



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“APLICACIÓN DE PIGMENTOS BIOACTIVOS DE *Justicia*  
*spicigera* EN UN PRODUCTO ALIMENTICIO”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**GABRIELA BAHENA MADRID**

**ASESORA**

**DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES**

**COASESOR**

**DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**

# Índice

|                                                                      |          |
|----------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>RESUMEN .....</b>                                                 | <b>1</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                            | <b>3</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO.....</b>                                 | <b>6</b> |
| 1.1 COLOR.....                                                       | 7        |
| 1.2 COLORANTES.....                                                  | 7        |
| 1.2.1 Clasificación de los colorantes .....                          | 8        |
| 1.2.2 Colorantes naturales .....                                     | 8        |
| 1.2.2.1 Derivados heterocíclicos de nitrógeno: betalainas .....      | 10       |
| 1.2.2.2 Derivados isoprenoides: carotenoides .....                   | 12       |
| 1.2.2.3 Derivados de pirrol: clorofilas .....                        | 14       |
| 1.2.2.4 Derivados de flavonoides: antocianinas .....                 | 15       |
| 1.2.2.4.1 Factores que determinan el color de las antocianinas ..... | 17       |
| 1.2.2.4.2 Capacidad antioxidante de las antocianinas.....            | 20       |
| 1.2.2.4.2.1 Capacidad antioxidante.....                              | 21       |
| 1.2.2.4.3 Cuantificación de antocianinas .....                       | 23       |
| 1.3 MEDICIÓN DE COLOR .....                                          | 23       |
| 1.4 GENERALIDADES DEL MUTILLE ( <i>Justicia spicigera</i> ) .....    | 26       |
| 1.4.1 Origen y distribución.....                                     | 27       |
| 1.4.2 Taxonomía.....                                                 | 27       |
| 1.4.3 Características botánicas .....                                | 28       |
| 1.4.4 Compuestos químicos .....                                      | 29       |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.4.5 Aplicaciones del muiltle .....                                                      | 30        |
| 1.5 GELATINA .....                                                                        | 31        |
| <b>CAPÍTULO 2 OBJETIVOS .....</b>                                                         | <b>32</b> |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL .....                                                                | 33        |
| 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....                                                          | 33        |
| <b>CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN .....</b>                                                     | <b>34</b> |
| <b>CAPÍTULO 4 HIPÓTESIS .....</b>                                                         | <b>36</b> |
| <b>CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                               | <b>38</b> |
| 5.1 MATERIALES .....                                                                      | 39        |
| 5.2 MATERIAL VEGETAL .....                                                                | 39        |
| 5.3 MÉTODOS .....                                                                         | 39        |
| 5.3.1 Procesamiento de la muestra .....                                                   | 39        |
| 5.3.2 Obtención de extractos .....                                                        | 39        |
| 5.3.3 Medición de pH de los extractos .....                                               | 40        |
| 5.3.4 Caracterización química de los extractos de <i>Justicia spicigera</i> .....         | 40        |
| 5.3.4.1 Cuantificación de fenoles totales .....                                           | 40        |
| 5.3.4.2 Cuantificación de flavonoides .....                                               | 40        |
| 5.3.4.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico ..... | 41        |
| 5.3.4.4 Determinación de actividad antioxidante por DPPH.....                             | 43        |
| 5.3.5 Determinación de color por colorimetría .....                                       | 43        |
| 5.3.6 Evaluación del efecto del pH en los extractos.....                                  | 43        |
| 5.3.7 Secado de los pigmentos bioactivos.....                                             | 44        |
| 5.3.7.1 Rendimiento de la extracción de los pigmentos .....                               | 44        |
| 5.3.7.2 Caracterización química de los pigmentos .....                                    | 45        |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3.7.3 Determinación de color por colorimetría .....                                     | 45        |
| 5.3.8 Aplicación de los pigmentos en un producto alimenticio .....                        | 45        |
| 5.3.8.1 Evaluación de la estabilidad del color en gelatina .....                          | 45        |
| 5.3.8.2 Prueba hedónica de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos             | 46        |
| 5.3.9 Análisis estadístico .....                                                          | 47        |
| <b>CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                             | <b>48</b> |
| 6.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>Justicia spicigera</i> .....           | 49        |
| 6.1.1 Cuantificación de fenoles totales.....                                              | 49        |
| 6.1.2 Cuantificación de flavonoides .....                                                 | 51        |
| 6.1.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas .....                      | 52        |
| 6.1.4 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH .....                             | 53        |
| 6.2 MEDICIÓN Y EVALUACIÓN DEL PH EN LOS EXTRACTOS .....                                   | 55        |
| 6.3 MEDICIÓN DE COLOR POR COLORIMETRIA .....                                              | 57        |
| 6.4 PIGMENTO BIOACTIVO .....                                                              | 58        |
| 6.4.1 Caracterización química de los pigmentos.....                                       | 59        |
| 6.4.1.1 Cuantificación de fenoles totales .....                                           | 59        |
| 6.4.1.2 Cuantificación de flavonoides .....                                               | 60        |
| 6.4.1.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico ..... | 60        |
| 6.4.1.4 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH.....                            | 62        |
| 6.4.2 Medición de color por colorimetría.....                                             | 63        |
| 6.4.3 Rendimiento de pigmentos.....                                                       | 64        |
| 6.4.4 Estabilidad del color en la gelatina .....                                          | 65        |
| 6.4.5 Prueba hedónica de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos .....         | 69        |
| <b>CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES .....</b>                                                      | <b>72</b> |

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS.....</b>                     | <b>74</b> |
| <b>CAPÍTULO 9 REFERENCIAS .....</b>                     | <b>76</b> |
| <b>CAPÍTULO 10 ANEXOS .....</b>                         | <b>90</b> |
| Anexo 1. Cuantificación de compuestos fenólicos.....    | 91        |
| Anexo 2. Cuantificación de flavonoides.....             | 92        |
| Anexo 3. Cuantificación de capacidad antioxidante ..... | 93        |

## Índice de tablas

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Justicia spicigera</i> . ....                                                                          | 28 |
| <b>Tabla 2.</b> Contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante en extractos de <i>J. spicigera</i> .....               | 50 |
| <b>Tabla 3.</b> Contenido de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico de <i>J. spicigera</i> .....                                   | 52 |
| <b>Tabla 4.</b> Medición de color de los extractos de <i>J. spicigera</i> por colorimetría .....                                                      | 57 |
| <b>Tabla 5.</b> Contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante en extractos seleccionados de <i>J. spicigera</i> ..... | 60 |
| <b>Tabla 6.</b> Contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en extractos de <i>J. spicigera</i> .....                                         | 61 |
| <b>Tabla 7.</b> Parámetros de color de los extractos morado y magenta de <i>J. spicigera</i> por colorimetría.....                                    | 63 |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ruta biosintética de betalainas (Polturak et al., 2016).....                                                                                                                                                                         | 12 |
| <b>Figura 2 .</b> Estructura de flavonoides y sus tipos (Martínez-Flórez et al., 2002). ....                                                                                                                                                          | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Cualidades del color a) matiz (hue), b) brillo, c) chroma (Tintometer Group, 2020).....                                                                                                                                              | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Representación del sistema CIELab (Konica Minolta, 2020) .....                                                                                                                                                                       | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Flores y hojas de Justicia spicigera (MXCITY, 2020) .....                                                                                                                                                                            | 29 |
| <b>Figura 6.</b> Boleta basada en la prueba hedónica de 9 puntos para evaluar los atributos sensoriales de gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos .....                                                                                       | 47 |
| <b>Figura 7.</b> Extractos de muitle bajo tres diferentes solventes a) agua, b) etanol-agua y c) etanol.....                                                                                                                                          | 49 |
| <b>Figura 8.</b> Barrido de pH 2 a 12 en extractos acuosos de muitle. ....                                                                                                                                                                            | 55 |
| <b>Figura 9.</b> Barrido de pH de 2 a 12 en extractos hidroetanólico de muitle .....                                                                                                                                                                  | 56 |
| <b>Figura 10.</b> Barrido de pH 2 a 12 en extractos etanólico de muitle. ....                                                                                                                                                                         | 56 |
| <b>Figura 11.</b> Extractos seleccionados de muitle a) acuoso y b) etanólico-acuoso para su aplicación en productos alimenticios.....                                                                                                                 | 59 |
| <b>Figura 12.</b> Gelatina adicionada con a) pigmento bioactivo morado extraído de muitle, GMOM, b) colorante comercial morado, GMOC y c) pigmento bioactivo magenta extraído de muitle, GMAM .....                                                   | 65 |
| <b>Figura 13.</b> Cinética de estabilidad de la coordenada L* en gelatinas adicionadas con pigmentos ..                                                                                                                                               | 66 |
| <b>Figura 14.</b> Cinética de estabilidad de la coordenada a* en gelatinas adicionadas con pigmentos ...                                                                                                                                              | 67 |
| <b>Figura 15.</b> Cinética de estabilidad de la coordenada b* en gelatinas adicionadas con pigmentos...                                                                                                                                               | 68 |
| <b>Figura 16.</b> Estabilidad del cambio de color total de gelatinas adicionadas con pigmento .....                                                                                                                                                   | 69 |
| <b>Figura 17.</b> Gráfico radial de los puntajes obtenidos en la prueba hedónica de gelatinas adicionadas con pigmento: morado a partir de muitle (GMOM), morado comercial (GMOC), magenta a partir de muitle (GMAM) y magenta comercial (GMAC) ..... | 70 |
| <b>Figura 18.</b> Gráfico de porcentaje de aceptación de gelatinas adicionadas con pigmentos.....                                                                                                                                                     | 71 |
| <b>Figura 19.</b> Curva patrón de ácido gálico .....                                                                                                                                                                                                  | 91 |
| <b>Figura 20.</b> Curva patrón de quercetina.....                                                                                                                                                                                                     | 92 |
| <b>Figura 21.</b> Curva patrón de Trolox.....                                                                                                                                                                                                         | 93 |

## RESUMEN

*Justicia spicigera* también conocida como muitle o muicle, es una planta nativa de México perteneciente a la familia de las Acantáceas (Acanthaceae) (Martinez, 1992), ha sido utilizada en México desde la época prehispánica en la medicina tradicional y como pigmento para elaborar artesanías y pinturas (Gomez-Verjan et al., 2012; Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltran, 2014).

Las hojas del muitle son utilizadas para tratar la disentería, fiebre, diarrea (Jacobo-Salcedo et al., 2011), dengue (Anaya-Esparza et al., 2018), trastornos intestinales como vómito, náuseas y dolor de estómago, reduce los niveles de azúcar en sangre en pacientes con diabetes (Euler & Alam, 1982; Navarrete-Mora et al., 2016). También han sido empleadas para teñir de color morado artesanías y textiles (Espinosa-Morales et al., 2012). Debido a su capacidad de teñir, se eligió a esta planta como fuente de pigmento bioactivo.

Se obtuvieron extractos a partir de las hojas de *J. spicigera* con tres diferentes solventes: agua, etanol-agua y etanol. La extracción se realizó con agitación mecánica a 30°C durante 20 min. Se cuantificaron los compuestos bioactivos de los extractos (compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico) y se determinó su capacidad antioxidante. Se evaluó el color de los extractos.

El extracto hidroetanólico fue el que presentó una mayor concentración de fenoles ( $2.16 \pm 0.03$  GAE/100g), antocianinas monoméricas ( $363.07 \pm 0.42$  mg/100g), porcentaje de color polimérico ( $64.89 \pm 1.72$ ) y una mayor capacidad antioxidante ( $4.56 \pm 0.10$  gTE/100g). El mayor contenido de flavonoides se encontró en el extracto acuoso ( $0.49 \pm 0.01$  gEQ/100g).

Se midió el pH de los extractos y se evaluó el color mediante un barrido de pH de 2 a 12. Posteriormente, se seleccionaron los extractos que presentaron tonalidad morada y magenta, provenientes del solvente acuoso e hidroetanólico, respectivamente; se ajustó el pH a 7 y se caracterizaron. Finalmente, los extractos se liofilizaron, se aplicaron en un producto alimenticio (gelatina) y se evaluó la estabilidad del pigmento durante 23 días. Se utilizó como control una gelatina elaborada con pigmento morado comercial.

El control presentó una mayor estabilidad en comparación con las gelatinas con pigmento de *J. spicigera*, no obstante, no se observaron diferencias visibles durante el periodo de almacenamiento.

Asimismo, se realizó una prueba hedónica, donde se evaluaron cuatro atributos (color, olor, sabor y textura). La gelatina con pigmento comercial morado obtuvo un mayor puntaje en el atributo de color (7.85). La gelatina con pigmento morado de muitle presentó un mayor puntaje en el atributo olor (6.95) y sabor (7.7). En el atributo textura, las gelatinas con pigmento de muitle tuvieron el mayor puntaje (7.95).

La gelatina con pigmento magenta obtuvo una aceptación de 83.75%, al igual que el pigmento comercial. La gelatina con pigmento morado de muitle obtuvo una aceptación de 88.75%, incluso mayor a la obtenida con pigmento comercial, siendo una buena alternativa al uso de colorantes sintéticos

# INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha incrementado el interés por ingredientes y/o aditivos naturales en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos como alternativa a los sintéticos, debido a los potenciales efectos nocivos asociados a su consumo. Uno de los ingredientes o aditivos más utilizados en la industria son los pigmentos. Siendo el color, el que desempeña un papel importante en el éxito de los productos alimenticios en el mercado (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017).

Si bien, la sustitución de pigmentos sintéticos por naturales es para evitar sus efectos adversos, los pigmentos naturales además poseen beneficios a la salud humana a corto y largo plazo (Sezgin & Ayyıldız, 2017).

La mayoría de las fuentes naturales de pigmento se obtienen a partir de plantas, el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles son las antocianinas, las cuales son extraídas a partir de la cáscara y extracto de uva, col morada, rábanos y diferentes variedades de bayas (Wrolstad, 2004). Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, que son responsables del color morado, azul y rojo de las plantas (Bendokas et al., 2020). Estos compuestos son solubles en agua, su estabilidad depende de muchos factores como luz, temperatura, oxígeno, iones metálicos y pH. El color de las antocianinas depende del pH de la solución en la que se encuentre (Khoo et al., 2017).

*Justicia spicigera* o mejor conocida como muitle o muicle es una de las plantas consideradas con gran potencial como fuente de fitoquímicos. Posee un contenido significativo de antocianinas con actividad antioxidante. Es nativa de países de Latinoamérica, pertenece a la familia de las Acanthaceae, se cultiva en climas cálidos, pero puede soportar temperaturas frías (-3°C). Es considerada con gran potencial como fuente de fitoquímicos debido a su contenido de antocianinas con actividad antioxidante, dicha actividad es empleada como determinante al valorar la calidad de un alimento y la cantidad de antioxidantes en un sistema (López-Alarcón & Denicolab, 2013; Gulcin, 2020).

En virtud de su alto contenido de fitoquímicos y capacidad tintórea, un nuevo campo de investigación se basa en la extracción de sus compuestos y la aplicación de ellos como colorantes naturales en diversos productos industriales (Castro-Muñoz et al., 2022).

En función de lo anterior, en este trabajo se propuso realizar una extracción de pigmentos bioactivos a partir de las hojas de *J. spicigera*, evaluar sus tonalidades con diferentes solventes y bajo diferentes pH.. Así como su aplicación en un producto alimenticio.

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

## **1.1 COLOR**

La sensación de color se produce cuando los rayos de luz de cierta frecuencia y longitud de onda inciden en la retina del ojo humano, y a su vez la retina transforma esta sensación en una señal nerviosa que se transmite a nuestro cerebro y es así como percibimos el color (Figura & Teixeira, 2007).

El ojo humano puede identificar la radiación de luz dentro del rango del espectro visible, este comprende longitudes de onda entre 380 y 740nm, hacia la longitud de onda superior es rojo y hacia la longitud de onda inferior es azul (Attokaran, 2011).

El color es una propiedad organoléptica que puede evaluarse a través del sentido de la vista. Es una de las principales cualidades que el consumidor juzga de un producto y realiza una preferencia a aquellos productos de apariencia más atractiva (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014), el color es un factor importante en la aceptabilidad de los productos. En el caso de los alimentos, los humanos relacionan el sabor con determinados colores, por lo que variaciones del color pueden afectar el sabor de los alimentos de manera psicológica (Uchegbu et al., 2020).

## **1.2 COLORANTES**

Los colorantes son aquellas sustancias que tienen la capacidad de teñir otras superficies (Yagub et al., 2014; Rai et al., 2005). De acuerdo con la NOM-119-SSA1-1994 los colorantes son aquellos materiales que imparten color a otro material o mezcla y son obtenidos de una fuente animal, vegetal o mineral.

En la industria alimentaria los colorantes son considerados como un tipo de aditivos alimentarios. El Codex Alimentarius define a los aditivos como “cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no tenga valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o

pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte sus características”.

Uno de los motivos por los cuales se emplean aditivos de color en los alimentos es para: poder igualar el color que llega a ser degradado debido a la exposición a la luz, temperaturas extremas, humedad y aire; mejorar o realzar los colores que posee el producto de manera natural y proporcionar color a alimentos incoloros (FDA y IFIC, 2020).

### **1.2.1 Clasificación de los colorantes**

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) clasifica a los colorantes alimentarios como certificados o exentos de certificación. Los colorantes certificados son aquellos que se sintetizan de manera química, en ellos se deben realizar ensayos de identidad, así como la evaluación de su pureza (Sigurdson et al., 2017). Los colorantes exentos de certificación son los naturales, pueden ser utilizados sin ninguna restricción (Marcano, 2018).

Sin embargo, también pueden ser clasificados de acuerdo a su origen como naturales o sintéticos (Haluen et al., 2019).

### **1.2.2 Colorantes naturales**

Los colorantes naturales han sido empleados desde 2600 a. C y continúan siendo utilizados en todo el mundo (Sezgin & Ayyıldız, 2017). Los pueblos de América Central y del Norte, fueron los primeros en extraer el pigmento cochinilla a partir de insectos comestibles (Uchegbu et al., 2020).

Se han divulgado los beneficios a la salud que poseen los colorantes naturales a corto y largo plazo, de manera que resultan de gran interés para los consumidores y esto ha generado que su comercialización vaya en aumento. Cabe mencionar que los consumidores asocian a los colorantes naturales como ingredientes más seguros que los colorantes sintéticos (Sezgin & Ayyıldız, 2017). Los colorantes naturales tienen efectos benéficos para la salud humana,

como ejemplo de ellos se encuentran los carotenoides, los cuales tienen propiedades antioxidantes y son empleados como suplementos dietéticos puesto que el  $\beta$ - caroteno es el precursor de la vitamina A. Por otro lado, los flavonoides actúan como antioxidantes al inhibir la citotoxicidad por radicales libres y peroxidación de lípidos, además se ha reportado que tienen efectos antimutagénicos. La ingesta de flavonoides como la quercetina tiene un efecto protector ante enfermedades cardiovasculares y hepáticas (Uchegbu et al., 2020).

Por el contrario, se han generado inconformidades sobre los colorantes sintéticos basado en los efectos secundarios a los que se han asociado, hiperactividad en niños, alergias, asma, cáncer, entre otros. Esto ha incitado a buscar alternativas como el uso de colorantes de origen natural (Downham & Collins, 2000; Uchegbu et al., 2020).

Los colorantes naturales tienen diversas aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, indicadores de pH, colorantes alimentarios, tinciones histológicas, teñidos y acabados textiles (Yusuf , Shabbir et al., 2017). Los más utilizados en la industria alimentaria son la curcumina, carbón vegetal, caramelo, clorofila, cochinilla, betalaínas, antocianinas y carotenoides. Son aplicados en productos lácteos como postres, helados, confitería, mostazas, aceites, productos horneados, gelatinas, mermeladas, bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Uchegbu et al., 2020).

Los colorantes naturales pueden ser clasificados según su origen, es decir, la fuente a partir de la cual son extraídos como lo son plantas, animales, minerales y microorganismos (Sigurdson et al., 2017). Siendo las plantas, la principal fuente a partir de las cuales se extraen y en menor medida los insectos, algas, hongos y bacterias (Solymosi et al., 2015). La segunda clasificación se basa en el método de extracción: extracción acuosa, ultrasónica, con disolventes, ácido/alcalina, enzimática, por fermentación, con fluidos supercríticos y asistida por microondas (Uchegbu et al., 2020). La tercera forma de clasificarlos es acorde a su naturaleza química, es decir, de acuerdo con su estructura, composición y propiedades (Lock, 1997). Sigurdson et al., (2017) clasificaron a los colorantes naturales en cuatro grupos principales:

#### **1. Derivados heterocíclicos de nitrógeno: betalaínas.**

2. Derivados isoprenoides: carotenoides.
3. Derivados de pirrol: clorofilas.
4. Derivados de flavonoides: antocianinas.

#### **1.2.2.1 Derivados heterocíclicos de nitrógeno: betalaínas**

Los compuestos N-heterocíclicos o bien heterocíclicos de nitrógeno son compuestos formados por carbono e hidrógeno y otro átomo denominado como heteroátomo, en este caso es el nitrógeno. Los pigmentos N-heterocíclicos se dividen en betalaínas, purinas, pterinas, flavinas, fenazinas y fenoxazinas. Las betalaínas son el grupo más importante de los heterocíclicos de nitrógeno (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003).

Las betalaínas se producen a partir de derivados imonio del ácido betalámico condensado con una amina primaria o secundaria (Figura 1.) (Fennema, 2000; Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Son solubles en compuestos polares como el agua, se encuentran en las vacuolas de las células vegetales, aunque también existen reportes de que se han encontrado en hongos (Stinzing & Carle, 2007; Ngamwonglumlert et al., 2017; Solymosi et al., 2015).

Los pigmentos son extraídos de raíces de betabel amarilla y roja, flores de amaranto y frutos de cactus. Son aplicados en la industria farmacéutica, alimentaria y en menor frecuencia en la industria textil (Halue et al., 2019). El color es atribuido a sus dobles enlaces resonantes (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003).

Son estables en un pH de 3 a 7. En su mayoría el color de las betalaínas es independiente del valor de pH en el cual se encuentren, los factores que modifican su estabilidad son la temperatura, luz, actividad de agua y oxígeno (Sigurdson et al., 2017). El aumento de temperatura provoca una oxidación a las betalaínas y por consecuencia hay un cambio de color (Ngamwonglumlert et al., 2017).

Las betalainas se clasifican en betacianinas y betaxantinas, dan lugar a los colores rojo-violeta y amarillo-naranja respectivamente (Rodríguez-Amaya, 2016).

#### *a) Betacianinas*

Las betacianinas se producen a partir de la condensación del grupo imonio del ciclo-DOPA con el ácido betalámico (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003). Poseen un máximo de absorción a 538 nm (Solymosi et al., 2015). Las betanidinas son el aglicón precursor de las betacianinas, se produce condensando el ácido betalámico con el ciclo-dopa (Figura 1.), las betanidinas pueden estar glicosiladas y/o aciladas, otro aglicón común es la isobentanidina (Stinzing & Carle, 2007). La diversidad de betacianinas se debe a la combinación de las agliconas con grupos glucosilo y acilo, que están unidos por los grupos hidroxilo. La glucosa es el grupo glicósido más frecuente seguido por la soforosa y ramnosa. El ácido sulfuro, malónico, cítrico, p-cumárico, ferúlico entre otros, son los grupos acilos más comunes (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003, Jackman & Smith, 1996).

Dentro de las betacianinas, la más común es la betanina y se encuentra en el betabel. El betabel deshidratado es empleado como un colorante, aprobado por la FDA (Rodríguez-Amaya, 2016; Badui, 2006).

#### *b) Betaxantinas*

Absorben luz a 480nm y dan lugar al color amarillo (Solymosi et al., 2015). La condensación del ácido betalámico con el grupo imonio o amino de aminoácidos da lugar a las betaxantinas (Figura 1). La conjugación de varios compuestos de amina, tales como los aminoácidos con el mismo resto de hidropiridina se forman la gran diversidad de betaxantinas (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003).

Las betacianinas disponen de un grupo glicósido y las betaxantinas un grupo indol (Marañón-Ruiz et al., 2011). Las betacianinas son más estables que las betaxantinas a causa de sus dobles y simples enlaces, los cuales tienen una conjugación más extendida y de ahí su

coloración más roja (Marcano, 2018). Las betaxantinas son más estables en pH neutros y las betacianinas en medios ácidos (Stinzing & Carle, 2007).

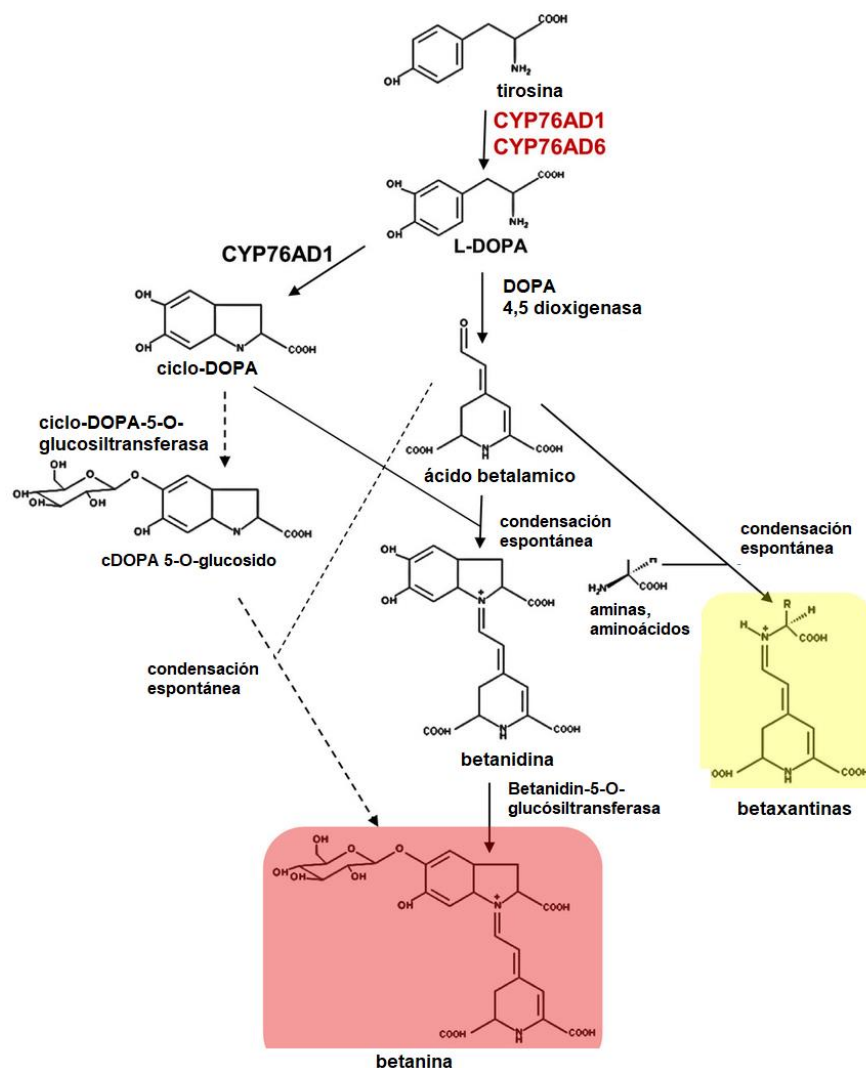


**Figura 1.** Ruta biosintética de betalainas (Polturak et al., 2016).

### 1.2.2.2 Derivados isoprenoides: carotenoides

Los terpenos se forman por unidades de isopreno, diversos autores definen a los terpenos como monoterpenos exclusivamente y al grupo en general como terpenoides (Yúfera, 1995). Los terpenoides también conocidos como isoprenoides poseen dos subgrupos considerados como pigmentos: carotenoides, quinonas y el subgrupo más reciente, los iridoides (Delgado-Vargas et al., 2000).

Los carotenoides son compuestos orgánicos, denominados colorantes poliénicos. Están constituidos por una cadena alifática con grupos metilo, un cromóforo con dobles enlaces conjugados y 8 unidades de isopreno, su esqueleto es de 40 átomos de carbono (Mínguez-Mosquera et al., 2005; Yúfera, 1995). Se consideran tetraterpenoides, sus unidades de isoprenoides se encuentran unidas de cabeza a cola, pueden ser, monocíclicos o dicíclicos (Sigurdson et al., 2017). Los carotenoides absorben luz a 500-400nm del espectro, dando lugar a colores amarillos, rojos y naranjas (Yusuf et al., 2017).

Los carotenoides se clasifican por su estructura química como: (1) carotenos que están constituidos por carbono e hidrógeno; (2) oxicarotenoides o xantofilas que tienen carbono, hidrógeno y, además, oxígeno. Además, los carotenoides se han clasificado como primarios o secundarios. Los carotenoides primarios agrupan aquellos compuestos requeridos por las plantas en la fotosíntesis ( $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina), mientras que los carotenoides secundarios se localizan en frutos y flores ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsantina, capsorubina). Los carotenoides son menos solubles en etanol debido a que no poseen el grupo hidroxilo que contienen las xantófilas (MacDougall, 2002; Ngamwonglumlert et al., 2017).

Las plantas y organismos fotosintéticos son los únicos capaces de sintetizar carotenoides, se ubican en los cloroplastos y cromoplastos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en las hojas, frutos, flores, tejidos animales y grasas animales, los primeros carotenoides que se identificaron fueron en las zanahorias (Yusuf et al., 2017).

Los carotenoides son utilizados como colorantes alimentarios, cosméticos y farmacéuticos. No obstante, desempeñan funciones importantes en la nutrición y salud humana; suministrando provitamina A al cuerpo y teniendo actividades anticancerígenas; en plantas, efectuando funciones fotoprotectoras y suministrando sustratos para la biosíntesis del ácido abscísico (Tanaka et al., 2008). Los carotenoides más conocidos son  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina, estos están presentes en los alimentos (Rodríguez-Amaya, 2016).

### **1.2.2.3 Derivados de pirrol: clorofilas**

Los pirroles constan de un anillo de cinco partes, cuatro átomos de carbono y uno de nitrógeno (Sigurdson et al., 2017). Son compuestos heterocíclicos aromáticos. La unión de cuatro pirroles en una estructura lineal se denomina, tetrapirroles lineales y al condensarse forman un macrociclo que se denomina como tetrapirroles cíclicos, la bilina y el anillo de porfirina son las estructuras básicas respectivas de cada compuesto (Solymosi et al., 2015; Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003).

El tetrapirrol lineal más importante es el fitocromo de color rojo, seguido de la ficocianina y ficoeritrina. Dentro de los compuestos tetrapirroles cíclicos, el más importante es la clorofila seguido de los pigmentos hemo (Sigurdson et al., 2017; Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003).

La clorofila se compone de un anillo de porfirina (tetrapirrol) con la unión de fitol y iones de magnesio (Sigurdson et al., 2017). Las clorofilas naturales se localizan en los cloroplastos de las plantas verdes y en las algas. Son empleados en cosméticos. Están constituidas por un núcleo porfirínico con un átomo de magnesio coordinado y una fracción del ácido propiónico esterificado con fitol (Marcano, 2018). Son compuestos solubles en aceites, dan el color característico verde de las plantas. Son sensibles al calor, oxígeno, luz, ácidos y enzimas. En medios ácidos producen la pérdida del átomo de magnesio en las clorofilas, con la sustitución de hidrógeno provocando un cambio a color marrón. La temperatura causa de manera indirecta cambios estructurales de las clorofilas, que consecuentemente lleva un cambio de color (Ngamwonglumlert et al., 2017).

De manera natural se encuentra como una mezcla de clorofila A y B. La clorofila A contiene un grupo metilo en la posición 3, y la clorofila B un grupo formilo (Marcano, 2018). La clorofila A es menos estable, presenta un color más azul que la variante B (Humphrey, 2004).

En la industria se extraen las clorofilas a partir de espinacas, alfalfa, ortigas, etc., se eliminan los carotenoides, ceras y grasas (Marcano, 2018).

En los grupos hemo, el anillo de porfirina se encuentra unido a un metal como hierro, cobre o vanadio. Los grupos hemo se encuentran en la hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidasas, catalasas y vitamina B12 (Delgado-Vargas, Jiménez , & Paredes-López , 2000).

#### **1.2.2.4 Derivados de flavonoides: antocianinas**

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos caracterizados por poseer dos anillos aromáticos bencénicos (anillo A y B) unidos a un puente de tres átomos de carbono, los cuales pueden establecer un tercer anillo (anillo C pirano), formando finalmente un núcleo fenil-2-benzopirona su estructura general es C6-C3-C6 (Solymosi et al., 2015; Cartaya & Reynaldo, 2001; Wang, Li , & Bi, 2018). Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas vasculares, su función es importante para el buen funcionamiento de las plantas, así como durante su desarrollo. Los flavonoides naturales generalmente, exhiben tres hidroxilos fenólicos y se encuentran combinados con azúcares en forma de glicósidos o bien como agliconas libres (sin el azúcar), aunque de esta forma se encuentran en menor proporción (Cartaya & Reynaldo, 2001). Poseen actividad antioxidante, la cual se debe a su acción quelante sobre iones y a la actividad óxido reductora de los grupos hidroxifenólicos. Los flavonoides tienen efectos terapéuticos en un número elevado de patologías como cardiopatía isquémica y aterosclerosis (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides pueden clasificarse de acuerdo a su estructura en (Figura 2):

1. Flavanos, con un grupo OH en la posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo OH en la posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, poseen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en la posición C3.
4. Antocianidinas, tienen unido el grupo OH en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez-Flórez et al., 2002).

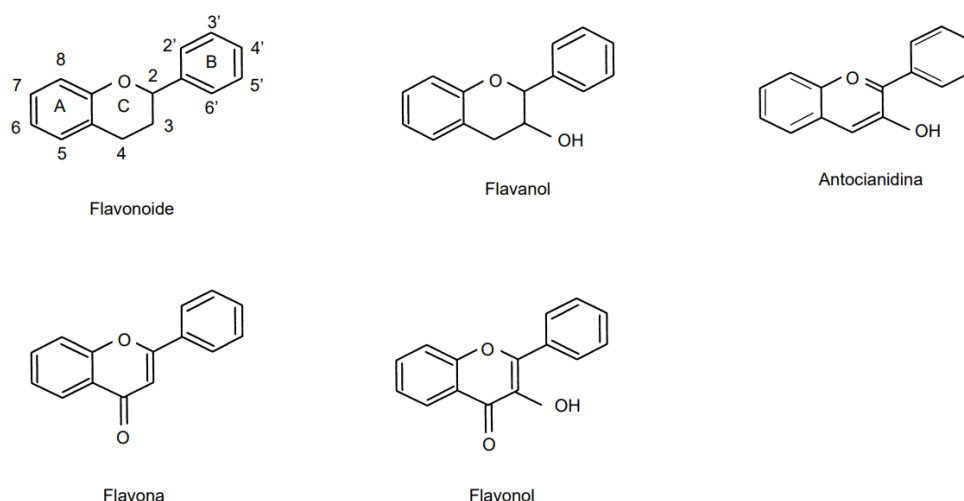


**Figura 2 . Estructura de flavonoides y sus tipos (Martínez-Flórez et al., 2002).**

La antocianidina es una aglicona, su estructura química básica es el ion flavilio también llamado 2-fenilbenzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico (Badui, 2006). El grado de metilación e hidroxilación del anillo B determina el tipo de antocianidina (Aguilera-Ortíz et al., 2011). La unión de las antocianidinas (agliconas) a una molécula de azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico da paso a la formación de las antocianinas, glucósidos de las antocianidinas (Badui, 2006). Las antocianidinas son menos estables que las antocianinas, la vida media de la glicona libre tiende a ser menor, por esta razón rara vez se encuentran en grandes cantidades, más que en trazas de alimentos o colorantes alimentarios (Francis & Markakis, 1989).

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, responsables de la coloración azul, púrpura, violeta y magenta de la mayoría de las especies del reino vegetal (Bendokas et al., 2020; Jackman & Yada, 1987), se encuentran glicosiladas, hidroxiladas, acetiladas o aciladas (Pereira, Donate, & Galembeck, 1997). Cada antocianina difiere en: número de grupos hidroxilo y/o metilo presentes; el tipo, número y sitios de unión de los azúcares (glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa, etc.) a la molécula; y las clases y número de ácidos alifáticos o aromáticos que están unidos a los azúcares de la molécula (Fennema, 2000).

Las antocianinas que se distribuyen principalmente en las frutas y verduras son: cianidin-3-O-glucósido, delphinidin-3-O-glucósido, malvidin-3-O-glucósido, pelargonidin-3-O-glucósido, y petunidin-3-O-glucósido (Patras et al., 2010).

#### **1.2.2.4.1 Factores que determinan el color de las antocianinas**

El color de las antocianinas está determinado por su estructura molecular y el medio fisicoquímico en el que se encuentra. Una sola antocianina puede tener una coloración distinta dependiendo del tipo de pigmento, copigmentación, pH y otros factores como el grado de hidroxilación y metoxilación (Markakis & Jurd, 1974; Khoo et al., 2017).

##### **– pH**

Las antocianinas son muy reactivas debido a que su núcleo flavilio es deficiente de electrones, por consiguiente, son sensibles a cambios de pH. Los cambios de pH generan cambios reversibles en su estructura, pero afectan su color. (Ngamwonglumlert et al., 2017; Badui, 2006). El pigmento de las antocianinas se encuentra más estable en medios ácidos como catión flavilio o ion oxonio (Garzón , 2008). La coloración roja es predominante en forma de cationes flavilio. Son más estables a pH más bajo y el catión permite que sea altamente soluble en agua. Cuando se disminuye la concentración de agua aumenta la tasa de deprotonación, reduciendo la estabilidad del color (Khoo et al., 2017).

Las cuatro especies moleculares de las antocianinas en una solución acuosa se encuentran en equilibrio. El catión flavilio (rojo) es más dominante a pH 1, conforme incrementa el pH a 4-5 aumenta la pseudobase de carbinol (incolora). En pH de 6, los grupos hidroxilo y la base quinoidal aumenta (azul o violeta), hasta pH 8 la base quinoidal se transforma en chalcona (amarillo) (Ngamwonglumlert et al., 2017).

Si bien el pH es un factor que debe considerarse para la mayor estabilidad del pigmento, existen antocianinas que son más estables a los cambios de temperatura y pH, a causa de su acilación (Jadhav & Bhujbal, 2020).

#### – Hidroxilación y metoxilación

Las antocianinas que presentan mayor grado de hidroxilación son menos estables y un mayor grado de metoxilación aumenta su estabilidad (Francis & Markakis, 1989). Por otra parte, el color de las antocianinas depende así mismo del número y la orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo. Cuando se incrementa la hidroxilación, las tonalidades se tornan azules mientras que el incremento de las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón, 2008). El hidroxilo desestabiliza la molécula, pese a ello, se puede restaurar a partir de una glicosilación de este hidroxilo (Jackman & Smith, 1996; Markakis & Jurd, 1974).

#### – Glucosilación y acilación

Las acilaciones y glicosilaciones afectan las propiedades físicas y químicas de las antocianinas como su tamaño molecular y polaridad. Fracciones de azúcares pueden sustituir a los grupos hidroxilo de la aglicona y a su vez pueden unirse otros azúcares a través de enlaces glicosídicos, o bien se pueden acilar con ácidos orgánicos aromáticos o alifáticos (He & Giusti, 2010).

La glucosilación tiene efectos batocrómicos, aumenta la solubilidad y la estabilidad del pigmento (Hendry & Houghton, 1996). Esto se asocia a la disminución de la actividad del agua en concentraciones altas de azúcares. Cuando el azúcar está en bajas concentraciones, tiene poco efecto sobre el agua, acelerando el proceso de degradación (Fennema, 2000).

No obstante, el aumento de la estabilidad de las antocianinas depende del tipo de azúcar que contenga, se reportó que el jugo de arándano era más estable con galactósidos que arabinósidos (Francis & Markakis, 1989).

La acilación mejora la estabilidad de las antocianinas debido al apilamiento del grupo acilo con el anillo de pirilio, retrasa el ataque neutrófilo del agua y la formación de la chalcona (Jadhav & Bhujbal, 2020), pero disminuye la solubilidad de las antocianinas en el agua, por el contrario de las glicosilaciones que aumentan su solubilidad (He & Giusti, 2010).

Cuando en una misma molécula se encuentra dos azúcares, generalmente acilados producen una molécula más estable que cuando solo contiene un solo monosacárido. La acilación no tiene efecto en el color, pero hace más estable al pigmento (Badui, 2006).

– Copigmentación y quelación de metales:

La copigmentación es la formación de complejos débiles con compuestos galotaninos, polisacáridos, proteínas u otros flavonoides. Los compuestos con los que forma complejos pueden ser incoloros sin embargo aumentan el color de las antocianinas (Markakis & Jurd, 1974; Eiro & Heinonen, 2002; Fennema, 2000).

Las antocianinas son muy reactivas con iones metálicos por lo que también pueden formar quelatos y sales metálicos (metaloantocianinas), y copigmentación. Estos fenómenos dan como resultado cambios batocrómicos, es decir se generan cambios en su absorción, a longitudes de onda más altas (Francis & Markakis, 1989; Fennema, 2000).

El efecto batocrómico se origina por los auxocromos (no tienen propiedades cromóforas) que se unen a las antocianinas y profundizan su tono. Los auxocromos son donadores de electrones. La capacidad reductora es mayor en grupos metoxilo que en los grupos hidroxilo de las antocianidinas (Fennema, 2000).

La quelación de metales divalente o polivalentes por antocianinas que contienen dos o más grupos hidroxilo adyacentes, puede causar la decoloración en frutas envasadas en recipientes metálicos. La pigmentación azul de las antocianinas se debe a la copigmentación y quelación de metales (Markakis & Jurd, 1974; Fennema, 2000; Francis & Markakis, 1989).

– Temperatura

El aumento de temperatura favorece a la formación de la chalcona, comienza con la formación de la pseudobase de carbinol y la apertura del anillo pirilio debido a que son reacciones endotérmicas y están asociadas con cambios de entropía positivos (Jackman &

Smith, 1996; Ngamwonglumlert et al., 2017). Al aumentar la temperatura, el equilibrio se dirige hacia la derecha, hacia la chalcona (Timberlake, 1980). Cuando se encuentra en la forma quinoidal y la base carbinol es reversible a la forma catiónica al enfriarse y acidificarse. También se puede desde la forma chalcona, pero es un proceso más lento para llegar al equilibrio (Francis & Markakis, 1989).

Las antocianinas pueden ser degradadas por la enzima polifenol oxidasa, si bien las antocianinas son más inestables a temperaturas altas, diversos autores reportan que someter los pigmentos a un tratamiento térmico o de blanqueamiento aproximadamente a 50°C puede inhibir la actividad de la enzima, y de esta manera tener efectos positivos en la retención de la antocianina (Patras et al., 2010).

Las antocianinas son inestables a temperaturas altas. Cabe mencionar que soluciones concentradas en antocianinas bajo tratamientos térmicos son menos susceptibles a la degradación de pigmentos (Khoo et al., 2017).

#### **1.2.2.4.2 Capacidad antioxidante de las antocianinas**

Las antocianinas tienen la capacidad de eliminar de manera directa e indirecta las especies reactivas de oxígeno (ROS), como superóxidos y el óxido nítrico, y radicales lípidos peróxidos, al estimular la síntesis o actividad de enzimas (catalasas, superóxido dismutasa), o bien inhibiendo las enzimas formadoras de ROS (Bendokas et al., 2020; Dangles et al., 2000). Los grupos hidroxilo son considerados como las estructuras fundamentales para la eliminación de radicales (Bors et al., 1990).

La eficacia de la actividad antioxidante de las antocianinas depende de su estructura, se le atribuye cuando ocurre la sustitución del 1,2 dihidroxi en el anillo B (grupo catecol), aumentando su actividad posiblemente porque la molécula se estabiliza. La capacidad antioxidante de las antocianinas disminuye con la glicosilación de las mismas en la posición 3 (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Dangles, Fargeix, & Dufoir, 2000).

Generalmente los aglicones (antocianidina) tienen mayor capacidad antioxidante en comparación con la forma glicosilada (antocianinas), aunque cabe mencionar que se han reportado excepciones (Dangles et al., 2000).

Azevedo et al., (2010) encontraron en determinadas antocianinas que contienen un grupo orto-hidroxilo (catecol) y un grupo tri hidroxilo vecinal (pirogallol), una mayor capacidad antirradical. Estas características estructurales posiblemente inducen una captación de radicales significativa.

#### **1.2.2.4.2.1 Capacidad antioxidante**

La capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa como la peroxidación lipídica, se le conoce como actividad antioxidante. La capacidad antioxidante se ve afectada por diversos factores, por lo que proporciona información sobre la duración mientras que la actividad antioxidante describe la dinámica inicial de la acción antioxidante (Roginsky & Lissi, 2005).

Los antioxidantes son sustancias que evitan la oxidación o inhiben las reacciones promovidas por oxígeno o peróxidos (Gupta, 2015), se pueden clasificar en dos tipos: primarios, son captadores de radicales libres o donadores de hidrógenos o interruptores de cadena y los secundarios, que inhiben la formación de oxidantes reactivos por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres como unión a metales pesados, captación de oxígeno, absorción de radiación UV, desactivación del oxígeno o conversión de peróxidos a especies no radicales (Karadag et al., 2009; André et al., 2010; Gordon, 2001; Sirivibulkovit et al., 2018). La eficacia de los antioxidantes depende de su capacidad para donar átomos de hidrógeno a los radicales libres, cuando disminuye la energía del enlace hidrógeno del antioxidante, la transferencia del hidrógeno al radical es más prometedora y rápida (Karadag et al., 2009).

Los radicales libres son altamente reactivos, a causa de que poseen uno o más electrones desapareados y tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello & Mario, 2006). Los radicales libres se dividen en dos tipos especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Dentro

del grupo de ROS incluye radicales oxígeno y agentes oxidantes, algunos ejemplos son: anión superóxido, radical hidroxilo, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno. Los RNS incluyen a radicales de óxido nítrico y dióxido de nitrógeno (Gupta, 2015). Pueden causar estrés oxidativo dañando lípidos y proteínas por la oxidación de sus monómeros, así como a enzimas, carbohidratos, ADN, tejidos e incluso la muerte celular inducida (Hoyos-Arbeláez et al., 2017).

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se pueden realizar a partir de técnicas espectrofotométricas y se dividen en dos categorías; los primeros son ensayos basados en la reacción de transferencia o donación de un átomo de hidrógeno (HAT) para formar compuestos estables, este ensayo tiene mayor relevancia en la capacidad de ruptura de cadena de radicales (Sirivibulkovit et al., 2018; Karadag et al., 2009) y los segundos son los ensayos basados en la transferencia de un electrón (ET) para reducir determinado compuesto, incluidos metales, carbonilos y radicales, (Shahidi & Zhong, 2015).

En los ensayos ET, la mezcla de la reacción se compone de un antioxidante y un oxidante o bien conocido como sonda. El oxidante atrae un electrón de antioxidante provocando cambios de color en la sonda, el grado de cambio de color es proporcional a la concentración de antioxidante. Cuando ya no hay más cambios de color, es cuando la reacción alcanza el punto final (Karadag et al., 2009; Huang, Ou, & Prior, 2005).

Los métodos más utilizados para medir la capacidad antioxidante son los ensayos de: capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC); 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), capacidad antioxidante reductora de iones férricos (FRAP) y parámetro antioxidante de ruptura de radicales (TRAP) (Huang et al., 2005; Hoyos-Arbeláez et al., 2017).

El ensayo DPPH se basa en la donación de electrones por parte de los antioxidantes para neutralizar o reducir al radical DPPH. Cuando ocurre la neutralización del radical (color violeta), la solución de la reacción tiene un vire de color a amarillo pálido. Es una técnica simple la cual solo requiere de un espectrofotómetro (Shahidi & Zhong, 2015). La

disminución de la absorbancia es dependiente de la concentración de antioxidantes, se emplea Trolox como antioxidante estándar (Gupta, 2015).

#### **1.2.2.4.3 Cuantificación de antocianinas**

La cuantificación de antocianinas se realiza a partir de los distintos tipos de cromatografías: capa fina, en columna, papel, líquida de alta resolución en contracorriente, extracción en fase sólida, así como espectroscopia de absorción UV-Vis, espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear (Lee et al., 2008; Hoyos-Arbeláez et al., 2017). Sin embargo, el método de pH diferencial es ampliamente utilizado por la comunidad científica y de la industria, ya que resulta ser menos costoso que la cromatografía líquida (Giusti & Wrolstad, 2001; Zhang et al., 2004).

El método de pH diferencial es un procedimiento sencillo y rápido que permite cuantificar a las antocianinas monoméricas totales e incluso en presencia de pigmentos degradados polimerizados, a partir de sus características espectrales. Esta metodología se basa en las transformaciones estructurales reversibles del cromóforo de antocianina en función del pH del medio. Las variaciones de pH manifiestan espectros de absorbancia diferentes, la forma coloreada oxonio prevalece a pH 4.5 y la forma hemiacetal incolora a 4.5 (Giusti & Wrolstad, 2001).

El método sustractivo es utilizado para determinar el pigmento de antocianinas poliméricas (color polimérico), tiene como fundamento el uso de agentes blanqueadores (bisulfito de sodio), los cuales blanquean fácilmente las antocianinas monoméricas mientras que las antocianinas poliméricas (complejos antocianina-tanino/melanoidina polimerizados) resisten a la reacción de blanqueamiento (Giusti & Wrolstad, 2001).

### **1.3 MEDICIÓN DE COLOR**

La medición del color es importante para la descripción y evaluación de la calidad e inspección de productos alimenticios. Se puede realizar de manera visual (humana), a través

de instrumentos tradicionales (colorímetros, espectrofotómetros) y visión por computadora (Wu & Sun, 2013).

Se pueden diferenciar los colores por diferentes aspectos, Munsell (1905) define tres cualidades del color (Figura 3):

1. Matiz (hue), es la forma en la que podemos distinguir un color de otro por ejemplo un rojo de un azul, este parámetro nombra el tono pero no nos dice si es claro u oscuro.
2. Brillo o luminosidad (value), es la luz del color, nos hace distinguir un color claro de uno oscuro. Sus variables son denominadas tintes y sombras.
3. Chroma, a través de esta cualidad distinguimos que tan fuerte es un color.

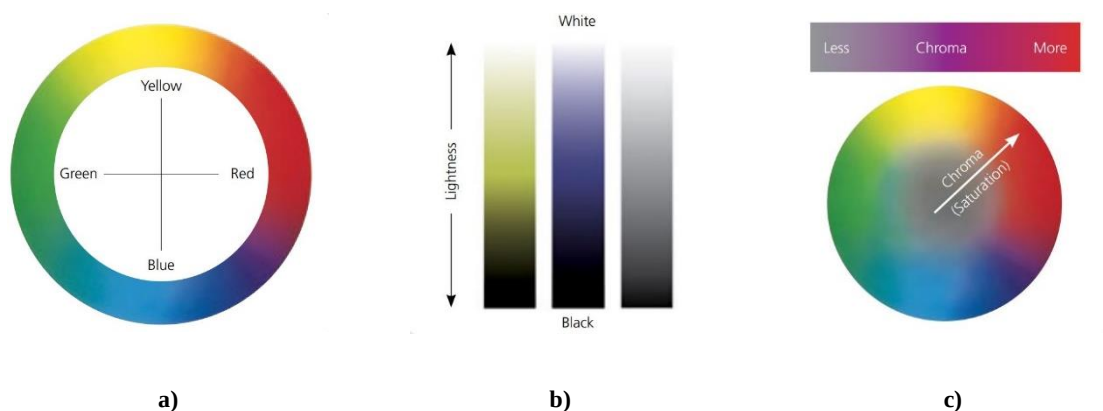


**Figura 3.** Cualidades del color a) matiz (hue), b) brillo, c) chroma (Tintometer Group, 2020)

Para facilitar la identificación de colores se crearon sistemas o modelos conocidos como espacios de color. Los espacios de color son una especificación de un sistema de coordenadas, donde cada color es representado en un solo punto (Gonzalez & Woods, 2008). Existen diversos espacios de color como el modelo RGB, XYZ, CIELAB, YIQ y HSI (Ortiz-

Zamora, 2002). Generalmente para medir el color en alimentos, se utiliza el modelo CIELAB, siendo este un estándar internacional (León et al., 2006).

El modelo RGB está basado en triestímulos y síntesis aditiva (Ortiz-Zamora, 2002). Emplea un sistema de coordenadas cartesianas, el color seleccionado aparece en sus componentes espectrales primarios, rojo (R), verde (G) y azul (B), cada uno de ellos toman valores positivos de 0 a 1 para cada coordenada (Gonzalez & Woods, 2008).

El espacio de color XYZ fue introducido por la CIE y se logra a partir por la transformación lineal del sistema RGB (Ortiz-Zamora, 2002).

El sistema Hunter define tres coordenadas rectangulares en una superficie uniforme: L representada por la luminosidad, donde 0 es el negro y 100 es el blanco, a (rojo-verde) y b (amarillo\_azul) (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). Las escalas de color de Hunter y CIELAB se derivan del sistema XYZ (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

El modelo CIELab, es desarrollado y recomendado por la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Es un sistema que permite especificar cualquier color en los ejes cartesianos  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .  $L^*$  es la variable luminosidad,  $a^*$  y  $b^*$  son coordenadas de cromaticidad (Sánchez-Marañón, 1995). El sistema CIE utiliza tres coordenadas para ubicar un color en un espacio de color (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

La coordenada  $L^*$  (claridad) toma valores de 0 a 100. Las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  forman un plano perpendicular a la claridad. La coordenada  $a^*$  define la desviación del punto acromático (claridad), hacia el rojo si  $a^*$  es mayor a 0, o hacia el verde si  $a^*$  es menor a 0. La coordenada  $b$  define la desviación hacia el amarillo, si  $b^*$  es mayor a cero o hacia el azul si  $b^*$  es menor a 0 (Figura 4) (Domínguez-Soto et al, 2012).

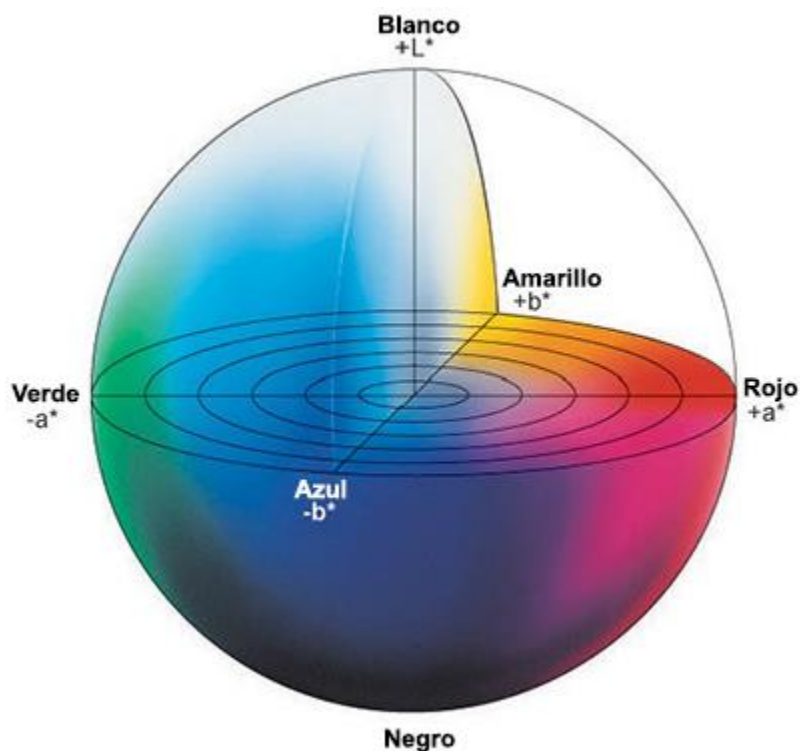


*Figura 4. Representación del sistema CIE Lab (Konica Minolta, 2020)*

#### **1.4 GENERALIDADES DEL MUITLE (*Justicia spicigera*)**

Existen reportes científicos sobre los extractos de *Justicia spicigera*, los cuales mencionan que poseen propiedades antimicrobianas y antimicóticas, inhiben el crecimiento de microorganismos causantes de la disentería y *C. albicans*, un agente causal del 86-90% de las infecciones superficiales o sistémicas (Vega-Avila et al., 2012). Alonso-Castro et al., (2012) observaron efectos apoptóticos sobre las células HeLa y efectos antitumorales en ratones portadores del tumor HeLa utilizando extractos de muiltle (Alonso-Castro et al., 2012). Se ha demostrado que extractos de *J. spicigera* ejercen efectos antioxidantes y disminuyen los niveles de glucosa en ratas normo glucémicas y en ratas diabéticas inducidas (Ortiz-Andrade et al., 2012).

#### **1.4.1 Origen y distribución**

*Justicia spicigera* también conocida como muitle o muicle, es una planta nativa de México, crece en los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Yucatán, Nayarit (Martinez , 1992) y Centro América, así como en algunas regiones de Estados Unidos de América. El muitle ha sido utilizado en México desde la época prehispánica en la medicina tradicional y como pigmento para elaborar artesanías y pinturas (Gomez-Verjan et al., 2012; Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltran, 2014), se puede encontrar a lo largo de las orillas de los arroyos, matorrales y bosques de México y América Central (Durkee, 1986).

#### **1.4.2 Taxonomía**

*J. spicigera* es una planta que pertenece a la familia de las Acantáceas (Acanthaceae), una familia tropical que consta aproximadamente de 300 géneros y 4,000 especies. *Justicia* es el género más grande y complejo de la familia Acanthaceae y comprende aproximadamente 600 especies. La taxonomía completa de *J. spicigera* se muestra en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Justicia spicigera*.

| Categoría taxonómica | CONABIO, (2019)  | UNIBIO, (2010)   | NRCS, USDA, (2020) | IBUNAM, (2013)   | ITIS, s.f.       |
|----------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| <b>Reino</b>         | Plantae          | Plantae          | Plantae            | Plantae          | Plantae          |
| <b>Subreino</b>      | -                | -                | Tracheobionta      | -                | Viridiplantae    |
| <b>Infrareino</b>    | -                | -                | -                  | -                | Streptophyta     |
| <b>Superdivisión</b> | -                | -                | Spermatophyta      | -                | Embryophyta      |
| <b>División</b>      | Tracheophyta     | Tracheophyta     | Magnoliophyta      | Magnoliophyta    | Tracheophyta     |
| <b>Subdivisión</b>   |                  |                  |                    |                  | Spermatophytina  |
| <b>Clase</b>         | Equisetopsida    | Magnoliopsida    | Magnoliopsida      | Magnoliopsida    | Magnoliopsida    |
| <b>Subclase</b>      | -                | -                | Asteridae          | -                |                  |
| <b>Superorden</b>    | -                | -                | -                  | -                | Asteranae        |
| <b>Orden</b>         | Lamiales         | Lamiales         | Scrophulariales    | Scrophulariales  | Lamiales         |
| <b>Familia</b>       | Acanthaceae      | Acanthaceae      | Acanthaceae        | Acanthaceae      | Acanthaceae      |
| <b>Subfamilia</b>    | Acanthoideae     | -                | -                  | -                | -                |
| <b>Tribu</b>         | Justicieae       | -                | -                  | -                | -                |
| <b>Genero</b>        | <i>Justicia</i>  | <i>Justicia</i>  | <i>Justicia</i>    | <i>Justicia</i>  | <i>Justicia</i>  |
| <b>Especie</b>       | <i>spicigera</i> | <i>Spicigera</i> | <i>spicigera</i>   | <i>spicigera</i> | <i>spicigera</i> |

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Unidad de Informática para la Biodiversidad (UNIBIO), Servicio de Conservación de Recursos Naturales (NRCS), Departamento de Agricultura (USDA), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM), Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS).

### 1.4.3 Características botánicas

Es un arbusto perene densamente ramificado de 1-1.5 m de alto. Posee hojas vellosas de color verde oscuro con peciolo de 5-10mm de largo y láminas ovadas de 6.5-17 cm de largo y 3.5-9 cm de ancho, apicalmente acuminadas. Flores tubulares y coloras anaranjadas de 3.5 -

4.4 cm de largo y 0.75-1 mm de ancho (Figura 5), basalmente se encuentran agrupadas entre la unión del tallo y la hoja. Sus frutos son capsulares ovoides cada uno posee de dos a cuatro semillas, aunque estos no se observan frecuentemente (Durkee, 1986; Martinez, 1992).



*Figura 5. Flores y hojas de Justicia spicigera (MXCITY, 2020)*

#### **1.4.4 Compuestos químicos**

La actividad antioxidante del muitle es atribuida a su contenido de compuestos fenólicos (Baquero-Peña & Guerrero-Beltrán, 2017). Awad et al., (2015) identificaron 12 antocianinas del muitle en una fracción de acetato de etilo, las antocianinas que encontró en mayor proporción fueron peonidina 3, 5-diglucósido, malvidina 3, 5-diglucósido y petunidina 3,5-diglucósido.

Euler y Alam, (1982) aislaron kaempferol-3,7-bisrhamnoside (kaempferitrin), triramnosido de kaempferol, la aglicona se identificó como kaempferol (flavonol) y el azúcar como ramnosa. Domínguez et al, (1999) aislaron la camferitrina  $\beta$ -sistosterol, el 3-O-glucósido de  $\beta$ -sistosterol, la alantoína, la criptoxantina y una antocianina muy polar que presenta fluorescencia en los extractos de *J. spicigera*.

Baqueiro-Peña y Guerrero-Beltrán, (2013) observaron compuestos en los extractos de muitle a partir de cromatografía de gases, compuestos como eucaliptol (monotepenoide), azuleno (isómero del naftaleno) y biciclogermacreno (sesquiterpeno).

Se identificaron flavonoides en extractos de *J. spicigera* con cloroformo, con mayor proporción la hesperidina, naringenina y kaempferol. Sin embargo, la quercetina fue uno de los flavonoides con menor concentración en el extracto (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013).

Brito, (1997) aisló antocianinas presentes en *Jacobina spicigera*, las identificaron como pelargonina y delfinidina. Estas dos antocianinas presentan una actividad antioxidante equiparable a Trolox (Kuskoski et al., 2004). Ismail et al., (1998) determinaron en un extracto polar de hojas de muitle el ácido N-(2-hidroxi-4,5-dimetoxifenil)-(S)- $\alpha$ -malámico. Se aisló una amida del ácido treo-  $\gamma$  -hidroxiglutámico y la nombraron justiciamida (ácido N-(2-hidroxi-4,5-dimetoxifenil) -(2 S, 4 S)- $\gamma$ -hidroxiglutámico) (Lorenz, Stermitz, & Ismai, 1999).

#### **1.4.5 Aplicaciones del muitle**

Las hojas del muitle son utilizadas para tratar la disentería, fiebre, diarrea (Jacobo-Salcedo et al., 2011), dengue (Anaya-Esparza et al., 2018), trastornos intestinales como vómito, náuseas y dolor de estómago, reduce los niveles de azúcar en sangre en pacientes con diabetes (Euler & Alam, 1982; Navarrete-Mora et al., 2016). No obstante, se utilizan diversas partes de la planta como remedio para la tuberculosis pulmonar, hemorroides, parásitos intestinales, artritis, enfermedades de la piel, control de presión arterial, infecciones renales, como antiinflamatorio, antiespasmódico (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2014; Navarrete-Mora et al., 2016), ayuda a tratar enfermedades poco comunes denominadas de filiación cultural como susto y tlazol (Domínguez-Barradas et al., 2015) pero esto solo se ha utilizado en la medicina tradicional.

Las hojas de muitle se han utilizado tradicionalmente para teñir de color morado artesanías y textiles (Espinosa-Morales et al., 2012). La aplicación de muitle como pigmento solo se ha realizado en trabajos de investigación, en productos alimenticios y cosméticos: mermelada

como alimento funcional (Soria-Zamora, 2014), gomitas (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2013), yogurt bebible (Jiménez-Ortega, et al. 2018), bebida funcional (Altamirano, 2013; Cruz-Hernández, Calvario-Palma, & Barroso-Bravo, 2019), tortillas (Alvarez-Poblano et al., 2020) y sombra de ojos (Salcedo-Luna, 2018) adicionadas con pigmentos extraídos del muile.

## **1.5 GELATINA**

La gelatina es una proteína ampliamente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica por sus características químicas y físicas, particularmente por su capacidad de formar geles térmicamente reversibles (Simon et al., 2002).

Algunos de sus principales usos en la industria alimentaria son: estabilizante, gelificante, conservador, emulsificante y clarificante. En la industria farmacéutica se emplea en la fabricación de cápsulas y como adhesivo con agregados de medicamentos (Olivares, 2007).

Es un polipéptido de alto peso molecular y un hidrocoloide, a diferencia de los otros hidrocoloides que en su mayoría son polisacáridos, la gelatina es una proteína digerible que contiene todos los aminoácidos esenciales excepto el triptófano (Mariod & Adam, 2013).

Se obtiene a partir de la desnaturalización parcial del colágeno. El colágeno se encuentra de manera abundante en los tendones, huesos, piel, sistema vascular de animales y en el tejido conjuntivo. Al desnaturalizarse el colágeno se rompen enlaces no covalentes y covalentes, así como algunos enlaces peptídicos, la estructura helicoidal del colágeno se convierte en una forma más amorfa, conocida como gelatina (Fennema, 2000).

Existen dos procesos de producción: el ácido y el básico. En ambos procesos se extrae la proteína con agua, a una temperatura controlada menor a 80°C (Badui, 2006).

# **CAPÍTULO 2**

## **OBJETIVOS**

## **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener pigmentos bioactivos a partir de extractos de *Justicia spicigera* y aplicarlos en un producto alimenticio.

## **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el solvente con el cual se obtiene la mayor extracción de compuestos químicos a partir de material vegetal de *Justicia spicigera*.
- Evaluar el cambio de las tonalidades en los extractos ante diferentes valores de pH para su posible aplicación.
- Caracterizar los extractos mediante técnicas de espectrofotometría y colorimetría para conocer sus propiedades fisicoquímicas
- Aplicar los pigmentos en un producto alimenticio para conocer su estabilidad en el tiempo.
- Determinar la aceptabilidad del producto alimenticio a través de una prueba hedónica.

# **CAPÍTULO 3**

## **JUSTIFICACIÓN**

En la industria alimentaria el color impacta en la preferencia y consumo de un producto debido a que este atributo es visto como un indicador de sabor, nutrición y seguridad, siendo uno de los aspectos más importantes en la comercialización de productos (Coultate & Blackburn, 2018). Por consecuencia, genera una alta demanda de colorantes, si bien en el pasado no existía suficiente información sobre efectos secundarios que provocaban los colorantes sintéticos, hoy en día se ha impulsado la búsqueda por colorantes de origen natural como sustituto a los colorantes sintéticos.

La principal fuente de pigmento de origen natural son las plantas y dentro de ellas, las moléculas más utilizadas son los carotenoides, betalainas, antocianinas y la clorofila.

Los pigmentos naturales adicionados en los alimentos pueden sufrir modificaciones durante su procesamiento térmico, dicho esto, es fundamental realizar una estandarización del color para asegurar que no se degrade o se intensifique la tonalidad (Ahmed et al., 2002).

*Justicia spicigera* es una planta con un alto contenido en fitoquímicos y con capacidad tintórea, unas de las moléculas a las cuales se les atribuye esta propiedad son las antocianinas, responsables de las tonalidades morado, azul y rojo. Además de su capacidad tintórea, *J. spicigera* posee actividad antioxidante y es utilizada en la medicina tradicional.

Destaca por sus niveles bajos de actividad de agua y humedad porcentual, lo que la hacen valiosa para la industria farmacéutica y alimentaria debido a que estos parámetros son importantes para garantizar su conservación y estabilidad (Londoño Moreira & Dueñas Rivadeneira, 2024).

Asimismo, *Justicia spicigera* es una planta que se puede propagar de manera masiva mediante propagación asexual, sin requerir el uso intensivo de abonos orgánicos, lo que reduce costos de producción y facilita su cultivo a mayor escala (Cordero, 2021).

Dicho lo anterior, en el presente trabajo se propuso la obtención de extractos a partir de hojas de *J. spicigera* mediante el uso de diferentes solventes. Una vez seleccionadas las tonalidades, se evaluó la estabilidad de los pigmentos aplicados a un producto alimenticio.

# **CAPÍTULO 4**

## **HIPÓTESIS**

Los extractos de *Justicia spicigera* presentarán capacidad tintórea bajo diferentes valores de pH, así como propiedades bioactivas. Adicionalmente, tendrán la estabilidad suficiente para ser aplicados en un producto alimenticio.

# **CAPÍTULO 5**

# **MATERIALES Y**

# **MÉTODOS**

## 5.1 MATERIALES

El alcohol etílico 99%, cloruro de potasio (KCl), acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), nitrito de sodio ( $NaNO_2$ ), cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) y el carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) fueron obtenidos de J.T. Baker ®. El ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ), 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), reactivo Folin-Ciocalteu 2N y la quercetina se obtuvieron de Sigma Aldrich S. de R.L de C.V. Grenetina en polvo BLOOM 290 se obtuvo de D' Gari®. Benzoato de sodio, saborizante artificial sabor fresa y uva sin color fueron obtenidos de Deiman S.A. de C. V. Sacarosa marca Zulka®. Se utilizó agua destilada para realizar todos los experimentos.

## 5.2 MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron hojas de muile (*Justicia spicigera*) durante el mes de agosto de 2019 en la localidad La Florida, Jungapeo, Michoacán.

## 5.3 MÉTODOS

### 5.3.1 Procesamiento de la muestra

Las hojas de muile se sometieron a un proceso de secado donde fueron colocadas sobre hojas de papel periódico por 5 días, el papel se cambió constantemente para evitar contaminación y retirar la mayor parte de humedad. Después, las hojas deshidratadas se molieron en un procesador de alimentos, la muestra obtenida fue almacenada en frascos color ámbar y colocada en un desecador hasta su posterior uso (Baquero-Peña & Guerrero-Beltrán, 2017).

### 5.3.2 Obtención de extractos

Se siguió la metodología de Baquero-Peña y Guerrero-Beltrán, (2017) con ligeras modificaciones. Los extractos se obtuvieron mediante agitación a 110 rpm en baño maría

durante 20 min a 30°C. Se emplearon tres diferentes solventes (agua destilada, etanol y etanol-agua 1:1) para cada muestra.

Se colocaron 0.05g de muestra molida de *J. spicigera* en un frasco ámbar con tapa y se adicionaron 10 mL de disolvente. Se llevaron a agitación durante 20 min. Los extractos obtenidos fueron filtrados con un papel filtro Whatman 1 de 25mm.

### **5.3.3 Medición de pH de los extractos**

Se determinó el potencial de hidrógeno de los extractos con un potenciómetro previamente calibrado, se colocó el electrodo en cada uno de los extractos y se tomó la lectura del valor de pH. Se utilizó un potenciómetro HANNA pH 210 Microprocessor pH Meter.

### **5.3.4 Caracterización química de los extractos de *Justicia spicigera***

#### **5.3.4.1 Cuantificación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales se cuantificó a través del método descrito por Ainsworth y Gillespie (2007) con ligeras modificaciones. Se tomaron 100µL de extracto, 250µL de reactivo Folin-Ciocalteu 1N, 750µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%, y 900µL de agua destilada. Se dejó reposar durante 40 min en obscuridad, finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. La concentración de fenoles totales se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de peso seco, se determinó a partir de una curva patrón que se realizó con ácido gálico 1-10 µg/mL.

#### **5.3.4.2 Cuantificación de flavonoides**

La cuantificación de flavonoides se llevó a cabo mediante un método colorimétrico. Se siguió la metodología reportada por Dewanto et al., (2002). En un tubo de ensaye se mezclaron 1.5 mL del extracto y 75µL de NaNO<sub>2</sub> al 5%, las muestras se incubaron durante 6 min a

temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla 150µL de AlCl<sub>3</sub> al 10%, se dejó reposar 5 min. Después se agregó 500 µL de NaOH 1M y se aforó la mezcla a 2.5 mL con agua destilada y se agitó la muestra con ayuda del vortex. Se establecieron lecturas de absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. Se utilizó una curva patrón de quercetina 5 – 100µg para calcular la concentración de flavonoides. Los resultados fueron expresados como equivalentes de quercetina (CE) por cada 100g de peso seco.

#### 5.3.4.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico

La cuantificación de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Giusti y Wrolstad (2001) con ligeras modificaciones.

Las antocianinas monoméricas se cuantificaron por el método de pH diferencial, se prepararon diluciones para cada muestra, primero se tomó 1mL de extracto y 1mL de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> a 0.4 M pH 4.5 en un tubo de ensaye. Después en otro tubo de ensaye se colocó 1mL de extracto y 1mL de buffer de KCl a 0.025M pH 1.0, se dejaron reposar las dos diluciones durante 15min y posteriormente se realizó un barrido de 400 a 700nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific.

Se calculó la absorbancia de la muestra (A) con la Ecuación 1:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{pH 4.5} \dots \dots \dots (1)$$

Donde:

$A_{\lambda \text{ vis-max}}$ = Absorbancia en la longitud de onda máxima

$A_{700}$ = Absorbancia a 700nm

La concentración de pigmento monomérico se calculó con la Ecuación 2:

$$\text{Pigmento monomérico de antocianinas } \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times 1} \dots \dots \dots (2)$$

Donde:

MW= Peso molecular de las antocianinas (449.02 g/mol)

FD= Factor de dilución

$\epsilon$ = Absortividad molar (26,900 L/cm mol)

Para el porcentaje de color polimérico se tomaron 2.8mL del extracto para cada muestra y 0.2 mL de agua destilada y se colocaron en un tubo de ensaye. En otro tubo de ensaye se colocaron 2.8mL del extracto y se mezclaron con 0.2mL de bisulfito de sodio, ambas muestras se dejaron reposar durante 15 min. Se realizó un barrido de 420-700nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific.

La densidad de color se calculó con la muestra control (tratamiento con agua destilada) utilizando la Ecuación 3:

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) + (A_{\lambda \text{ vis max}} - A_{700\text{ nm}})] \times DF \dots (3)$$

donde,  $A_{420\text{ nm}}$  es la absorbancia de la muestra control leída a 420nm,  $A_{700}$  es la absorbancia de la muestra control leída a 700nm,  $A_{\lambda \text{ vis max}}$  es la máxima absorbancia leída de la muestra y DF es el factor de dilución.

El color polimérico se calculó con la muestra tratada con bisulfito de sodio mediante la Ecuación 4:

$$\text{Color polimérico} \equiv [(A_{420\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) + (A_{\lambda \text{ vis max}} - A_{700\text{ nm}})] \times DF \dots (4)$$

Donde:

$A_{420\text{ nm}}$ = Absorbancia a 420 nm

$A_{700\text{ nm}}$ = Absorbancia a 700 nm

$A_{\lambda \text{ vis-máx}}$ = Absorbancia en la longitud de onda máxima

FD= Factor de dilución

Los parámetros de esta ecuación son los mismos de la Ecuación 3 sin embargo, en esta ecuación se utilizan los parámetros obtenidos de la muestra tratada con bisulfito de sodio.

El porcentaje de color polimérico se calculó a partir de la Ecuación 5:

$$\% \text{ Color polimérico} = \frac{\text{Color polimérico}}{\text{Densidad de color}} \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

#### 5.3.4.4 Determinación de actividad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante fue determinada de acuerdo con la metodología descrita de Brand-Williams et al., (1995) con ligeras modificaciones. Se adicionó 0.1 mL de cada uno de los extractos y 3.9 mL de la solución de DPPH 0.025 g/L en tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio para mantener condiciones de obscuridad y se agitó la muestra vigorosamente. Se dejó reposar durante 30min y posteriormente se tomaron las lecturas de absorbancia de las soluciones a 515 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. La actividad antioxidante se determinó como el porcentaje de inhibición correspondiente a la cantidad del radical DPPH neutralizado por el extracto. Además, se expresó como equivalentes de Trolox (TE) por cada 100g de peso seco a partir de una curva patrón de Trolox 0.015-1.5 mM.

#### 5.3.5 Determinación de color por colorimetría

El color fue determinado por medio de un colorímetro KONICA MINOLTA A8203798. En cada una de las muestras se midieron las variables L\* (luminosidad), a\* (de rojo a verde), b\* (amarillo a azul) y se registraron los valores obtenidos (Muñoz-López et al., 2018).

#### 5.3.6 Evaluación del efecto del pH en los extractos

Se prepararon 10mL de cada uno de los extractos (acuoso, etanólico y acuoso-etanólico) y se ajustó el pH para realizar un barrido de 2 a 12. Se utilizaron soluciones saturadas de

NaHCO<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>C<sub>7</sub> para ajustar el pH de acuerdo a Jiménez-Gonzalez et al., (2023) con ligeras modificaciones.

### 5.3.7 Secado de los pigmentos bioactivos

Después de evaluar el efecto del pH en los extractos a través de un barrido de pH, se eligieron dos tonalidades para su posible aplicación alimenticia. La primera tonalidad fue morada y se utilizó agua como solvente, la segunda tonalidad fue magenta y se empleó una mezcla de agua y etanol 1:1.

A partir de las tonalidades seleccionadas, se prepararon 600 mL de extracto a una concentración de 0.05g/10mL para cada una de las muestras. En ambas muestras se ajustó el pH a 7 usando soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>C<sub>7</sub>. Posteriormente fueron concentradas en un rotavapor, se evaporó el 50% del solvente acuoso de la primera muestra y el 100% de solvente etanólico de la segunda muestra. Los extractos concentrados fueron sometidos a un proceso de ultracongelación mediante mezcla de hielo seco y acetona durante este proceso la muestra se encontraba en rotación constante en un ángulo de 45°. Seguido de este proceso las muestras fueron liofilizadas durante 28 h en un liofilizador FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System LABCONCO. Finalmente, los pigmentos obtenidos fueron recuperados y almacenados en frascos ámbar.

#### 5.3.7.1 Rendimiento de la extracción de los pigmentos

El rendimiento de los pigmentos se calculó con la siguiente ecuación a partir de los pesos de la biomasa seca y el pigmento de acuerdo a Muñoz-López et al., 2018.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{gramos del pigmento}}{\text{gramos iniciales de biomasa}} \times 100$$

### **5.3.7.2 Caracterización química de los pigmentos**

Se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides, antocianinas monoméricas y poliméricas y actividad antioxidante, de acuerdo con las metodologías reportadas en las secciones 5.3.4.1, 5.3.4.2, 5.3.4.3, y 5.3.4.4 respectivamente.

### **5.3.7.3 Determinación de color por colorimetría**

Se determinó el color de los pigmentos seleccionados a través de la metodología descrita en la sección 5.3.5.

### **5.3.8 Aplicación de los pigmentos en un producto alimenticio**

Se elaboraron gelatinas adicionadas con dos pigmentos bioactivos (morado y magenta). Se empleó un saborizante de fresa para la gelatina color magenta y otro de uva para la gelatina con el pigmento morado.

Se agregaron en un recipiente 25 g de grenetina y 30 mL de agua a temperatura ambiente para hidratar la grenetina. Después se calentaron 470 mL de agua hasta ebullición. Se agregó la grenetina hidratada y 75 g de azúcar, dos gotas de saborizante artificial sin color en constante agitación. Se mantuvo una agitación constante para obtener una mezcla homogénea. Finalmente se agregaron 0.005g del pigmento liofilizado.

#### **5.3.8.1 Evaluación de la estabilidad del color en gelatina**

Se evaluó la estabilidad del color de la gelatina adicionada con el pigmento bioactivo a través del tiempo, de acuerdo con la metodología descrita en la sección 5.3.5 durante 23 días. Las muestras fueron almacenadas en condiciones de obscuridad a 4°C. La diferencia de color ( $\Delta E$ ) se calculó a partir de la siguiente fórmula utilizada por Eyarkai Nambi et al., (2015). Los valores para cada variable serán obtenidos a partir del colorímetro.

$$\Delta E = \sqrt{(L_f - L_i)^2 + (a_f - a_i)^2 + (b_f - b_i)^2}$$

Donde **L** es luminosidad, **a** va de rojo a verde, **b** de amarillo a azul, el subíndice para cada variable indica; **f** valor final e **i** valor inicial.

### 5.3.8.2 Prueba hedónica de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos

Se evaluaron las propiedades organolépticas de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos a través de un análisis sensorial por medio de una prueba hedónica basada en 9 puntos (Ramírez, 2012). La prueba se realizó por un panel no entrenado de 20 personas, donde evaluaron el color, olor, sabor y textura de cada una de las gelatinas utilizando una escala categorizada de 1 a 9 puntos como se muestra en la Figura 6. A la gelatina adicionada con el pigmento morado de muile, se le asignó el código GMOM y la gelatina con pigmento magenta de muile, se le asignó el código GMAM. Se elaboró una gelatina adicionada con pigmento morado y magenta comercial (GMOC y GMAC, respectivamente) para evaluar su aceptación en comparación con las gelatinas elaboradas con los pigmentos bioactivos.

**Nombre:** \_\_\_\_\_ **Fecha:** \_\_\_\_\_

**Instrucciones**

Se le presentan tres muestras de gelatina saborizada. Por favor observe y pruebe cada una de ellas. Indique el grado en el que le gusta o disgusta cada uno de los atributos (color, olor sabor y textura) en cada una de las muestras con su respectivo código, a partir del puntaje que se muestra en la tabla.

| Puntaje | Calificación               |
|---------|----------------------------|
| 1       | Me disgusta extremadamente |
| 2       | Me disgusta mucho          |
| 3       | Me disgusta moderadamente  |
| 4       | Me disgusta ligeramente    |
| 5       | Ni me gusta ni me disgusta |
| 6       | Me gusta ligeramente       |
| 7       | Me gusta moderadamente     |
| 8       | Me gusta mucho             |
| 9       | Me gusta extremadamente    |

| Código      | Puntaje para cada atributo |      |       |         |
|-------------|----------------------------|------|-------|---------|
|             | Color                      | Olor | Sabor | Textura |
| <b>GMOM</b> |                            |      |       |         |
| <b>GMOC</b> |                            |      |       |         |
| <b>GMAM</b> |                            |      |       |         |
| <b>GMAC</b> |                            |      |       |         |

*Figura 6. Boleta basada en la prueba hedónica de 9 puntos para evaluar los atributos sensoriales de gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos*

### 5.3.9 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, los resultados mostrados son el promedio de tres mediciones. Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) a los resultados para determinar las diferencias significativas entre las medias aritméticas y la prueba LSD para conocer la diferencia significativas entre los tratamientos. Los análisis fueron realizados mediante el software Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.03.

# **CAPÍTULO 6**

## **RESULTADOS Y**

### **DISCUSIÓN**

## 6.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *Justicia spicigera*

Los distintos tipos de solventes dieron como resultado una tonalidad diferente en los extractos obtenidos, el extracto acuoso mostró una coloración morada, el hidroetanólico presentó un color magenta y el etanólico, verde (Figura 7).



**Figura 7.** Extractos de muile bajo tres diferentes solventes a) agua, b) etanol-agua y c) etanol

### 6.1.1 Cuantificación de fenoles totales

En la Tabla 2 se muestra el contenido de fenoles totales obtenidos en los extractos de muile, los cuales fueron expresados en gramos equivalentes de ácido gálico (gGAE) por cada 100 g de muestra seca. Se observó la mayor concentración de fenoles en el extracto hidroetanólico de 2.16 gGAE/100g y la menor concentración en el extracto etanólico con 0.58 gGAE/100g (Tabla 2). Las diferencias encontradas en el contenido de fenoles en los tres extractos fueron estadísticamente significativas, con un nivel de confianza de 95.0%.

**Tabla 2.** Contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante en extractos de *J. spicigera*

| Extracto              | Fenoles Totales<br>(gGAE/100g) | Flavonoides<br>(gEQ/100 g) | Actividad Antioxidante |                          |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|
|                       |                                |                            | gTEAC/ 100g            | Porcentaje de inhibición |
| <b>Acuoso</b>         | 1.72±0.00 <sup>a</sup>         | 0.49±0.01 <sup>a</sup>     | 2.98±0.04 <sup>a</sup> | 28.95±0.68 <sup>a</sup>  |
| <b>Hidroetanólico</b> | 2.16±0.03 <sup>b</sup>         | 0.46±0.02 <sup>b</sup>     | 4.56±0.10 <sup>b</sup> | 54.18±1.63 <sup>b</sup>  |
| <b>Etanólico</b>      | 0.58±0.00 <sup>c</sup>         | 0.07±0.00 <sup>c</sup>     | 2.36±0.02 <sup>c</sup> | 19.20±0.32 <sup>c</sup>  |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD

García-Márquez et al.,(2012) observaron un mayor rendimiento en los extractos de *J. spicigera* al utilizar como solventes agua-etanol, glicerol, propilenglicol y agua, respectivamente. El etanol fue el solvente con el cual se extrajo un menor contenido de fenoles totales, del mismo modo que en el presente trabajo. El mayor contenido de fenoles totales lo encontraron en aquellos solventes con polaridad intermedia (agua-etanol) en comparación con los de menor polaridad o polaridad superior. Este comportamiento también se ha reportado por Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) en extractos de muile y por Turkmen et al., (2007) en extractos de té negro, donde obtuvieron una mayor concentración de polifenoles al utilizar solventes acuosos al 50%.

La cantidad de fenoles encontrada en los tres extractos fue menor a la reportada por otros autores como García-Márquez et al., (2012), Awad et al, (2015), Sepúlveda-Jiménez et al., (2009), Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) y Anaya-Esparza, (2018). Cabe mencionar que la metodología empleada no fue la misma, García-Márquez et al., (2012) emplearon maceración durante 12h, Awad et al, (2015) extracción con etanol frío, Sepúlveda-Jiménez et al., (2009) maceración durante 30 min a 25°C, Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) agitación a temperatura ambiente durante 2h y Anaya-Esparza (2018) agitación 2h a 25°C. Estas diferencias en los métodos de extracción afectan la eficacia de

extracción de compuestos bioactivos, siendo desfavorable la combinación de temperatura con agitación empleada.

### 6.1.2 Cuantificación de flavonoides

La concentración de flavonoides entre cada uno de los extractos presentó diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2). Se observó una mayor concentración de flavonoides en el extracto acuoso, de  $0.49 \pm 0.01$  gEQ/100g, seguido el extracto hidroetanólico con  $0.46 \pm 0.02$  gEQ/100g. A diferencia del contenido de fenoles, el cual se encontró en mayor cantidad en el extracto hidroetanólico.

Esquivel-Gutiérrez et al, (2013) reportaron tres flavonoides principales en extractos de *J. spicigera*, hesperidina (1.8 mg/g), naringenina /0.06 mg/g) y kaempferol (0.003 mg/g).

La concentración de flavonoides aumentó conforme se incrementaba la proporción de agua en los extractos. Los flavonoides provenientes de plantas se encuentran en forma de glucósidos y presentan una alta polaridad (Miranda & Cuéllar , 2001). Su alta polaridad es atribuida al gran número de grupos hidroxilo, y por lo tanto son más solubles en solventes polares (Cartya & Reynaldo, 2001), como el agua.

Cabe mencionar que el extracto etanólico fue el que menor concentración de compuestos tuvo en ambos casos (fenólicos y flavonoides), con una concentración de 0.58 gGAE/100g y 0.07 gEQ/100g, respectivamente. Eso puede suceder debido a que el etanol es una molécula moderadamente polar en comparación con el agua, que es altamente polar (Judson King, 2021).

El contenido de flavonoides en el extracto acuoso fue menor al reportado por otros autores como Castro-Alatorre et al.,(2021) y Sepúlveda-Jiménez et al., (2009) donde reportaron  $0.62 \pm 0.13$  gCE/100g. A diferencia de la metodología utilizada en este trabajo, Sepúlveda-Jiménez et al., (2009) no emplearon agitación en el proceso de extracción y Castro-Alatorre et al.,(2021) llevaron acabo la extracción durante 1 hora.

Existen diferentes factores a los cuales se les pueden atribuir estas diferencias como la madurez de las hojas, la temporada en la que se recolectaron, el tipo de suelo, la altura sobre el nivel del mar donde se cultivó la planta (Castro-Alatorre et al., 2021).

### 6.1.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas

Se determinó la densidad de color de los extractos, en este parámetro se evaluaron tanto las antocianinas monoméricas, como el porcentaje de color polimérico (Tabla 3).

El extracto acuoso obtuvo una densidad de color de  $7.14 \pm 0.05$ , el extracto hidroetanólico de  $11.25 \pm 0.01$  y el extracto etanólico de  $2.86 \pm 0.07$ .

Seguido de esto se obtuvo el porcentaje de color polimérico, se llevó a cabo a partir del blanqueamiento de las antocianinas monoméricas con ayuda de bisulfito de sodio. El extracto acuoso fue el que presentó un mayor porcentaje de color polimérico de  $67.59 \pm 0.22\%$ , seguido del hidroetanólico de  $64.89 \pm 1.72$ , el menor porcentaje lo obtuvo el extracto etanólico con  $47.56 \pm 0.68\%$ . Los tres extractos tuvieron valores diferentes en la densidad de color, así como en el porcentaje de color polimérico, a pesar de que el porcentaje del extracto acuoso y hidroetanólico parece ser similar, tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 3.** *Contenido de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico de J. spicigera*

| Extracto              | Antocianinas monoméricas (mg/100g) | Densidad de color  | Color polimérico  | % Color polimérico |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Acuoso</b>         | $49.76 \pm 0.47^a$                 | $7.14 \pm 0.05^a$  | $4.82 \pm 0.02^a$ | $67.59 \pm 0.22^a$ |
| <b>Hidroetanólico</b> | $363.07 \pm 0.42^b$                | $11.25 \pm 0.01^b$ | $7.3 \pm 0.18^b$  | $64.89 \pm 1.72^b$ |
| <b>Etanólico</b>      | $76.81 \pm 0.94^c$                 | $2.86 \pm 0.07^c$  | $1.36 \pm 0.01^c$ | $47.56 \pm 0.68^c$ |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD.

El mayor contenido de antocianinas se encontró en el extracto hidroetanólico  $363.07 \pm 0.42$  mg/100g, seguido del etanólico con  $76.81 \pm 0.94$  mg/100g y por último el extracto acuoso  $49.76 \pm 0.47$  mg/100g. Por lo que al igual que la cuantificación de flavonoides, fenoles y capacidad antioxidante, la concentración de antocianinas monoméricas es influida por el tipo del solvente empleado y su proporción.

La concentración de pigmento monomérico de los extractos de muile fue superior al reportado por Curo-Diaz, (2017) en una bebida funcional a base de betabel y arándanos.

Soria-Zamora, (2014) determinaron el contenido de antocianinas en un alimento funcional a base de frutos rojos y *Justicia spicigera*, el contenido de antocianinas monoméricas, así como porcentaje el color polimérico, fue mayor en los extractos obtenidos en el presente trabajo en comparación con lo reportado del alimento funcional.

Los valores de antocianinas monoméricas de muile se encuentra dentro del rango de antocianinas reportados por Vieira et al, (2019) en otras especies (fresas, berenjena, col morada). Y superiores a los reportados por Maltabar, (2020) en *Zea mays*, *Vaccinium meridionale*, *Hibiscus*, *Prunus domestica* y *Brassica oleracea*.

#### **6.1.4 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH**

La actividad antioxidante fue expresada en equivalentes de Trolox (TEAC). Se observaron diferencias significativas entre los tres extractos de *J. spicigera* (Tabla 2). El extracto hidroetanólico fue el que presentó una mayor capacidad antioxidante de  $4.56 \pm 0.10$  gTE/100g, seguido del extracto acuoso con  $2.98 \pm 0.04$  gTE/100g y el etanólico con  $2.36 \pm 0.02$  gTE/100g.

Los solventes polares disminuyen el potencial de ionización (Farrokhnia, 2020), facilitando la transferencia de electrones (Fifen et al., 2011; Xue, et al., 2013; Foti & Giuseppe, 2001). Sin embargo, Turkmen et al., (2007) reportaron valores más altos de capacidad antioxidante utilizando solventes acuosos al 50% en comparación con los solventes puros.

Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017), reportaron concentraciones más altas en el extracto etanólico ( $2.121 \pm 0.160$  gTE/100g) que en el extracto hidroetanólico ( $0.236 \pm 0.042$  gTE/100g), mientras que en este trabajo, el extracto etanólico fue el que tuvo una menor capacidad antioxidante. Existen variaciones en el método de extracción que emplearon Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) en comparación con el que se presenta en este trabajo, estas diferencias pueden afectar la disponibilidad de los compuestos.

Anaya-Esparza et al, (2018) determinaron  $43.86 \pm 0.37$  mmol/g y  $132.32 \pm 0.58$  mmol/g en el extracto acuoso de *J. spicigera*; el primer valor es el resultado de una extracción por agitación durante 2 h a 25°C y el segundo es de un tratamiento térmico sin agitación a 60°C durante 5 min.

El porcentaje de inhibición de los extractos se determinó con una muestra de 500µg de muestra seca de *J. spicigera*, el mayor porcentaje de inhibición de 54.18, se obtuvo del extracto hidroetanólico. Por otro lado, Awad et al, (2015) reportaron valores mayores de la capacidad antioxidante de su extracto, emplearon acetato de etilo como solvente polar aprótico en el extracto de *J. spicigera*, el cual inhibió en un 82 y 92% al radical DPPH, en una concentración de 10 y 50 µg de la muestra, los valores obtenidos fueron incluso mayores al de la vitamina C.

Cabe señalar que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró en el extracto hidroetanólico y la menor en el extracto etanólico, por lo que pudimos deducir en este estudio que, existe una relación entre la cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de *J. spicigera*, reflejado en su porcentaje de inhibición y en los gramos equivalentes a Trolox. Esta correlación es descrita por otros autores como Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) empleando el ensayo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) en extractos de *J. spicigera*, Jha et al., (2014) en extractos de *Justicia adhatoda*, en donde la capacidad antioxidante fue determinada por el ensayo DPPH y por Turkmen et al., (2007) donde encontraron una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante en extractos de té negro.

## 6.2 MEDICIÓN Y EVALUACIÓN DEL PH EN LOS EXTRACTOS

El extracto acuoso arrojó un pH de 7.8, el hidroetanólico de  $7.35 \pm 0.2$  y el etanólico un pH de  $6.05 \pm 0.03$ . De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos entre cada uno de los extractos.

El efecto de pH en los extractos se evaluó de manera visual sobre su coloración. El extracto acuoso a un pH de 7.8 presentó una pigmentación morada, la coloración se mantuvo conforme se incrementó el pH hasta 12, por el contrario, al disminuir el pH a 5 se comenzó a ver una pigmentación rojiza en el extracto (Figura 8).



*Figura 8. Barrido de pH 2 a 12 en extractos acuosos de muile.*

En el extracto hidroetanólico se observó una coloración magenta a pH de  $7.35 \pm 0.2$  (Figura 7) el color fue constante al incrementar el pH hasta 11, puesto que a un pH de 12 la saturación de color disminuyó. Cuando se acidificó el extracto a 2 y 3 cambió a un color naranja (Figura 9).

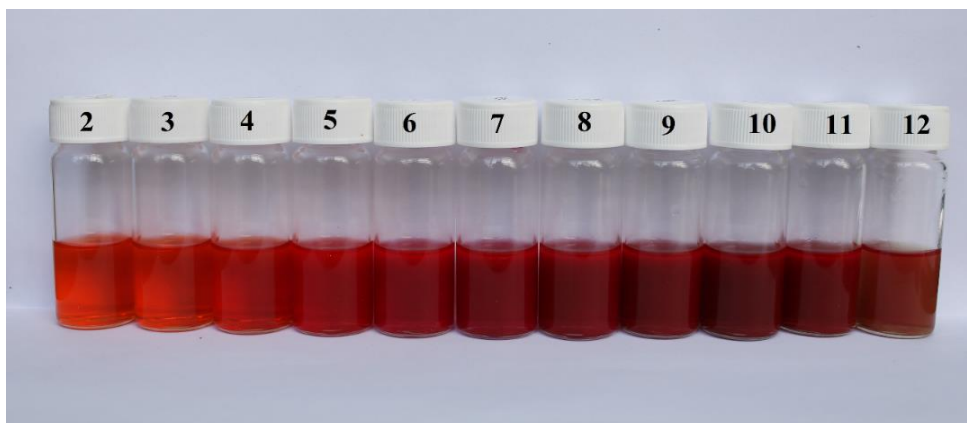


*Figura 9. Barrido de pH de 2 a 12 en extractos hidroetanólico de muiltle*

El extracto etanólico a pH  $6.05 \pm 0.03$  presentó un color verde cartujo, esa coloración se mantuvo estable en pH 4 a 12. Se observaron cambios en la pigmentación en pH muy ácidos de 2-3, el verde cartujo viró a un verde más oscuro (Figura 10). Este extracto fue el que se mantuvo más estable ante las variaciones de Ph.

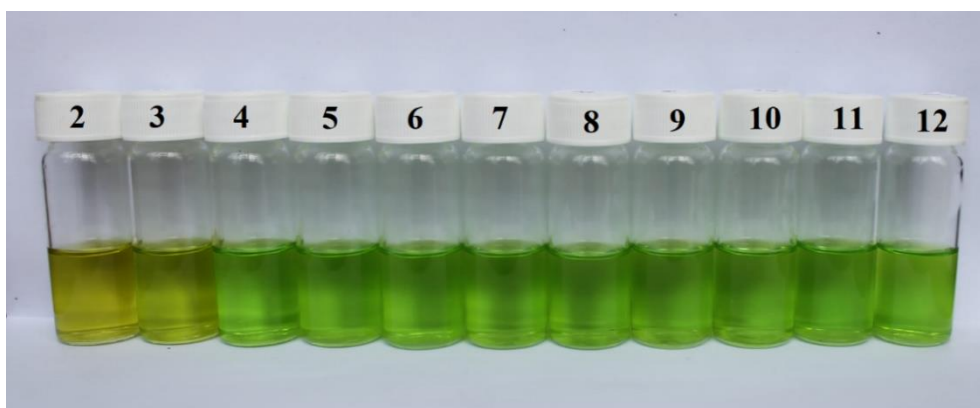


*Figura 10. Barrido de pH 2 a 12 en extractos etanólico de muiltle.*

### 6.3 MEDICIÓN DE COLOR POR COLORIMETRIA

Se determinó el color de cada uno de los extractos bajo una concentración de 0.005 g/mL (Tabla 4). Los valores de las variables analizadas fueron distintas entre cada uno de los extractos.

Para la variable acromática ( $L^*$ ), el extracto hidroetanólico presentó mayores valores ( $40.90 \pm 0.02$ ), seguido por el extracto etanólico ( $34.70 \pm 0.18$ ) y por último el acuoso ( $12.13 \pm 0.01$ ). Esto se puede observar no solamente a través de los valores obtenidos con el colorímetro si no que, de manera visual, el extracto acuoso tiene una pigmentación muy intensa que casi no permite el paso de la luz al ser expuesto a ella. Valores bajos de  $L^*$  están relacionados con una extracción más eficiente de antocianinas (Vieira et al., 2019), esto también se observó en el extracto acuoso de muile donde se encontró la mayor cantidad de antocianinas.

Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, (2017) reportan que conforme aumenta la concentración de etanol en el extracto, aumenta la luminosidad, sin embargo esto puede depender de la concentración a la cual se encuentra el extracto empleado, así como su pH.

**Tabla 4.** Medición de color de los extractos de *J. spicigera* por colorimetría

| Extracto              | Parámetros de color |                    |                    |                    |                      |
|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                       | $L^*$               | $a^*$              | $b^*$              | Chroma             | Hue (°)              |
| <b>Acuoso</b>         | $12.13 \pm 0.01^a$  | $10.24 \pm 0.16^a$ | $-1.39 \pm 0.01^a$ | $10.33 \pm 0.16^a$ | $359.87 \pm 0.002^a$ |
| <b>Hidroetanólico</b> | $40.90 \pm 0.02^b$  | $16.08 \pm 0.03^b$ | $-5.61 \pm 0.06^b$ | $17.04 \pm 0.02^b$ | $359.66 \pm 0.001^b$ |
| <b>Etanólico</b>      | $34.70 \pm 0.18^c$  | $-21.2 \pm 0.25^c$ | $30.93 \pm 0.41^c$ | $37.66 \pm 0.40^c$ | $179.03 \pm 0.002^c$ |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD.

El extracto acuoso y acuoso-etanólico presentaron valores positivos para la variable cromática  $a^*$  y negativos para la variable  $b^*$ . Esto quiere decir que ambos tienden hacia los colores rojo y azul, pero no en la misma proporción. El extracto acuoso para la variable  $a^*$  arrojó valores de  $10.24 \pm 0.16$  y el hidroetanólico de  $16.08 \pm 0.03$ . La variable  $b^*$  se encontró en mayor proporción en el extracto hidroetanólico  $-5.61 \pm 0.06$  en comparación con el acuoso  $-1.39 \pm 0.01$ , con respecto a los valores negativos de esta variable. El extracto hidroetanólico tiende más hacia las tonalidades azules, se observó una diferencia significativa donde aumentó cuatro veces más el valor de  $b^*$  que en el extracto acuoso. Los valores de la variable  $a^*$  para el extracto acuoso y el hidroetanólico también presentaron diferencias significativas, siendo el extracto hidroetanólico el que más tiende al rojo.

Por otro lado, el extracto etanólico tuvo un promedio de  $-21.2 \pm 0.25$  para la variable cromática  $a^*$ , al tener valores negativos para la variable  $a^*$  quiere decir que el extracto tiende al color verde y al amarillo por parte de la variable  $b^*$  al poseer valores positivos de  $30.93 \pm 0.4$ .

Considerando los valores de C (Chroma) que están directamente relacionados con la pureza o saturación del color, el extracto etanólico (verde) presentó una mayor intensidad de color seguido del hidroetanólico (magenta) y acuoso (morado). Los tres extractos mostraron diferencias significativas en este parámetro. El valor de Hue permitió corroborar el matiz de cada muestra, el extracto acuoso e hidroetanólico tuvieron valores similares de 359.87 y 359.66 respectivamente, correspondiente a la tonalidad violeta. El valor del extracto etanólico fue de  $179.03^\circ$ , este ángulo representa a la tonalidad verde ligeramente amarilla de acuerdo con lo descrito por Pocan, İlhan, & Öztop, (2019).

#### **6.4 PIGMENTO BIOACTIVO**

Se seleccionaron dos extractos (Figura 11), hidroetanólico y acuoso para ser aplicados en un producto alimenticio, esto debido a que las tonalidades de estos extractos son más comunes en productos alimenticios, Una vez seleccionadas las tonalidades, ambos extractos se ajustaron a pH 7. El extracto acuoso presentó una pigmentación morada y el hidroetanólico una pigmentación magenta.



**Figura 11.** Extractos seleccionados de muiltle a) acuoso y b) etanólico-acuoso para su aplicación en productos alimenticios.

#### **6.4.1 Caracterización química de los pigmentos**

Los resultados arrojados en la caracterización química de los dos extractos seleccionados indican que existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5). En la Tabla 5 también se puede observar la comparativa con los extractos iniciales de muiltle, a los cuales no se les realizó un ajuste de pH.

##### **6.4.1.1 Cuantificación de fenoles totales**

Así como en la determinación de compuestos fenólicos de los extractos iniciales, hubo una mayor concentración de fenoles totales en el pigmento magenta, que en el morado. El pigmento morado contenía  $16.44 \pm 0.11$  gGAE/100g y el magenta  $19.15 \pm 0.25$  gGAE/100g. Estos pigmentos, a los cuales se les ajustó el pH a 7, presentaron una menor cantidad de fenoles estadísticamente significativas en comparación con los extractos iniciales a pH de  $7.8 \pm 0.0$  (extracto acuoso) y  $7.35 \pm 0.2$  (extracto hidroetanólico), a los cuales no se les modificó el pH. García-Márquez et al., (2012) reportan cambios en la concentración de fenoles totales en extractos de muiltle bajo diferentes pH, donde se ve una disminución en su concentración en el extracto acuoso e hidroetanólico.

**Tabla 5.** Contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante en extractos seleccionados de *J. spicigera*

| Extracto                      | Fenoles Totales (gGAE/100g) | Flavonoides (gEQ/100 g) | Actividad Antioxidante |                          |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
|                               |                             |                         | gTE/ 100g              | Porcentaje de inhibición |
| <b>Acuoso inicial</b>         | 1.72±0.00 <sup>a</sup>      | 0.49±0.01 <sup>a</sup>  | 2.98±0.04 <sup>a</sup> | 28.95±0.68 <sup>a</sup>  |
| <b>Hidroetanólico inicial</b> | 2.16±0.03 <sup>b</sup>      | 0.46±0.02 <sup>b</sup>  | 4.56±0.10 <sup>b</sup> | 54.18±1.63 <sup>b</sup>  |
| <b>Pigmento morado</b>        | 1.62±0.03 <sup>c</sup>      | 0.45±0.00 <sup>b</sup>  | 4.09±0.05 <sup>c</sup> | 46.68±0.84 <sup>c</sup>  |
| <b>Pigmento magenta</b>       | 1.94±0.03 <sup>d</sup>      | 0.35±0.00 <sup>c</sup>  | 5.21±0.01 <sup>d</sup> | 63.96±1.03 <sup>d</sup>  |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD.

#### 6.4.1.2 Cuantificación de flavonoides

Se encontró una mayor cantidad de flavonoides en el pigmento morado  $2.67 \pm 0.02$  gEQ/100g con diferencias significativas en comparación con el pigmento magenta con  $2.09 \pm 0.01$  gEQ/100g (Tabla 5). El pigmento morado al igual que el magenta tuvieron concentraciones menores de flavonoides a las previamente reportadas del extracto acuoso e hidroetanólico iniciales de muile, a estos extractos se les ajustó el pH para dar lugar al pigmento morado y magenta. Por lo tanto, el pH ejerce un efecto en la disponibilidad de flavonoides.

#### 6.4.1.3 Cuantificación de antocianinas monoméricas y porcentaje de color polimérico

La densidad de color y el color polimérico de los extractos morado y magenta tuvieron diferencias significativas entre sí (Tabla 6). El pigmento morado con relación al extracto

acuoso y el pigmento magenta con el extracto hidroetanólico, no mostraron diferencias significativas en la densidad de color y color polimérico.

Asimismo, los pigmentos seleccionados arrojaron porcentajes de color polimérico similares entre ellos y a los obtenidos en los extractos iniciales, puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas comparado cada uno con su respectivo solvente es decir el pigmento morado de pH 7 con el extracto acuoso de 7.8.

El porcentaje de color polimérico del extracto de color morado fue de  $66.56 \pm 0.22\%$  y el extracto de color magenta de  $65.35 \pm 0.24\%$ , sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 5). Cabe recalcar que esto no es un indicativo de que tienen la misma concentración de antocianinas, puesto a que su densidad de color es distinta entre los dos pigmentos y los extractos iniciales. El porcentaje en este caso nos dice que se encuentran en la misma proporción el color polimérico con respecto a su densidad o al total de antocianinas presentes.

**Tabla 6.** *Contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas en extractos de J. spicigera*

| <b>Extracto</b>               | <b>Antocianinas monoméricas (mg/100g)</b> | <b>Densidad de color</b> | <b>Color polimérico</b> | <b>% Color polimérico</b> |
|-------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Acuoso inicial</b>         | $49.76 \pm 0.5^a$                         | $7.14 \pm 0.05^a$        | $4.82 \pm 0.02^a$       | $67.59 \pm 0.22^a$        |
| <b>Hidroetanólico inicial</b> | $363.07 \pm 0.42^b$                       | $11.25 \pm 0.01^b$       | $7.3 \pm 0.18^b$        | $64.89 \pm 1.72^b$        |
| <b>Pigmento morado</b>        | $35.90 \pm 0.7^c$                         | $7.46 \pm 0.18^a$        | $4.97 \pm 0.11^a$       | $66.56 \pm 0.22^{ab}$     |
| <b>Pigmento magenta</b>       | $332.64 \pm 0.90^d$                       | $11.01 \pm 0.20^b$       | $7.20 \pm 0.16^b$       | $65.35 \pm 0.24^b$        |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD.

La concentración de antocianinas monoméricas en los pigmentos fue menor a la de los extractos iniciales, por tanto, la cantidad de antocianinas presentes en el muiltle se ven afectada por el pH del medio. Si bien la estabilidad de las antocianinas aumenta con el

descenso de pH de la solución, en extractos de mora, camu-camu, pitaya roja, fresa, uva roja y jabuticaba, la acidificación del medio no fue eficiente para promover una mayor extracción de antocianinas (Vieira et al., 2018). No obstante, la eficacia de acidificación del medio dependerá del tipo de ácido utilizado (Montes et al., 2005). Revilla et al., (1998) mencionan que la extracción de antocianinas aciladas bajo condiciones ácidas puede causar su hidrólisis parcial o total.

#### **6.4.1.4 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH**

Asimismo, como en los extractos iniciales, el pigmento magenta que provenía del solvente agua-etanol tuvo una mayor concentración en gramos equivalentes de Trolox, de  $5.21 \pm 0.01$  gTE/100g, en contraste con el pigmento morado que tuvo  $4.09 \pm 0.05$  gTE/100g, existiendo diferencias significativas entre ambos extractos (Tabla 5).

Aunado a esto, se observó una mayor capacidad antioxidante en los pigmentos seleccionados (morado y magenta), es importante enfatizar que se ajustó el pH a 7 a diferencia de los extractos iniciales. Por lo tanto, el pH tiene un papel importante en la capacidad antioxidante que tienen los extractos.

La capacidad antioxidante de los eliminadores de radicales libres (FRS) fenólicos dependen de diversos factores como su volatilidad, sensibilidad al pH y polaridad (tipo de solvente utilizado) (Karadag , Ozcelik , & Saner, 2009). Los valores de pH tienen efecto sobre la capacidad reductora de los antioxidantes a causa de la disminución del potencial de ionización que disminuye al aumentar el pH, reflejando una mayor capacidad de donación de electrones con la desprotonación (Prior, Wu, & Schaich, 2005; Karadag , Ozcelik , & Saner, 2009).

Por consiguiente, el porcentaje de inhibición del extracto morado aumentó a  $46.68 \pm 0.84$  y el extracto magenta a  $63.96 \pm 1.03$ , con diferencias significativas entre ambos (Tabla 5).

### 6.4.2 Medición de color por colorimetría

De igual manera, como en la sección 6.4 se determinó el color de los dos pigmentos a una concentración de 0.005g/mL.

Para la variable L\* (luminosidad) ambos pigmentos (morado y magenta) tuvieron diferencias significativas con valores de  $10.91 \pm 0.13$  y  $21.5 \pm 0.02$  respectivamente (Tabla 7). El pigmento morado está más cercano al 0, por lo tanto, más cercano al negro y el pigmento magenta al blanco. El pigmento morado mostró diferencias significativas con respecto al extracto acuoso inicial, así como el pigmento magenta con el extracto hidroetanólico inicial. Ambos pigmentos fueron más cercanos al 0 con respecto a su extracto inicial correspondiente, por ende, fueron más oscuros.

*Tabla 7. Parámetros de color de los extractos morado y magenta de J. spicigera por colorimetría*

| Extracto                      | Parámetros de color |                    |                    |                    |                      |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                               | L*                  | a*                 | b*                 | Chroma             | Hue                  |
| <b>Acuoso inicial</b>         | $12.13 \pm 0.01^a$  | $10.24 \pm 0.16^a$ | $-1.39 \pm 0.01^a$ | $10.33 \pm 0.16^a$ | $359.87 \pm 0.002^a$ |
| <b>Hidroetanólico inicial</b> | $40.90 \pm 0.02^b$  | $16.08 \pm 0.03^b$ | $-5.61 \pm 0.06^b$ | $17.04 \pm 0.02^b$ | $359.66 \pm 0.001^b$ |
| <b>Pigmento morado</b>        | $10.91 \pm 0.13^c$  | $5.58 \pm 0.09^c$  | $-4.1 \pm 0.08^c$  | $6.92 \pm 0.12^c$  | $359.36 \pm 0.2^c$   |
| <b>Pigmento magenta</b>       | $21.5 \pm 0.02^d$   | $25.24 \pm 0.09^d$ | $-1.55 \pm 0.07^d$ | $25.28 \pm 0.1^d$  | $359.94 \pm 0.001^d$ |

Los valores que poseen letras distintas entre cada columna marcados como superíndices, son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), se determinó por la prueba LSD.

En la variable cromática a\* los valores son positivos correspondiente a las tonalidades rojas a pesar de ello, el pigmento magenta ( $25.24 \pm 0.09$ ) tiende más hacia el rojo que el morado ( $5.575 \pm 0.09$ ). El pigmento magenta tuvo valores más altos (más rojo) con respecto al extracto hidroetanólico inicial. Por el contrario, el pigmento morado arrojó valores más bajos

(menos rojo) en comparación con el extracto acuoso inicial. Las diferencias entre los pigmentos y los extractos iniciales fueron estadísticamente significativas.

Por lo que concierne a la variable  $b^*$ , ambos pigmentos (morado y magenta) presentaron valores negativos:  $-4.1 \pm 0.08$  y  $-1.55 \pm 0.07$  respectivamente, estos corresponden a la tonalidad azul. El pigmento morado tuvo valores más altos que el extracto acuoso inicial, por lo que su tonalidad fue más cercana al azul. El pigmento magenta comparado con el extracto hidroetanólico presentó tonalidades más intensas de azul.

Los dos pigmentos tuvieron un matiz (hue) correspondiente a la tonalidad violeta, sin embargo, el pigmento magenta mostró una mayor intensidad de color incluso con respecto al extracto hidroetanólico. El pigmento morado tuvo una menor saturación de color en comparación con el extracto acuoso.

A pesar de que a los pigmentos seleccionados no se les realizaron modificaciones bruscas de pH, estos cambios tuvieron repercusiones en su composición química, ya que se observaron diferencias significativas en su caracterización química (compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante) con respecto a los extractos iniciales.

La cantidad de antocianinas poliméricas a diferencia de la determinación de los otros parámetros, no se vio modificada por las ligeras variaciones de pH, aunque se han destacado las antocianinas en general por ser sensibles a diferentes factores como el pH.

De manera visual no se observaron cambios en la coloración bajo los cambios de pH realizados en los extractos y pigmentos seleccionados, sin embargo, a través de la colorimetría se logró ver diferencias entre cada una de las variables cromáticas y acromáticas.

#### **6.4.3 Rendimiento de pigmentos**

Se prepararon 500 mL de cada extracto de las tonalidades seleccionadas a una concentración de 0.005g/mL, donde el extracto acuoso es correspondiente a la tonalidad morada y el extracto hidroetanólico corresponde a la tonalidad magenta a ambas se realizó un ajuste de

pH. Los extractos fueron concentrados en el rotavapor y posteriormente liofilizados. El pigmento morado tuvo un rendimiento de 27.9% y el pigmento magenta, un rendimiento de 20.5%.

(Salcedo-Luna, 2018) reportó que el solvente que obtuvo un mayor porcentaje de rendimiento de 46.05%, fue el etanol al 50%.

Jiménez-Ortega, Barrientos-Ramírez, & Albarrán-Rodríguez (2018) obtuvieron un rendimiento de 2.42% de extractos solubles en agua. En otras especies como *Justicia wynaadensis* Patil, Nigudkar et al., (2015) reportaron un rendimiento de 5.62% en extractos acuosos macerados.

#### 6.4.4 Estabilidad del color en la gelatina

Se evaluó la estabilidad de los pigmentos (morado y magenta) aplicados en gelatinas a través de colorimetría, se incorporó dos muestras para poder comparar la evolución del pigmento extraído del muile y su tonalidad comercial equivalente (Figura 12). Se evaluaron tres variables: acromática ( $L^*$ ) y dos cromáticas ( $a^*$  y  $b^*$ ) durante 23 días, fueron almacenadas a 4°C. Se le asignó un código a una cada a: gelatina con pigmento morado de muile (GMOM), gelatina morada con pigmento comercial (GMOC), gelatina con pigmento magenta de muile (GMAM) y gelatina con pigmento magenta comercial (GMAC).

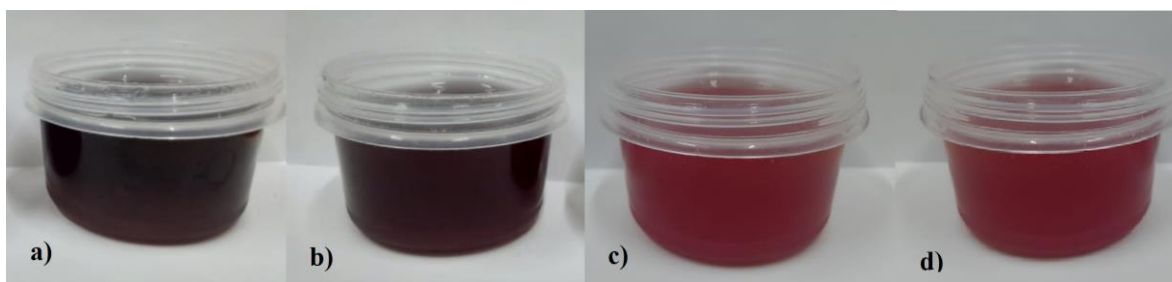


**Figura 12.** Gelatina adicionada con a) pigmento bioactivo morado extraído de muile, GMOM, b) colorante comercial morado, GMOC, c) pigmento bioactivo magenta extraído de muile, GMAM y d) pigmento comercial magenta GMAC

En la Figura 13 se muestra la cinética de la estabilidad para la coordenada  $L^*$ . Las cuatro gelatinas exhibieron cambios para esta variable. GMOC, GMAC y GMAM disminuyeron sus valores de  $L^*$ , mientras que gelatina GMOM aumentó con el transcurso del tiempo, esta variable está relacionada con la transmisión de luz (Vieira et al, 2018). El aumento de la coordenada  $L^*$  puede estar relacionado con la formación de extractos translúcidos, debido a un desvanecimiento del color (Reyes & Cisneros-Zevallos, 2007). Los cambios de luminosidad a través del tiempo se representaron como  $\Delta L^*$ . Donde GMOM tuvo  $\Delta L^* = 3.25$ , GMOC  $\Delta L^* = -0.87$ , GMAM  $\Delta L^* = -1.83$ . y GMAC  $\Delta L^* = 1.8$ .

Las gelatinas adicionadas con pigmento de muile (GMOM y GMAM) tuvieron una menor estabilidad en comparación con las gelatinas adicionadas con pigmento comercial.

Pavón-García et al., (2011) reportaron este mismo comportamiento de la coordenada  $L^*$  a través del tiempo en extractos acuosos de muile, donde la luminosidad fue decreciendo, con un  $\Delta L^*$  aproximadamente de 0.37-0.45 en el día 20. Parrado-Castro & Pardo-Pardo, (2019) observaron el mismo patron de esta variable en bebidas de leche fermentadas a través del tiempo, a las cuales se les adicionó pigmento de *Justicia secunda* Vahl.

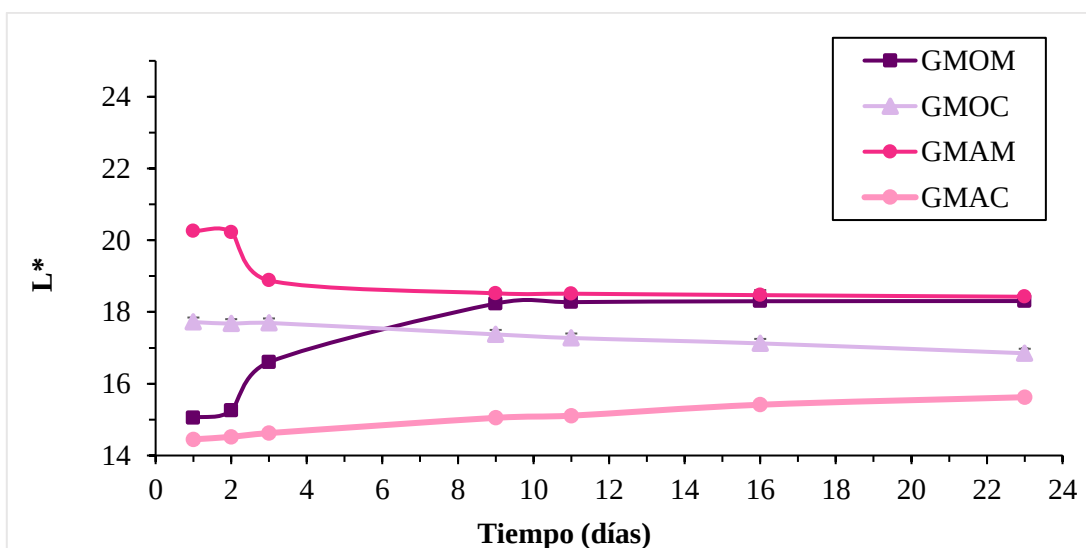


**Figura 13.** Cinética de estabilidad de la coordenada  $L^*$  en gelatinas adicionadas con pigmentos

El comportamiento de la coordenada  $a^*$  a través del tiempo fue distinto a de  $L^*$ . Las gelatinas morada (GMOM) y magentas (GMAM y GMAC) adicionadas con pigmentos de muile

redujeron sus valores (Figura 14), perdiendo pigmento rojo de manera contraria a lo reportado por Pavón-García et al.,(2011) en extractos acuosos de *J. spicigera*. La gelatina morada con pigmento comercial (GMOC) incrementó los valores de la coordenada  $a^*$ , aumentando la tonalidad roja. La evolución del color de la gelatina GMAM y GMAC durante su periodo de almacenamiento, tuvieron una mayor estabilidad con respecto GMOM y GMOC. Las diferencias de color de la gelatinas GMOM, GMOC, GMAM y GMAC para esta variable durante el periodo de almacenamiento fueron de  $\Delta a^* = -0.7$ ,  $\Delta a^* = 0.75$  y  $\Delta a^* = -0.32$  y  $\Delta a^* = -0.22$ , respectivamente. A pesar de que el comportamiento no fue el mismo para las 4 gelatinas, el  $\Delta a$  reportado por Pavón-García et al.,(2011) fue mayor.

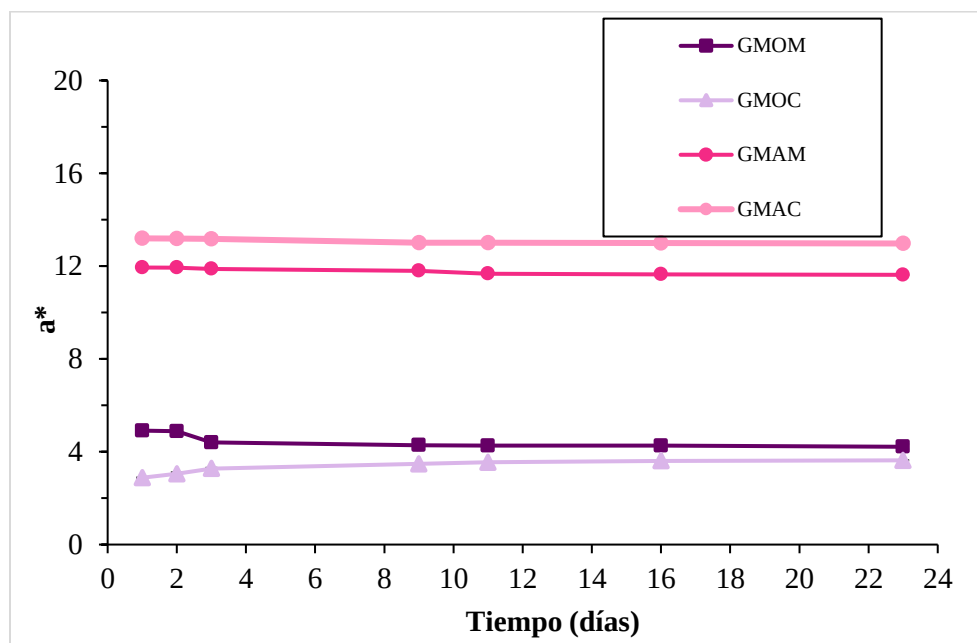


**Figura 14.** Cinética de estabilidad de la coordenada  $a^*$  en gelatinas adicionadas con pigmentos

La cinetica de estabilidad de la coordenada  $b^*$  se presentó en la Figura 15. Las cuatro gelatinas aumentaron sus valores para esta coordenada, esto nos indica que la tonalidad amarilla se incrementó ligeramente. GMOM y GMAC presentaron menores cambios que

GMOC y GMAM por lo tanto, exhibieron una mayor estabilidad conforme el tiempo. La diferencia del día 1 al 23 fue de  $\Delta b^* = 0.10$ , para GMOM,  $\Delta b^* = 0.42$ , para GMOC y  $\Delta b^* = 0.55$  para GMAM y  $\Delta b^* = 0.11$  para GMAC. Pavón-García et al., (2011) observaron un aumento en la coordenada  $b^*$  a través del tiempo en extractos acuosos de muile, donde en el día 20 determinaron un  $\Delta b^*$  aproximadamente de 0.2, siendo menor el  $\Delta b^*$  de la gelatina con pigmento morado de muile.

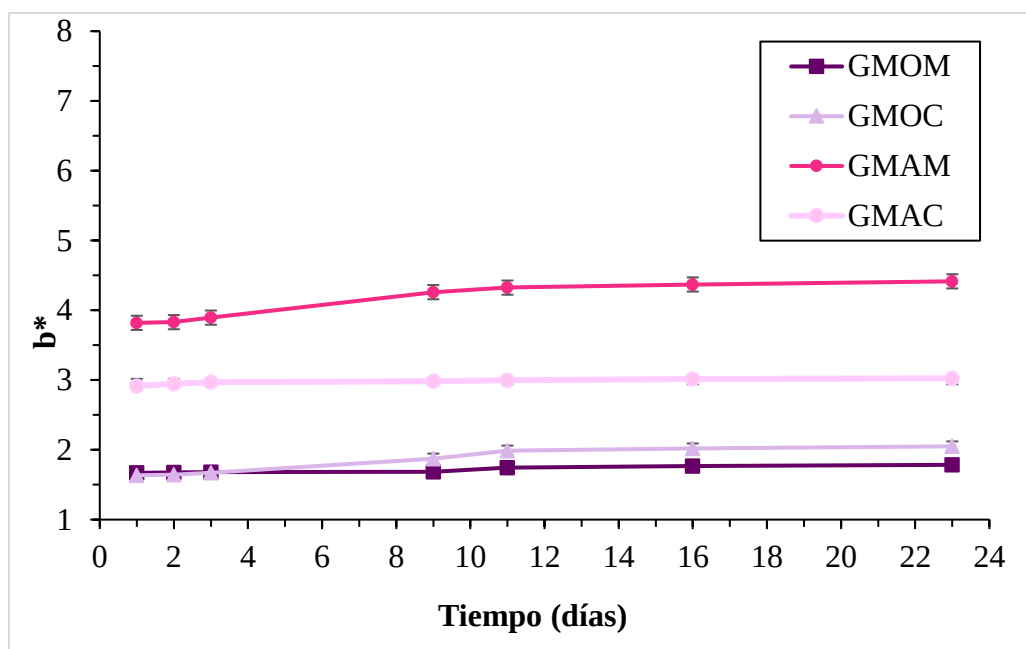


**Figura 15.** Cinética de estabilidad de la coordenada  $b^*$  en gelatinas adicionadas con pigmentos

La diferencia de color total de las tres coordenadas evaluadas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), se determinó con  $\Delta E$ . En la Figura 16 se observa que la diferencia de color total ocurre a partir del día 3 de manera abrupta para las gelatinas con pigmento morado y magenta extraídos del muile (GMOM y GMAM, respectivamente), a diferencia de la gelatina adicionada con pigmento comercial, a pesar de que los cambios de color total comienzan en el día 2, estos no son abruptos. De acuerdo con los valores de  $\Delta E$  en el día 23, GMAC y GMOC mostraron menores cambios de color y las gelatinas con mayores diferencias de color total fue GMOM seguida

de GMAM. Esto nos demuestra que los pigmentos extraídos del muile tienen menor estabilidad de color a través del tiempo en comparación con un pigmento comercial. Únicamente los valores de la gelatina morada al final del almacenamiento; fueron más altos que los reportados por Rodrigues, et al., (2018) donde añadieron pigmento extraído de *Myrciaria cauliflora* en gelatinas y por Pavón-García et al., (2011) en extractos acuosos de muile, pero menores a los obtenidos por Obon et al., (2009) en una bebida adicionada con extracto de *Opuntia stricta*.

No obstante, los valores de  $\Delta E$  fueron menores a 10 y 5, cifras que indican una variación evidente del color, estas cifras fueron establecidas por Vera de Rosso & Mercadante, (2007) y Obón et al., (2009).

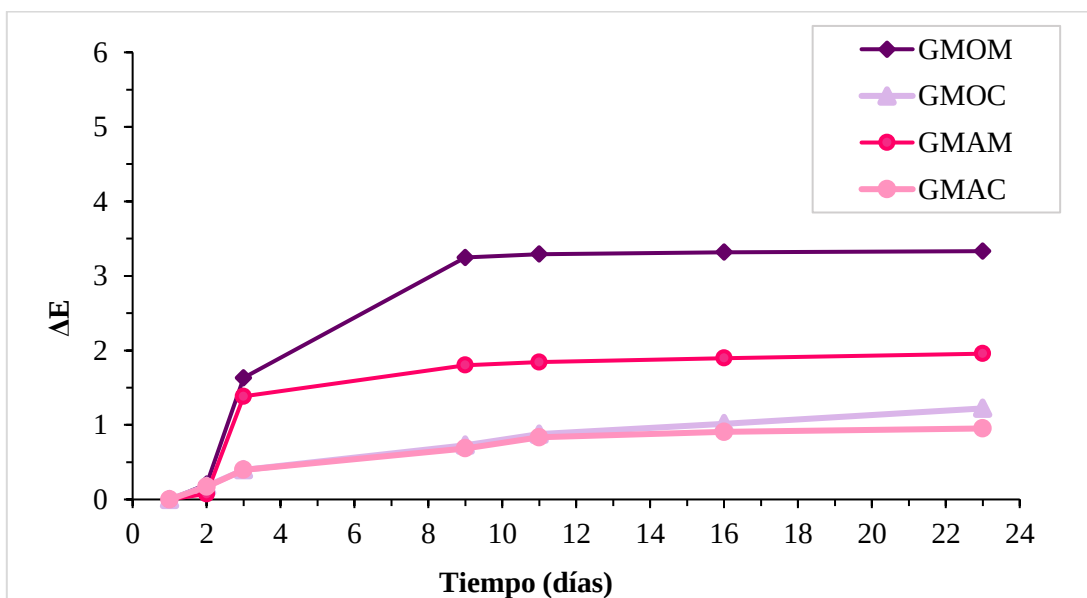


**Figura 16.** Estabilidad del cambio de color total de gelatinas adicionadas con pigmento

#### 6.4.5 Prueba hedónica de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos

En la prueba hedónica se elaboraron cuatro gelatinas para su análisis (Figura 17), a cada una se le asignó un código, GMOM se elaboró con pigmento morado extraído de muile de y la

gelatina GMAM con el pigmento magenta. GMOC y GMAC, se elaboraron a partir de una mezcla de pigmentos comerciales dando lugar al color morado y magenta respectivamente.

GMOC obtuvo un mayor puntaje en el atributo de color, no obstante, de acuerdo con la prueba de rangos múltiples no se observó una diferencia significativa con GMOM. De la misma manera GMAM tuvo mayor puntuación que GMAC, sin diferencias significativas. Solo se encontraron diferencias significativas entre GMOC y GMAC. La gelatina con pigmento morado de muile presentó un mayor puntaje en el atributo olor y sabor, sin embargo, no existen diferencias significativas con las gelatinas restantes. En el atributo textura las gelatinas GMOM y GMAM tuvieron un mayor valor en relación con las gelatinas GMOC y GMAC, pero sin diferencias significativas.

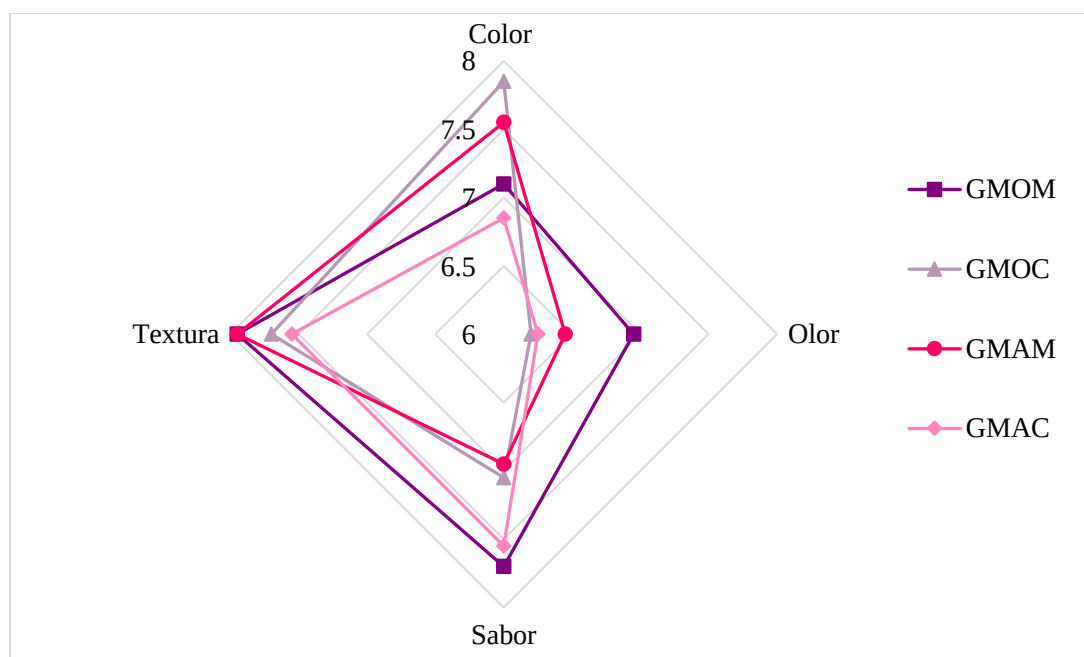


**Figura 17.** Gráfico radial de los puntajes obtenidos en la prueba hedónica de gelatinas adicionadas con pigmento: morado a partir de muile (GMOM), morado comercial (GMOC), magenta a partir de muile (GMAM) y magenta comercial (GMAC)

Castro-Alatorre et al., (2021) realizaron una prueba hedonica en gelatinas con microcápsulas de extracto de muile, donde el atributo de sabor y aroma obtuvieron una puntuación de 5 y 5-6 respectivamente, estos valores fueron ligeramente inferiores a los reportados en este

trabajo, esto se puede ser debido a que la formulación de las gelatinas no fue la misma. Soria-Zamora, (2014) reportó valores similares en memeladas de frutos rojos y muiltle encapsulado y sin encapsular.

Así mismo se realizó la evaluación de aceptación de cada uno de los productos, donde se tomaron en cuenta los cuatro atributos seleccionados. GMOM tuvo una mayor aceptación por parte del panel como se observa en la Figura 18 seguido de GMOC. GMAM y GMAC tuvieron el mismo porcentaje de aceptación, con esto podemos inferir que el panel no hizo alguna preferencia por el pigmento magenta proveniente del muiltle o el comercial. La gelatina adicionada con pigmento morado de muiltle mostró la mayor aceptación por parte del panel e incluso mayor que la gelatina con pigmento comercial.

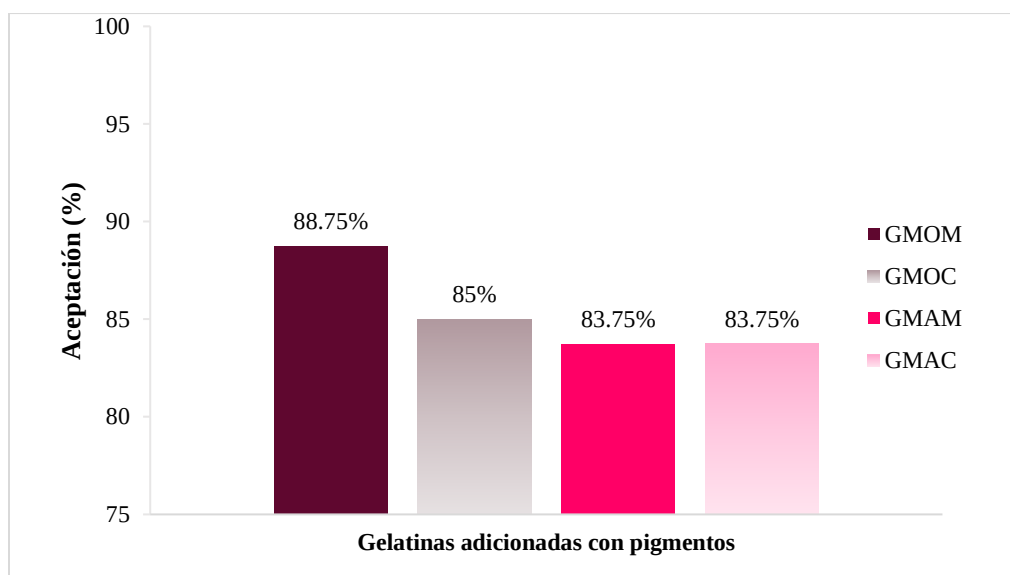


**Figura 18.** Gráfico de porcentaje de aceptación de gelatinas adicionadas con pigmentos

# **CAPÍTULO 7**

# **CONCLUSIONES**

Las tonalidades y características químicas de los extractos de *Justicia spicigera* se ven afectadas por el solvente empleado.

Polaridades intermedias como la mezcla de etanol y agua permitieron una mayor extracción de compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas, color polimérico y una mayor capacidad antioxidante. Mientras que la mayor extracción de flavonoides se logró utilizando etanol como solvente puro.

Las características químicas de los extractos, como los compuestos fenólicos, antocianinas monoméricas y flavonoides, se vieron afectados después del ajuste de pH a los extractos.

De acuerdo con los parámetros de color evaluados, existieron diferencias durante el periodo de almacenamiento donde las gelatinas con pigmento comercial mostraron una mayor estabilidad, sin embargo, no fueron perceptibles a simple vista en el producto.

Los resultados obtenidos demuestran que los pigmentos de *Justicia spicigera* no solo poseen capacidad tintórea y propiedades bioactivas, sino que además presentan un alto nivel de aceptación por parte del consumidor, lo que respalda su potencial como alternativa natural para la industria alimentaria.

# **CAPÍTULO 8**

## **PERSPECTIVAS**

- Analizar las características químicas de los extractos bajo distintos pH.
- Evaluar la estabilidad del pigmento posterior a los 23 días.
- Buscar métodos para mejorar la estabilidad del pigmento, así como sus características bioactivas.
- Aplicar el pigmento en diferentes productos alimenticios y/o cosméticos.

# **CAPÍTULO 9**

## **REFERENCIAS**

- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M., Chávez, M., . . . García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl. *Journal of Ethnopharmacology*, 888-894.
- Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 135-147.
- Markakis, P., & Jurd, D. L. (1974). Anthocyanins and their stability in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 437-456.
- Ahmed, J., Shivhare, U., & Sandhu, K. (2002). Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, 67(7), 2692-2695.
- Alvarez-Poblano, P., Roman-Guerrero, A., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2020). Exogenous addition of muicle (*Justicia spicigera* Schechtendal) extract to white maize tortillas affects the antioxidant activity, texture, color, and in vitro starch digestibility. *LWT-Food Science and Technology*, 133, 110120.
- Anaya-Esparza, L. M., Ramos-Aguirre, D., Zamora-Gasga, V. M., Yahia, E., & Montalvo-González, E. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Justicia spicigera* leaves. *Food Sci Biotechnol*, 27, 1093-1102.
- Attokaran, M. (2011). *Natural Food Flavors and Colorants*. Iowa,USA: Willey-Blackwell.
- Avello, M., & Mario, S. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*(494), 161-172.
- Awad, N. A., Abdelkawy, M. A., Hamed, M. A., Souleman, A. M., Abdelrahman, E. H., & Ramadan, N. S. (2015). ANTIOXIDANT AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF JUSTICIA SPICIGERA ETHYL ACETATE FRACTION AND CHARACTERIZATION OF ITS ANTHOCYANIN CONTENT. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8), 91-96.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson.

- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). *Antioxidant and Coloring Characteristics of Muicle (Justicia spicigera)*. Anual Meeting and Food Expo- Institute of Food Technologists, Illinois, USA.
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltran, J. A. (2014). Uses of Justicia spicigera in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, 401 of 414.
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2017). Physicochemical and antioxidant characterization of Justicia spicigera. *Food Chemistry*, 218, 305-312.
- Bendokas, V., Stanys, V., Mažeikiene, I., Trumbeckaite, S., Baniene, R., & Liobikas, J. (2020). Anthocyanins: From the Field to the Antioxidants in the Body. *Antioxidants*, 9, 1-17.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies. *Methods in enzymology*, 186, 343–355.
- Brito, E. (1997). Antocianinas presentes en Jacobina Spicigera Schl. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceúticas*, 28(5).
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). FLAVONOIDES: CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos tropicales*, 5-14.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Castro-Alatorre, N. C., Gallardo-Velázquez, T., Boyano-Orozco, L. C., Téllez-Medina, D. I., Meza-Márquez, O. G., & Osorio-Revilla, G. (2021). Extraction and Microencapsulation of Bioactive Compounds from Muicle (Justicia spicigera) and Their Use in the Formulation of Functional Foods. *Foods*, 10(8), 1747.
- Castro-Muñoz, R., León-Becerril, E., & García-Depraect, O. (2022). Beyond the Exploration of Muicle (Justicia spicigera): Reviewing Its Biological Properties, Bioactive Molecules and Materials Chemistry. *Processes*, 10(5), 1035. MDPI AG.

- CONABIO. (2019). Recuperado el 07 de 08 de 2020, de Catálogo de autoridades taxonómicas de especies de flora y fauna con distribución en México. Base de datos SNIB-CONABIO, Méxic: <https://www.snib.mx/taxonomia/descarga/>
- Cordero, R. C. (2021). *Cultivo orgánico de Espinosilla (Loeselia mexicana(Lam.) Brand) y Muicle (Justicia spicigeraSchltdl)*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México .
- Coultate, T., & Blackburn, R. (2018). Food colorants: their past, present, and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165-186.
- Dangles, O., Fargeix, G., & Dufoir, C. (2000). Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*(8), 1653-1663.
- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2003). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. Boca Raton, Florida: CRC PRESS.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez , A. R., & Paredes-López , O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289.
- Domínguez-Barradas, C., Cruz-Morales, G. E., & González-Gándara, C. (2015). Plantas de uso medicinal de la Reserva Ecológica "Sierra de Otontepec", municipio de Chontla, Veracruz, México. *CienciaUAT*, 9(2), 41-52.
- Domínguez-Soto, J. M., Román-Gutiérrez, A. D., Prieto-García, F., & Acevedo-Sandoval, O. (2012). Sistema de Notación Munsell y CIELab como herramienta para evaluación de color en suelos\*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 3(1), 141-155.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 5-22.
- Durkee, L. H. (1986). Acanthaceae. En W. C. Burger, *Flora Costaricensis, Family 200* (págs. 1-87). Chicago: Field Museum of Natural History.

- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50(25), 7461–7466.
- Espinosa-Morales, Y., Reyes, J., Hermosín, B., & Azamar-Barrios, J. A. (2012). Characterization of a Natural Dye by Spectroscopic and Chromatographic Techniques. *MRS Proceedings*, 1374, 49-59.
- Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, M. (2013). Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats. *PharmacologyOnline*, 2, 120-127.
- Euler, K. L., & Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia Spicigera*. *Journal of Natural Products*, 220-220.
- Farrokhnia, M. (2020). Density Functional Theory Studies on the Antioxidant Mechanism and Electronic Properties of Some Bioactive Marine Meroterpenoids: Sargahydroquionic Acid and Sargachromanol. *ACS Omega*, 5(32), 20382–20390. Obtenido de <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02354>
- FDA y IFIC. (13 de Diciembre de 2020). *Food ingredients and colors*. Obtenido de U.S Food and Drug Administration: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors#foodadd>
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España : Acribia.
- Fifen, J. J., Nsangou, M., Dhaouadi, Z., Motapon, O., & Jaidane, N. (2011). Solvent effects on the antioxidant activity of 3,4-dihydroxyphenylpyruvic acid :DFT and TD-DFT studies. *Computational and Theoretical Chemistry*, 966(1-3), 232-243.
- Figura, L. O., & Teixeira, A. A. (2007). *Food Physics*. Berlin, Alemania : Springer.
- Foti, M., & Giuseppe, R. (2001). Kinetic Solvent Effects on Phenolic Antioxidants Determined by Spectrophotometric Measurements. *J. Agric. Food Chem*, 49, 342–348.
- Francis, F. J., & Markakis, P. C. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science*, 273-314.

- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 1-10.
- Garzón , G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta biol. Colomb*, 27 - 36.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En R. E. Wrolstad , A. E. Terry , A. Haejung , E. A. Decker , M. H. Penner , D. S. Reid , . . . P. Sporns, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (págs. F1.2.1-F1.2.13). New York, USA: John Wiley and Sons.
- Gomez-Verjan, J. C., Reyes-Chilpa, R., & Aguilar, M. I. (2012). Chemistry and Pharmacology of Selected Asian and American Medicinal Species of Justicia. En V. K. Gupta, *Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine Vol. 1* (págs. 400-418). India: Daya Publishing House.
- González, K. L., Gutiérrez, R., Hernández, Y., Valdés-Iglesias, O., & Rodriguez, M. (2016). Determination of the antioxidant capacity of two seagrass species according to the extraction method. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(5), 199-205.
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2008). *Digital Image Processing*. New Jersey, USA: Pearson.
- Gulcin, Í. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *IJPSR*, 6(2), 546-566.
- Halue, L. V., Nambela, L., & Mgani, Q. (2019). A Review on Source, Chemistry, Green Synthesis and Application of Textile Colorants. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119036.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 1, 163-187.

- Hendry, G. A., & Houghton, J. D. (1996). *Natural Food Colorants*. Glasgow, Escocia: Blackie Academic and Professional.
- Humphrey, A. M. (2004). Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. *Journal of Food Science*, 69, 422–425.
- IBUNAM. (27 de 05 de 2013). *Justicia spicigera Schltld.*, *ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares*. Recuperado el 07 de 08 de 2020, de Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México.: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:834936>
- Ismail, L. D., Lorenz, P., & Stermitz, F. R. (1998). Isolation and Synthesis of an r-Malamic Acid Derivative from *Justicia ghiesbreghtiana*. *J. Nat. Prod*, 61, 1174-1176.
- ITIS. (s.f.). *Sistema Integrado de Información Taxonómica*. Recuperado el 07 de 08 de 2020, de [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=507036&print\\_version=PRT&source=to\\_print#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=507036&print_version=PRT&source=to_print#null)
- Jackman , R. L., & Yada, R. Y. (1987). ANTHOCYANINS AS FOOD COLORANTS - A REVIEW. *Journal of Food Biochemistry*, 201-247.
- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. En G. A. Hendry, & J. D. Houghton, *Natural Food Colorants* (págs. 244-309). Bostos. MA: Springer.
- Jacobo-Salcedo , M. d., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvareze, C., González-Espíndola, L. A., Domínguez, F., . . . García-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Mexican Medicinal Plants. *Natural Product Communications*, 6(12), 1925 - 1928.
- Jadhav, R. V., & Bhujbal, S. S. (2020). A REVIEW ON NATURAL FOOD COLORS. *Pharmaceutical Resonance*, 2(2), 12-20.
- Jimenez-Gonzalez, O., López-Malo, A., González-Pérez, J. E., Ramírez-Corona, N., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2023). Thermal and pH stability of *Justicia spicigera* (Mexican honeysuckle) pigments: Application of mathematical probabilistic models to predict pigments stability. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 6.

- Jiménez-Ortega, L. A., Barrientos-Ramírez, L., & Albarrán-Rodríguez, E. (2018). Desarrollo y evaluación de un yogurt bebible adicionado de extracto liofilizado de *Justicia spicigera* como colorante natural. *e-CUCBA*(9), 25-34.
- Judson King, C. (2021). *Procesos de separación*. Barcelona, España: Reverté.
- Karadag , A., Ozcelik , B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods*, 2, 41-60.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang , S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical. *FOOD & NUTRITION RESEARCH*, 1-21.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1-21.
- Konica Minolta. (20 de 11 de 2020). *Konica Minolta Sensing Americas*. Obtenido de <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Kuskoski, M. E., Asuero, A. G., García-Padilla, C. M., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*, 24(4), 691-693.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L\* a\* b\* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084-1091.
- Lock, O. S. (1997). *Colorantes naturales*. Lima, Peru : Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Londoño Moreira, L., & Dueñas Rivadeneira, A. A. (2024). Uso potencial del pigmento de Muicle. *JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH*, 9(4), 32-46.
- López-Alarcón, C., & Denicolab, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Lorenz, P., Stermitz, F. R., & Ismai, L. D. (1999). An amide of L-threo-gamma-hydroxyglutamic acid from *Justicia*. *Phytochemistry*, 52, 63-66.

- MaDdougall, D. B. (2002). *Colour in food. Improving quality*. England: Woodhead Publishing Limited.
- Maltabar, Y. (2020). Extracción y Cuantificación de Antocianinas por Método de pH. (*Tesis de pregrado*). Universidad San Francisco de Quito.
- Marañón-Ruiz, V. F., Rizo de la Torre, L. d., & Chiu-Zarate, R. (2011). Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z. *Superficies y Vacío*, 24(4), 113-120.
- Marcano, D. (2018). *Introducción a la Química de los Colorantes Colección Divulgación Científica y Tecnológica*. Caracas, Venezuela: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- Martinez, M. (1992). *Plantas Medicinales de México*. México: Botas.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñon, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 271-278.
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 57-66.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturales. *CTC Alimentación*, 26, 108–113.
- Miranda, M., & Cuéllar, A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales*. Ciudad de la Habana: Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela.
- Munsell, A. H. (1905). *A color notation – A measured color system, based on the three qualities Hue, Value and Chroma*. Boston : Geo. H. Ellis Co.
- Muñoz-López, C., Urrea-García, G. R., Jiménez-Fernández, M., Rodríguez-Jiménes, G., & Luna-Solano, G. (2018). Efecto de las condiciones de liofilización en propiedades fisicoquímicas, contenido de pectina y capacidad de rehidratación de rodajas de ciruela (*Spondias purpurea* L.). *Agrociencia*, 52(1).

- MXCITY. (20 de 11 de 2020). *MX CITY Guía Insider*. Obtenido de <https://mxcity.mx/2020/02/el-muicle-es-una-de-las-plantas-medicinales-mexicanas-mas-antiguas-fotos/>
- Nambi, E. V., Thangavel, K., Shahir, S., & Geetha, V. (2015). Evaluation of colour behavior during ripening of Banganapalli. *Journal of Applied Horticulture*, 17(3), 205-209.
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2017). Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *ritical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3243-3259.
- NRCS, USDA. (2020). *The PLANTS Database*. Recuperado el 09 de 08 de 2020, de <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=JUSP4>
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90, 471–479.
- Olivares, M. L. (2007). *Caracterización Reológica y Reométrica de Soluciones Macromoleculares Eléctricamente Cargadas: Aplicación a Gelatinas*. Argentina.
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., . . . García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 445-462.
- Ortiz-Zamora, G. F. (2002). Procesamiento morfológico de imágenes en color. Aplicación a la reconstrucción geodésica. *Tesis doctoral*. Universidad de Alicante, España.
- Parrado-Castro, G. A., & Pardo-Pardo, K. G. (2019). EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLORANTE DEL EXTRACTO DE *Justicia secunda* Vahl COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE COLORANTES AZOICOS EN LECHE FERMENTADAS. *Tesis*. Universidad de los Llanos, Villavicencio.
- Patil, N., Nigudkar, M., Sane, R., Ajitkumar, B. S., & Datar, A. (2015). Evaluation of microscopic structure of *Justicia wynaadensis* and the stability of its color extracted by using conventional and microwave extraction method. *J Food Sci Technol*, 52(10), 6455-6464.

- Patras, A., Bruton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 3-11.
- Pavón-García, L. M., Pérez-Alonso, C., Orozco-Villafuerte, J., Pimentel-González, D. J., Rodríguez-Huezo, M. E., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Storage stability of the natural colourant from *Justicia spicigera* microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1428–1437.
- Perales-García, M., Lozano, I., & López-Rodríguez, A. (2018). Los colores de la vida. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 85-91.
- Pereira, G. K., Donate, P. M., & Galembeck, S. E. (1997). Effects of substitution for hydroxyl in the B-ring of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure*, 392, 169-179.
- Pocan, P., Ilhan, E., & Oztop, M. (2019). Effect of D-psicose substitution on gelatin based soft candies: A TD-NMR study. *Magn Reson Chem*, 57, 661-673.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302.
- Rai, H. S., Bhattacharyya, M. S., Singh, J., Bansal, T. K., Vats, P., & Banerjee, U. C. (2005). Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry: A Review of Emerging Techniques With Reference to Biological Treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(3), 219-238.
- Ramírez, J. S. (2012). *Ánàlisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor*. Colombia: ReCiTeIA. Obtenido de [https://books.google.es/books?id=4\\_TNm-72U7MC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?id=4_TNm-72U7MC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false)
- Reyes, F. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, 100(3), 885–894.

- Rodrigues, L. M., Januário, J. G., dos Santos, S. S., Bergamasco, R., & Madrona, G. S. (2018). Microcapsules of 'jabuticaba' byproduct: Storage stability and application in gelatin. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(6), 424-429.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254.
- Salcedo-Luna, F. S. (2018). Extracción e identificación de los metabolitos secundarios concapacidad tintórea de Justicia spicigera Schltd para su posibleuso cosmético. *Tesis de pregrado*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Sarria-Villa, R. A., Gallo, J. A., & Benítez , R. (2021). Extraction of phenolic compounds and content of catechin in barks of three forest species from Cauca-Colombia. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 15(29), 19-27.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Reyna-Aquino, C., Chaires-Martínez, L., Bermúdez-Torres, K., & Rodríguez-Monroy, M. (2009). Antioxidat Activity and Content of Phenolic Compounds and Flavonoids from Justicia Spicigera. *Journal of Biological Sciences*, 9(6), 629-632.
- Sezgin, A., & Ayyıldız, S. (2017). Food Additives: Colorants. En A. Méndez-Vilas , *Science within Food: Up-to-Date Advances on Research* (págs. 87-94). Badajoz, Spain: Formatex Research Center.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Sigurdson , G. T., Tang , P., & Giusti, M. M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu Rev Food Sci Technol*, 8, 261-280.
- Simon, A., Vandanjon, L., Levesque, G., & Bourseau , P. (2002). Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. *Desalination*, 3 13-3 18.

- Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., & Schoefs, B. (2015). Food colour additives of natural origin. En M. J. Scotter, *Colour Additives for Foods and Beverage* (págs. 3-34). Woodhead Publishing Series in Food Science.
- Soria-Zamora, M. (2014). Desarrollo de un alimento funcional a partir de frutos rojos procesado con microondas y adicionado con microcápsulas de muicle (*Justicia spicigera*) con potencial antiproliferativo en la línea celular LNCaP. (*Tesis de maestría*). Universidad Veracruzana.
- Stinzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains in Food: Occurrence, Stability, and Postharvest Modifications. En C. Socaciu, *Food Colorants: Chemical and Functional Properties* (págs. 277-290). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The plant journal*, 54, 733-749.
- Timberlake, C. F. (1980). ANTHOCYANINS-OCCURRENCE, EXTRACTION AND CHEMISTRY. *Food Chemistry*, 5, 69-80.
- Tintometer Group. (20 de 11 de 2020). *A Guide to Understanding Colour Communication*. Obtenido de Lovibond : <https://www.lovibond.com/es>
- Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat, G. (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12, 484-496.
- Uchegbu, N., Nnamocha, T., & Ishiwu, C. (2020). Natural Food Colourants Juxtaposed with Synthetic Food Colourant: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 19(8), 404-419.
- UNIBIO. (27 de 05 de 2010). "*Justicia spicigera* Schltdl. - IBUNAM:MEXU:PV525864". Recuperado el 07 de 08 de 2020, de <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Pérez-Flores, J., & Velasco-Lezama, R. (2012). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE JUSTICIA. *Revista Latinoamericana de Química*, 75-82.

- Vera de Rosso, V., & Mercadante, A. Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 347–352.
- Vieira, L. C., Marinho, L. G., Rocha, J. C., Barros, F. A., & Stringheta, P. C. (2018). Chromatic analysis for predicting anthocyanin content in fruits and vegetables. *Food Science and Technology*, 39(2), 415-422.
- Vieira, L. M., Marinho, L. M., Rocha, J., Barros, F. A., & Stringheta, P. C. (2019). Chromatic analysis for predicting anthocyanin content in fruits and vegetables. *Food Science and Technology*, 39(2), 415-422.
- W. Brand-Williams, M. E. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. *Food Sci Technol*, 28, 25-30.
- Wang, T.-y., Li, Q., & Bi, K.-s. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-23.
- Wrolstad, M. G. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En H. y. Lichtenthaler, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (págs. F1.2.1-F1.2.13). New York: John Wiley and Sons.
- Wu, D., & Sun, D.-W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 29(1), 5-20.
- Xue, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wu, W., Yu, D., & Liu, Y. (2013). Theoretical study on the antioxidant properties of 2'-hydroxychalcones: H-atom vs. electron transfer mechanism. *Journal of Molecular Modeling*, 19, 3851–3862.
- Yagub, M.T, Sen, T., Afroze, S., & Ang, H. (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. *Adv Colloid Interfac*, 209, 172–184.
- Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Vol 2. España: Reverte.
- Yusuf, M., Shabbir, M., & Mohammad, F. (2017). Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. *Nat. Prod. Bioprospect*, 7, 123–145.

# **CAPÍTULO 10**

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Cuantificación de compuestos fenólicos

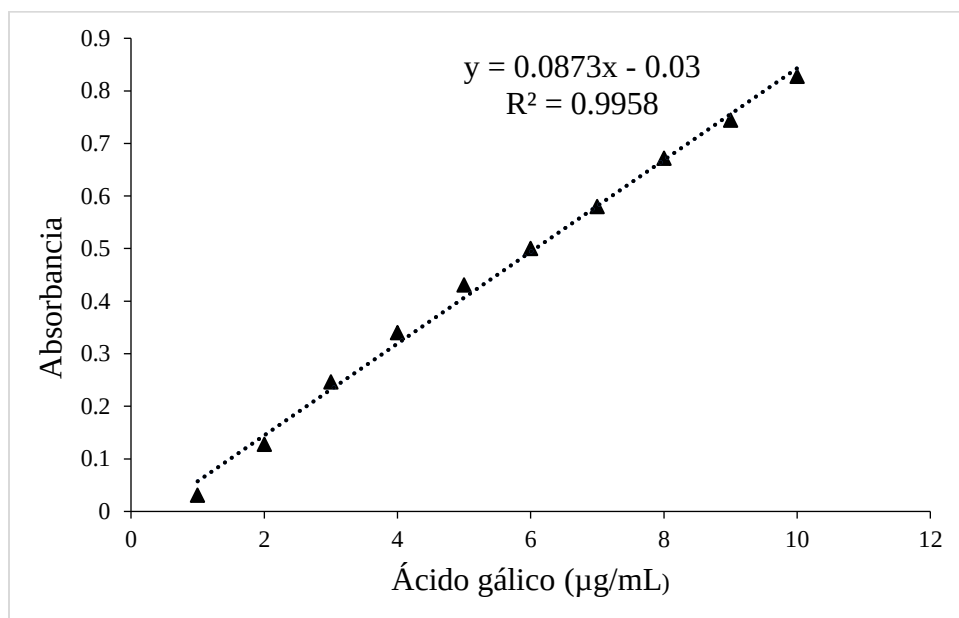


*Figura 19. Curva patrón de ácido gálico*

## Anexo 2. Cuantificación de flavonoides

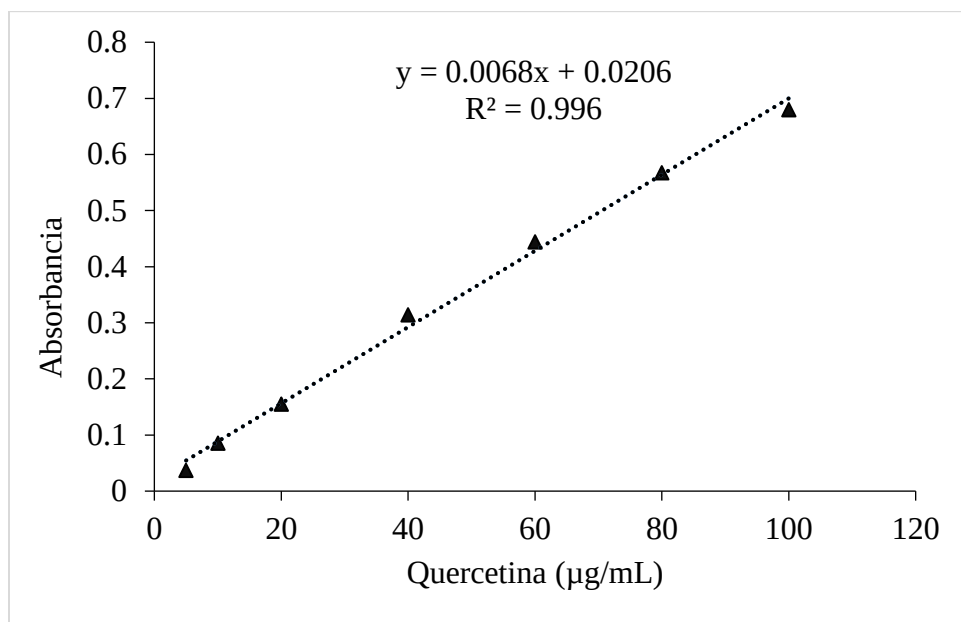


*Figura 20. Curva patrón de quercetina*

### Anexo 3. Cuantificación de capacidad antioxidante

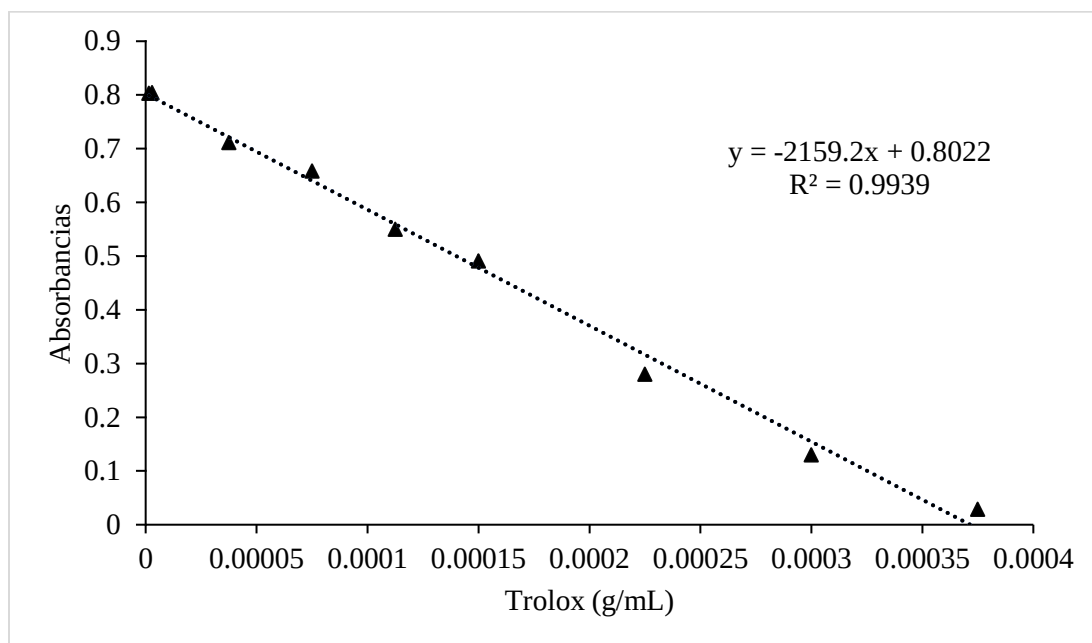


*Figura 21. Curva patrón de Trolox*