Día en el que se espera que la concentración decaiga al 80% 37.4 días

Intervalo de confianza al 95% 30.27 a 47.61 días



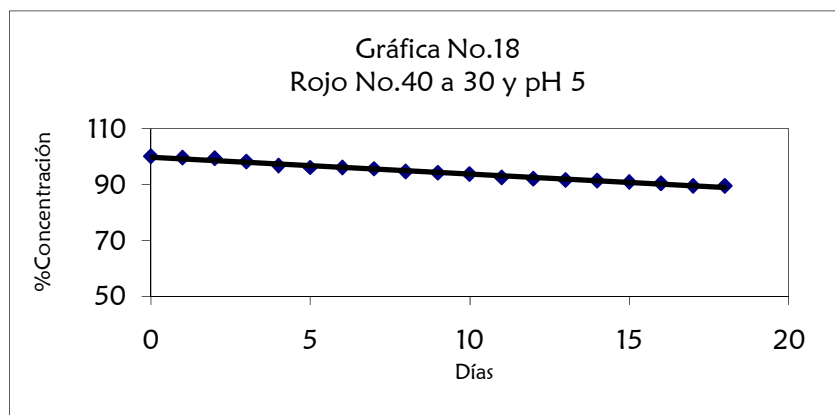
Ecuación: $y=100.170367 - 0.69471573x$

Coefficiente de determinación (R^2): 0.98934529

La regresión lineal es significativa ($p<0.0001$)

Día en el que se espera que la concentración decaiga al 80% 29.03 días

Intervalo de confianza al 95% 27.04 a 31.25 días



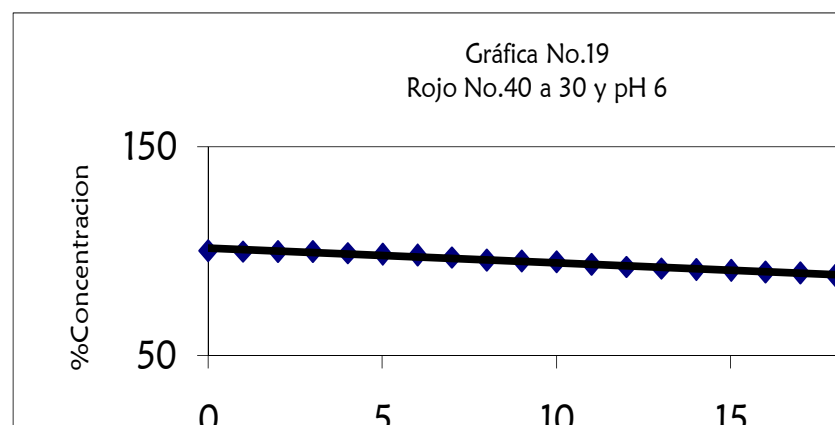
Ecuación: $y=99.7834991 - 0.60716377x$

Coefficiente de determinación (R²): 0.98824115

La regresión lineal es significativa (p<0.0001)

Día en el que se espera que la concentración decaiga al 80% 32.6 días

Intervalo de confianza al 95% 30.30 a 35.13 días



Ecuación: $y=101.335188 - 0.70533473x$

Coefficiente de determinación (R²): 0.98070443

La regresión lineal es significativa (p<0.0001)

Día en el que se espera que la concentración decaiga al 80% 30.25 días

Intervalo de confianza al 95% 27.52 a 33.4 días

Tabla No. 17

Promedio conjunto de las concentraciones del extracto-colorante en condiciones óptimas

Días	RJ-30°C-pH 5	R40-30°C-pH 4	R40-30°C-pH 5	R40-30°C-pH 6
0	100.96	100.17	99.78	101.34
5	98.16	96.70	96.75	97.81
10	95.36	93.22	93.71	94.28
15	92.56	89.75	90.68	90.76
18	90.88	87.67	88.85	88.64
25	86.96	82.80	84.60	83.70
35	81.36	75.86	78.53	76.65
37	80.24	74.47	77.32	75.24
40	78.56	72.38	75.50	73.12

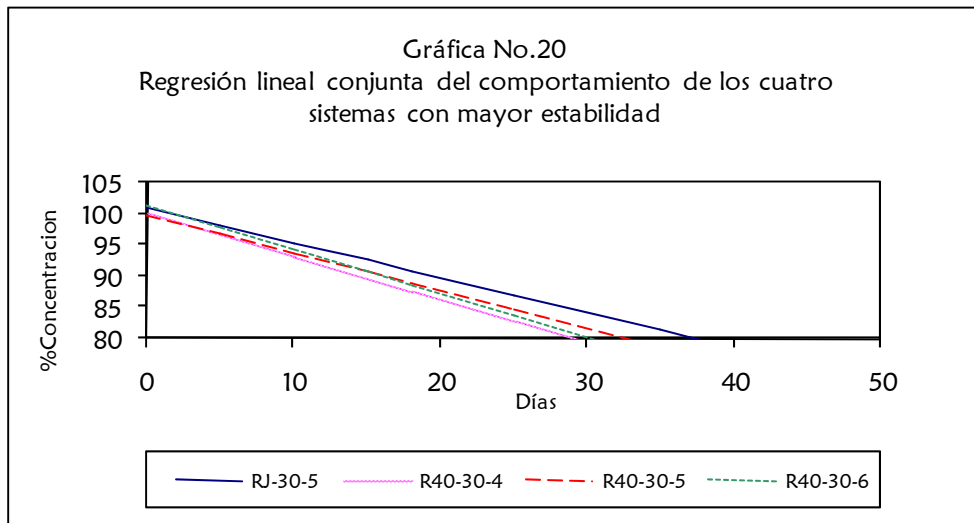
RJ = rosa de

jamaica

R40= colorante artificial Rojo

No.40

La concentración de cada una de las muestras se calculó utilizando la ecuación respectiva (gráficas 16-19)



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La extracción de los pigmentos que proporcionan las coloraciones rojizas a los cálices de la rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) se realizó por medio de la técnica de maceración en frío. Después de obtenido el extracto se procedió a la caracterización de los pigmentos utilizando la cromatografía en capa fina (CCF).

Según Wagner, et. al., en el cromatograma deben observarse dos bandas principales de color azul-violeta en la región de la banda del estándar azul de metileno y a un R_f entre 0.25-0.5. Comparando con los resultados experimentales, se confirma la presencia del pigmento de interés: delfinidín-3-xilosilglucósido (hibiscina) en la muestra analizada, de coloración azul-violeta y que se ubica a un R_f de 0.5 la que representa dicho pigmento, el cual es el responsable de las coloraciones rojizas que caracterizan a la rosa de jamaica. (Tabla 1 y Figura 1). Además se identificó otro pigmento: la gosipetina de coloración de rosada a rojo, que no tiene relevancia alguna en la investigación pero se mencionan ya que con éste se confirma la caracterización del extracto de la rosa de jamaica. Cabe mencionar que el estándar amarillo naftol no se logró separar, por lo que no aparece en el cromatograma (Figura 1), sin embargo esto no interfiere con los resultados ni en el análisis de los mismos, debido a que este se utiliza para comparar los colorantes amarillos presentes en la rosa de jamaica, los cuales no tienen relevancia en este estudio.

El estudio de estabilidad, en resumen, consistió en comparar la concentración (del extracto de rosa de jamaica) expresada en porcentaje, contra el colorante artificial Rojo No.40, ambos sometidos a diferentes condiciones de temperatura y pH. Con esto se pretendía medir, por espectrofotometría ultravioleta-visible, la concentración de las muestras y determinar el día en el cual una de ellas disminuía su concentración por debajo del 80% (día de corte) y al mismo tiempo observar cómo las variables de temperatura y pH afectaban el comportamiento tanto de la rosa de jamaica como del Rojo No. 40, con la finalidad de determinar su estabilidad a corto plazo, es importante mencionar que los análisis se realizaron por duplicado con un intervalo de confianza al 95%.

El análisis se dividió en varias secciones para una mejor comprensión de los resultados:

a) Análisis General de la Estabilidad.

Las muestras estudiadas de rosa de jamaica a 30°C y pH 4, 5 y 6; rosa de jamaica a 50°C y pH 4 y 5; Rojo No. 40 a 30°C y pH 4, 5 y 6; Rojo No. 40 a 50°C y pH 4, 5 y 6, mantuvieron la concentración por arriba del 80% de la concentración inicial, siendo la muestra de rosa de jamaica a 50°C y pH 6 la que disminuyó su concentración hasta un 78.58% al día 17 de observación, día en el cual la técnica indicaba finalizar la experimentación. En todos los demás casos se mantiene dentro del rango de concentración esperado, tanto de las muestras de rosa de jamaica como Rojo No. 40 expuestos a las mejores condiciones establecidas de temperatura y pH.

b) Análisis de Varianza.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el modelo estadístico ANOVA, por medio del cual se determinó la mejor combinación entre el colorante Rojo No. 40, temperatura y pH; así como entre la rosa de jamaica, temperatura y pH a las cuales presentaban mejor estabilidad. A su vez estos datos fueron tomados para realizar la regresión lineal y con esto determinar si existía diferencia significativa entre las muestras estudiadas. De lo anterior se determinó entonces, que existe diferencia significativa entre los porcentajes de concentración entre rosa de jamaica y Rojo No. 40 ($p < 0.00001$). La rosa de jamaica es la que tiende a tener menor porcentaje de concentración y mayor variabilidad. (Tabla 2-13)(Gráficas 1-12).

También se estableció que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras sometidas a las distintas temperaturas ($p < 0.00001$), siendo la variable temperatura de 30°C en donde se obtiene mayor concentración que a 50°C. De las variables de pH, por medio del análisis de varianza, se determinó que existe diferencia significativa entre las concentraciones tanto de rosa de jamaica como del colorante artificial, sometidos a los tres niveles de pH medidos ($p < 0.00001$). Con la prueba de la mínima diferencia de Fisher (MDF), se tiene que entre todos los valores de pH hay diferencia

significativa, pero esto puede deberse a la gran cantidad de datos, lo que hace que aunque los promedios sean muy cercanos, la prueba indica diferencia. El valor de pH que marca una diferencia significativa, comparado con los otros dos, es el pH 6, en el cual la concentración es significativamente menor a las obtenidas con pH 4 y 5 ($p < 0.00001$). (Gráficas 16-18)

Según los porcentajes de concentración se puede decir que el mejor pH, por su estabilidad o concentración, es el pH 5. Además de lo anterior, se observa que las combinaciones de los factores muestra- temperatura, muestra-pH, y muestra-temperatura-pH, presentan diferencias significativas o interacciones ($p < 0.0001$), con excepción de la combinación temperatura-pH que no presenta interacción ($p = 0.7175$). Analizando las combinaciones de los factores, ya mencionadas, se estableció que: a 50°C la rosa de jamaica presenta menor estabilidad ya que los porcentajes de concentración decaen significativamente (Gráfica 13). De la combinación colorante-pH, se observó que a pH 4 y 5 el comportamiento de ambos colorantes (rosa de jamaica y Rojo No. 40) es similar, pero a pH 6, la rosa de jamaica disminuye la concentración significativamente (Gráfica 14). Acerca de la combinación colorante-temperatura-pH, se observó que a 30°C el colorante artificial Rojo No. 40 no presenta muchos cambios en la estabilidad de la concentración, pero la rosa de jamaica tiene mejor estabilidad a pH 5 y disminuye a pH 6. Así mismo, a 50°C la rosa de jamaica pierde estabilidad y sobre todo, a pH 6 en donde presenta la máxima diferencia, mientras que el colorante Rojo No. 40 no presenta diferencia significativa al cambiar las variables de pH y temperatura (Gráfica 15).

En conclusión, puede decirse que el mejor colorante es Rojo No. 40 a 30°C a cualquier pH (4, 5 y 6) y que las condiciones óptimas para rosa de jamaica son también a 30°C pero específicamente a pH 5.

c) Mediciones Repetidas.

Considerando que se midieron alícuotas de los colorantes bajo las diferentes condiciones de temperatura y pH a través del tiempo, el análisis se denomina medidas repetidas. Se incluye en el diseño y en análisis como tal, para aislar la variación debida a los

cambios entre días (variable tiempo) y así poder estimar mejor las variaciones debidas a los factores (temperatura y pH).

El análisis indica que existe diferencia significativa entre días ($p < 0.00001$). Si bien es cierto que no interesa establecer qué días son diferentes, ya que, lo que interesa es conocer el día en el que al menos una de las muestras disminuya el 80% de concentración inicial (día de corte), se puede observar el comportamiento de las respuestas a través del tiempo, en donde se puede observar que el decaimiento es lineal y por lo tanto proporciona la base para el análisis de regresión (Anexos).

d) Análisis de Regresión.

Considerando las mejores condiciones de estabilidad derivadas del análisis anterior, se presenta que, de conformidad con los días en que se espera tener 80% de concentración, la rosa de jamaica es mejor, ya que ofrece mayor estabilidad, sin embargo, lo que ocurre es que la concentración, en este caso, presenta mayor variación, lo cual se refleja en el intervalo de confianza que es muy amplio (Gráfica 16). Por otro lado, al observar el comportamiento del colorante Rojo No.40, se puede determinar que la mayor estabilidad se obtiene a pH 5 y 30°C, con un intervalo de confianza de al 95% que indica que la concentración disminuirá entre los días 30.30 a 35.13, (Gráfica 17, 18 y 19) por lo que podría considerarse este pH como el recomendado para este colorante al igual que en el caso de la rosa de jamaica.

Si se colocan las cuatro líneas de regresión lineal (condiciones óptimas de rosa de jamaica y Rojo No. 40), en un solo gráfico, se pueden observar las similitudes y diferencias entre el comportamiento de los cuatro sistemas (Gráfica 17). En conclusión, una vez establecidas las mejores condiciones de temperatura y pH, la rosa de jamaica presenta una estabilidad similar a la que tiene el colorante artificial Rojo No. 40, por lo que puede ser utilizada como alternativa de consumo de este, por lo que se confirma la hipótesis que se estableció inicialmente.

10. CONCLUSIONES

1. El pigmento principal, identificado por cromatografía en capa fina, se caracterizó por presentar una coloración azul-violeta a un Rf entre 0.25 y 0.5, éste es el responsable de las coloraciones rojizas características de los cálices de la rosa de jamaica y comúnmente se conoce como hibiscina.
2. Las muestras estudiadas de rosa de jamaica a 30°C y pH 4, 5 y 6; rosa de jamaica a 50°C y pH 4 y 5; Rojo No. 40 a 30°C y pH 4, 5 y 6; Rojo No. 40 a 50°C y pH 4, 5 y 6, mantuvieron la concentración por arriba del 80% de la concentración inicial, siendo la muestra de rosa de jamaica a 50°C y pH 6 la que disminuyó su concentración hasta un 78.58% al día 17 de observación.
3. Existe diferencia significativa entre la concentración del extracto de rosa de jamaica y Rojo No. 40 ($p < 0.00001$), siendo la rosa de jamaica la que tiende a tener menor concentración y mayor variabilidad.
4. Hay una diferencia significativa entre la concentración de las muestras sometidas a las diferentes temperaturas ($p < 0.00001$), siendo la variable temperatura de 30°C en donde se obtiene mayor concentración que a 50°C.
5. Existe diferencia significativa entre la concentración de las muestras en estudio, bajo las condiciones de pH ($p < 0.00001$), siendo el valor de pH 6 el que marca una diferencia significativa, comparado con los otros dos, en el cual la concentración es significativamente menor a las obtenidas con pH 4 y 5 ($p < 0.00001$).
6. Según la interacción entre pH y la concentración de las muestras el mejor pH, es el 5, tanto en la rosa de jamaica como en el colorante Rojo No.40.

7. Las combinaciones de los factores muestra-temperatura, muestra-pH, y muestra-temperatura-pH, presentan diferencias significativas o interacciones ($p < 0.0001$), con excepción de la combinación temperatura-pH que no presenta interacción ($p = 0.7175$).
8. El análisis estadístico por medio del modelo ANOVA, determinó que las condiciones óptimas de estabilidad para el colorante artificial Rojo No. 40 son a 30°C a cualquier pH y para la rosa de jamaica son a 30°C y pH 5.
9. Los colorantes presentes en la rosa de jamaica presentan una estabilidad similar a la que tiene el colorante artificial Rojo No. 40, por lo que puede ser utilizada como alternativa de consumo en sustitución de éste, por lo que se confirma la hipótesis establecida.

10. RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio de estabilidad por medio de un análisis a largo plazo, para determinar si existen cambios en la concentración para los factores que no fueron afectados por las variables de pH y temperatura.
2. Estudiar la estabilidad de los colorantes de la rosa de jamaica ya implementados como excipientes en preparados farmacéuticos o alimenticios y observar su comportamiento.
3. Analizar otros pigmentos presentes en la rosa de jamaica y establecer si estos pueden al mismo tiempo ser sustitutos de algún colorante artificial que contenga características similares en cuanto al color.
4. Estudiar la estabilidad de los colorantes de la rosa de jamaica comparados con otros colorantes artificiales como por ejemplo Rojo No.2, para observar si los pigmentos de la rosa de jamaica pueden también, ser sustitutos de estos.
5. Determinar las dosis tóxicas de los colorantes de la rosa de jamaica para establecer las cantidades mínimas y máximas que pueden ser consumidas si causar daño.
6. Debido al sabor fuertemente ácido de la rosa de jamaica que puede afectar algunos principios activos o componentes de preparados farmacéuticos, cosméticos o alimentos, es recomendable realizar estudios del comportamiento del mismo.

11. REFERENCIAS

1. MARMION, D. 1984. Handbook of U.S. colorants for foods, drugs and cosmetics. 2^a Ed. New York. John Wiley. 466 pp.
2. PLA, J. Ma. 1961. Colorantes sintéticos en bromatología y farmacia. Barcelona. Talleres Gráficos. 370 pp.
3. Alimentación Sana. Acerca de los Aditivos. Disponible en:
<http://www.alimentacionsana.com.ar/informaciones/novedades/aditivos2.htm>. Fecha de Consulta: 02 de febrero 2007.
4. UGAZ, O. 1997. Colorantes Naturales. Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 274 pp.
5. CALVO, M. Bioquímica de los Alimentos. Colorantes Artificiales. Disponible en:
<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/colorartif.html>. Fecha de Consulta: 02 de febrero 2007.
6. TREASE-EVANS. 1991. Farmacognosia. 13^a Ed. México. Interamericana McGraw-Hill. 472 pp.
7. MUÑOZ, O. et.al. 2003. Antocianos, colorantes naturales de aplicación industrial. Revista de Fitoterapia. Chile. 3(2): 147-152.
8. SATUÉ-GRACIA, M. 1997. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome System. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(9): 3362-3366.
9. CÁCERES, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal de Guatemala. Guatemala. Editorial Universitaria. Volumen I. Pág. 322-323.
10. ALONSO, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Argentina. Editorial Corpus. Pág. 592-596.
11. FITOTERAPIA: VEDEMECUM DE PRESCRIPCIÓN. 2003. 4^a Edición. Barcelona. Editorial Masson. Pág. 290-291.
12. STANDLEY AND STEYERMARK. 1949. Flora de Guatemala. Editorial Chicago Natural History Museum. v. 24: Parte VI. 457 pp.

13. FARMACOPEA HERBOLARIA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 2001. México. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Pp: 105.
14. ARTICHE, A. 1998. Fitoterapia; Vademecum de Prescripción de Plantas Medicinales. 3ª Ed. España. Masson. Pp: 259.
15. PRIOR, R. Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic and Anthocyan Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium Species*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46(7): 2686-2693.
16. LOGAN, H. 1973 Digestive disorders and plant medicinals in Highland Guatemala. Anthropos. 68:537-547.
17. GIRÓN L.M., Martínez V. 2001 Buenas Prácticas de Agricultura en el cultivo cosecha y post cosecha de plantas medicinales. Manual para el funcionamiento de formulario de plantas medicinales. Guatemala. Pp. 6-10.
18. DUARTE, E. 1983. Algunas Indicaciones para la Preservación de Plantas. Herbario de la Facultad de Agronomía. Publicación No. 1. Pp. 4,6 y 8.
19. LOT, A. y CHANG, F. 1986. Manual de Herbario. Departamento de Botánica, Consejo Nacional de la Flora de México. A.C. México. Pp. 123-128.
20. WAGNER, H. et. al. 1984. Plant Drug Analysis. Editorial Springer-Verlag. 290 p.
21. FULEKI, T.; and FRANCIS, F.J. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins Extraction and Determination of Total Anthocyanins in cranberries. Journal of Food Science. (33).
22. ZULIN, S. et.al. 1992. Quantitative Comparison of the Stability of Anthocyanins from *Bassica Oleracea* and *Tradescantia pallida* in Non-sugar Drink Model and Protein Model System. Journal of Food Science. 57(3).
23. BAUBLIS, A. et.a. 1994. Anthocyanin Pigments: Comparison of Extract Stability. Journal of Food Science. 59(6).
24. JOHN, G. 1976. Colour and Constitution of Organic Molecules. Academic Press. EE.UU.
25. GOODWIN, T. 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment. 2ª Ed. London. Academic Press Ed. v.2.
26. FUENTES, W. 2005. Extracción, Cuantificación y Estabilidad de Colorantes Naturales Presentes en los Frutos de *Prunus capuli* Cav. (cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (mora) y

Sambucus canadensis L. (saúco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales Rojo No. 40, Rojo No. 3 y Rojo No. 2, en bebidas en el rango de pH: 3,4 y 5. 75 p. Tesis Licenciado en Química. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química.

27. BARRIENTOS, R. 1993. Estabilidad Fisicoquímica de colorantes distribuidos en Guatemala utilizados en la manufactura de formas farmacéuticas líquidas. Tesis Licenciado en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.

28. ESCOBAR, M. 1992. Identificación de colorantes en formas farmacéuticas líquidas (jarabes) distribuidos en la Ciudad de Guatemala. Tesis Licenciado en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.

12. ANEXOS

Tabla A
Propiedades de las antocianidinas comunes

Antocianidina	Forestal	Fórmico	Rf(x100) BAW	Color Visible	$\lambda_{\text{máx}}$, nm en MeOH-HCl
Pelargonidina	68	33	80	Rojo	530
Cianidina	49		68	Magenta	535
Peonidina	63	30	71	Magenta	532
Delfinidina	32	13	42	Púrpura	546
Petunidina	46	20	52	Púrpura	543
Malvidina	60	27	58	Púrpura	542

Tabla B
Propiedades de las antocianinas comunes

Antocianina	BAW	BuHCl	Rf(x100) HOAcHCl	1%HCl	$\lambda_{\text{máx}}$, nm en MeOH-HCl
Pelargonidin-					
3-glucósido	44	38	35	14	506
3,5-diglucósido	31	14	45	23	504
5-glucósido	51	49	57	18	513
Cianidin-					
3-glucósido	38	25	42	07	523
3,5-glucósido	28	06	40	16	522
3-galactósido	37	24	26	07	
Malvidin-					
3-glucósido	38	15	29	06	534
3-galactósido	36	15	29	06	
3,5-diglucósido	31	03	61	34	

Tabla C
Algunos ejemplos de antocianinas y su ocurrencia natural

Nombre científico/Nombre común/Ocurrencia	Antocianidinas o Antocianinas presentes
Allium cepa/cebolla/bulbos	Cy 3-glucósido, 3-laminaribiosido
Cyphomandra betaceae/berenjena/cáscara	Cy, Pn, Dp 3- glucósido
Citrus sinensis/naranja/cáscara	Cy y Dp 3-glucósido
Ipomea batatas/camote/raíces	Cy y Pn 3-(dicafeil soforósido)-5-glucósido
Malus pumila/manzana/cáscara	Cy 3-glucósido, 3-xilósido, 3-galactósido, 3- y 7-arabinósidos; libres y acilados
Olea europea/aceituna/frutos	Cy 3-glucósido
Passiflora edulis/maracuyá/frutos	Cy 3-glucósido
Prunus avium/cereza/frutos	Cy, Pn 3-glucósidos y 3-rutinósidos
Sambucus nigra/saúco/frutos	Cy 3(2-1-xilosilglucósido), sambucianina
Zea mays/maíz morada/mazorca	Cy, Pg y Pn 3-glucósidos, Cy 3-galactósido, libres y acilados

Muestra de rosa de jamaica colectada en Jacaltenango, Huehuetenango e Identificada en la Unidad de Investigación Herbario



Herbario BIGU
Flora de Guatemala
Escuela de Biología, USAC

Hibiscus sabdariffa L.

MALVACEAE

GUATEMALA, Huehuetenango, Jacaltenango.
Altitud 1600 msnm

Hierba erecta de 1-2 metros de alto. Tallos rojo oscuros, glabros. Cáliz formando una copa roja, larga y carnososa.
Col. P. Rojas. IV/2006.



HERBARIO BIGU

Escuela de Biología
Facultad de C.C.Q.Q y Farmacia

Guatemala, 09 de Mayo de 2006.

A quien interese:

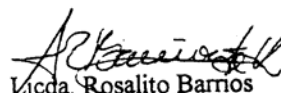
Por medio de la presente hago constar que la Br. Irma Lucía Arriaga Tórtola, estudiante de la carrera de Química Farmacéutica, depositó en la colección del Herbario BIGU, un ejemplar de *Hibiscus sabdariffa* L., al cual se le asignó el número de registro 33815 de la colección de referencia de la Unidad de Investigación Herbario BIGU. Esta muestra constituye material de respaldo de su proyecto de tesis de título "Caracterización, extracción y estabilidad de los pigmentos antocianicos de *Hibiscus sabdariffa* L., como alternativa de consumo de los colorantes artificiales".

Y para los usos que a la interesada convengan, extiendo, sello y firmo la presente a los nueve días del mes de mayo del año en curso.

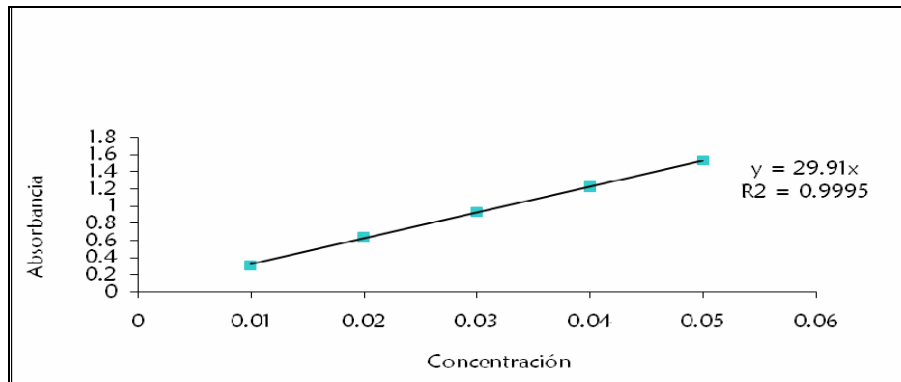
Atentamente,



"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Licda. Rosalito Barrios
Asistente Herbario BIGU

Gráfica A
Curva de Calibración utilizando estándar de Rojo No.40



Ecuación utilizada para encontrar la concentración de las muestras

$$y = a + bx$$

En donde:

y = absorbancia

x = concentración

a = 0.0287

b = 29.91

Por ejemplo: En el día 12 se midió la absorbancia de la rosa de jamaica (50°C y pH 4) la cual fue de 0.488, la concentración se calcula así:

$$0.488 = 0.0284 + 29.91x$$

$$\frac{0.488 - 0.0284}{29.91} = x$$

$$0.0154 = x$$

Gráfica B

Comportamiento de las respuestas a través del tiempo por medio de la cual se determinó (por sus características) que el decaimiento es lineal y por lo tanto da base para el análisis de regresión

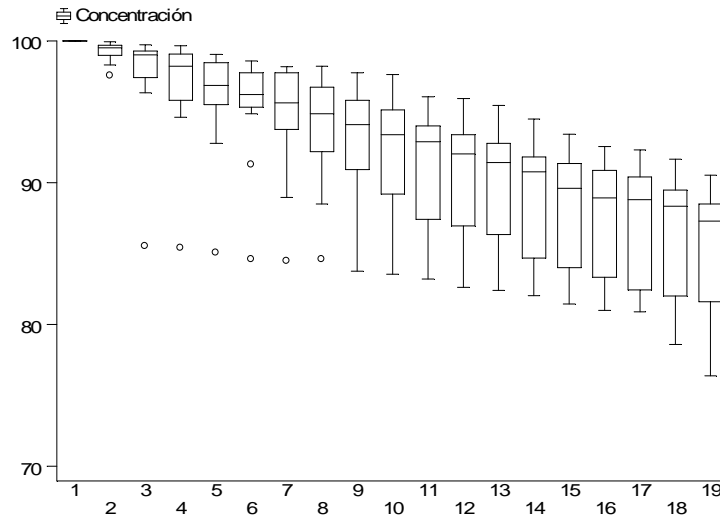
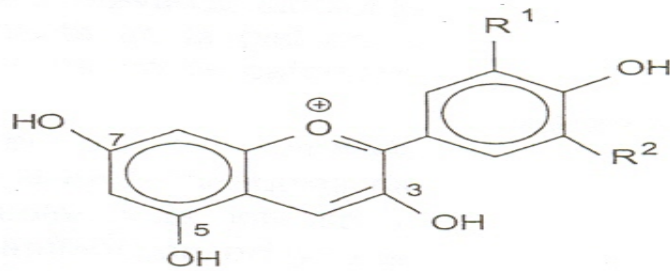
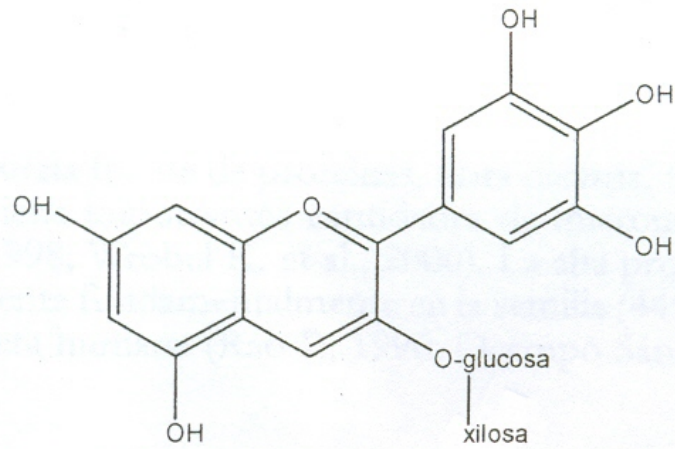


Figura 1
Antocianidinas presentes en la naturaleza



	R ¹	R ²
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 2
Estructura química del pigmento rojizo característico
de la rosa de jamaica



hibiscina

