

87
28j



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL
COLORANTE DE LA JAMAICA MEXICANA
(HIBISCUS SABDARIFFA) L.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

FABIOLA VEGA GALEANA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

- I. INTRODUCCION
- II. HISTORIA DE LOS COLORANTES
- III. IMPORTANCIA PSICOLOGICA DEL COLOR
- IV. CLASIFICACION DE LOS COLORANTES
 - a) COLORANTES ARTIFICIALES
 - b) COLORANTES NATURALES
- V. CLASIFICACION BOTANICA DE LA JAMAICA
- VI. METODOS Y MATERIALES
- VII. DISCUSION DE RESULTADOS
- VIII. CONCLUSIONES
- IX. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

Actualmente la situación del uso de colorantes artificiales en alimentos es crítica, debido a que existe una gran desconfianza en cuanto a la completa inocuidad de dichos colorantes, por lo que la Food and Drug Administration constantemente realiza estudios acerca de los posibles daños que pudieran ocasionar, ya que algunos de ellos producen efectos fisiológicos secundarios en el organismo por sus altos índices cancerígenos, por lo que recobra gran importancia el estudio de pigmentos naturales como posibles colorantes para alimentos, drogas y cosméticos.

Pigmentos naturales extraídos de plantas, flores, o frutos pueden desempeñar el papel de colorante en alimentos evitando así el gran riesgo de problemas toxicológicos y teratogénicos que se presentan al seguir utilizando colorantes artificiales.

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (jamaica) variedad archer que se cultiva en la República Mexicana, poseen un color rojo brillante que por medio de métodos químicos y físicos, se determina que los compuestos causantes del color, son antocianinas que debido a la presencia de un ácido contenido en la planta originan el color rojo característico de la jamaica.

Actualmente en México ya se cultiva la cochinilla (nombre vulgar), debido al pigmento colorido que posee, a tomado gran importancia en la industria de colorantes naturales.

II. HISTORIA DE LOS COLORANTES

La utilización de colorantes naturales en alimentos se remonta a épocas antiguas, son usados desde hace 3000 años, así como las especias y condimentos, los colorantes usados en esa época probablemente provenían de minerales, plantas y/o animales.

En los siglos XVIII Y XIX fabricantes poco escrupulosos, empezaron a explotar las características que presentan los colorantes, haciendo los productos más atractivos, otros lo utilizaban con la finalidad de ocultar la calidad dudosa de algunos productos, algunos vinos franceses eran coloreados con fucsina, el dinitrocresol era utilizado para colorear macarrones, licores y mantequilla, anilina era usada para blanquear harina. Los encurtidos en muchas ocasiones eran coloreados con sulfato de cobre para darle un color verde agradable, algunos dulces eran coloreados con sales de plomo y cobre que son altamente tóxicos, lo cual repercutió en problemas de salud hasta que se empezó a legislar los colorantes para evitar su efecto nocivo, y tener un control de su uso o bien descontinuar el uso de colorantes tóxicos.

En 1856 fué sintetizado el primer colorante, por lo que provocó un gran crecimiento en la industria de colorantes, ya que el uso de colorantes sintéticos presentan tonalidades atractivas e uniformes. (3)

En Inglaterra fué aprobada la primera acta de Alimentos, Drogas y Cosméticos en 1860, apoyada por otros países europeos

que limitaron el uso de algunos colorantes tóxicos, permitiendo solo aquellos que sí respetaban aplicaciones específicas y dosificaciones controladas.

En Estados Unidos de Norteamérica los colorantes para alimentos fueron controlados hasta 1886 y en este nuevo siglo el departamento de agricultura (Bureau of Chemistry) de los Estados Unidos de América, se dedicó a estudiar el uso apropiado de los colorantes existentes, gran parte fué supervisado bajo la dirección del Dr. Bernhard C. Hesse, quien trato de obtener información de los fabricantes de Alemania, Inglaterra, Bélgica y Estados Unidos de América acerca de los colorantes usados, en la cual encontró opiniones contradictorias. Al revisar los datos de pruebas toxicológicas de estos compuestos realizadas en conejos, perros y humanos; algunos de esos colorantes resultaron altamente tóxicos, mientras que otros se encontraban dentro de los límites de toxicidad aceptables, por lo que acepto solo aquellos que no sobrepasaban los límites de toxicidad permitidos, siendo legalizados bajo el Acta de alimentos, drogas y cosméticos, en 1906 bajo las siglas FD&C, los cuales se encuentran citados en la tabla No. II.1

A través de cierto tiempo se observó que el uso de colorantes se acrecentaba causando problemas toxicológicos, cancerígenos y efectos nocivos sobre la reproducción animal por lo que hubo que tomarse medidas drásticas para controlarlos y así fué como en los Estados Unidos de América a partir de 1938 se

estableció que todos los colorantes para alimentos, drogas y cosméticos deberán ser aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), habiendo efectuado pruebas en animales bajo cierta supervisión de esta organización.

NOMBRE COMUN	NOMBRE FDA
Ponceau 3 R	FD&C Rojo No. 1
Amaranto	FD&C Rojo No. 2
Eritrosina	FD&C Rojo No. 3
Naranja No. 1	FD&C Naranja No. 1
Naftol Amarillo	FD&C Amarillo No.1
Verde Claro	FD&C Verde No. 2
Indigotina	FD&C Azul No. 2

Tabla No. II.1 Colorantes legalizados en 1906, bajo las siglas FD&C

Los colorantes sintéticos FD&C que se usan en la Unión Americana con permiso gubernamental, se conocen como colorantes certificados y el proceso de certificación consiste en realizarles análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y clínicos, los cuales deben garantizar la salud de los consumidores. (30)

Hoy en día es un grave problema para la humanidad el utilizar colorantes sintéticos en alimentos, por lo que la FDA constantemente hace investigaciones sobre los colorantes certificados que se usan, restringiendo cada día más la lista permitida, resaltando las especificaciones que deben seguirse, aun así el uso de colorantes es necesario en algunos productos y su uso es ilimitado, por lo que es sumamente importante que estos colorantes no sean tóxicos.

Todo colorante que se desee utilizar en alimentos, drogas y/o cosméticos debe comprobarse su inocuidad estrictamente o bien estar dentro de los límites de tolerancia de toxicidad, habiendo efectuado pruebas toxicológicas bajo supervisión estricta por la FDA para su certificación.

III. IMPORTANCIA PSICOLOGICA DEL COLOR

El color es una propiedad de la materia directamente relacionado con el espectro de la luz, se puede medir físicamente en términos de energía radiante o intensidad y por su longitud de onda.

El ojo humano solo puede percibir los colores que se generan en el espectro correspondiente al intervalo de longitud de onda de 380 a 770 nm. De ahí que la definición de color sea: "La parte de energía radiante que el humano percibe a través de las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo".

Universalmente el recurso del ojo humano es un factor muy importante en la selección de los alimentos, debido a que el color provoca que se vean apetecibles y atractivos, además de tener una gran influencia en la satisfacción del paladar humano.

(8)

El color es la primera impresión sensorial que se tiene con los alimentos, el consumidor los juzga primeramente por su apariencia, color y forma. La mayoría de los alimentos tanto en forma natural como procesada tienen un color característico y bien definido, por lo cual el consumidor los identifica, debido a esto los fabricantes en alimentos tienen gran interés en la selección de materias primas utilizadas en los productos, la

selección de un buen colorante es punto importante en la apariencia del producto terminado.

Hall (16) trabajó con helados de diversos sabores limón, lima, naranja, uva, pina y nuez, pero sin colorantes, los presentó todos en color blanco a un grupo de jueces, un alto porcentaje de ellos no lograron determinar el sabor en forma correcta, por otra parte cuando los helados estudiados tenían un color diferente al que correspondía de acuerdo a su sabor, los jueces emitieron opiniones incorrectas, por ejemplo cuando la nieve de sabor lima presentaba color verde, el 75 % de los jueces acertaron el sabor, pero cuando tenían color púrpura (como uva) solo el 47 % identificaron el sabor en forma correcta.

Con estos estudios se demostró que el color puede influir más que el sabor en la impresión global que produce un alimento con los consumidores y en ocasiones aunque el sabor sea agradable si el color no es el correcto el producto no es aceptado por el consumidor, por lo que es de suma importancia el mantener un control de calidad en los colorantes constante, ya que el público asocia un cierto color con una buena calidad en el producto.

IV. CLASIFICACION DE LOS COLORANTES

Los colorantes son sustancias que se agregan a los alimentos, bebidas, drogas y/o cosméticos, fijándose a estos de un modo estable, proporcionándoles o intensificándoles su color. La estabilidad o resistencia de estas sustancias a los agentes químicos y a la acción de la luz no es la misma para todas, varían según su constitución física y química además de las características de las sustancias a la cual se incorporan. (8)

La función de los colorantes es muy importante debido a la aceptación o rechazo de los productos por el consumidor, el adicionar materiales colorantes a los alimentos se realiza con el propósito de obtener uniformidad de color y aspecto y por lo tanto una mayor aceptación, asimismo corrige variaciones naturales en el color e irregularidades resultantes del almacenamiento, proceso, empaque y distribución del alimento, ayudando a preservar la identidad o carácter mediante el cual los alimentos son reconocidos.

Los colorantes han recibido especial atención a lo largo de los años, debido a que el uso de estos, necesita tener justificación y además tener seguridad de que no son tóxicos.

Los colorantes permitidos deben consumirse en cantidades moderadas y para esto la Organización Mundial de la Salud propone que, consumiéndolos en cantidades menores a 0.002% por peso del alimento no causen daño o peligro alguno.

El uso excesivo de los colorantes en general provocan danos irreversibles al individuo. (30)

El empleo de colorantes no debe usarse con la intension de enganar al consumidor sobre la calidad del alimento y tampoco el uso de estos debe reducir el valor nutritivo del alimento.

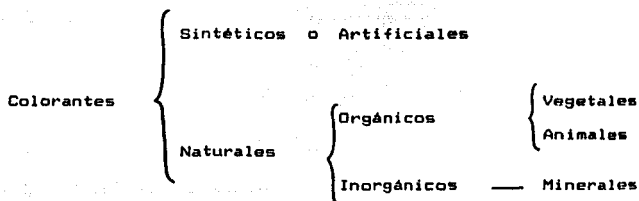
Las Características que deben de cumplir los colorantes para permitir su uso en alimentos, drogas y/o cosméticos son las siguientes:

- a) El colorante debe ser insípido e inodoro o bien sus propiedades organolepticas ser inofensivas.
- b) Debe mezclarse bien en aquellos alimentos a los cuales colorea.
- c) Estable a la influencia de la luz, oxidación, reducción, pH, y al ataque microbiológico.
- d) Debe ser compatible con otros componentes del alimento.
- e) Su poder tintoreo debe ser elevado.
- f) Debe ser altamente soluble en agua y otros disolventes polares de grado alimenticio y baratos tales como el alcohol.
- g) Debe ser inocuo, o bien su grado de toxicidad debe ser muy bajo.

Según especificaciones, los agentes colorantes deben ser libres de impurezas, incluyendo como impurezas a metales como el zinc, arsenico, estano, etc.

Los colorantes serán adicionados a los alimentos o bebidas solo después de haberse realizado pruebas apropiadas de toxicología y clínicas, siempre y cuando se hayan obtenido resultados negativos para evitar peligro en el consumo de humanos.

Los colorantes alimenticios se clasifican de acuerdo a su origen, aplicación y obtención en:



En los últimos años, ha surgido en el consumidor una tendencia en dudar de la seguridad en el consumo humano de los colorantes sintéticos, debido a la alta toxicidad que presentan algunos de ellos, por tal razón las restricciones o especificaciones con las que son reglamentados los colorantes son de suma importancia, todo esto ha renovado un gran interés en poder emplear los pigmentos naturales como agentes colorantes en alimentos, drogas y/o cosméticos. (7)

Las autoridades de la comision de la Comunidad Económica Europea (EEC) encargada del estudio de los aditivos alimenticios reevaluaron cuidadosamente la utilización de colorantes empleados en alimentos, despues de un tiempo llegaron a la conclusión de que el uso de colorantes sintéticos deberá ser gradualmente prohibido, debido a que las pruebas toxicológicas resultaron positivas en algunos casos del uso de estos colorantes en cantidades excesivas, por lo que día con día la lista de colorantes permitidos por la Organización Mundial de la Salud cada vez es más pequeña. (9)

Las principales razones para el propósito, han sido los resultados de las investigaciones clínicas, las cuales han demostrado que los colorantes pueden causar reacciones alérgicas y de hipersensibilidad en el humano. Debido a lo anterior la Organización Mundial de la Salud ha revisado recientemente las limitaciones existentes para los colorantes usados en productos alimenticios, drogas y cosméticos, para dicha revisión se han tomado en cuenta los siguientes principios básicos:

- a) Investigaciones bajo condiciones de utilización de los colorantes deben mostrar que no es danino.
- b) Los colorantes no deben ser adicionados a productos alimenticios consumidos por ninos menores de cinco años.
- c) Si es posible y de preferencia, los productos alimenticios básicos no deberán ser coloreados.

La Organización Mundial de la Salud a través de recopilaciones obtenidas de los diversos estudios hechos sobre colorantes han concluido que un alto porcentaje de los colorantes sintéticos adicionados a los productos alimenticios, pueden ser cancerígenos directa o indirectamente, es decir en muchas ocasiones el compuesto colorante en si no produce efectos toxicológicos, sin embargo al entrar al organismo muchas ocasiones es transformado en compuestos secundarios cancerígenos para el organismo, por lo que es muy importante que un compuesto colorante usado en alimentos reúna las siguientes características.

- a) No deben existir impurezas en el colorante.
- b) Que los compuestos colorantes no puedan reaccionar con otros compuestos presentes en los alimentos, originando nuevos compuestos.
- c) Que los compuestos colorantes no puedan ser convertidos Metabólicamente en productos secundarios que causen toxicidad al organismo.

Considerando todo lo anterior como base, la Organización Mundial de la salud ha emitido 3 normas importantes que deberán cumplir aquellos colorantes que deseen ser utilizados en alimentos, y estas son las siguientes:

- 1) Especificar ruta de administración.
- 2) Estudios que en base a la investigación científica sean biables.
- 3) Deberán tener buena evaluación estadística del origen de tumores. (15)

IV. a) COLORANTES ARTIFICIALES O SINTETICOS

Los colorantes artificiales son sustancias sintetizadas a partir de productos derivados del alquitrán de hulla o compuestos con estructura química similar, los colorantes sintéticos al igual que los naturales no aportan ningun valor nutritivo a los alimentos, unicamente desempeñan un papel estético ya que hacen más atractivos los productos dando una tonalidad brillante.

El uso de colorantes sintéticos tienen una marcada ventaja sobre los colorantes naturales debido a ciertas características que se presentan citadas a continuación.

- a) Poder de tinción alto
- b) Uniformidad de color
- c) Disponibilidad
- d) Estabilidad

- e) Variación de matices
- f) Menos problemas de contaminación

Así como poseen estas ventajas, hay que considerar una gran y significativa desventaja:

- a) Problemas toxicológicos, ocasionando efectos cancerígenos y teratogénicos.

Debido a esta gran desventaja se han realizado numerosas investigaciones para poder encontrar en los productos naturales nuevas fuentes de colorantes para alimentos, drogas y/o cosméticos.

Los colorantes sintéticos pertenecen a la clase de colorantes azoicos, nitrosados de pirazolona, indigoidea, xanteno, antraquinona, quinolina y trazina, estos incluyen a un gran número de los colorantes que aparecen en la lista certificada de la Food and Drug Administration y se caracterizan por la presencia del grupo funcional azo (-N=N).

Los azocolorantes son pigmentos usados en la industria de alimentos y bebidas para mantener o modificar el color de los productos, en los cuales muchas veces se desarrollan cambios de color durante el proceso. Los colorantes sintéticos representan la mayoría de los agentes colorantes usados por la industria alimentaria, existen variaciones de estructuras químicas por lo que presentan dificultad en cuanto a su clasificación. (32)

Existe una legislación para los colorantes, con ciertas

especificaciones que deben cumplir para que sean permitidos en alimentos, el organismo que se encarga de la legislación de alimentos en los Estados Unidos es la Food and Drug Administration y sus regulaciones y decisiones se publican en el Federal Register, bajo el título 21 de alimentos y drogas, en México se cuenta con la dirección de alimentos y bebidas de la Secretaría de Salubridad y Asistencia la cual por lo general adopta varias de las disposiciones de la FDA.

Los estudios de los colorantes deben incluir las siguientes pruebas, para su aceptación en el uso de alimentos, drogas y cosméticos.

- a) Determinación de toxicidad aguda, vía oral en ratas.
- b) Toxicidad aguda intraperitoneal en ratones, toxicidad subaguda con un mínimo de 60 días de pruebas toxicológicas mediante alimentación con el colorante.
- c) Toxicidad crónica, suministro prolongado del colorante en el alimento de 2 especies de roedores generalmente ratas y ratones, (una de las especies debe constar con hembras preñadas).
- d) Suministro del colorante en el alimento de una especie diferente a los roedores (usualmente perros).
- e) Estudios teratogénicos.
- f) Estudio de reproducción múltiple.

Con todos estos requerimientos solo 7 FD&C colorantes sintéticos, cumplieron con los requisitos para su aceptación y estos son los siguientes:

FD&C	Verde No. 3
FD&C	Azul No. 1
FD&C	Rojo No. 3
FD&C	Azul No. 2
FD&C	Rojo No. 40
FD&C	Amarillo No. 5
FD&C	Amarillo No. 6

Las regulaciones para los aditivos alimenticios en México se encuentran en el reglamento de aditivos para alimentos, emitido por el sector salud del Gobierno Federal y publicado en el diario oficial del 15 de febrero de 1958 (Secretaría de Salubridad y Asistencia 1958).

En el artículo No. 12 se mencionan los colorantes orgánico-sintéticos permitidos en México para utilizarlos en alimentos, drogas y/o cosméticos, siendo una lista provisional sujeta a cambio. (7)

El Rojo No. 2 (Amaranto) fué aprobado, en una emisión del 13 de Julio de 1907 por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, donde estudios de toxicidad aguda

y crónica, hechos durante los años setentas con animales de laboratorio no revelaron efectos adversos, pero en 1970 se publicaron resultados por investigadores rusos que concluyeron que el amaranto es capaz de producir cáncer y efectos nocivos sobre la reproducción animal, posteriormente la FDA inició un estudio de toxicidad crónica por ingestión de este colorante con ratas preñadas a las cuales se les administró diferentes dosis de 7.5 ,15, 30, 100 y 200 mg/kg, administrando la dosis por medio de un tubo estomacal observandose la muerte de fetos, ocurriendo estos efectos en todos los casos y con todas las dosis excepto la de 7.5 mg/kg. (8)

Colorantes orgánico-sintéticos permitidos actualmente en alimentos, drogas y cosméticos.

- Azul No. 2 (Indigotina)
- Amarillo No.5 (Tartrazina)
- Amarillo No.6 (Sunset FCT)
- Rojo No. 3 (Eritrosina)
- Rojo No. 5 (Carmoisina)
- Rojo No. 6 (Ponceau 4R)
- Rojo No. 40

El uso del colorante Rojo No. 1 demostró que su ingestión

durante periodos largos seria perjudicial para la salud pública por lo que la FDA canceló su registro para el uso en alimentos drogas y/o cosméticos.

La FDA nombró un comité consultivo de toxicología para que analizara todos los datos y estudios disponibles sobre el colorante Rojo No.2, este comité rechazo el estudio previo debido a que la dosis de prueba no se mantuvo constante y el grado de extensión de autólisis hacian difícil la evaluación patológica por lo que no se podia demostrar en forma concluyente la toxicidad del colorante.

Asimismo en 1980 se rechazo la petición de registro permanente de FD&C Rojo No.2 debido a que la información disponible era insuficiente para demostrar que el colorante era de uso seguro en alimentos. Investigadores Canadienses consideraban un inadecuado control experimental e indicaron que no hay explicación de porque la aparición de tumores solo se daba en ratas hembras y que este hecho, siguiendo un razonamiento lógico, podría utilizarse como evidencia de que en ratas machos el amaranto no tenia altos efectos cancerigenos. Además señalan que según sus propios estudios el FD&C Rojo No.2 no es mutagénico y esta es una característica que generalmente se presenta aunada a los efectos teratogénicos, por otra parte la estructura química del amaranto no es semejante a los otros colorantes que se ha demostrado que producen cáncer, como resultado de estas

consideraciones el Ministro Canadiense de Salud y Bienestar Nacional decidió en 1976 continuar con el uso de dicho colorante y en iguales posiciones se encontraban Suecia, Dinamarca, Alemania Occidental, Japón y algunos países miembros de la Comunidad Europea. Por lo que desde entonces el uso del colorante Rojo No.2 no ha sido totalmente designado para uso en alimentos, efectuandose continuamente estudios sobre su efecto toxicológico demostrando que la ingestión de este colorante produce cáncer.

Canadá ha rehusado permitir el uso en alimentos del colorante Rojo No. 40, después de que datos proporcionados por la oficina de Salud Pública demostraron que su seguridad era insuficiente, por lo que debería utilizarse bajo ciertas restricciones y provisionalmente.

En el año de 1974 el colorante Rojo No.40 fué aprobado en forma permanente para usarlo en alimentos, en Estados Unidos este colorante es el único colorante rojo certificado que se admite en la actualidad para el uso en alimentos, drogas y/o cosméticos, en cambio el colorante FD&C Rojo No.2 ha sido estrictamente prohibido en alimentos, la Organización Mundial de la Salud continuamente efectúa estudios de los colorantes que se usan en alimentos, para evitar el uso de aquellos que tengan efectos cancerígenos y teratogénicos.

Para elegir el colorante adecuado para el uso en alimentos, se tendrá que tomar en cuenta el origen del alimento, proceso,

empaque, etc. ya que los colorantes tambien requieren de algunos factores para mantener sus propiedades, el grado de sensibilidad a la luz debe de tomarse en cuenta para el calculo de la dosis que se va a emplear, ya que a concentraciones bajas los colorantes que son sensibles pueden perder el color, mientras que en altas concentraciones la decoloración puede ser poco observable por largo tiempo, se permite la mezcla entre si para obtener determinadas tonalidades cromáticas, tambien queda permitida la adición a los colorantes o a su mezcla, de excipientes o vehiculos inocuos, tales como dextrinas, aceites, grasas comestibles, glicerina y otros que demuestren inocuidad para la Salud Pública. (7, 32)

IV. b) COLORANTES NATURALES

El uso de colorantes naturales data desde la antigüedad y el desarrollo inicial de estos para colorear alimentos fué conocido con formulación de colorantes propios para uso en confiteria, bebidas y productos de reposteria.

Un colorante natural es aquel que se obtiene por medio de extractos de frutas, flores o vegetales, algunos colorantes naturales son obtenidos de animales (ejemplo la cochinilla),

algunos minerales también son utilizados como colorantes naturales, actualmente los más utilizados son los pigmentos extraídos de plantas comestibles ya que son considerados inofensivos. Aunque la naturaleza produce una gran variedad de pigmentos de buen aspecto y tonalidades brillantes, solo algunos parecen tener valor comercial usándose como colorantes en alimentos, drogas y/o cosméticos, debido al inconveniente que se ha presentado en el alto costo y en que algunos de estos colorantes tienen poder de tinción muy bajo en comparación con los colorantes sintéticos, por lo que el uso de la gran variedad de pigmentos naturales como colorantes, se reduce. (26)

Los colorantes naturales no por ser pigmentos de la naturaleza se escapan de cumplir con las legislaciones de la Food and Drug Administration ya que desde el año de 1977 a la actualidad y por supuesto en el futuro la FDA requerirá de estudios químicos y toxicológicos así como el proceso de obtención de los mismos, para poder aceptar los pigmentos propuestos como colorantes naturales para alimentos, drogas y/o cosméticos, muchos de los colorantes para alimentos están exentos de certificación condicionando su uso a buenas prácticas de elaboración y respetando las normas de identidad y pureza que se dictan al respecto. (29)

Para escoger un colorante adecuado es necesario considerar el proceso al que se va a someter el alimento, los ingredientes activos, como son: el disolvente o base en el cual el color va a

ser incorporado y el empaque en el cual se va a vender el alimento, y para esto existen ciertas reglas elementales.

En la actualidad existen varios problemas para los productores de alimentos, ya que deben encontrar colorantes naturales que sean estables, resistentes a la luz, capaces de resistir los procesos a los que serán sometidos, el problema es especialmente serio para los productores, debido a que los colorantes naturales generalmente no son estables al calor y por lo tanto sufren cambios. Existen algunos productores de colorantes a los que les resulta virtualmente imposible dar a los productos la misma apariencia usando colorantes naturales que usando sintéticos.

Existe un número increíble de factores a considerar cuando se usan dichos colorantes naturales para colorear alimentos, uno de estos es que la mayoría de los colorantes naturales son importados, por lo que representa un alto costo, sin embargo existen productores nacionales que hacen el esfuerzo por desarrollar colorantes de buena calidad, pero el grave problema en la obtención de estos colorantes es el bajo rendimiento, técnicas de procesamiento deficientes y falta de fertilización para que las plantas cultivadas contengan mayor concentración de colorante, debido a la gran importancia que tienen actualmente los colorantes naturales es necesario que las técnicas para intensificar el pigmento en las plantas sean investigadas.

Un número de técnicas y requerimientos legislativos fueron cuidadosamente estudiados durante la formulación de colorantes para alimentos a partir de las plantas, todo esto se realizó de acuerdo al tipo de colorantes y técnicas aceptables para la industria de alimentos, estos requerimientos son los siguientes:

- a) Se necesita que la intensidad del color sea estandarizado para controlar estrictamente los niveles, los cuales pueden ser fácilmente verificados por métodos analíticos.
- b) Los extractos de las plantas deberán ser procesados de tal manera que, no contengan compuestos que puedan intervenir causando problemas al producto final alterando su estabilidad, si es posible aislar exclusivamente el compuesto colorante.
- c) La variabilidad de colorantes y tintes deberá ser controlada por el uso de las variedades conocidas de plantas cultivadas en zonas de climas similares conjuntamente con el control de calidad.
- d) Los colorantes deberán ser toxicológica y farmacológicamente aceptables y así mismo estar bajo la legislación de estos.
- e) Las pruebas deberán hacerse siempre, asegurando la estabilidad a la luz y al calor.
- f) Las características de solubilidad necesitan ser cuidadosamente controladas. (12 , 29)

Así como existen legislaciones para los colorantes sintéticos, también los colorantes naturales se encuentran sujetos a ciertas especificaciones de pruebas toxicológicas, por lo que los colorantes naturales permitidos en alimentos también se encuentran enlistados en el Código Sanitario de Salubridad citados a continuación.

Colorantes Organo-Naturales permitidos en alimentos, drogas y/o cosméticos.

- Achiote o Annatos.- Semilla de *Bixa orellana* L. (materia colorante bixina)
- Ancusa.- Raíz de *Anchusa tintorea* L. (materia colorante ancusina)
- Antocianinas.- Materia colorante de algunos vegetales, flores o frutos.
- Azafrán.- Estigmas de *Crocus sativus* L. (materia colorante crocina)
- Carotenoides.- Materia colorante de algunos vegetales y derivados de animales.
- Cochinilla.- Hembras de insecto *Dactilopius coccus* L. (materia colorante carmín y su derivado ácido)
- Clorofila.- Materia colorante de algunos vegetales.
- Caramelo.- Reacción de caramelización que se presenta cuando los carbohidratos son calentados por encima de su temperatura de fusión, originan el color caramelo.

Otros colorantes naturales no incluidos en esta lista, también son permitidos en el uso de alimentos, siempre y cuando sea demostrada su inocuidad ante la Secretaría de Salubridad y Asistencia. (7)

Los colorantes naturales se dividen o clasifican de acuerdo a su estructura química en: Antocianinas, Flavonoides, Clorofilas, Carotenoides, Xantinas y Betalainas.

ANTOCIANINAS

Las antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, su escala de color comprende de rojo a violeta-azul, estas se encuentran en gran cantidad en frutos, sépalos y pétalos de las flores y en hojas.

Las antocianinas pertenecen al grupo de compuestos fenólicos que presentan diferentes tipos de sustituyentes en la fórmula básica y por lo tanto esto provoca que exista una gran variedad, son compuestos hidrosolubles responsables de los vistosos colores en muchas flores, frutos y vegetales, son glucosidos que cuando se les hidroliza química o enzimáticamente se rompe la molécula originando uno o varios carbohidratos y otra parte llamada aglucón o antocianidina, el enlace entre el carbohidrato y el aglucón es resistente a la mayoría de los tratamientos empleados

en la manufactura de los alimentos, es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidratos para formar diferentes antocianinas, el color de cada antocianina depende de su estructura química, del pH debido al ácido con el que forma la sal correspondiente.

A pesar de que las antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, su uso como colorantes para alimentos no se ha implantado, muchas de ellas por falta de investigación, algunas por bajo rendimiento, por lo cual resulta interesante la identificación de pigmentos naturales, para su futuro uso como colorantes naturales, ya que si podemos obtener un colorante que se encuentra distribuido en la naturaleza, resulta de gran beneficio para la humanidad el uso de pigmentos naturales como colorantes en alimentos, drogas y/o cosméticos, reemplazando así a los colorantes sintéticos, los cuales tienen mayor posibilidad de ser dañinos para el organismo.

Los desechos de las industrias vitivinícolas y de jugos de frutas son buenas fuentes de pigmentos antociánicos que actualmente se tratan de extraer en forma comercial para emplearlos en alimentos.

Las antocianinas absorben mayor energía radiante en longitudes de onda de 510 nm, para la identificación de pigmentos se utilizan métodos espectroscópicos como visible, ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear. (2)

Las antocianidinas son todos derivados hidroxilados del catión 2-fenil-benzopirilo (flavilio), ver figura No. IV.1 y pueden poseer también grupos metoxilos como sustituyentes. Los diferentes tipos de sustituyentes son los que hacen la diferencia básicamente.

Las antocianinas se encuentran como monómeros y algunas de ellas en grandes complejos, la caracterización de antocianinas se hace mediante métodos de extracción y examinación de interferencias o alteraciones en la estructura.

Las antocianinas son glucosidos de las antocianidinas y están basadas en la estructura de la sal de flavilio.

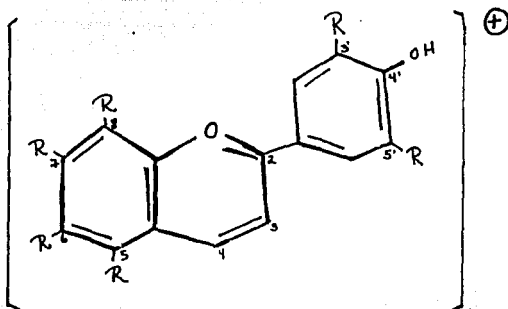


Fig. IV.1 Estructura química del grupo flavilio.

ANTOCIANIDINA	--	3	5	6	7	3'	5'
Apigenidin	(Ap)	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidin	(Lt)	H	OH	H	OH	OH	H
Tricetinidin	(Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH
Pelargonidin	(Pg)	OH	OH	H	OH	H	H
Aurantidinidin	(Au)	OH	OH	OH	OH	H	H
(Jurd and Harborne, 1968; Nilsson, 1973b)							
Margicassinidin	(Adinarayana and Seshadri, 1966)	OH	OH	alkenyl (o en B)	OH	H	H
Cyanidin	(Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidin	(Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H
Rosinidin	(Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	H
Delphinidin	(Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidin	(Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Pulchellidin	(Pl)	OH	OMe	H	OH(?)	OH(?)	OH

Tabla IV.1 Antocianidinas comúnmente encontradas.

A la tabla IV.1 se le pueden agregar las siguientes antocianinas:

- a) 3-monósidos: pelargonidin y delphinidin 3-arabinosidos cianidin 3-xilosa (Timberlake and Bridle 1971b)
- b) 3-biosidos: cianidin 3-arabinosilglucosido (wang and Francis 1972c) cianidin y delphinidin 3-ramnosilgalactosido y cianidin 3-xilosilarabinosido (crowdwn 1973) peonidin y petunidin 3-xilosilglucosidos (Lowry 1970) cianidin y pelargonidin 3-galactosilglucosidos (Timberlake and Brick 1971).
- c) 3-triosidos: cianidin y peonidin 3-glucosil-ramnosilglucosidos (Linar and Francis 1967).
- d) 3,5-diglucosidos: cianidin y malvidin 3-arabinosilglucosidos-5glucosidos (Lowry 1972c), delphinidin 3-soforosido 5-glucosido y 3-sambubiosido 5-glucosido (statham et.al.1972)
- e) Otros sustituyentes: cianidin 4-glucosido y 3-4'diglucosido, delphinidin 7-glucosido y cianidin 3-glucosido, 7-ramnosido (Tanchev y Timberlake 1969b), delphinidin 7-galactosido (Yeh and Huang 1961; Benz and Jonsson 1971) cianidin 3-ramnosilglucosido 7-xilosa.
- f) Existen otro tipo de antocianinas que contienen no solo carbohidratos sino se encuentran también asociados a ácidos orgánicos.

Existen varios métodos de aislamiento e identificación de los pigmentos dependiendo de la cantidad de muestra.

Métodos químicos: cromatografía en papel, en capa fina, en columna usando soportes de silica-gel, alúmina, resina intercambiadora de iones, florisil-celite, otras técnicas como electroforesis en papel, degradación alcalina, dimetilación controlada y una reducción usando amalgama sodica mientras que el uso de enzimas antocianinasas puede ser de utilidad en la identificación de la estructura.

Métodos Físicos: son muy utilizados cuando se tiene poca cantidad de muestra, espectros de visible, ultravioleta, infrarojo y resonancia magnética nuclear (rmn), son de suma utilidad en la identificación de estructuras químicas. (17)

Existen compuestos llamados leucoantocianidinas.- son incoloras que mediante una hidrolisis ácida pierden agua y se convierten en antocianidinas.

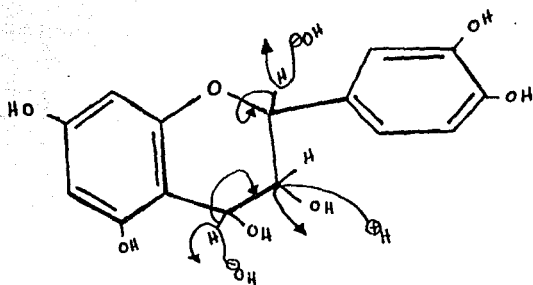


Fig: 1V.2 Estructura química de leucoantocianidina.

Las leucoantocianidinas son precursores de antocianidinas, el color de las antocianinas depende de tres factores principalmente:

- 1) Concentración de la antocianina
- 2) Tipo de antocianina
- 3) Efectos de co-pigmentos o precursores.

Muchas ocasiones aunque no aparezca color radiante visible, existen una gran variedad de leucoantocianidinas o leucoantocianinas, generalmente no presentan coloración ya que requieren de una hidrólisis ácida para que pueda existir el cambio de estructura, algunas ocasiones el oxígeno desarrolla las características de color de las antocianinas; en muchas frutas, flores y/o vegetales las leucoantocianinas están basadas en la estructura de cianina. (1, 22,)

Aspecto toxicológico de las antocianinas.

Las antocianinas en cuanto a su aspecto general de toxicidad son consideradas inocuas, ya que experimentos efectuados con algunas de ellas lo confirman.

Mezclas de antocianidin glucosidos extraídos de diferentes frutas y flores que contenían dichos compuestos se mezclaron para aplicarseles a ratas y ratones de laboratorio por medio de vía oral e intravenosa, los resultados fueron los siguientes: en ratas y ratones con dosis orales de 20 g/kg no produjeron ningún dano, la dosis letal media intravenosa fué de 240 mg/kg en ratas y de 40 mg/kg en ratones.

Otro experimento reportado fué con dosis oral de 6 g/día a ratas durante un periodo de 3 meses, dando resultados satisfactorios ya que no produjeron ninguna anomalía hepática al microscopio.

Las antocianinas y muchos otros flavonoides naturales no son rápidamente absorbidos, se probó con conejos, alimentándolos con 500 mg de antocianinas extraídas de uvas y excretaron del 1 al 2% en la orina y perros que fueron inyectados intravenosamente con el mismo pigmento excretaron porciones de estas, en un periodo de 20 minutos transcurridos por medio de bilis y orina.

Una vez habiendo experimentado con animales y al no ocurrir daño alguno o transformaciones se procede a probarlas con humanos.

A un grupo de personas se les dió alimento mezclado con 750mg de antocianinas durante 3 días, no produjeron ningún efecto tóxico, sin embargo se observó que en hombres y animales provocaban una acelerada adaptación a la oscuridad. (24)

V. CLASIFICACION BOTANICA DE LA JAMAICA

Familia	Malvaceae
Género	Hibiscus
Especie	sabdariffa
Ploidia	2n=72
Raíz	profunda
Tallo	ramificado
Hojas	inferiores, completas y lanceoladas, las superiores son lobuladas.
Flor	completa, solitaria y axilar.
Fruto	capsula aboide recubierta por el cáliz, contiene numerosas semillas reniformes pubicentis con el hilo rojizo.
Fotoperíodo	es sensible al fotoperíodo corto ya que su floración se presenta cuando los días son más cortos y esto es a partir de noviembre.

La Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta perteneciente a la familia malvaceae, que se cultiva en las regiones subtropicales de algunos países, entre los que se encuentra la republica Mexicana, no se conoce con exactitud su centro de origen, Baley (4) menciona como posible centro de origen el oeste de la India , Maximino Martínez (23) clasifica a la Jamaica como una planta asiática.

Según la Dirección de Fomento Agropecuario del estado de Guerrero (28), este cultivo fué introducido por los españoles en la época colonial, a esta planta se le conoce también con los nombres de flor de jamaica, serent, aleluya, agria de Guinea y roselle.

Los cálices poseen un color rojo brillante que puede ser extraído y utilizado como colorante natural en la elaboración de gelatinas, dulces, bebidas refrescantes, jaleas, mermeladas etc.

La jamaica es un cultivo anual de rápido desarrollo, en México se siembra exclusivamente para la producción de cálices, se cultiva principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Colima, siendo el estado de Guerrero el principal productor en nuestro país, ya que aporta aproximadamente el 40% de la producción nacional. (19)

La jamaica se cultiva en los municipios de Tecanapa, Ayutla, Juan R. Escudero, Sn Marcos, Coyuca de Benitez y Acapulco, siendo los tres primeros los de mayor importancia y estos se encuentran enclavados en la parte norte de la región conocida como costa chica. La superficie que se siembra jamaica anualmente en esta región es de 13 600 habitantes en los municipios de Ayutla, Tecanapa y Juan R. Escudero, el cultivo de la jamaica es de gran importancia económica ya que es el único entre los cultivos anuales cuya cosecha se comercializa íntegramente, su importancia en la región radica también en la amplia superficie que se cultiva, ya que es casi equivalente a la

cultivada con maíz, sin embargo la mayor parte del maíz cosechado se utiliza para autoconsumo, por lo que el cultivo de la jamaica es su fuente de ingreso. (25)

Las descripciones botánicas de esta planta tiene algunas variaciones, esto se debe quizá a que las observaciones pudieron haberse hecho en diferentes variedades, así por ejemplo, Maximino Martínez (23) describe a la jamaica como una planta de 1.5 a 2 metros de altura, con tallos rojizos, hojas digitado-partidas en 3 lóbulos crenado-dentados, flores solitarias y sésiles, con el cáliz y brácteas gruesas y rojas, de sabor ácido, corola amarilla, el fruto es una cápsula, esta descripción casi coincide con la que da Baley (4) , quien dice que la jamaica es una planta anual que mide de 1.52 a 2.13 metros, casi lisa, tallos rojizos, hojas ovaladas, partidas digitalmente en 3 lóbulos lanceolados oblongos, flores solitarias y casi siempre sésiles en el eje, brácteas y cálices rojos, menos de la mitad de la longitud de la corola amarilla.

Existen diferentes clases de variedades de acuerdo a la finalidad de la explotación, ya que poseen aspectos ligeramente diferentes, Baley (4) presenta una división y corresponde a la siguiente.

- a) variedades productoras de fibra: altissima y bhagalpuriensis.

b) variedades intermedias: intermedius, albus y ruber, de estas variedades se obtienen simultáneamente fibra y cálices.

c) variedades para obtención de cálices: archer, temprano, rico y victor.

En la India hay cultivares seleccionados para doble propósito, se aprovecha la fibra y el cáliz comestible, variedades bhagalpuriensis, albus y ruber que son de color verde, porte bajo y ramificado, los cultivares no ramifican.

La Dirección General de Extensión Agrícola (28) señala que las variedades que se cultivan en México son las siguientes:

Variedades que se cultivan principalmente por sus cálices son: archer, rico, victor.

Variedad archer.- es una variedad vigorosa, hojas verdes con nervios rojos y cáliz rojo oscuro, siendo la variedad más productiva y comercial.

Variedad rico.- es una variedad pequeña, más frondosa que las otras variedades, sus tallos y cálices son rojo oscuro llegan a medir hasta 5 centímetros, hoja verde con nervaciones rojizas.

Variedad victor.- es una variedad vigorosa siendo toda la planta color verdoso.

En el caso particular de este trabajo se eligió la variedad archer para estudiarla ya que los cálices son de color rojo oscuro significando esto que contienen una considerable cantidad de pigmentos, además de ser la variedad más cultivada en nuestro país, la muestra fué obtenida de cultivos del estado de Guerrero.

Requerimientos del terreno para el cultivo de Hibiscus sabdariffa L. variedad archer (jamaica).

Se prepara el terreno mediante barbecho, ya que sus raíces son profundas, generalmente se cultiva la jamaica conjuntamente con el maíz, la siembra se puede hacer por semilla, también puede hacerse en semillero y transplantarse, requiere de ambientes cálidos, la germinación ocurre a 25 grados centígrados, en el estado de Guerrero las lluvias son escasas sin que haya detención prolongada de estas, sin embargo la producción de jamaica con ese clima es buena. (25)

Fertilización.-Las necesidades de fertilizantes para la jamaica no han sido ampliamente estudiadas, sin embargo reportes al respecto (25) dicen que el efecto de fertilizante es más marcado cuando la cantidad de nitrógeno anadido es relativamente mayor que el fósforo y potasio.

cosecha.- Se efectua a los 15 días después de la floración ya que en este lapso de tiempo es cuando han alcanzado su maduración, la cosecha es en el mes de diciembre y se prolonga hasta enero, para

almacenarla se requiere secarla, se seca exponiendola al sol durante unos dias, es necesario secarla para almacenarla ya que de esta manera evita la infestación de hongos.

Rendimiento.- es de 6000 a 8000 kg/hect llegando a 15000 kg/hect por medio de tres cortes de la planta se aumenta el rendimiento hasta llegar entre 12000 y 20 000 kg/hect. (28)

La producción de la jamaica en nuestro país casi es destinada en su totalidad a exportación, los países principales compradores son Estados Unidos de América y Alemania, seguida por Canadá y la India. (20)

Debido al grave problema que presentan los colorantes artificiales, existe un gran interés en estudiar los pigmentos coloridos de la naturaleza.

Investigadores de la Republica Popular de China (10, 31) han experimentado usando el pigmento extraido de Hibiscus sabdariffa L. como colorante en caramelos, gomas, obteniendo buenos resultados en el poder de tinción y de estabilidad cuando el aumento de temperatura es constante durante el proceso.

Investigadores japoneses (27) han reportado estudios utilizando extracto acuoso de cálices de Hibiscus sabdariffa L. y purificado por medio de resina intercambiadora de iones identificando dos compuestos: delfinidin 3-glucosido y cianidin 3- glucosido.

Investigadores de la Republica Federal Alemana (21) han estudiado el pigmento colorido de Hibiscus sabdariffa L. en muestras cultivadas y obtenidas de otros países como Egipto, Senegal, Tailandia, América central e India, observando que existe una diferencia de compuestos y concentraciones de los mismos dependiendo del origen de la muestra, algunas de ellas variando solo en la concentración y otras definitivamente teniendo diferencias de compuestos, además tenía una influencia considerable la etapa de maduración en la que se encontraban cuando fueron recolectadas. Los Compuestos identificados en la mayoría de las muestras son: cianidin 3-sambubioside, cianidin 3-glucosido y delphinidin 3-glucosido.

Hegnauer (18) reporta estudios hechos en cálices de Hibiscus sabdariffa L. var. sabdariffa obteniendo el pigmento colorido y utilizandolo en la elaboración de mermeladas, gelatinas y dulces para impartirles el color rojo, evaluó su estabilidad y poder de tinción obteniendo buenos resultados, los compuestos causantes del color identificados por este autor son 7 glucosido-herbacetrin y 3 glucosido-hibiscitrin, y el ácido Hibiscusoico.

Investigadores del Departamento de Tecnología y Ciencia de Alimentos en la Universidad de Massachusetts (11, 13, 14) han extraído el pigmento y utilizado como colorante en gelatinas, mermeladas, manzanas coloreadas, bebidas de frutas y bebidas refrescantes, con la finalidad de evaluar la estabilidad

somatiendolas a varias pruebas de temperaturas de refrigeración presentaron tonalidad brillante y atractiva.

Algunos otros estudios realizados en la Universidad de Massachussetts (5, 6) han sido, extrayendo el pigmento y utilizandolo como colorante en muestras de gelatinas y haciendo comparaciones con muestras de gelatinas coloreadas con colorante sintético Rojn No. 2 , las gelatinas coloreadas con el pigmento natural tuvieron buena estabilidad pero se observó que las antocianinas aumentaron el conducto higroscopico de los productos acortando la vida del producto, por lo que en productos secos empacados, deberá ser considerado el parámetro físico de higroscopicidad, destinandole un empaque adecuado al producto para evitar que este sea danado.

VI. METODOS Y MATERIALES

Se trabajaron 2 kg. de cálices secos de Hibiscus sabdariffa L. variedad archer (jamaica), fueron perfectamente molidos y depositados en un matraz redondo adicionando metanol como disolvente e hirviendo a reflujo durante 12 horas, una vez obtenido el extracto se filtro y se concentró en rotavapor hasta sequedad, se introdujo en un desecador hasta que el disolvente se habia evaporado totalmente, se obtuvieron 80 gramos de extracto concentrado.

Se montó una columna para cromatografía usando como soporte mezcla de silicato de magnesio (florisil) y tierra de infusorios (celite) (3:1) relación en peso, las dimensiones de la columna fueron: diámetro = 4.3 cm. y altura = 45 cm.

Se colocaron 40 gramos del extracto concentrado en la columna, una vez absorbida la muestra se empezó a eluir la columna con metanol + acetato de etilo (6:4) relación en volumen, colectando fracciones de 25 ml. y aumentando la polaridad gradualmente hasta eluir la columna con agua unicamente, el cambio de polaridad se efectuó cuando ya no aparecian compuestos en las fracciones, esto se fue controlando por medio de cromatografía en capa fina.

Se colectaron 200 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a la semejanza de compuestos existentes, se concentraron

en rotavapor y posteriormente se les dio una clave a cada grupo para facilitar el manejo de las muestras.

clave	Fracción	eluyente (relación en volumen)
JJBB	1 - 31	Metanol+acetato de etilo 6:4
JJCC	32 - 47	Metanol+acetato de etilo 7:3
JJOG	48 - 89	Metanol+acetato de etilo 8:2
JJOP	90 - 103	Metanol+acetato de etilo 9:1
JJOG	104 - 115	Metanol
JJOR	116 - 129	Metanol + agua 8:2
JJOS	130 - 140	Metanol + agua 5:5
JJOT	141 - 165	Metanol + agua 2:8
JJOU	166 - 189	Metanol + agua 1:9
JJOZ	190 - 200	Agua

El compuesto con clave JJCC fué aislado del grupo de fracciones con la misma clave de la siguiente manera: al grupo de fracciones con clave JJCC se le hicieron pruebas de cromatografía en capa fina, observandose la presencia de un compuesto impuro por lo que se procedió a purificarlo adicionandole alcohol isopropilico lograndose una disolución parcial, filtrandose y ayregando mas alcohol isopropilico hasta separar la parte soluble de la no soluble.

A la parte no soluble se le agregó metanol calentando ligeramente hasta lograr su disolución, agregando unas gotas de acetona, enfriando y raspando las paredes para provocar la cristalización, se dejó reposar aproximadamente 4 horas, apareciendo cristales de color azul intenso, se filtro a vacío y se puso a secar en desecador durante un tiempo de 36 horas aproximadamente, obteniendo el producto seco, a este se le efectuaron las siguientes pruebas:

El compuesto fué soluble en agua, a una pequeña muestra se le adicionó 1 ml. de ácido clorhídrico 0.01N solubilizandose completamente y dando una coloración rojo de inmediato, esta característica la presentan los compuestos antociánicos. Se le hizo pruebas de cromatografía en capa fina y se determinó el punto de fusión, comprobandose la pureza del compuesto aislado. Una vez efectuadas estas pruebas se determinaron los siguientes espectros: ultravioleta, visible, e infrarojo.

Con los espectros de estos análisis se detectó la presencia de varios grupos oxhidrilos, por lo que fué necesario obtener el derivado acetilado del compuesto aislado y hacer análisis de resonancia magnética nuclear para obtener mayor información de la estructura.

La acetilación se hizo en medio ácido, usando anhídrido acético en presencia de pequeñas cantidades de ácido paratoluensulfónico, hirviendo a reflujo durante 6

horas. Para purificar este derivado se extrajo la mezcla con acetato de etilo separándose la capa superior y haciendo lavados con agua hasta tener un pH neutro, los líquidos resultantes de la extracción se concentraron en rotavapor a sequedad. A este compuesto acetilado se le hicieron pruebas de cromatografía en capa fina y se determinó el punto de fusión para comprobar la pureza de dicho compuesto.

El compuesto con clave JJ06 fué aislado del grupo con la misma clave de la siguiente manera: Al concentrado de este grupo se le hicieron pruebas de cromatografía en capa fina observándose la presencia de dos compuestos con diferencia de polaridad, por lo que se procedió a la separación de los mismos, adicionando acetato de etilo calentando ligeramente y obteniéndose la separación del compuesto con menor polaridad, la parte no soluble se cristalizó con metanol obteniéndose cristales de color azul grisáceo, se filtró a vacío y se puso a secar en desecador durante 2 días aprox. hasta obtener un producto seco para hacerle las siguientes pruebas:

a) Solubilidad del compuesto en agua, b) A una pequeña muestra se le adicionó ácido clorhídrico 0.01N solubilizándose y presentando coloración roja de inmediato, se hicieron pruebas de cromatografía en capa fina y c) se determinó el punto de fusión comprobando la pureza del compuesto.

Una vez obtenido el compuesto puro, se determinaron los espectros de ultravioleta, visible e infrarojo, observandose que el compuesto presentaba las mismas características que el compuesto con clave JJCC, por lo que se decidió acetilar el compuesto de la misma manera que el anterior, para hacerle análisis de resonancia magnética nuclear y determinar su estructura.

Hidrolisis:

De acuerdo a la interpretación de espectros; se observó la presencia de carbohidratos en ambas estructuras, por lo que se decidió hacer una hidrolisis ácida con la finalidad de separar los carbohidratos y comprobar su identificación.

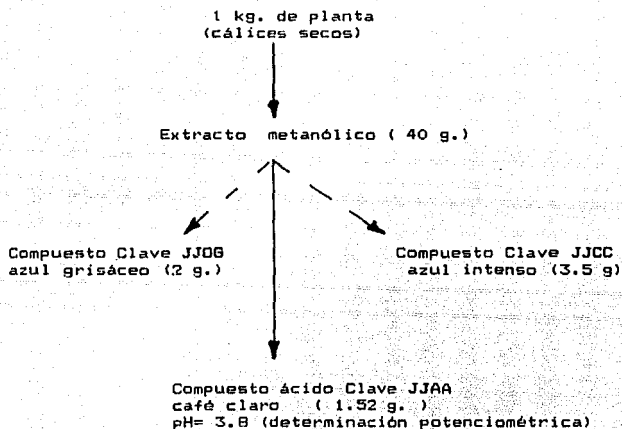
A una pequeña muestra de cada compuesto se le agrego ácido clorhídrico al 10% y se puso a reflujo durante 6 horas aproximadamente, una vez transcurrida la hidrolisis se agrego acetato de etilo y agua para hacer una separación del aglucón y los carbohidratos presentes en el compuesto.

La solución acuosa que contenía los carbohidratos, fue concentrada en rotavapor y posteriormente se hicieron comparaciones con patrones de referencia por medio de cromatografía en capa fina usando como eluyente cloroformo + metanol en relación (7:3) en volumen, correspondiendo el mismo Rf del patrón de glucosa, con el carbohidrato aislado del compuesto con clave JJCC, y el mismo valor de Rf del patrón de ramnosa, con el carbohidrato que se encontraba unido al compuesto con clave JJOG.

Compuesto ácido : clave JJAA

En vista de que otros autores han informado la presencia de un ácido orgánico en la planta, que es el responsable de que los compuestos antociánicos se encuentren en forma de sal de oxonio y originen la coloración roja típica de la jamaica, a las fracciones eluidas se les midió el pH, y se fueron uniendo las fracciones que tenían el mismo pH, formando 3 grupos correspondiendo a pH= 4, 3 y 2 se les hicieron pruebas de cromatografía en capa fina para saber cuantos compuestos se tenían en cada grupo y cuales, observándose que los compuestos aparentemente eran los mismos solo variaban su concentración por lo que se decidió unir los grupos y posteriormente separar los compuestos. El compuesto ácido aislado se purificó disolviendo el concentrado de las fracciones en alcohol isopropílico calentando ligeramente y agregando unas gotas de acetato de etilo enfriando y raspando las paredes para inducir la cristalización, se dejó en reposo durante 2 horas aprox. por medio de cromatografía en capa fina se observó que el compuesto aún se encontraba impuro, por lo que se hizo una recristalización en acetona obteniéndose unos cristales de coloración ligeramente café, se filtró a vacío y se puso a secar en desecador. Una vez seco el producto, se hicieron las siguientes pruebas: a) cromatografía en capa fina, b) determinación del punto de fusión, c) se determinó el pH potenciométricamente, d) se determinaron los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

VII. DISCUSION DE RESULTADOS



Compuesto con clave : JJCC

Características : cristales de color azul intenso, que al adicionar ácido clorhídrico 0.01 N presenta coloración roja de inmediato solubilizándose completamente, existe una cetona

conjugada con dos dobles enlaces que al adicionar el ácido, el protón ataca al grupo cetónico provocando un movimiento de las dobles ligaduras, formándose una sal de oxonio; característica que presentan los compuestos antocianicos.

Es un compuesto hidrosoluble, con un punto de fusión = 120-122 °C y un valor de Rf = 0.625 usando como eluyentes metanol + agua relación en volumen de (8:2).

El carbohidrato existente en esta molécula es glucosa.

Se determinó el punto de fusión del compuesto acetilado, fue de 250 - 208 °C y un valor de Rf = 0.54 habiendo usado como eluyente: cloroformo + metanol (6:4) relación en volumen.

Compuesto con clave: JJ08

Características: cristales hidrosolubles de color azul, al adicionar ácido clorhídrico se solubiliza inmediatamente dando coloración roja, punto de fusión = 180-182 °C y un Rf= 0.72 usando como eluyente metanol + agua (8:2)

Al compuesto acetilado se le determinó el punto de fusión, siendo de 292 -295 °C y un valor de Rf = 0.64 usando como eluyente cloroformo + metanol (6:4) . El carbohidrato existente en la estructura es ramosa, comprobado por cromatografía en capa fina comparado con patrones de referencia.

Compuesto ácido con clave JJAA

Características: Cristales de color café claro con punto de fusión = 145-147 °C, un Rf = 0.47 usando como eluyente metanol + agua (8:2) y pH = 3.8 (potenciométricamente).

Con los espectros de visible, ultravioleta, infrarojo, y resonancia magnética nuclear, que se obtuvieron de las sustancias aisladas, se procedió a localizar señales características de moléculas orgánicas en cada uno de ellos, para que al término de su identificación se tuvieran las estructuras de las sustancias causantes del color en la planta.

Interpretación de espectros de infrarojo:

Clave: JJCC

- A: Alargamiento O-H, hidrógeno intermolecular, banda amplia, a 3400 cm⁻¹
- B: Alargamiento C-H aromático a 2905 cm⁻¹
- C: Presencia de anillo de cinco miembros (lactona) a 1740 cm⁻¹
- D: Presencia de anión carboxílico COO⁻ a 1630 cm⁻¹
- E: Indica presencia de dobles enlaces en los grupos aromáticos a 1550 cm⁻¹
- F: Indica presencia de un grupo carbonilo perteneciente al grupo piridonio a 1400 cm⁻¹
- G: Señales correspondientes a metilos y metoxilos a 1325-1375 cm⁻¹

- H: Señales de hidrógeno correspondiente al O-H unido a carbonos pertenecientes a grupos aromáticos a 1180 cm^{-1}
- I: Vibraciones de C-O del carbono anomérico en 1030 cm^{-1}
- J: Vibraciones fuera del plano de los anillos aromáticos, dobles enlaces, a 860 - 980 cm^{-1}
- K: Vibraciones del pirano de los carbohidratos a 765 cm^{-1}

Clave 1 JJOG

- A: Alargamiento O-H hidrógeno enlazado intermolecular, banda en 3410 cm^{-1}
- B: Alargamiento C-H en 2905 cm^{-1}
- C: Absorción característica de metoxilos en 2820 cm^{-1}
- D: Absorbancia característica de grupo carbonilo perteneciente a la flavona en 1715 cm^{-1}
- E: Señal intensa indicando dobles enlaces de la flavona (pirano) en 1615 cm^{-1}
- F: Señales de dobles enlaces de los anillos aromáticos en 1460 - 1510 cm^{-1} .
- G: Indica presencia de metilos de los metoxilos en 1270 cm^{-1}
- H: Señales de C-O pertenecientes a los carbohidratos en 1200 cm^{-1}
- I: Vibraciones de C-O del carbono anomérico en 1100 cm^{-1}
- J: Vibraciones fuera del plano, grupo metoxilo contra el anillo aromático en 800 cm^{-1} , flexión C-H, fuera del plano.
- K: Vibraciones fuera del plano de los carbohidratos (pirano) en 620 cm^{-1}
- L: Vibraciones fuera del plano del anillo B con los carbohidratos en 440 cm^{-1}

Clave : JJAA

- A: Asociación considerable, banda amplia que llega a tener un máximo intenso en 3450 cm^{-1} correspondiendo a los hidrogenos libres del grupo ácido
- B: Señales de C-H alifáticos en 2905 cm^{-1}
- C: Señal del grupo carbonilo de lactona en 1745 cm^{-1}
- D: Señal del grupo COOH ácido en $1640-1680\text{ cm}^{-1}$
- E: Señal amplia correspondiente a grupos metilenos (CH_2) en 1400 cm^{-1}
- F: Vibraciones C-O de la lactona asimétrica en 1230 cm^{-1}
- G: Señal asimétrica del grupo carbonilo en 1080 cm^{-1}

Interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear

Clave: JJCC

- A: Aparece señal doble indicando presencia de un grupo glucosídico en 5 ppm
- B: Singuletes correspondientes a los hidrógenos del carbohidrato en 4.45 ppm
- C: Singuletes correspondientes a siete grupos metoxilos en 3-4 ppm
- D: Doblete de dobletes correspondientes a grupos (CH_2) de la glucosa a 2.65 ppm
- E: Señales correspondientes al grupo (CH_2) del ácido de la lactona

No presenta señales de protones aromáticos libres, lo cual indica que todas las posiciones aromáticas están sustituidas.

Clave: JJCC acetilado

- A: Señales de protones de hidrógenos unidos a los acetatos derivados de los núcleos aromáticos a 4.75 - 5.5 ppm
- B: Singuletes correspondientes a grupos metoxilos en 3 - 4 ppm
- C: Doblete de los acetatos del carbohidrato a 1.5 ppm

Clave: JJOG acetilado

- A: Doblete del protón de hidrógeno anomérico de ramnosa a 5 ppm
- B: Señal múltiple de los hidrógenos acetilados de ramnosa de 4.75 a 5.5 ppm
- C: Señales de grupos metoxilos a 3.75-4.5 ppm
- D: Señales que indican posibilidad de existir siete grupos acetilos a 1.90 - 2.25 ppm
- E: Doblete del metilo de ramnosa a 0.95 ppm

No aparecen señales de hidrógenos aromáticos libres, indicando de esta manera que todos se encuentran sustituidos.

Clave: JJAA

- A: Señal del protón del disolvente (agua deuterada) a 4.2 ppm
- B: Patrones AB, dos dobletes sobrepuestos que indican la presencia de grupos metilenos (CH₂), el metileno a 3.2 ppm es el más desplazado debido a la cercanía con el oxígeno de la lactona y del grupo carbonilo vecino, en 2- 3.2 ppm.
- C: Señal de protones del grupo metilo unido a un metileno a 1.3- 1.9 ppm

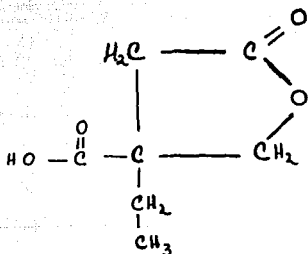
Interpretación de espectros de ultravioleta y visible

Los compuestos con clave JJCC y JJDB presentan las mismas absorbancias, indicando así que se tratan de compuestos semejantes.

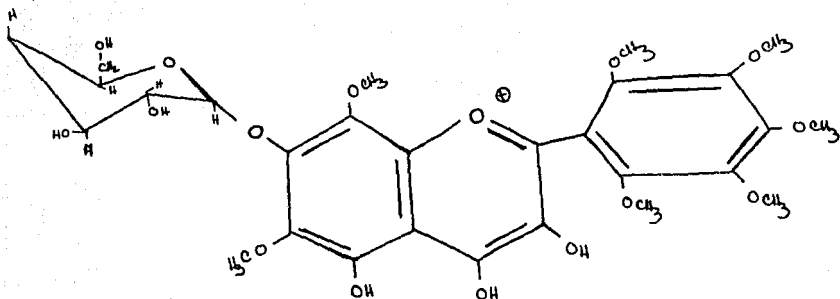
Confirman la presencia de un sistema aromático con absorbancias en ultravioleta de 250, 284, y 330 nm.

En los espectros de visible presentan absorbancias en 440 y 540 nm, indicando la presencia del grupo flavilio, provocado por la adición de ácido clorhídrico 0.01N para disolver los compuestos y originar color.

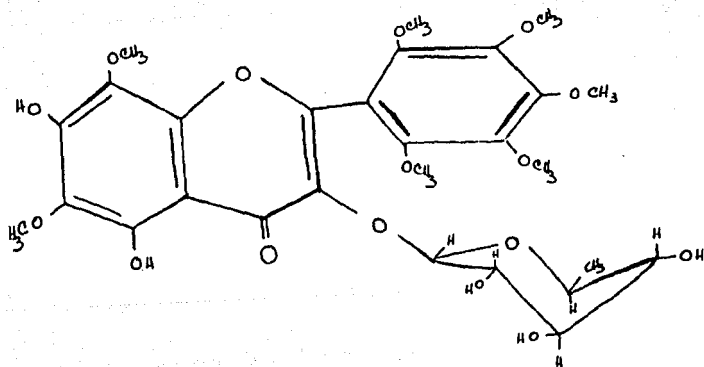
De acuerdo a la interpretación de los espectros, se proponen las siguientes estructuras de los compuestos antociánicos aislados, y la estructura del ácido orgánico contenido en *Hibiscus sabdariffa* L. variedad archer (jamaica).



Compuesto ácido con clave JJAA: 3 etil- 3 carboxi butiro
- 4 - lactona.



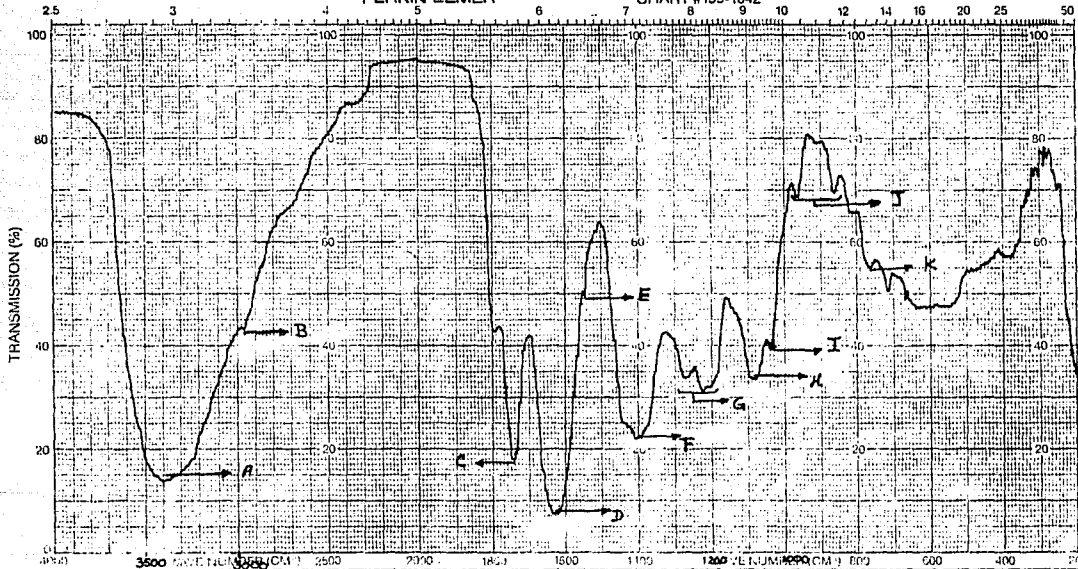
Compuesto con clave JJCC: 7-glucosido del 3,4,5, trihidroxi, 6,8, 2',3',4',5',6', septimetoxi flavilio.



Compuesto con clave JJCG 3-ranmosido del 4, ceto, 5,7, dihidroxi, 6,8, 2',3',4',5',6', septimetoxi flavona.

PERKIN-ELMER®

CHART #199-1042



SAMPLE

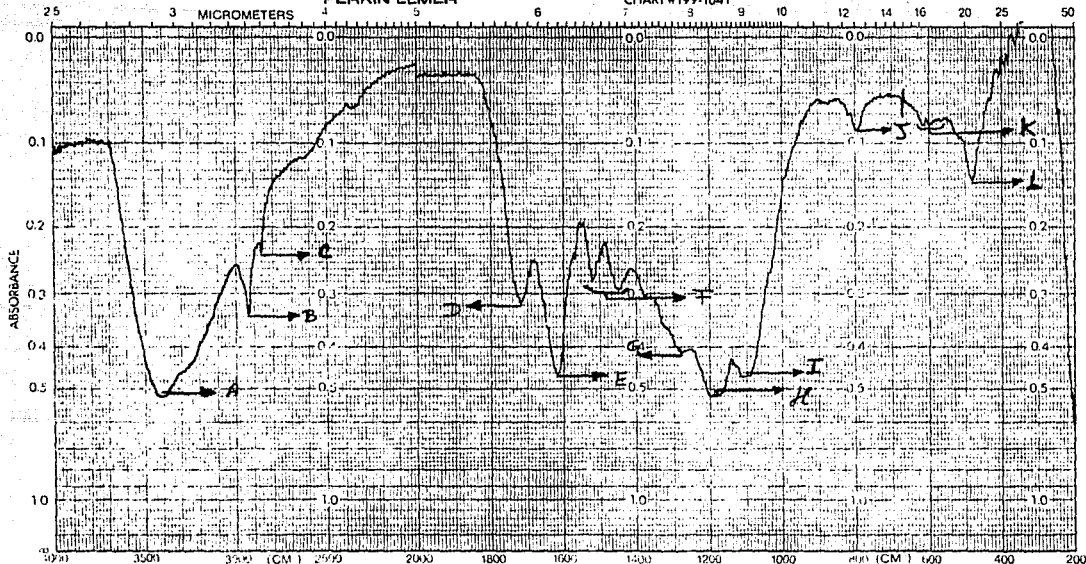
REF NO

199-1042

ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REP SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE
SUPERVISION		METHOD <u>ABS</u>		CELL PROGRAM <u>N</u>	OPERATOR <u>Harwick</u> DATE <u>1-1-67</u>
SAMPLE <u>JICE</u>		REMARKS <u>pastils</u>		SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH
ORIGIN <u>Fabula Vega</u>				CONCENTRATION	REFERENCE <u>one</u>

PERKIN-ELMER

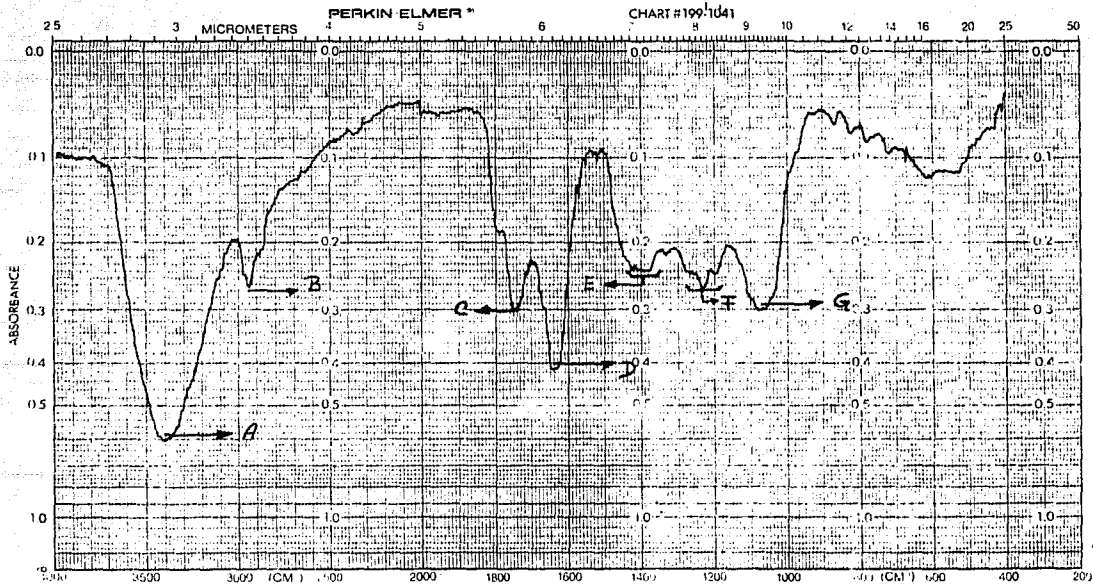
CHART #199-1041



SAMPLE

REF. NO.

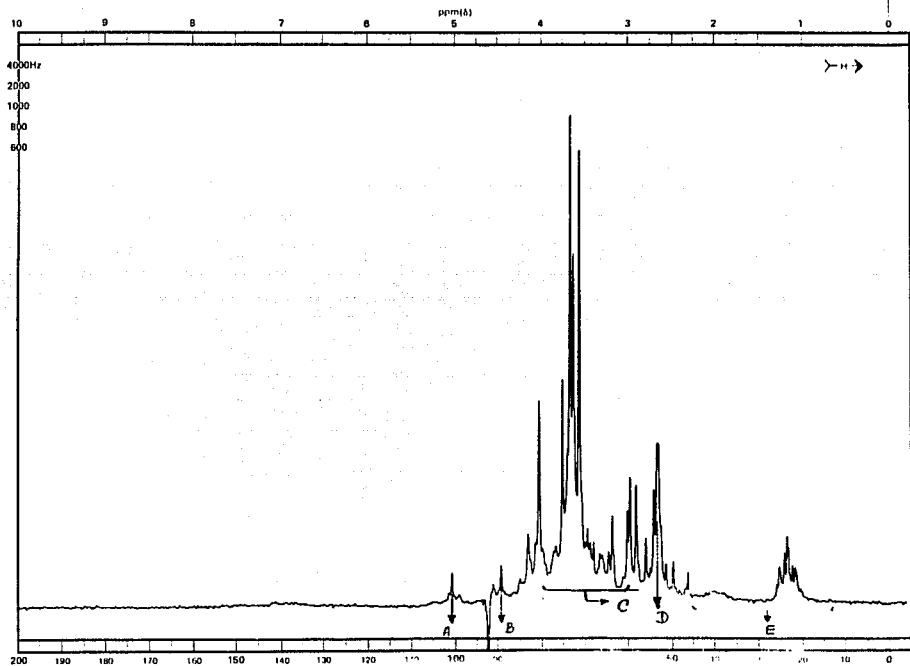
ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>6</u>	REP. SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION		EXPANSION <u>ABS</u>		MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DELAY
SAMPLE <u>J.J.O.G.</u>		REMARKS <u>pesticide</u>		SPLIT PROGRAM <u>1</u>	DATE <u>11/12/52</u>
ORIGIN <u>Fabola</u>		19.2.2		SOLVENT <u>Rln</u>	CELL PATH
				CONCENTRATION	REFERENCE <u>219</u>



SAMPLE

REF. NO.

ABSCISSA EXPANSION: _____	ORDINATE EXPANSION: _____	SCAN TIME <u>2</u> MULTIPLIER <u>0</u> SELF PROGRAM <u>1-4</u>	REF. SCAN _____ SINGLE BEAM TIME DRIVE _____ OPERATOR <u>S. J. J. J.</u> DATE <u>3/20/61</u>
SAMPLE <u>3-9 TJa</u> PREP. <u>1200</u>	REMARKS <u>gas = TJa</u>	SOLVENT _____ CONCENTRATION _____	CELL PATH _____ REFERENCE <u>2.0</u>



CFT 20
SPECTRUM NO. _____ DATE _____
OPERATOR _____
SAMPLE _____
TUBE O.D. 5 in. 8mm 10mm
JSEC

NUCLEI ¹³C ¹⁹F ³¹P
LOCK INTERNAL EXTERNAL
LOCK SIGNAL _____
SPIN RATE _____ rpm TEMP. _____ °C

ACQUISITION
SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
ACQUISITION TIME (AT) _____ sec
PULSE WIDTH (PW) _____ μ sec
PULSE DELAY (PD) _____ sec
DATA POINTS (DP) _____

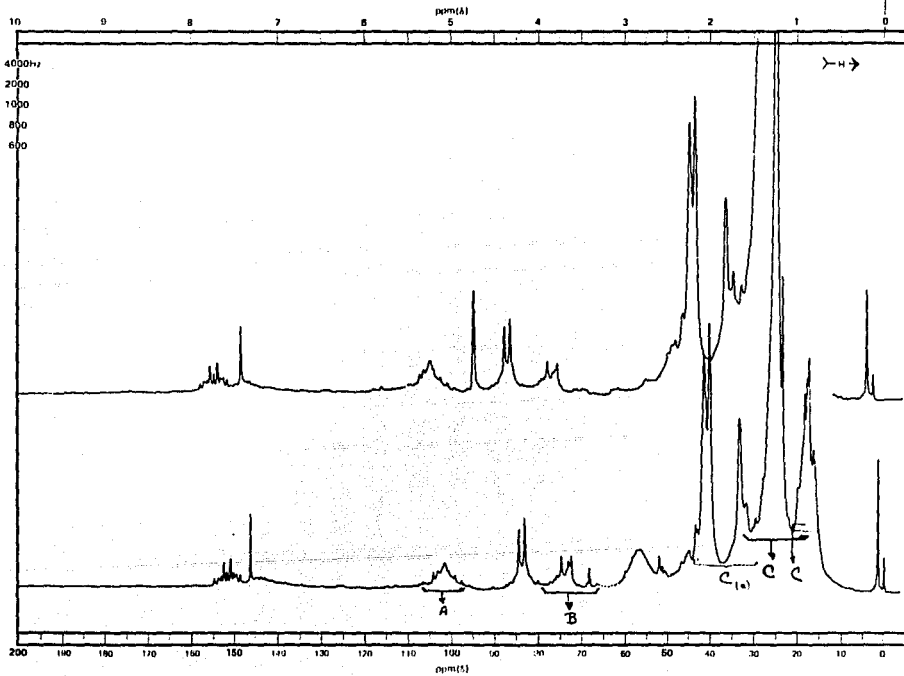
TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
DECOUPLER OFFSET (DO) _____
NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
SENS ENHANCEMENT (SE) _____ sec
WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
END OF PLOT (EP) _____ Hz
WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
END OF CHART (EC) _____ Hz
VERTICAL SCALE (VS) _____
REFERENCE LINE (RL) _____

WILMAD GLASS CO. INC.

CHART NO. WCV 20



SPECTRUM NO. _____

OPERATOR _____ DATE _____

SAMPLE _____

TUBE OD: 5mm : 8mm : 10mm _____

NUCLEI: ¹³C ¹⁵N ³¹P _____

LOCK: INTERNAL EXTERNAL

LOCK SIGNAL _____

SPIN RATE _____ cps TEMP _____ °C

ACQUISITION _____

SPECTRAL WIDTH (BW) _____ Hz

NO OF TRANSIENTS (NT) _____

ACQUISITION TIME (AT) _____ sec

PULSE WIDTH (PW) _____ μ sec

PULSE DELAY (PD) _____ sec

DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____

HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____

RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____

DECOUPLER OFFSET (DO) _____

NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz

ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY _____

SENS ENHANCEMENT (SE) _____ sec

WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz

END OF PLOT (EP) _____ Hz

WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz

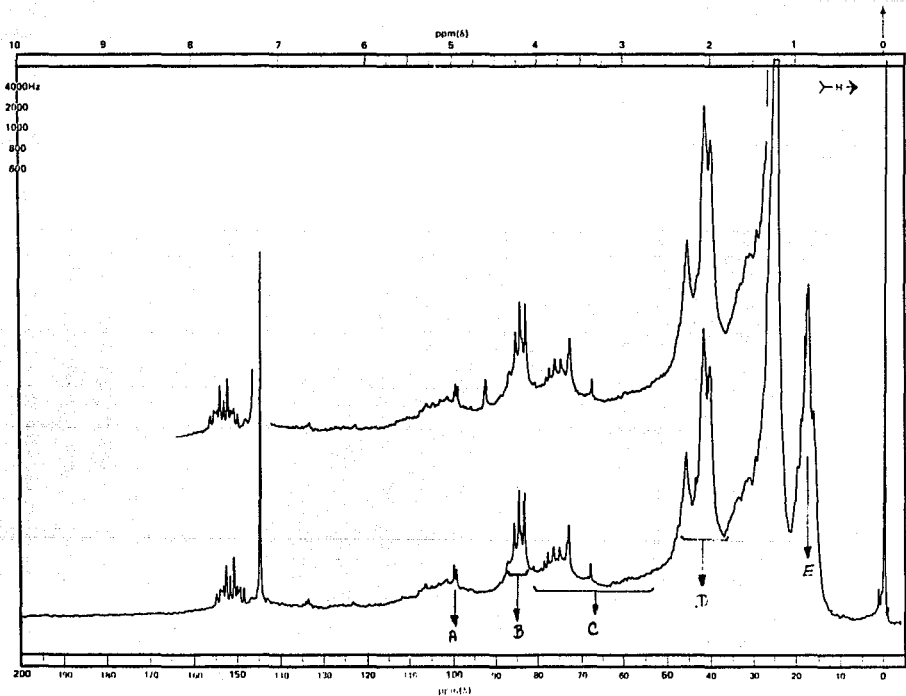
END OF CHART (EC) _____ Hz

VERTICAL SCALE (VS) _____

REFERENCE LINE (RL) _____

WILMAD GLASS CO., INC.

CHART NO. WCV 20



CFT-20
 SPECTRUM NO. _____
 OPERATOR _____ DATE _____
 SAMPLE _____
 TUBE OD: 5mm 8mm 10mm

SSOg Acet
ca H⁺

NUCLEI: ¹H ¹³C ¹⁹F ³¹P
 LOCK: INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL _____
 SPIN RATE _____ cps TEMP _____ °C

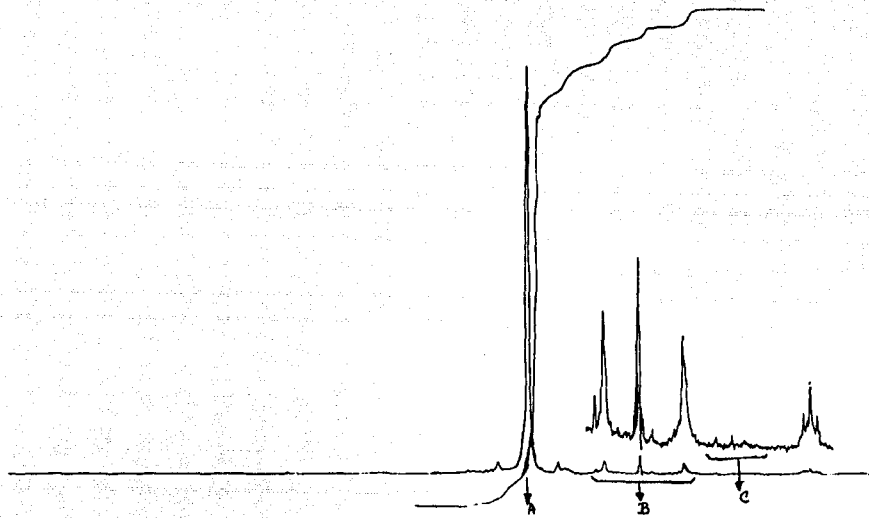
ACQUISITION:
 SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec
 PULSE WIDTH (PW) _____ μ sec
 PULSE DELAY (PD) _____ sec
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

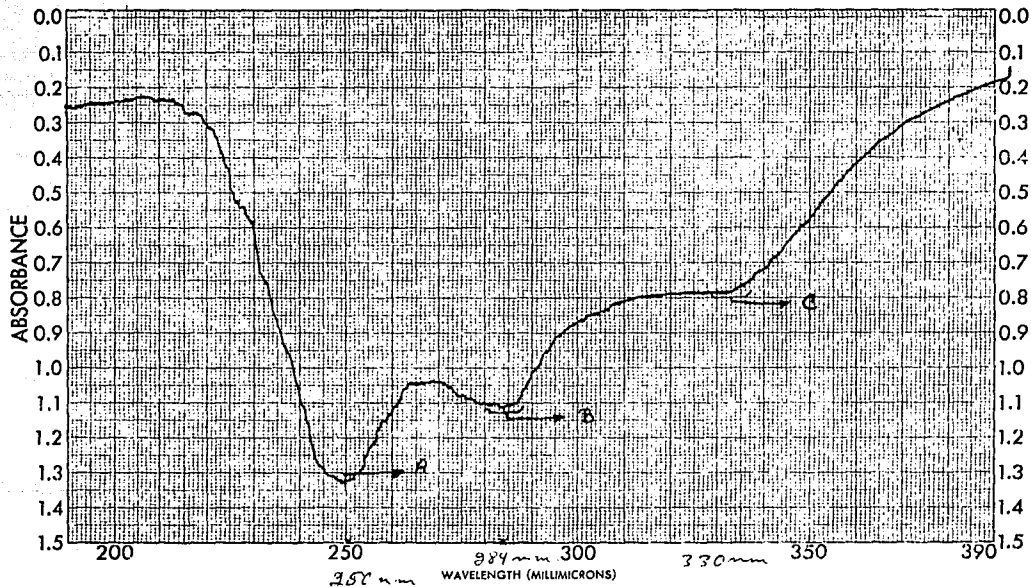
DISPLAY:
 SENS ENHANCEMENT (SE) _____ sec
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

WILMAD GLASS CO. INC.
 CHART NO. WCV 20




J.V.a.a.

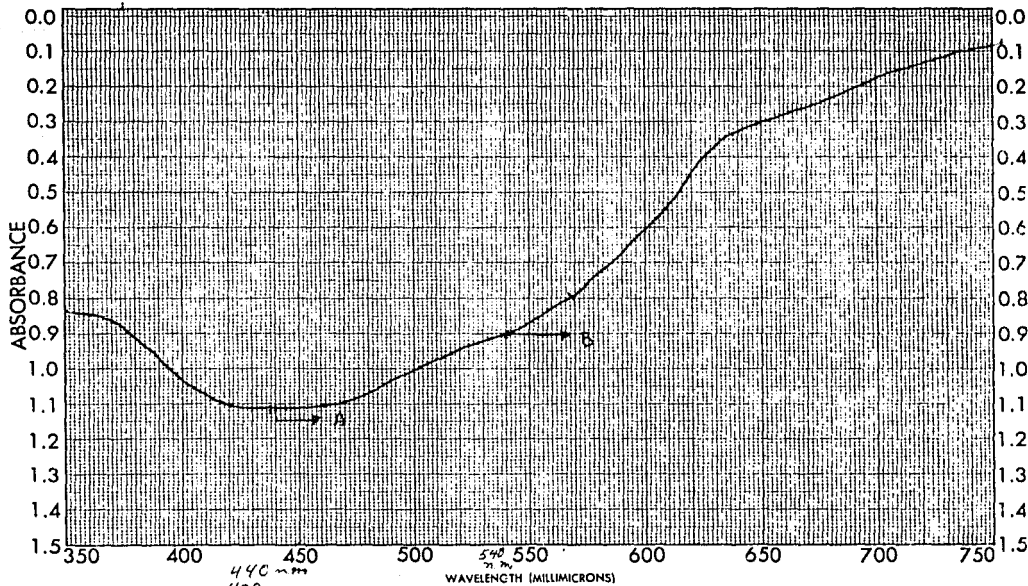
UV



SAMPLE <u>J.F.C.</u>	CURVE NO. <u>1234</u>	SCAN SPEED <u>Rapid</u>	OPERATOR <u>S. Ives</u>
ORIGIN <u>Fabrick</u>	CONC. <u>-</u>	SLIT <u>25</u>	DATE <u>4/10/82</u>
SOLVENT <u>H₂O + 0.01 HCl</u>	CELL PATH <u>1 cm</u>	REMARKS	
	REFERENCE <u>H₂O + 0.01 HCl</u>		

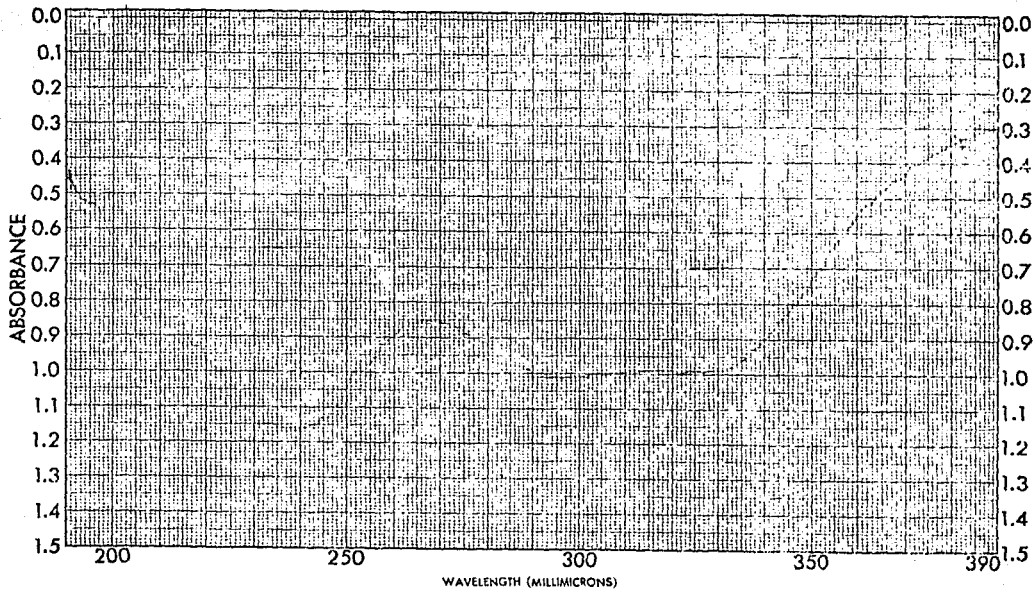
PART NO. 202-1511 

PERKIN-ELMER



SAMPLE <u>JSCC</u>	CURVE NO. <u>1743</u>	SCAN SPEED <u>R</u>	OPERATOR <u>Schen</u>
ORIGIN <u>Fabul</u>	CONC. _____	SLIT <u>25</u>	DATE <u>24 Nov 1977</u>
SOLVENT _____	CELL PATH _____	REMARKS _____	
REFERENCE _____			

UV

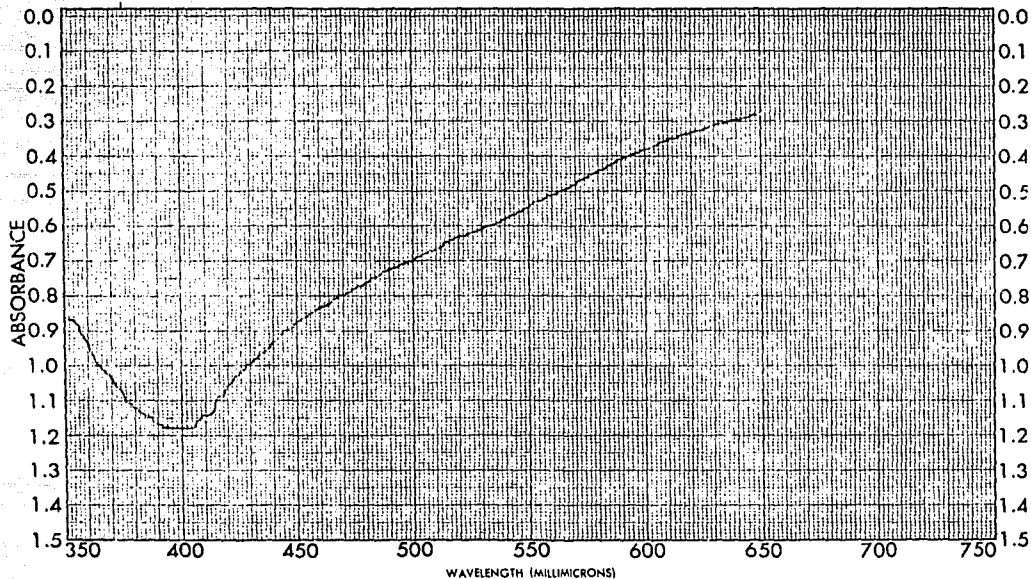


SAMPLE <u>2nd Colocute "J50G"</u>	CURVE NO. <u>1808</u>	SCAN SPEED <u>2ap</u>	OPERATOR <u>Chish</u>
ORIGIN <u>Diethen State</u>	CONC. <u>Qualitative</u>	SLIT <u>25</u>	DATE <u>6/11/87</u>
SOLVENT <u>Agua + HCl</u>	CELL PATH <u>1cm</u>	REMARKS	
REFERENCE <u>agua</u>			

PART NO. 202-1511 ⁵⁵

PERKIN-ELMER

VIS



SAMPLE <u>550G 14</u>	CURVE NO. <u>1285</u>	SCAN SPEED <u>rapid</u>	OPERATOR <u>S. Baker</u>
ORIGIN <u>Fabola Vega</u>	CONC. <u>—</u>	SLIT <u>25</u>	DATE <u>9/10/52</u>
SOLVENT <u>methanol + 0.01% HCl</u>	CELL PATH <u>1 cm</u>	REMARKS	
	REFERENCE <u>air's</u>		

PART NO. 202-1512 $\frac{25}{2}$

PERKIN-ELMER

VIII. CONCLUSIONES

Se proponen las estructuras de los componentes del pigmento colorido y del ácido contenido en *Hibiscus sabdariffa* L. variedad archer (jamaica), que se cultiva en el estado de Guerrero en la región conocida como costa chica.

Los compuestos identificados corresponden al grupo de las antocianinas, que debido a la presencia de un ácido orgánico contenido en la planta, se mantiene en forma de sal de oxonio, presentando coloración roja característica de la jamaica.

El ácido 2 ceto, 3 etil, 3 furanil carboxílico, aislado de *Hibiscus sabdariffa* L. variedad archer (jamaica) es diferente al encontrado en otras variedades, por lo que le asignamos el nombre de ácido sabdariffico.

Uno de los compuestos antocianínicos aislados es 7-glucosido del 3,4,5, trihidroxi, 6,8, 2',3',4',5',6', septimetoxi flavilio, siendo diferente a las antocianinas comúnmente encontradas le asignamos el nombre de Sabdariffina.

Otro compuesto antocianínico aislado de esta planta fue 3-ramosido de 4,ceto, 5,7, dihidroxi, 6,8, 2',3',4',5',6', septimetoxi flavona, este compuesto tampoco ha sido reportado con anterioridad, por lo que le asignamos un nombre apropiado de la variedad archer de la cual se aisló, llamándolo archeridina.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Achenson R.M.: Química Heterocíclica, Publicaciones culturales S.A., México D.F., 1981
- 2.- Badui D.S.: Química de los alimentos. 1a. ed. Editorial Alhambra, S.A. México, D.F., 1982
- 3.- Balasubramain T.: How safe are the food colours , Neelakantan, S. Indian Farming, 1980
- 4.- Baley L. H.: Manual of cultivated plants , The Mac. Millan Co. N.Y. U.S.A., 1949
- 5.- Clydesdale, F.M. : Main, J.H. Francis, F.J. (Dep. Food Sci. Nutr. Univ. Massachusetts, Amherst, Mass.) Anthocyanins as colorants for beverages and gelatin desserts., J. Food Prot. 42 (3) 204-7 (Eng)., 1979
- 6.- Clydesdale, F.M. : Main, J.H. Francis, F.J. (Dep. Food Sci. Nutr. Univ. Massachusetts, Amherst, Mass.) Effect of anthocyanins preparation as colorant on higroscopicity of dry-pack foods., J. Food Prot. 42 (3), 225-7 (Eng) ., 1979
- 7.- Código Sanitario.: Leyes y Codigos de México. 14a. ed. Editorial porrúa. México, D.F., 1977
- 8.- Código sanitario mexicano. : Aditivos alimentarios., 19a. ed. Editorial porrúa, México, D.F., 1983
- 9.- Comunidad economica europea.: Food Aditives and the consumer, Editorial lux., 1980
- 10.-Dong, Yansheng, Chen, Xicomng Zeng, Huating (Xiamen Food. Co. Xiamen Peop. Rep. China), Preparation and aplication of red pigment from roselle, " Four coloration test in candies"., Shipin Yu Fajiao Gongye 1985 (1) 24-7 (Ch)., 1985
- 11.-Du, C.T. Francis, F.J. (Dep. food. Sci. Technol. Univ. Massachusetts, Amherst, Mass.), Anthocyanins of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) J. Food Sci. 1974 38(5) 810-12 (Eng) 1974
- 12.-Dupaigne P. Fruits.: Red dyes of natural origin.,Food Technology., 1974

- 13.-Esselem W.B. Sammy, G.M. (Dep. food Sci. Nutr. Univ. Massachusetts, Amherst Mass.), Application for roselle as a red food colorant., Food Prod. Dev. 1975, 9(8), 37-8 40 (Eng)., 1975
- 14.-Esselem W.B. Sammy, G.M. (Dep. Food. Sci. Technol. Univ. Massachusetts, Amherst Mass.), Natural red colorant for foods., Food Prod. Dev. 1973 7(1) 80-82 (Eng)., 1973
- 15.-Fairweather F.A. Swann C. A.: Food aditives and cancer., Proceeding of the nutrition society ., 1981
- 16.-Hall R.L. : Flavor research and food acceptance, Reinhold Pub. Corp. New York., Food colours, Food Technology on July., 1980
- 17.-Harborne, J.B. Mabry T. J. Mabry Helga.: The flavonoids., Champman and Hall., London, Eng., 1974
- 18.-Hegnauer, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Berkhauser Verlag Basel und Stuttgart, Germany., 1969
- 19.-Imeplant: Usos de las plantas medicinales en México, monografias científicas II., 1976
- 20.-Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.: Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos., 1986
- 21.-Khafaga El-Sayed R; Koch herwig (Inst. Trop. Subtrop. Pflanz Univ. Goettingen, D-3400 Goettingen Fed. Rep. Ger.), Stoge of maturity and quality of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) II Anthocyanins., Angew Bot. 1980 54-(5-6) 295-300 (Ger)., 1980
- 22.-Mackinney and Little.: Color of foods, The AVI Publishing Company Inc., 1962
- 23.-Martinez M.: Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas., Editorial fondo de cultura económica , México, D.F., 1973
- 24.-National Academy of Sciences.: Toxicants occurring naturally in foods., second edition ., 1973
- 25.-Patino N.A.: Cultivo y aprovechamiento de la jamaica, Dirección gral. de extensión agrícola, Chapingo, México., 1975
- 26.-Philip T.: Utilization of plant pigments as food colorants., Food Technology., 1973

- 27.-Sanyo-Kokusaku Pulp. Co. LTD Jpn. Kokai Tokkyo Koho.: Food coloring agents from Hibiscus flowers., J.P. 81, 141, 358(c1.C09B 61/00) 05 Nov 1981 appl 80-45 178,08 Ap 1980 .5p.p., 1980
- 28.-Subsecretaría de Agricultura y Operación.: Información Agropecuaria y Forestal., Dirección gral. de Economía Agrícola., 1986
- 29.-V. Elbe J.H.: Stability of betalains as food colours, Food Technology., 1975
- 30.-Weissler Alfred.: Regulation of food colours, Food Technology F.D.A. , 1975
- 31.-Zeng, Huating, Dong, Yansheng, Yang, Jucheng (Fujian Inst. Subtrop. Plants Peop. Rep. China.), Preparation and application of red pigments from Hibiscus sabdariffa L., Selection of the most optimal extraction conditions., Shipin Yu Fajiao Gongye 1984 (5) 27-32 (Ch).,1984
Two effects of heat on the red pigment from roselle., Shipin Yu Fajiao Gongye 1984 (6) 31-4 (Ch)
- 32.-Zucherman S.: Atlas certified colors for foods, drugs and cosmetics., H. Kohnstamm Company Inc., 1964