



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

EL EFECTO AMBIENTAL Y DEL GENOTIPO EN LOS COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE CULTIVARES NACIONALES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

CÉSAR SÁNCHEZ FERIA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: "EL EFECTO AMBIENTAL Y DEL GENOTIPO EN LOS COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE CULTIVARES NACIONALES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)", realizada por el alumno: CÉSAR SÁNCHEZ FERIA, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. VÍCTOR A. GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS



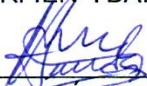
DRA. YÓLANDA SALINAS MORENO

ASESORA



DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

ASESOR



DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR



DR. R. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2017

EL EFECTO AMBIENTAL Y DEL GENOTIPO EN LOS COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE CULTIVARES NACIONALES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

CÉSAR SÁNCHEZ FERIA, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta apreciada por sus cálices debido a su elevado contenido de fenoles solubles totales (FST), antocianinas (CTA) y ácidos orgánicos, compuestos responsables del color y el sabor en sus cálices y extractos acuosos. Las caracterizaciones físicas y químicas realizadas en variedades mexicanas sólo han considerado el efecto del genotipo (G) en las variables de calidad evaluadas, por lo cual es importante elucidar los efectos de los factores ambiente de producción (A) y de su interacción G x A, en la calidad de los cálices deshidratados y extractos acuosos de jamaica. Por tales razones, el objetivo de esta investigación fue cuantificar los efectos debidos al genotipo (G), ambiente de producción (A) y su interacción (G x A), para identificar los genotipos más destacables por su contenido de FST y CTA, así como su acidez titulable, y ubicar las localidades en las cuales pudieran expresar su mayor contenido de estos fitoquímicos. El análisis de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (AMMI) reveló que los factores G, A, y G x A tuvieron efectos significativos ($p \leq 0.01$) en la variación de la calidad en cálices y extractos de *H. sabdariffa*. La variación de los contenidos de FST y CTA, así como el color (luminosidad, tonalidad, saturación de color, a^* y b^*) en cálices y extractos acuosos de *H. sabdariffa* se debió principalmente al factor genotipo, que representó entre 44 y 81 % del total de los efectos; mientras que la acidez fue dominada por el efecto ambiental, que representó entre el 52 y 77 % del total de los efectos. Las variedades de cálices oscuros destacaron por tener un mayor contenido de FST y CTA, así como valores bajos en luminosidad, tonalidad, saturación de color, a^* y b^* ; mientras que la acidez destacó cuando las variedades, rojo oscuro o rojo claro, fueron establecidas en las localidades de Nayarit. Estos resultados indican que para la obtención de cálices con alto contenido de fitoquímicos se debe hacer una selección de las variedades que destaquen por su contenido de fitoquímicos; mientras que si el fin es tener cálices con mayor acidez, se deben de ubicar las localidades en donde las variedades de *H. sabdariffa* expresen una mayor síntesis de ácidos orgánicos.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, análisis AMMI, color, fenoles solubles, antocianinas.

**ENVIRONMENTAL AND GENOTYPE EFFECTS ON THE PHYTOCHEMICAL
COMPOUNDS OF NATIONAL CULTIVARS OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

CÉSAR SÁNCHEZ FERIA, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is a plant valued for its calyces which are rich in total soluble phenols (FST), anthocyanins (CTA) and organic acids, compounds that are responsible for the color and flavor of its aqueous extracts. The physical and chemical characterizations of Mexican varieties have only considered the effect of the genotype (G) in the quality variables. It is important to elucidate also the effects of the environmental factors of production (A) and of the interaction G x A on the quality of dehydrated calyces and aqueous extracts of roselle. For these reasons, the objective of this research was to quantify the effects due to the genotype (G), the production environment (A) and its interaction (G x A), to identify the most notable genotypes on FST and CTA content, as well as their titratable acidity, and to learn the location where these genotypes may reach the best content of phytochemicals. The additive main effects and multiplicative interaction analysis (AMMI) revealed that the factors G, A, and G x A had significant effects ($p \leq 0.01$) on the variation of the quality in calyces and extracts of *H. sabdariffa*. The variation of the FST and CTA contents, as well as the color parameters (luminosity, tonality, color saturation, a^* and b^*) in calyces and aqueous extracts of *H. sabdariffa* was mainly due to the genotype factor, which represented between 44 and 81 % of total effects; whereas the acidity was mainly ruled by the environmental effect, which represented between 52 and 77 % of the total effects. The varieties of dark calyces had a higher content of FST and CTA, as well as lower values in luminosity, tonality, saturation of color, a^* and b^* ; while acidity stood out in any variety, dark or clear red, were established in localities of Nayarit State. These results indicate that for obtaining calyces with high phytochemical content, a selection must be made for the varieties that stand out for their phytochemical content; however, for producing calyces of greater acidity, the best way is to grow any variety of *H. sabdariffa* in a location where the organic acids synthesis is promoted.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, analysis AMMI, colour, total soluble phenols, total anthocyanins.

AGRADECIMIENTOS

Al **Pueblo Mexicano** que mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) hicieron posible el otorgamiento de recursos económicos para financiar mis estudios e investigación doctoral.

Al **Colegio de Postgraduados** por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional, especialmente al PREGEP - Fisiología Vegetal, por cobijarme durante mi estancia en esta casa de estudios.

Al **Dr. Víctor A. González Hernández** por su acertada dirección en mi formación y trabajo de investigación doctoral, por todo su apoyo, disposición, conocimiento y amistad compartida, pero sobre todo por el gran ejemplo de la persona que aspiro ser en el futuro.

A la **Dra. Yolanda Salinas Moreno** por su dirección, orientación y apoyo en el trabajo de laboratorio, además agradezco su gran amistad y confianza que me otorgó.

A la **Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada** por la gran aportación de su conocimiento estadístico que mejoró la investigación.

Al **Dr. Javier Hernández Morales** por sus atinadas observaciones que contribuyeron a mejorar la investigación.

Al **Dr. R. Marcos Soto Hernández** por compartir su conocimiento y experiencia en el área de la fitoquímica que hicieron importantes aportes a este trabajo de investigación, siendo el más grande hacia mi formación profesional.

Al **Dr. Nicacio Cruz Huerta** por compartir su amplio conocimiento que facilitó la realización de esta investigación, además de su amistad brindada.

Al **Fondo Sectorial de Investigación en materia agrícola, pecuaria, acuicultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos**, por la aportación del material vegetal y el financiamiento para realizar esta investigación en sus primeras dos fases, como parte del proyecto titulado “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”, con clave 163972.

Al **M. C. Francisco de Jesús Caro Velarde** por el apoyo brindado en las distintas fases de campo realizadas, sobre todo por la aportación del material biológico con el cual realicé mi tercera fase de investigación y por mostrarme lo apasionante que es la investigación en campo. Además por brindarme su amistad que es muy valiosa para mí.

A la **Dra. María Luisa Machuca Sánchez** por compartir su invaluable conocimiento en postcosecha de cálices de jamaica, lo cual hizo posible la realización de la tercera fase de investigación, y por brindarme su valiosa amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres, **Epifanía Feria Coronel y Maximino Sánchez Cruz**, por darme la vida y apoyarme a lo largo de ella, gracias. No habría podido llegar tan lejos sin su apoyo y su cariño, los amo.

A mis hermanos **Martín, Maximino, Silvia, Hugo e Ivette** por siempre brindarme su apoyo y cariño incondicional en todo momento, los amo hermanos.

A mis sobrinos **Ángel, Rodolfo, Diana Paola, Hugo, Iván, Roland, Dilan y Aranza Sophia**, sus muestras de cariño me hacen muy feliz, los amo.

A **mis amigos y compañeros** con los que he compartido cada momento vivido en esta aventura. No los nombro porque olvidar a uno solo sería una gran omisión de mi parte.

Especial dedicatoria a **los productores de jamaica de México** que hacen que sea posible, con su esfuerzo diario, que podamos disfrutar de las bondades de este cultivo.

CONTENIDO

	Número de página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. EFECTO DE GENOTIPO Y AMBIENTE EN LA CALIDAD FISICOQUÍMICA DE VARIEDADES MEXICANAS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	4
2.1. RESUMEN.....	4
2.2. ABSTRACT.....	5
2.3. INTRODUCCIÓN.....	6
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.4.1. Material vegetal.....	8
2.4.2. Preparación de los extractos acuosos.....	9
2.4.3. Color.....	10
2.4.4. Contenido de fenoles solubles totales (FST).....	10
2.4.5. Contenido total de antocianinas (CTA).....	11
2.4.6. Acidez titulable (AT).....	11
2.4.7. pH.....	11
2.4.8. Análisis estadístico.....	12
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
2.5.1. Análisis de varianza.....	12
2.5.2. Variación genética en color de cálices deshidratados y de extractos acuosos.....	15
2.5.3. Características fitoquímicas.....	19
2.5.4. Clasificación integral de genotipos por calidad fisicoquímica.....	24
2.6. CONCLUSIONES.....	27
2.7. LITERATURA CITADA.....	27

3. EFECTO DEL GENOTIPO Y AMBIENTE DE PRODUCCIÓN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA, ACIDEZ TITULABLE Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁLCICES DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	32
3.1. RESUMEN	32
3.2. ABSTRACT.....	33
3.3. INTRODUCCIÓN	34
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.4.1. Material vegetal	36
3.4.2. Preparación de los extractos acuosos.....	37
3.4.3. Fenoles solubles totales (FST).....	38
3.4.4. Contenido total de antocianinas (CTA)	38
3.4.5. Perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	39
3.4.6. Acidez titulable (AT).....	39
3.4.7. Extracción y análisis de ácidos carboxílicos	39
3.4.8. Análisis de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular por HPLC	40
3.4.9. Análisis estadístico	40
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.5.1. Análisis de varianza.....	41
3.5.2. Variación del contenido de fenoles solubles totales (FST) y antocianinas (CTA).....	43
3.5.3. Perfil cromatográfico de antocianinas	50
3.5.4. Variación de la acidez titulable (AT)	52
3.5.5. Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos	55
3.5.6. Contenido de ácidos orgánicos	56
3.6. CONCLUSIONES	59
3.7. LITERATURA CITADA	59
4. EFECTO DEL DESHIDRATADO EN LOS PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÁLCICES DE <i>Hibiscus sabdariffa</i>	64
4.1. RESUMEN	64
4.2. ABSTRACT.....	65
4.3. INTRODUCCIÓN	66
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	68
4.4.1. Material vegetal	68
4.4.2. Tratamientos de deshidratado de cálices (TDC).....	68

4.4.3. Preparación de los extractos acuosos.....	69
4.4.4. Fenoles solubles totales (FST).....	69
4.4.5. Contenido total de antocianinas (CTA)	70
4.4.6. Perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	70
4.4.7. Color en extractos acuosos	71
4.4.8. Acidez titulable (AT).....	72
4.4.9. Extracción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular	72
4.4.10. Análisis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por HPLC	72
4.4.11. Análisis estadístico	73
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.5.1. Análisis de varianza.....	73
4.5.2. Fenoles solubles totales (FST).....	75
4.5.3. Contenido de antocianinas totales (CTA).....	78
4.5.4. Análisis de antocianinas por HPLC.....	80
4.5.5. Parámetros de color en extractos acuosos	83
4.5.6. Acidez titulable (AT).....	86
4.5.7. Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos de bajo peso molecular	86
4.5.8. Ácidos orgánicos de bajo peso molecular	89
4.6. CONCLUSIONES	92
4.7. LITERATURA CITADA	92
5. DISCUSIÓN GENERAL	98
6. CONCLUSIONES GENERALES	101

LISTA DE CUADROS

	Número de página
Cuadro 2.1. Características de las localidades probadas en el cultivo de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	9
Cuadro 2.2. Sumas de cuadrados estimadas mediante análisis estadísticos combinados de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , cada uno cultivado en cinco ambientes de producción.....	14
Cuadro 2.3. Efecto del ambiente de producción en los valores de luminosidad (L), tonalidad (T) y saturación de color (SDC) en cálices deshidratados y extractos acuosos de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , cada uno crecido en cinco localidades.	18
Cuadro 2.4. Contenido promedio de antocianinas, fenoles solubles totales, pH y acidez titulable en extractos acuosos de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> de cálices color rojo crecidas en cinco localidades.	19
Cuadro 2.5. Comparación del contenido total de antocianinas (CTA), fenoles solubles totales (FST), pH y acidez titulable (AT), en seis grupos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	25
Cuadro 2.6. Efecto del ambiente de producción en el contenido total de antocianinas (CTA), fenoles solubles totales (FST), pH y acidez titulable (AT) en 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	26
Cuadro 3.1. Ubicación geográfica y altitud de las localidades en las que se cultivaron los genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> bajo estudio.	37
Cuadro 3.2. Sumas de cuadrados resultantes del análisis AMMI para el contenido de fenoles solubles totales (FST), contenido total de antocianinas (CTA) y acidez titulable (AT) de cálices deshidratados de dos variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades.	42
Cuadro 3.3. Contenido relativo de antocianinas (D3S y C3S) en extractos acuosos de cálices deshidratados de dos genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> crecidos en diferentes localidades.....	52

Cuadro 3.4. Concentración de ácidos orgánicos identificados en extractos acuosos de los genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> Negra Quiviquinta (NQ) y UAN-8, cada una crecida en cinco localidades.....	58
Cuadro 4.1. Sumas de cuadrados correspondiente al análisis de varianza aplicado a las variables FST, CTA, AT y descriptores de color (luminosidad, a* y b*) en extractos acuosos de cálices de tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> deshidratadas a seis es temperaturas.....	75
Cuadro 4.2. Contenido de delfinidina 3-sambubiósido (D3S) y cianidina 3-sambubiósido (C3S) en extractos de variedades de <i>H. sabdariffa</i> sometidas a distintos tratamientos de deshidratado de cálices.....	82
Cuadro 4.3. Variación de luminosidad, a*, b*, diferencia total de color (ΔE) y referencias de color (RC*) en extractos acuosos de tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sometidas a diferentes tratamientos de deshidratado.	84
Cuadro 4.4. Contenido de ácidos orgánicos en cálices de tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sometidos a diferentes tratamientos de deshidratado.....	91

LISTA DE FIGURAS

	Número de página
Figura 2.1. Agrupamiento de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> de acuerdo con sus valores de luminosidad, tonalidad y saturación de color (SDC) en cálices deshidratados y extractos acuosos.	17
Figura 2.2. Agrupamiento de 53 genotipos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> de acuerdo a su contenido total de antocianinas, fenoles solubles totales, pH y acidez titulable.	24
Figura 3.1. Efecto del genotipo, el ambiente y su interacción G x A en el contenido de fenoles solubles totales en dos variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades de México.....	44
Figura 3.2. Efecto de la interacción G x A en el contenido de fenoles solubles totales en dos variedades de <i>H. sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades de México. DMS = 197 mg EAG. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).	45
Figura 3.3. Efecto del genotipo, la localidad y su interacción G x A en el contenido total de antocianinas en dos variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades de México.....	47
Figura 3.4. Efecto de la interacción G x A en el contenido total de antocianinas en dos variedades de <i>H. sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades de México. DMS = 109 mg EC3G. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).	48
Figura 3.5. Perfil cromatográfico de antocianinas identificadas en extractos acuosos de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , en los genotipos Negra Quiviquinta y UAN-8. Las antocianinas fueron: 1) delphinidina 3-glucósido, 2) Delfinidina 3-sambubiósido, 3) cianidina 3,5-diglucósido, 4) No identificada, 5) Cianidina 3-sambubiósido.	51

Figura 3.6. Efectos del genotipo, la localidad y su interacción G x A en la acidez de extractos acuosos de dos variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> crecidas en nueve localidades de México.	53
Figura 3.7. Efecto del genotipo y la localidad en el porcentaje de acidez titulable en dos variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> cada una crecida en nueve localidades. DMS = 0.81 % ácido cítrico. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).	54
Figura 3.8. Perfil cromatográfico típico de ácidos orgánicos de cadena corta identificados en cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> en los genotipos Negra Quiviquinta y UAN-8. La identidad de los picos fue: 1) ácido oxálico, 2) ácido tartárico, 3) ácido málico, 4) ácido cítrico y 5) ácido succínico. NI: No identificado.	56
Figura 4.1. Efecto de tratamientos de deshidratado de cálices en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales (FST) en tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . DMS=197 mg EAG 100 g ⁻¹ MS. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).	76
Figura 4.2. Efecto de los tratamientos de deshidratado de cálices en el contenido total de antocianinas de tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . DMS = 71 mg EC3G 100 g ⁻¹ MS. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4). ...	79
Figura 4.3. Perfil de antocianinas característico en extractos de cálices de la variedad Negra Quiviquinta de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sometidos a diferentes tratamientos de deshidratado. La identidad de las antocianinas fue: 1) y 3) no identificadas, 2) delfinidina 3-sambubiósido y 4) cianidina 3-sambubiósido.	81
	87
Figura 4.4. Efecto de los tratamientos de deshidratado de cálices en la acidez de extractos de tres variedades de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . DMS = .Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).	87

Figura 4.5. Perfiles cromatográficos de ácidos orgánicos de bajo peso molecular de las variedades de *Hibiscus sabdariffa* Negra Quiviquinta y UAN-9 (A) y UAN 16-1 (B). Los ácidos identificados en el perfil fueron: 1) oxálico, 2) tartárico, 3) málico, 4) cítrico y 5) succínico. NI: No identificado.88

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Hibiscus sabdariffa es una malvácea, a la cual se le conoce en México como jamaica o flor de jamaica. Esta planta originaria de África fue introducida a México durante la época colonial, y desde entonces se ha dispersado en las distintas regiones tropicales y subtropicales del territorio nacional. Actualmente son los estados de Guerrero, Oaxaca y Michoacán los principales productores de esta especie, al proveer cerca del 90 % de la producción nacional, que equivale a 6284 toneladas (SIAP, 2015).

Los genotipos de *H. sabdariffa* se pueden clasificar por su color en variedades con cálices color rojo claro y rojo oscuro, además de las variedades que presentan cálices verde-amarillos (Christian y Jackson, 2009), que difieren en su composición química y fitoquímica (Salinas-Moreno *et al.*, 2012; Juliani *et al.*, 2009).

H. sabdariffa es apreciada por sus diferentes propiedades medicinales, entre las que destacan sus efectos para prevenir padecimientos de tipo cardiovasculares (Herrera-Arellano *et al.*, 2004) y prevenir ciertos tipos de cáncer (Hui-Hsuan *et al.*, 2007), debido a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas y ácidos fenólicos. Las variedades de cálices rojos son valoradas por su efecto en la disminución de lipoproteínas de baja densidad debido a su alto contenido de antocianinas (delfinidina 3-sambubiósido y cianidina 3-sambubiósido) (Ojeda *et al.*, 2010); por su parte, las variedades de cálices color verde-amarillos sobresalen por su alto contenido de ácido clorogénico, así como algunos de sus isómeros (Reyes-Luengas *et al.*, 2015).

La mayoría de los genotipos que utilizan los agricultores para la producción de jamaica carecen de mejoramiento genético, así como la nula aplicación de paquetes tecnológicos durante

su producción, lo que provoca que el rendimiento y la calidad de la jamaica (física, química y fitoquímica) sean bajos. Por tales motivos, varios centros de investigación y universidades han creado en los últimos años programas de mejoramiento genético para esta especie, con lo cual han colectado y mejorado genotipos de *H. sabdariffa* que sobresalen en sus características de color, composición química y fitoquímica, algunos con mayor resistencia a plagas y enfermedades, y con altos rendimientos de cálices.

Los estados de Nayarit y Puebla, aunque con una menor extensión del cultivo de jamaica en comparación con Guerrero y Oaxaca, han mejorado su sistema de producción al utilizar variedades mejoradas y aplicar paquetes tecnológicos, lo que provocado incrementos en los rendimiento y calidad de cálices, que son la estructura con mayor valor económico de la planta.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar genotipos de *H. sabdariffa* derivados de tales programas de mejoramiento genético, obtenidos mediante el Fondo Sectorial de investigación en materia agrícola, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos, a través del proyecto titulado “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”, con clave 163972.

La presente investigación se desglosó en tres fases de investigación, que se describen a continuación:

En la primera fase fueron evaluados 53 genotipos de *H. sabdariffa* de cálices color rojo (oscuros y claros), crecidos cada uno de ellos una localidad con tradición productora en los estados de Colima (Comala), Guerrero (Ayutla de Libres), Nayarit (Xalisco), Oaxaca (Los

Limones) y Puebla (Chautla de Puebla), con el objetivo de evaluar y cuantificar los efectos del genotipo (G), del ambiente de producción (A) y de su interacción G x A, en la variación del color en cálices y extractos acuosos, así como en los cambios de los contenidos de fenoles solubles totales (FST), contenido total de antocianinas (CTA), pH y acidez titulable (AT).

La segunda fase consistió en el análisis de dos variedades de cálices rojos, Negra Quiviquinta (NQ, cálices rojo oscuro) y UAN-8 (cálices rojo claro), cada una crecida en tres localidades en tres estados: Colima (Comala, Puerta de Anzar y Trapichillos), Nayarit (Jala, Quiviquinta y Xalisco) y Oaxaca (Los Limones, Río Grande y Santa María Tonameca). El objetivo de esta fase fue validar los resultados de los efectos del genotipo y del ambiente de producción obtenidos en la primera fase de investigación, y determinar los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos de cadena corta.

En la tercera y última fase se evaluó el efecto de tratamientos de deshidratado (exposición directa al sol, y secado en estufa a 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C), en la degradación de fenoles solubles totales y antocianinas, y en la modificación de la acidez y del color de los extractos acuosos, de tres variedades de *H. sabdariffa*: Negra Quiviquinta y UAN-9 (de cálices rojos oscuros y claros, respectivamente) y UAN 16-1 (de cálices color verde-amarillos).

Los resultados obtenidos en cada una de las tres fases se describen en los siguientes tres capítulos de la presente tesis.

2. EFECTO DE GENOTIPO Y AMBIENTE EN LA CALIDAD FISICOQUÍMICA DE VARIEDADES MEXICANAS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

César Sánchez-Feria¹, Víctor A. González-Hernández¹, Yolanda Salinas-Moreno² y Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Estado de México. ²Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP. km 8 Carretera Tepatitlán – Lagos de Moreno. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

Autor de correspondencia: vagh@colpos.mx (artículo enviado a Agrociencia)

2.1. RESUMEN

En este estudio se evaluaron 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa* L., con coloración roja contrastante en sus cálices deshidratados, cada uno de ellos crecidos en cinco regiones productoras de Colima, Guerrero, Nayarit, Oaxaca y Puebla, estados con tradición en el cultivo de jamaica en México, con el objetivo de cuantificar los efectos de los factores genotipo, ambiente y su interacción G x A, en las variables de color (luminosidad, tonalidad y saturación de color), contenido total de antocianinas (CTA), fenoles solubles totales (FST), pH y acidez titulable (AT), en cálices deshidratados y extractos acuosos. Los tres factores tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la calidad de los cálices y extractos de jamaica, pero el efecto del genotipo fue el más determinante en las variables de color (60-81 %), CTA (72 %) y FST (44 %), mientras que la tonalidad de los cálices fue explicada en 62 % por la interacción G x

A. El pH y la AT fueron afectados en mayor medida por el ambiente de producción (56 y 52 %) y por la interacción G x A (22 y 24 %). De los genotipos, 19 se clasificaron como cálices color rojo oscuro, los cuales destacaron por un contenido mayor de antocianinas y fenoles solubles totales, variables que tuvieron una mayor expresión en la localidad de Nayarit. Los 34 genotipos restantes de cálices color rojo claro, sobresalieron por su alta acidez que fue mayor cuando se crecieron en Nayarit. Aunque los efectos de los factores genotipo, ambiente así como su interacción G x A tuvieron efectos significativos en la variación de la calidad de los cálices de jamaica, entre ellos el genotipo fue el factor más importante en el color, CTA y FST, mientras que el efecto ambiental fue el principal responsable de la variación en el AT y pH de los extractos acuosos.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, color, contenido total de antocianinas, fenoles solubles totales, acidez titulable.

2.2. ABSTRACT

This study evaluated 53 genotypes of *Hibiscus sabdariffa* L., with contrasting red coloration in their dehydrated calyces, each grown in five producing regions of Colima, Guerrero, Nayarit, Oaxaca and Puebla, states with a tradition of roselle cultivation in Mexico, with the objective of quantify the effects of genotype, environment and their interaction G x A in color variables (luminosity, tonality and color saturation), total anthocyanin content (CTA), total soluble phenols (FST), pH and titratable acidity (AT), in dehydrated calyces and aqueous extracts. The three factors had significant effects ($p \leq 0.01$) on the quality of calyces and extracts of roselle, but the effect of genotype was the most determinant in color (60-81%), CTA (72%) and FST (44%), whereas the tonality of the calyces was explained in 62% by the interaction G x A. The pH and

AT were affected to a greater extent by the production environment (56 and 52%) and by the interaction G x A (22 and 24%). Of the genotypes, 19 were classified as dark red calyces, which stood out for a greater content of total soluble anthocyanins and soluble phenols, variables that had a greater expression in the locality of Nayarit. The remaining 34 genotypes of light red calyces were noted for their high acidity, which was higher when grown in Nayarit. Although the effects of genotype, environment factors as well as their interaction G x A had significant effects on the quality variation of roselle calyces, among them genotype was the most important factor in color, CTA and FST, while the environment effect was responsible for the variation in AT and pH of the aqueous extracts.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, color, total anthocyanin content, total soluble phenols, titratable acidity.

2.3. INTRODUCCIÓN

Hibiscus sabdariffa L. es una malvácea originaria de África, que durante la época colonial se dispersó en las regiones tropicales y subtropicales aptas para su cultivo en América (Morton, 1987). La amplia extensión territorial con las condiciones ambientales y edáficas ideales permitió que este cultivo tuviera una apropiada adaptación en México, donde la producción nacional anual de cálices deshidratados equivale a 6950 toneladas, cosechadas principalmente en los estados de Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Nayarit (SIAP, 2014).

Los cálices, denominados como flor de jamaica o simplemente jamaica, son las estructuras más valoradas de la planta de *Hibiscus sabdariffa* (*H. sabdariffa*), porque en ellos se acumulan antioxidantes, pigmentos y ácidos orgánicos, compuestos que en gran medida determinan su valor comercial. En México el principal uso de los cálices es la elaboración de extractos (fríos,

infusiones y decocciones) para la elaboración de bebidas, debido a sus atractivas características de color y palatabilidad (Fasoyiro *et al.*, 2005) y a sus efectos antioxidantes (Tsai *et al.*, 2002) a los cuales además se les han atribuido propiedades medicinales (Ojeda *et al.*, 2010; Herrera-Arellano *et al.*, 2007). En los cálices de *H. sabdariffa* se han identificado numerosos fitoquímicos, entre los que sobresalen las antocianinas, los ácidos orgánicos y otros flavonoides (Patel, 2014; Sindi *et al.*, 2014; Fernández-Arrollo *et al.*, 2011).

Por ser una especie introducida, en México la mayor parte de los genotipos cultivados de jamaica son considerados como criollos, porque no han sido sometidos a mejoramiento genético y cuya variación genética se ha limitado a describir la expresión de genes ante los diversos factores ambientales que se presentan en las regiones donde son cultivados. No obstante, en años recientes se han creado programas de mejoramiento genético para esta especie con el objetivo de generar variedades más rendidoras y con características sobresalientes en color, acidez y contenido de fitoquímicos en sus cálices deshidratados y extractos acuosos (Borrás-Linares *et al.*, 2015; Salinas-Moreno *et al.*, 2012).

Por lo anterior, es necesario conocer la calidad de los genotipos de *H. sabdariffa* cultivados en el país, así como evaluar la magnitud de alteración en la calidad de los cálices provocada por las características ambientales de los sitios de producción. Al respecto, Borrás-Linares *et al.* 2015 y Christian y Jackson (2009) reportaron que el factor genotipo influye en las características de color, contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante que poseen los cálices. Por su parte, Juliani *et al.* (2009) encontraron que el contenido de fitoquímicos de *H. sabdariffa* también se ve afectado por la localidad geográfica del sitio de producción.

En dichos estudios hechos en México, sin embargo, no se elucidó la interacción genotipo x ambiente, como lo hicieron Ottai *et al.* (2004) al evaluar variedades y sitios de África, en variables como antocianinas, acidez total, pH, sólidos solubles totales, aminoácidos y azúcares; con sus resultados mostraron que el ambiente de producción afecta la calidad de los cálices en una magnitud que difiere entre genotipos; es decir, demostraron que hay interacción genotipo x ambiente de producción.

Esta interacción es de gran importancia para programas de mejoramiento genético de esta especie, porque conocerla permite seleccionar los genotipos más estables y las localidades más sobresalientes para la producción de cálices con alta calidad. Por tales razones, el objetivo de esta investigación fue caracterizar el comportamiento de 53 genotipos de *H. sabdariffa*, que se producen en México, crecidos en cinco localidades, en cuanto a sus características de color (luminosidad, tonalidad y saturación de color), contenidos de fenoles solubles totales, antocianinas, pH y acidez titulable, tanto de sus cálices deshidratados como de sus extractos acuosos, y de esa forma conocer la magnitud de los efectos debidos a los factores genotipo y ambiente de producción, así como la variación debida a la interacción genotipo x ambiente.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal

Se cosecharon cálices deshidratados de 53 genotipos de jamaica disponibles en México, ya sea como variedades comerciales o experimentales, que son contrastantes en color, y todos ellos fueron crecidos, manejados y cosechados en cinco localidades representativas de los estados de mayor producción en el país que se describen en el Cuadro 2.1. La identidad de los 53 genotipos se dará a conocer más adelante.

Cuadro 2.1. Características de las localidades probadas en el cultivo de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa*.

Estado	Localidad	TMA °C	LN	LO	Altura m	Precipitación mm	Clima
Guerrero	Ayutla de Libres	28.0	16°57'12.55"	99°04'49.03"	400	1400	Aw
Oaxaca	Los Limones	26.8	16°02'59.95"	97°29'26.14"	280	1300	Aw
Puebla	Chiautla de Tapia	24.8	18°07'48"	98°48'06"	900	900	Cwa
Colima	Comala	26.4	19°18'19.36"	103°45'12.03"	610	1000	Cwa
Nayarit	Xalisco	23.0	21°25'41.38"	104°53'28.81"	960	1232	Cwa

TMA: temperatura media anual; LN: latitud Norte; LO: longitud Oeste; AW: tropical; Cwa: subtropical húmedo.

2.4.2. Preparación de los extractos acuosos

En cada muestra la extracción se hizo conforme al método descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Se colocaron 2.5 g de cálices en base seca en un vaso de precipitados de 600 mL, al que se le adicionaron 100 mL de agua destilada; la mezcla se llevó a ebullición durante 15 min, para enseguida separar el extracto de los cálices por decantación. El procedimiento de extracción se repitió por segunda vez bajo las mismas condiciones, y al final se mezclaron los dos extractos; el volumen acumulado se aforó a 200 mL con agua destilada y se filtró con papel Whatman No. 4. Con los extractos acuosos así preparados se hicieron todas las determinaciones de color, fitoquímicas y químicas.

2.4.3. Color

Se midió directamente en la superficie de los cálices deshidratados, con un colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus (modelo 45/0-L) en la escala CIE L*a*b*, con iluminante D65 y un ángulo 10°, en cinco repeticiones. Previo a la medición, los cálices fueron introducidos a una bolsa plástica negra para evitar la interferencia de luz. Con los valores de a* y b* se calcularon los valores de tonalidad y de saturación de color (SDC), de acuerdo con lo descrito por McGuire (1992).

En los extractos acuosos el color se midió en cuatro repeticiones, cada una en 50 mL depositados en una copa de cristal (accesorio No. 04-7209-00), a la que se introdujo un aro negro que en su parte superior sostenía un disco blanco con 90 % de reflectancia (accesorio No. 02-4579-00). Luego la copa de cristal fue cubierta con una trampa de luz (accesorio No. 04-7209-00), y se tomó la lectura con el colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus con una calibración de iluminante D65 y un ángulo 10°. Los cálculos de la tonalidad y de saturación de color se realizaron de la misma forma que para los cálices deshidratados.

2.4.4. Contenido de fenoles solubles totales (FST)

Se cuantificaron en cuatro repeticiones con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), con modificaciones para realizar el desarrollo de color en microplacas como se describe a continuación: a 240 µL de agua destilada se le adicionaron 15 µL del extracto a analizar y 15 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich®) 0.25 N; la mezcla se dejó reaccionar por 3 min en oscuridad; posteriormente se neutralizó con 30 µL de carbonato de sodio 1 N (J. T. Baker®). La muestra se dejó en reposo a temperatura de cuarto por 2 h en oscuridad, para finalmente medir la absorbancia en el espectrofotómetro de placas a 765 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar, a

partir del cual se elaboró una curva patrón para la cuantificación del contenido de FST expresado en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca (mg EAG 100 g⁻¹ MS).

2.4.5. Contenido total de antocianinas (CTA)

Se midió en cuatro repeticiones de los extractos acuosos mediante la absorbancia registrada en un espectrofotómetro de placas modelo Epoch (BioTek Instrument®) provisto con microplacas (Costar®) de 96 pozos. El método empleado fue el propuesto por Galicia-Flores *et al.* (2008), modificado para usar 300 µL del extracto diluido y leer su absorbancia a 510 nm. El CTA se calculó mediante una ecuación de regresión lineal obtenida de la curva patrón de cianidina 3-glucósido (Polyphenols®, Nw), estándar empleado para su cuantificación. El CTA fue expresado en mg equivalentes de cianidina 3-glucósido por 100 g de muestra seca (mg EC3G 100 g⁻¹ MS).

2.4.6. Acidez titulable (AT)

Se determinó, por duplicado, con el método de la AOAC (1984), en una alícuota de 10 mL depositada en un vaso de precipitados de 600 mL al que se adicionaron 200 mL de agua destilada para diluir la coloración de la muestra y permitir observar el vire de la fenolftaleína. La titulación se hizo con NaOH 0.1 N (JT. Baker®). La AT se calculó en miliequivalentes del ácido cítrico (0.06404 g ácido cítrico anhidro por mL de NaOH 0.1 N).

2.4.7. pH

Se determinó por duplicado, con un potenciómetro Denver Instrument UB10, calibrado con amortiguadores (J. T. Baker®) de pH 4 y 7, para hacer mediciones en medios ácidos.

2.4.8. Análisis estadístico

En cada variable se realizó un análisis combinado a través de ambientes (localidades, que incluye las diferencias en clima y suelo, así como de cosecha y de manejo postcosecha), lo que permitió cuantificar los efectos de varianza del genotipo (G), del ambiente (A) y de su interacción G x A. Adicionalmente se hizo un análisis de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) entre genotipos y localidades, para identificar a las más sobresalientes. Los análisis estadísticos univariados se hicieron con SAS System Versión 9.0. Con los promedios de las variables se aplicaron las técnicas de análisis de componentes principales (ACP) y de análisis de conglomerados (AC) por el método de enlace completo empleando distancias euclidianas, para agrupar a los 53 genotipos primeramente en función de sus características de color; luego se hizo la agrupación de los genotipos en función de su contenido de CTA, FST, AT y pH, para la identificación de los sobresalientes. Para los análisis multivariados se utilizó Minitab® 17.1.0.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Análisis de varianza

Los contenidos de fitoquímicos antioxidantes, CTA y FST, variaron significativamente ($p \leq 0.01$) por efecto del genotipo (G), del ambiente de producción (A) y por la interacción G x A, como se muestra en el Cuadro 2.2. Destaca que estos dos compuestos fitoquímicos fueron principalmente influenciados por el genotipo, ya que este factor explicó 72 y 44 % de la variación debida a tratamientos, respectivamente. Por su parte, los efectos de la interacción G x A ocasionaron 19 y 29 % de la variación total en las mismas variables, que ubica a la interacción como el segundo factor de importancia en la acumulación de estos fitoquímicos en los cálices

deshidratados de jamaica. El efecto del ambiente de producción representó 9 y 27 % de la variación, respectivamente.

Por su parte, Ottai *et al.* (2004) reportaron una dependencia del genotipo estimada en 94 %, y el 6 % restante dependió del ambiente y de la interacción G x A. Esta dependencia tan elevada del genotipo pudiera deberse a que la comparación que hicieron estos autores fue entre apenas tres genotipos, dos de cálices de color rojo (uno claro y uno oscuro) y uno de cálices blancos (carente de antocianinas), y posiblemente evaluados en ambientes poco contrastantes, lo que sin duda produjo tan alto contraste en su CTA. Para FST no se encontró información publicada que relacione su concentración con los factores genotipo, ambiente y su interacción G x A.

En cambio, el pH y la AT fueron afectados primordialmente por el ambiente de producción, en magnitudes de 56 y 52 %, respectivamente (Cuadro 2.2). El segundo lugar en magnitud de afectación correspondió a la interacción G x A con 19 y 29 % de la variación total debida a tratamientos. Es decir, las dos variables referentes a la acidez y al sabor son características más dependientes del ambiente de producción y de la interacción, que del genotipo.

Los resultados obtenidos por Ottai *et al.* (2004) difieren en la variable de pH, ya que ellos reportaron una mayor dependencia del genotipo (53 %) en comparación con el ambiente de producción (40 %). Tal diferencia entre resultados podría radicar en el número de genotipos y localidades evaluadas, que fue inferior en África que los estudiados en México para esta investigación. Los resultados obtenidos para la AT concuerdan con los reportados por Ottai *et al.* (2004), en que el efecto del ambiente es el más importante en la variación de acidez en genotipos de *H. sabdariffa*.

Cuadro 2.2. Sumas de cuadrados estimadas mediante análisis estadísticos combinados de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa*, cada uno cultivado en cinco ambientes de producción.

Variable	Genotipo (G)		Ambiente (A)		Interacción G x A	
		%		%		%
	<i>gl</i> = 52		<i>gl</i> = 4		<i>gl</i> = 208	
CTA	33417920**	72	4086368**	9	9000434**	19
FST	175107729**	44	106542954**	27	117319721**	29
pH	6**	22	15**	56	6**	22
AT	2114**	24	4592**	52	2141**	24
Luminosidad cálices	8724**	60	1052**	7	4694**	32
Tonalidad cálices	3353**	21	2593**	16	9895**	62
SDC cálices	24749**	73	2274**	7	6790**	20
Luminosidad extractos	34291**	81	1104**	3	7061**	17
Tonalidad extractos	32219**	80	1610**	4	6563**	16
SDC extractos	56089**	74	7143**	9	12657**	17

** $p \leq 0.01$. CTA: contenido total de antocianinas; FST: fenoles solubles totales; AT: acidez titulable; SDC: saturación de color.

El color de los cálices deshidratados y de los extractos acuosos fue dependiente en mayor proporción del efecto del genotipo (Cuadro 2.2), sobre todo en los extractos acuosos en donde representó un efecto de 74 a 81 % en luminosidad, tonalidad y saturación del color, mientras que en los cálices deshidratados los porcentajes de luminosidad y saturación de color oscilaron entre 72 y 76 %, y en este caso los valores de tonalidad fueron más dependientes de la interacción G x A (62 %). Es decir, en las variables de color predomina considerablemente el efecto del

genotipo, de modo que las características de color son altamente heredables y estables a través de ambientes.

Esta información sugiere que cuando la finalidad de los cálices de jamaica sea para la obtención de fitoquímicos la mayor ganancia se logra mediante la selección de los genotipos de color rojo oscuro y que sean sobresalientes en la síntesis y acumulación de CTA y FST. En cambio, para obtener los cálices con mayor acidez titulable es más conveniente producirlos en localidades donde los genotipos expresen una mayor síntesis de ácidos orgánicos por efecto ambiental.

2.5.2. Variación genética en color de cálices deshidratados y de extractos acuosos

Los análisis de componentes principales (ACP) y de conglomerados (AC) permitieron clasificar a los 53 genotipos de jamaica en dos grupos contrastantes por su color de cálices y extractos acuosos (EA), en rojo oscuro y rojo claro. Los primeros dos componentes del ACP explicaron 94.9 % de la variación de los genotipos con respecto a las variables descriptoras del color (Figura 2.1). El CP1, que representó 78.7 % de la varianza total del color de los cálices y los EA, fue descrito por las variables saturación de color (SDC) en cálices deshidratados y luminosidad y tonalidad en extractos acuosos; mientras que el CP2, responsable de 16.2 % de la variación restante, fue explicado por la tonalidad de los cálices y la saturación de color (SDC) de los extractos acuosos.

Borrás-Linares *et al.* (2015) clasificaron en cinco grupos a los cálices de *H. sabdariffa* en función de su contenido de antocianinas. Sin embargo, es más común la clasificación de los genotipos en función de la coloración de sus cálices, aunque la mayoría de las veces esta clasificación se realiza de manera visual en tres categorías de color, rojo oscuro y rojo claro; y en

menor proporción los genotipos con cálices de color verde-amarillo (Salinas-Moreno *et al.*, 2012; Juliani *et al.*, 2009, Christian and Jackson, 2009; Babalola *et al.*, 2001), aunque estos últimos no fueron estudiados en nuestra investigación.

El grupo de color rojo oscuro (GCRO) estuvo integrado por 19 genotipos (Figura 2.1): Tempranilla Negra, Jersey Acriollada, Negra UAN, Criolla Morada, Negra Quiviquinta, China, Morada x Roja, UAN 5, UAN 12-1, UAN 16-2, UAN 17, UAN 18, UAN 21, UAN 23, UAN 29, UAN 31, 6Q6, 7Q7 y 10. Este grupo se caracterizó por tener un intervalo de luminosidad en sus cálices deshidratados de 12.5 a 14.8 %. Los valores de la tonalidad oscilaron entre 17.6 a 26.2°, con una saturación de color que varió de 6.3 a 10.4 unidades.

Los 34 genotipos restantes integraron el grupo de color rojo claro (GCRC): 2MQ2, 3Q3, Colima, Coneja, Criolla Huajicori, Criolla Precoz, Criolla Puebla Precoz, Criolla Roja Violeta, Criolla Súper Precoz, Q12, Tempranilla Flor, Tempranilla Roja, UAN 10-1, UAN 10-2, UAN 11, UAN 12, UAN 13, UAN 15, UAN 16, UAN 19, UAN 20, UAN 21-1, UAN 22, UAN 24, UAN 24-1, UAN 25, UAN 26, UAN 27, UAN 30, UAN 6 Novillero, UAN 6 Puga, UAN 6-1, UAN 7 y UAN 8 (Figura 2.1). En este grupo la variación de luminosidad en cálices deshidratados fue de 15.7 a 22.2 %; los valores de tonalidad fueron de 19.9 a 24.9° con saturaciones de color que oscilaron de 11.5 a 23.2 unidades. Los extractos acuosos mostraron rangos similares de valores en luminosidad, tonalidad y saturación en ambos grupos de genotipos.

A pesar de que el número de genotipos fue inferior en el GCRO, su dispersión muestra que su variación genética entre genotipos fue mayor a la observada en los genotipos de color rojo claro (Figura 2.1), en relación a la tonalidad de sus cálices deshidratados y la saturación de color en

extractos acuosos. Esto es de interés en los programas de mejoramiento genético, ya que son los genotipos rojo oscuro los que pueden expresar mayor variabilidad genética, lo que resultaría en una mayor variedad de tonalidades en los cálices y extractos.

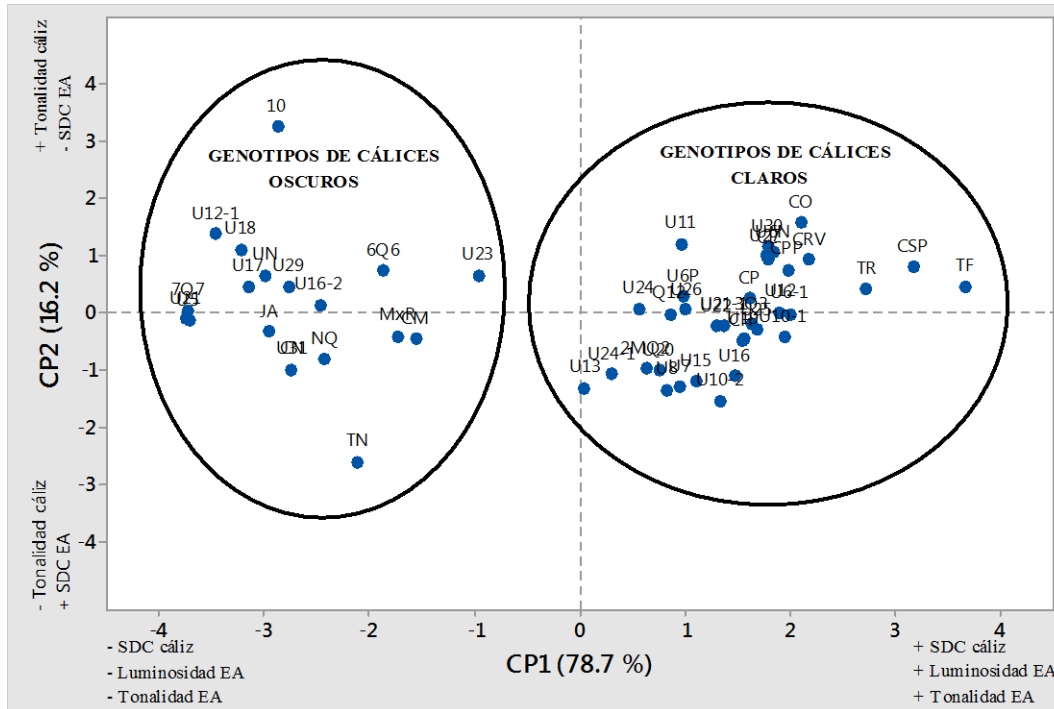


Figura 2.1. Agrupamiento de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa* de acuerdo con sus valores de luminosidad, tonalidad y saturación de color (SDC) en cálices deshidratados y extractos acuosos.

El efecto significativo ($p \leq 0.01$) del ambiente de producción en los descriptores de color de cálices deshidratados y extractos acuosos de *H. sabdariffa*, se presenta en el Cuadro 2.3. La luminosidad de cálices deshidratados mostró los valores más bajos cuando los genotipos crecieron en Nayarit (15.0 ± 3.0 %), comparado con las otras cuatro localidades; en los extractos acuosos las diferencias en luminosidad ocurrieron entre las cinco localidades evaluadas, los

extractos de Colima (21.9 ± 7.0 %) fueron los más luminosos, mientras que los de Guerrero fueron los más oscuros (19.1 ± 7.0 %).

Los cálices producidos en Nayarit, Oaxaca y Puebla (20.4 ± 4.0 a $21.1 \pm 4.6^\circ$) tuvieron una tonalidad roja más definida en comparación con los cálices cosechados en Colima y Guerrero (23.6 ± 4.6 y 23.6 ± 4.0 , respectivamente) (Cuadro 2.3). La saturación de color de cálices y extractos fue mayor en Oaxaca (15.0 ± 5.1), seguida de Colima (14.3 ± 5.8) y Puebla (13.9 ± 5.4), y en Nayarit se registraron los valores más bajos de saturación de color (11.3 ± 4.6). En los extractos acuosos la tonalidad fue más definida en los genotipos que fueron crecidos en Oaxaca (34.4 ± 6.2) y Guerrero (32.4 ± 7.6).

Cuadro 2.3. Efecto del ambiente de producción en los valores de luminosidad (L), tonalidad (T) y saturación de color (SDC) en cálices deshidratados y extractos acuosos de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa*, cada uno crecido en cinco localidades.

Localidad	Cálices deshidratados			Extractos acuosos		
	L (%)	T (°)	SDC	L (%)	T (°)	SDC
Colima	$17.0 \pm 3.9b^z$	$23.6 \pm 4.6a$	$14.3 \pm 5.8b$	$21.9 \pm 7.0a$	$35.8 \pm 6.3a$	$54.2 \pm 7.8c$
Guerrero	$17.4 \pm 3.9a$	$23.6 \pm 4.0a$	$12.6 \pm 4.4d$	$19.1 \pm 7.0e$	$32.4 \pm 7.6c$	$49.4 \pm 9.5e$
Nayarit	$15.0 \pm 3.0c$	$21.1 \pm 4.6b$	$11.3 \pm 4.6e$	$21.0 \pm 4.8b$	$35.3 \pm 4.8a$	$57.1 \pm 6.9a$
Oaxaca	$17.3 \pm 3.7ab$	$20.4 \pm 4.0c$	$15.0 \pm 5.1a$	$19.4 \pm 6.2d$	$34.4 \pm 6.2b$	$53.1 \pm 7.9d$
Puebla	$17.2 \pm 2.8ab$	$21.0 \pm 3.6bc$	$13.9 \pm 5.4c$	$20.5 \pm 6.2c$	$35.5 \pm 6.8a$	$55.4 \pm 8.5b$
DMS	0.4	0.7	0.4	0.2	0.6	0.4

^z: Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa.

2.5.3. Características fitoquímicas

El contenido de antioxidantes en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* representado por los contenidos de CTA y FST, presentó una amplia diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre genotipos (Cuadro 2.4). Los genotipos con mayor CTA fueron los de cálices color rojo oscuro: UAN 18, Negra UAN, UAN 17, UAN 21, UAN 12-1, UAN 29, UAN 5 y 10, con una variación de 608 ± 206 a 757 ± 178 mg EC3G 100 g^{-1} MS; mientras que UAN 30, UAN 25, UAN 15, UAN 19, UAN 27, Tempranilla Roja, UAN 6-1, UAN 6 Novillero, Tempranilla Flor y Criolla Súper Precoz, de cálices color rojo claro, fueron los que registraron el contenido más bajo en esta fracción fenólica (163 ± 51 a 228 ± 74 mg EC3G 100 g^{-1} MS).

Cuadro 2.4. Contenido promedio de antocianinas, fenoles solubles totales, pH y acidez titulable en extractos acuosos de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa* de cálices color rojo crecidas en cinco localidades.

Genotipo	ID	CTA	FST	pH	AT
		mg EC3G 100 g^{-1} MS	mg EAG 100 g^{-1} MS		% AC
TN ¹	TN	$456 \pm 48 \text{gk}^z$	$2352 \pm 210 \text{gm}$	$2.70 \pm 0.12 \text{ad}$	$16.7 \pm 3.2 \text{ad}$
TF ²	TF	$176 \pm 54 \text{op}$	$2022 \pm 811 \text{ln}$	$2.49 \pm 0.12 \text{ad}$	$20.4 \pm 4.0 \text{ad}$
Colima	CL	$302 \pm 92 \text{lp}$	$2130 \pm 318 \text{kn}$	$2.42 \pm 0.14 \text{cd}$	$23.2 \pm 3.3 \text{a}$
JA ³	JA	$578 \pm 140 \text{dg}$	$3639 \pm 1408 \text{a}$	$2.72 \pm 0.24 \text{ad}$	$16.2 \pm 4.2 \text{bd}$
CRV ⁴	CRV	$266 \pm 81 \text{lp}$	$2216 \pm 437 \text{kn}$	$2.50 \pm 0.19 \text{ad}$	$21.5 \pm 4.5 \text{ac}$
CH ⁵	CH	$314 \pm 66 \text{ko}$	$2220 \pm 321 \text{kn}$	$2.40 \pm 0.18 \text{d}$	$22.3 \pm 2.9 \text{ab}$
UN ⁶	UN	$746 \pm 180 \text{ab}$	$2651 \pm 427 \text{ck}$	$2.57 \pm 0.21 \text{ad}$	$19.1 \pm 3.5 \text{ad}$
CM ⁷	CM	$396 \pm 132 \text{hl}$	$2924 \pm 965 \text{bh}$	$2.77 \pm 0.28 \text{ad}$	$14.2 \pm 4.3 \text{d}$
UAN 5	U5	$641 \pm 120 \text{ae}$	$3152 \pm 794 \text{ad}$	$2.73 \pm 0.18 \text{ad}$	$15.7 \pm 2.3 \text{bd}$

CSP ⁸	CSP	163±51p	1647±259n	2.53±0.22ad	20.6±3.7ad
CPP ⁹	CPP	340±169jn	2320±258hm	2.54±0.11ad	19.5±2.5ad
CP ¹⁰	CP	264±81lp	2328±323gm	2.53±0.20ad	19.8±4.4ad
NQ ¹¹	NQ	573±81dg	2948±397bg	2.67±0.23ad	16.8±4.4ad
China	CN	548±179eg	2917±300bi	2.58±0.18ad	17.3±3.4ad
U6P ¹²	U6P	296±87lp	2502±222em	2.54±0.22ad	18.7±3.8ad
UAN 31	U31	511±273ei	2922±376bi	2.67±0.23ad	16.5±3.7ad
UAN 6-1	U6-1	194±84np	2161±232kn	2.55±0.21ad	19.1±5.0ad
UAN 16-2	U16-2	586±178cg	2946±522bg	2.75±0.19ad	17.2±2.9ad
U6N ¹³	U6N	183±101op	2159±383kn	2.71±0.27ad	17.5±4.9ad
MxR ¹⁴	MxR	531±132eh	2587±258dl	2.70±0.23ad	16.8±3.9ad
UAN 25	U25	226±67np	2302±321im	2.68±0.24ad	19.1±4.5ad
UAN 7	U7	283±110lp	2541±455dm	2.70±0.25ad	18.1±3.4ad
TR ¹⁵	TR	198±54np	1962±277nm	2.55±0.22ad	19.8±4.1ad
UAN 23	U23	379±96im	2716±199bk	2.54±0.21ad	19.4±4.2ad
UAN 11	U11	273±73lp	2728±291bk	2.74±0.30ad	16.9±4.3ad
UAN 24	U24	280±96lp	2411±371fm	2.76±0.25ad	15.7±4.2bd
UAN 21	U21	731±146ac	3640±828a	2.77±0.21ad	15.8±3.3bd
UAN 8	U8	277±53lp	2576±179dm	2.62±0.21ad	18.2±4.1ad
UAN 13	U13	257±102lp	2433±437fm	2.68±0.21ad	16.2±3.3bd
UAN 17	U17	734±99ac	3245±369ac	2.65±0.19ad	18.7±2.3ad
UAN 26	U26	271±88lp	2627±659cl	2.75±0.26ad	16.9±3.8ad
UAN 27	U27	205±47np	2409±327fm	2.75±0.19ad	18.3±3.1ad
UAN 12-1	U12-1	710±238ad	3278±739ab	2.81±0.22ab	16.2±4.4bd
UAN 15	U15	220±54np	2311±216hm	2.79±0.34ac	15.6±5.7bd
UAN 24-1	U24-1	305±144lp	2610±560dl	2.76±0.26ad	15.3±4.5cd
UAN 12	U12	241±83mp	2244±566kn	2.58±0.18ad	18.3±4.2ad
UAN 20	U20	307±91lp	2594±519dl	2.61±0.17ad	17.4±2.4ad
UAN 22	U22	267±63lp	2354±291gm	2.63±0.22ad	18.4±4.7ad
UAN 10-1	U10-1	240±37mp	2430±297fm	2.56±0.15ad	19.1±3.0ad
UAN 29	U29	698±88ad	2871±362bj	2.59±0.21ad	18.6±2.8ad

UAN 19	U19	207±46np	2348±249gm	2.72±0.17ad	16.8±3.1ad
UAN 30	U30	228±74np	2311±312hm	2.54±0.23ad	18.3±4.9ad
UAN 16	U16	246±73mp	2272±423jm	2.61±0.20ad	18.3±4.0ad
UAN 18	U18	757±178a	3156±354ad	2.63±0.24ad	20.0±4.3ad
UAN 21-1	U21-1	333±181jn	2194±371kn	2.60±0.25ad	18.9±4.0ad
UAN 10-2	U10-2	257±35lp	2386±355fm	2.55±0.18ad	21.5±5.0ac
2MQ2	2MQ2	318±73ko	2623±763dl	2.48±0.11ad	21.3±2.7ac
3Q3	3Q3	275±44lp	2152±380kn	2.47±0.20bd	20.3±3.1ad
6Q6	6Q6	470±155fj	2691±564bk	2.71±0.21ad	17.0±2.1ad
7Q7	7Q7	575±118dg	2981±396bf	2.80±0.26ac	15.4±3.4bd
10	10	608±206bf	3085±482ae	2.86±0.26a	16.0±3.4bd
CONEJA	CO	236±50mp	2294±357jm	2.61±0.13ad	18.8±0.7ad
Q12	Q12	333±48jn	2264±415jn	2.51±0.16ad	22.0±4.2ac
DMS ^y		148	620	0.39	6.9

^z: Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ^yDMS: Diferencia mínima significativa. CTA: contenido total de antocianinas; FST: fenoles solubles totales; AT: acidez titulable; AC: ácido cítrico. ¹Tempranilla Negra; ²Tempranilla Flor; ³Jersey Acriollada; ⁴Criolla Roja Violeta; ⁵Criolla Huajicori; ⁶Negra UAN; ⁷Criolla Morada; ⁸Criolla Súper Precoz; ⁹Criolla Puebla Precoz; ¹⁰Criolla Precoz; ¹¹Negra Quiviquinta; ¹²UAN 6 Puga; ¹³UAN 6 Novillero; ¹⁴Morada x Roja; ¹⁵Tempranilla Roja.

En contenido de FST los genotipos de cálices color rojo oscuro UAN 21, Jersey Acriollada, UAN 12-1, UAN 17, UAN 18, UAN 5, 10, 7Q7, Negra Quiviquinta, UAN 16-2, Criolla Morada, UAN 31, China y UAN 29 destacaron por su alto contenido en este antioxidante (3640 ± 828 a 2871 ± 362 mg EAG 100 g⁻¹ MS) (Cuadro 2.4), principalmente los genotipos Jersey Acriollada y UAN 21 que tuvieron un contenido semejante al del genotipo conocido como Sudán, el cual es valorado y reconocido a nivel nacional por su alto contenido de antioxidantes (Reyes-Luengas *et al.*, 2015). Los genotipos con menor contenido de FST fueron los de cálices color rojo claro, especialmente Criolla Huajicori, Criolla Roja Violeta, UAN 21-1, UAN 6-1, UAN 6 Novillero,

3Q3, Colima, Tempranilla Flor, Tempranilla Roja y Criolla Súper Precoz (2220 ± 321 - 1647 ± 259 mg EAG 100 g^{-1} MS).

Los genotipos superiores en CTA no necesariamente fueron los sobresalientes en FST, y viceversa; este comportamiento, que también fue reportado por Christian y Jackson (2009), muestra que genotipos que no destacan por su contenido en CTA lo pueden hacer en FST; pero también hay genotipos que destacaron por sus altos contenidos de ambos antioxidantes, como fueron UAN 21, Jersey Acriollada, UAN 12-1, UAN 17, UAN 18, UAN 5, 10, 7Q7 y Negra Quiviquinta. Los contenidos de FST y CTA registrados en los 53 genotipos mexicanos aquí evaluados se asemejan a los reportados para genotipos nacionales (Reyes-Luengas *et al.*, 2015; Salinas-Moreno *et al.*, 2012; Galicia-Flores *et al.*, 2008), y con genotipos crecidos en Jamaica (Christian y Jackson, 2009).

Entre los genotipos de color rojo oscuro (GCRO), el genotipo Jersey Acriollada fue el más inestable por el efecto ambiental, ya que su variación entre localidades fue de $1408 \text{ mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, en contraste con los genotipos China, Morada x Roja, Tempranilla Negra y UAN 23 que tuvieron una variación de entre 199 y $300 \text{ mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, y por ello resultaron más estables. La variación en los GCRC fue de 179 a $811 \text{ mg EAG } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ (Cuadro 2.4), donde Tempranilla Flor, 2MQ2 y UAN 26 fueron los genotipos más inestables a través de localidades. Estos resultados muestran que los GCRO contienen más fitoquímicos antioxidantes que los GCRC, que en el caso de CTA el contenido promedio de GCRO superó en 2.3 veces al registrado en GCRC, y en el contenido de FST la superioridad fue de 1.3 veces mayor en la misma dirección que CTA.

Las dos variables importantes en la palatabilidad de los extractos acuosos de cálices de jamaica (pH y la AT), fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre genotipos (Cuadro 2.4). Los valores promedio de pH fluctuaron de 2.40 ± 0.18 a 2.86 ± 0.26 entre los 53 genotipos evaluados, los cuales son convenientes para preservar la estabilidad estructural del catión flavilio de las antocianinas que confieren la tonalidad roja brillante (Prenesti *et al.*, 2007; Wrolstad, 2004), característica de los extractos acuosos de *H. sabdariffa*. Los extractos de los genotipos UAN 10, UAN 12-1, 7Q7, UAN 15, Criolla Morada, UAN 24-1, UAN 24, UAN 26 y UAN 11 fueron los más afectados por el efecto ambiental, con cambios en su pH del orden de 0.34 a 0.22 unidades que ocasionó que los valores de pH fueran de 3.0 o superiores, lo que puede afectar la estabilidad de la coloración roja brillante en los extractos acuosos de *H. sabdariffa*.

La AT tuvo una variación entre genotipos de 14.2 ± 4.3 a 23.2 ± 3.3 % de ácido cítrico (Cuadro 2.4). Los genotipos con los porcentajes de AT más elevados y por ende los más palatables, fueron Colima, Criolla Huajicori, Q12, Criolla Roja Violeta, UAN 10-2, 2MQ2, Criolla Súper Precoz, Tempranilla Flor y 3Q3, con valores que oscilaron entre 20.3 ± 3.13 y 23.2 ± 3.26 %; los genotipos con la acidez más baja fueron 10, UAN 21, UAN 5, UAN 24, UAN 15, 7Q7, UAN 24-1 y Criolla Morada (16.0 ± 3.4 - 14.2 ± 4.3 % de ácido cítrico). El valor promedio de acidez titulable entre los grupos GCRO (17.0 %) y GCRC (18.9 %) fue semejante.

Los valores más elevados de desviación estándar observados en AT (Cuadro 2.4) muestran que el efecto del ambiente de producción fue mayor en esta variable, donde los 53 genotipos presentaron una variación de AT a través de localidades que fue de 0.68 hasta 5.71 % de ácido cítrico. Los valores de AT de los genotipos UAN 15 y UAN 6-1 fueron los más inestables, su variación fue entre 5.0 y 5.71 % de ácido cítrico; en contraste, los extractos acuosos del genotipo

Coneja fueron los de acidez más estable, ya que su diferencia a través de las localidades probadas apenas fue de 0.7 % de ácido cítrico.

2.5.4. Clasificación integral de genotipos por calidad fisicoquímica

Al agrupar a los 53 genotipos en función de sus características antioxidantes y de acidez mediante la aplicación de un ACP para las variables CTA, FST, pH y AT, se encontró que los dos primeros componentes explicaron 94.0 % de la varianza detectada en los extractos acuosos. El CP1, constituido por FST y la AT, explicó 68.8 % de la varianza total; mientras el CP2 aportó el 25.2 % de la varianza restante, y fue debido al CTA y pH. Con el análisis de conglomerados los 53 genotipos de *H. sabdariffa* se clasificaron en seis categorías (Figura 2.2).

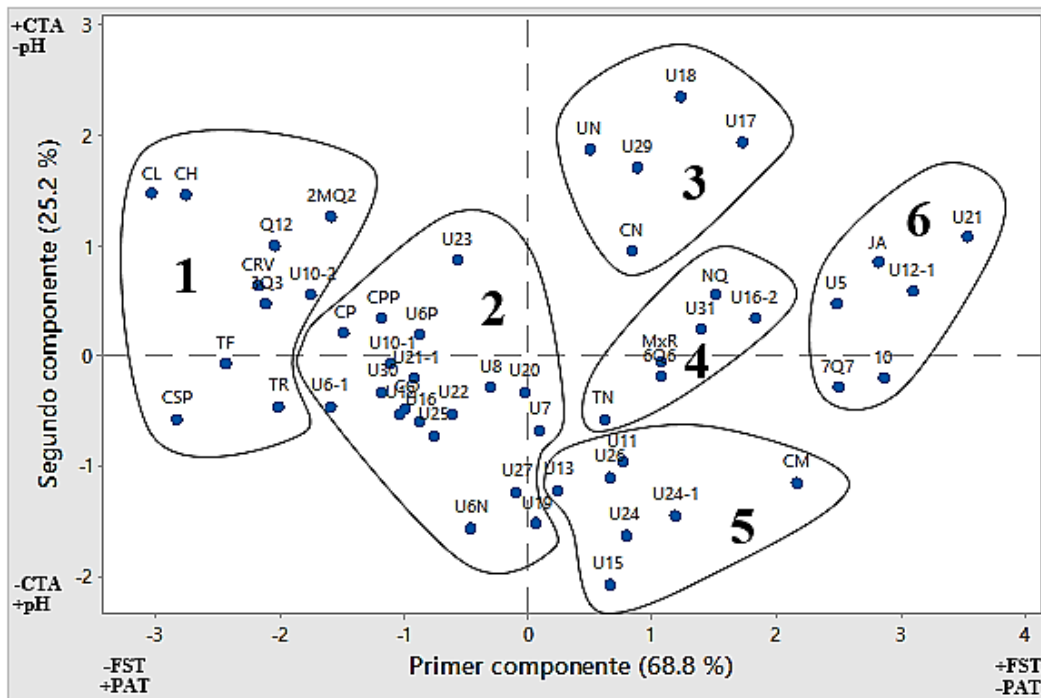


Figura 2.2. Agrupamiento de 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa* de acuerdo a su contenido total de antocianinas, fenoles solubles totales, pH y acidez titulable.

Los conglomerados 3 (Negra UAN, China, UAN 17, UAN 19 y UAN 18) y 6 (Jersey Acriollada, UAN 5, UAN 21, UAN 12-1, 7Q7 y 10) agruparon a los genotipos con mayor contenido de CTA y FST, pero los genotipos del conglomerado 3 tuvieron una AT mayor que los del conglomerado 6 (Cuadro 2.5). En cambio, los genotipos del conglomerado 1 (Tempranilla Flor, Colima, Criolla Roja Violeta, Criolla Huajicori, Criolla Súper Precoz, Tempranilla Roja, UAN 10-2, 2MQ2, 3Q3 y Q12) fueron los que registraron mayor AT, aunque sus contenidos de CTA y FST fueron los más bajos entre los 53 genotipos evaluados. La mayor cantidad de genotipos resultaron en el conglomerado 2 (Criolla Puebla Precoz, Criolla Precoz, UAN 6 Puga, UAN 6-1, UAN 6 Novillero, UAN 25, UAN 7, UAN 23, UAN 8, UAN 27, UAN 12, UAN 20, UAN 22, UAN 10-1, UAN 19, UAN 30, UAN 16, UAN 21-1 y Coneja), el cual se caracterizó por tener un bajo contenido de CTA y FST, con valores intermedios de AT.

Cuadro 2.5. Comparación del contenido total de antocianinas (CTA), fenoles solubles totales (FST), pH y acidez titulable (AT), en seis grupos de *Hibiscus sabdariffa*.

Grupo	No. de genotipos	CTA	FST	pH	AT
		mg EC3G 100 g ⁻¹ MS	mg EAG 100 g ⁻¹ MS		% A. cítrico
1	10	260±61c ^z	2162±259e	2.49±0.05c	21.3±1.0a
2	19	261±53c	2371±154de	2.61±0.07b	18.5±0.8b
3	5	697±86a	2968±237ab	2.60±0.03b	18.7±1.0b
4	6	521±53b	2741±243bc	2.70±0.03a	16.8±0.2c
5	7	286±55c	2578±210cd	2.75±0.03a	15.8±1.0c
6	6	641±67a	3296±283a	2.78±0.05a	15.9±0.3c
DMS ^y		93	339	0.09	1.3

^z: Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ^y:DMS: Diferencia mínima significativa.

El conglomerado 4 (Tempranilla Negra, Negra Quiviquinta, UAN 31, UAN 16-2, Morada x Roja y 6Q6) tuvo valores intermedios de CTA y FST, con porcentajes bajos de acidez (Cuadro 2.5); mientras que los genotipos incluidos en el conglomerado 5 (Criolla Morada, UAN 11, UAN 24, UAN 13, UAN 26, UAN 15 y UAN 24-1) tuvieron valores bajos en CTA y AT, pero intermedios en FST.

Entre localidades, Nayarit destacó por inducir la mayor acumulación de CTA (492 ± 224 mg EC3G 100 g^{-1} MS) y de FST (3114 ± 747 mg EAG 100^{-1} MS), que en las demás localidades (Cuadro 2.6). Los contenidos más bajos en CTA se dieron en Colima y Guerrero (327 ± 180 y 322 ± 172 mg EC3G 100 g^{-1} MS), y los más bajos en FST ocurrieron en Colima y Puebla (2296 ± 551 y 2281 ± 476 EAG 100 g^{-1} MS, respectivamente).

Cuadro 2.6. Efecto del ambiente de producción en el contenido total de antocianinas (CTA), fenoles solubles totales (FST), pH y acidez titulable (AT) en 53 genotipos de *Hibiscus sabdariffa*.

Localidad	CTA	FST	pH	AT
	mg EC3G 100 g^{-1} MS	mg EAG 100 g^{-1} MS		% ácido cítrico
Colima	327 ± 180 ^d	2296 ± 451 ^d	2.76 ± 0.19 ^a	16.8 ± 2.9 ^d
Guerrero	322 ± 172 ^d	2714 ± 560 ^b	2.73 ± 0.18 ^c	15.7 ± 3.2 ^e
Nayarit	492 ± 224 ^a	3114 ± 747 ^a	2.31 ± 0.11 ^e	24.0 ± 2.9 ^a
Oaxaca	357 ± 220 ^c	2404 ± 391 ^c	2.75 ± 0.10 ^b	17.1 ± 2.0 ^c
Puebla	389 ± 205 ^b	2282 ± 476 ^d	2.62 ± 0.17 ^d	17.5 ± 3.2 ^b
DMS	6	36	0.2	0.6

^z: Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ^yDMS: Diferencia mínima significativa.

El pH y el AT fueron las variables más fuertemente afectadas por el ambiente de producción ($p \leq 0.01$) (Cuadro 2.6). En el pH la variación a través de localidades fue de 2.31 ± 0.11 a 2.76 ± 0.19 , valores extremos registrados en las localidades de Nayarit y Colima, respectivamente. La AT mostró una varianza a través de localidades desde 15.7 ± 3.2 % en Guerrero hasta 24.0 ± 2.9 % en Nayarit. A diferencia de las variables fitoquímicas, la variación del pH fue mayor en Colima, seguido de Guerrero y Puebla; en AT la variación mayor fue en la localidad de Guerrero y la menor en Oaxaca.

2.6. CONCLUSIONES

Aunque los efectos de los factores genotipo, ambiente así como su interacción G x A tienen efectos significativos en la variación de la calidad de los cálices de *H. sabdariffa*, entre ellos el genotipo fue el factor más importante en los contenidos de antocianinas y fenoles solubles totales, mientras que el efecto del ambiente de producción fue el principal responsable de la variación en la acidez de los extractos acuosos. Los genotipos de cálices color oscuro destacaron por un mayor contenido de fitoquímicos, y los genotipos de cálices color rojo claro mostraron un mayor porcentaje de acidez titulable.

2.7. LITERATURA CITADA

Association of Official Analytical Chemist Inc. (AOAC). 1984. Official Methods of analysis. 14th ed. St Paul Minnesota, USA.

Babalola, S. O., A. O. Babalola, and O. C. Aworh. 2001. Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Journal of Food Technology in Africa 6: 133-134.

Borrás-Linares, I., S. Fernández-Arroyo, D. Arráez-Roman, P. A. Palmeros-Suárez, R. Del Val-Díaz, I. Andrade-González, A. Fernández-Gutiérrez, J. F. Gómez-Leyva, and A. Segura-Carretero. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products* 69: 385-394.

Christian, K. R., and J. C. Jackson. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 663-667.

Fasoyiro, S. B., O. A. Ashaye, A. Adeola, and F. O. Samuel. 2005. Chemical and storability of fruit-flavoured (*Hibiscus sabdariffa*) drinks. *World Journal of Agricultural Sciences* 1: 165-168.

Fernández-Arrollo, S., I. C. Rodríguez-Medina, R. Beltrán-Debón, F. Pasini, J. Joven, V. Micol, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez. 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Research International* 44: 1490-1495.

Galicia-Flores, L. A., Y. Salinas-Moreno, B. M. Espinoza-García, y C. Sánchez-Feria. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 121-129.

Herrera Arellano, A., S. Flores Romero, M. A. Chávez-Soto, and J. Tortoriello. 2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine* 11: 375-382.

Herrera-Arellano, A., J. Miranda-Sánchez, P. Ávila-Castro, S. Herrera-Álvarez, J. E. Jimenez-Ferrer, A. Zamilpa, R. Roman-Ramos, H. Ponce-Monter, and J. Tortoriello. 2007. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, doubleblind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Medica* 73: 6-12.

Juliani, H. R., C. R. Welch, Q. Wu, B. Diouf, D. Malaini, and J. E. Simon. 2009. Chemistry and quality of *Hibiscus* (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science* 74: S113-121.

McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurement. *HortScience* 27: 1254-1255.

Morton, J. F. 1987. Roselle. *In: Fruits of Warm Climates*. pp: 281-286.

Ojeda, D., E. Jiménez-Ferrer, A. Zamilpa, A. Herrera-Arellano, J. Tortoriello and L. Alvarez. 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-*O*-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal Ethnopharmacology* 127: 7-10.

Ottai, M., A. Abdel-Moniem, and R. El-Mergawi. 2004. Effect of variety and location on growth and yield components of roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. and its infestation whit the spiny bollworm *Earias insulana* (Boisd). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37: 215-231.

Patel, S. 2014. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4: 23-27.

Prenci, E., S. Berto, P. G. Daniele, and S. Toso. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* 100: 433-438.

Reyes-Luengas, A., Y. Salinas-Moreno, M. E. Ovando-Cruz, R. I. Arteaga-Garibay, y M. D. Martínez-Peña. 2015. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de diversos colores. *Agrociencia* 49: 277-290.

Salinas-Moreno, Y., A. R. E. Zuñiga-Hernández, L. B. Jiménez-De la Torre, V. Serrano-Altamirano, y C. Sánchez-Feria. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 395-407.

Sindi, H. A., L. J. Marshall, and R. A. Morgan. 2014. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry* 164: 23-29.

Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. Cierre de la producción agrícola por estado. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (Consulta: Enero 2016).

Tsai, P. J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*. 35: 351-356.

Wrolstad, R. E. 2004. Anthocyanins pigments-Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* 69: 419-421.

3. EFECTO DEL GENOTIPO Y AMBIENTE DE PRODUCCIÓN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA, ACIDEZ TITULABLE Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁLCICES DE *Hibiscus sabdariffa* L.

César Sánchez-Feria¹, Yolanda Salinas-Moreno², Víctor A. González-Hernández¹, R. Marcos Soto-Hernández³, Ma. Carmen Ybarra-Moncada⁴, Javier Hernández-Morales⁵ y Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Fisiología Vegetal, ³Posgrado en Botánica y ⁵Posgrado en Fitosanidad - Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ²Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP. km 8 Carretera Tepatitlán – Lagos de Moreno. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. ⁴Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Texcoco, Edo. México.

Autor de correspondencia: yolasm@gmail.com

3.1. RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar los efectos del genotipo (G), del ambiente de producción (A) y de la interacción G x A en dos variedades de *Hibiscus sabdariffa*, Negra Quiviquinta (NQ, cálices oscuros) y UAN-8 (cálices claros), crecidas en tres ambientes en cada uno de los estados de Colima, Nayarit y Oaxaca, para evaluar los cambios en los contenidos de fenoles solubles totales (FST), antocianinas (CTA) y en acidez titulable (AT), así como en el perfil cromatográfico de CTA y de ácidos orgánicos. El análisis AMMI reveló que los efectos del genotipo, el ambiente y la interacción G x A fueron significativos ($p \leq 0.01$). Sin embargo, los

contenidos de FST y CTA fueron dominados por el genotipo (67 y 68 %), mientras que la AT se sometió primariamente al efecto ambiental (77 %). NQ tuvo un contenido promedio de FST y CTA entre ambientes mayor al de UAN-8 (3355 ± 235 vs. 2685 ± 256 mg EAG 100 g^{-1} MS y de 718 ± 184 vs. 323 ± 73 mg EC3G 100 g^{-1} MS, respectivamente); las antocianinas más abundantes fueron delfinidina 3-sambubiósido (52.7-71.6 %) y cianidina 3-sambubiósido (23.5-43.2 %). Por su parte, la AT promedio entre ambientes fue semejante en ambos genotipos (20.0 ± 5.0 y 21.8 ± 3.9 %), aunque su comportamiento fue diferente entre variedades y ambientes de producción; los ácidos orgánicos identificados fueron oxálico, tartárico, málico, cítrico y succínico, de los cuales el succínico fue el de mayor contenido en NQ ($509.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) y UAN-8 ($412.2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). El contenido de FST, CTA y la AT fueron significativamente superiores ($p \leq 0.05$) en los ambientes de Nayarit. Aunque los efectos del genotipo, el ambiental e interacción G x A fueron significativos, el factor genotipo fue el más importantes en el contenido de FST y CTA, mientras que el factor ambiente modificó en mayor grado el porcentaje de acidez. Tales efectos no alteraron los perfiles cromatográficos de CTA ni los de ácidos orgánicos.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, análisis AMMI, antocianinas, acidez titulable, perfil cromatográfico.

3.2 ABSTRCT

The objective of this research was to evaluate the effects of genotype (G), production environment (A) and G x A interaction in two varieties of *Hibiscus sabdariffa*, Negra Quiviquinta (NQ, dark calyces) and UAN-8 (light calyces), grown in three environments in the states of Colima, Nayarit and Oaxaca, to evaluate changes in total soluble phenol content (FST), anthocyanins (CTA) and titratable acidity (AT), as well as in the CTA and organic acids

chromatographic profile. The AMMI analysis revealed that the effects of genotype, environment and G x A interaction were significant ($p \leq 0.01$). However, the contents of FST and CTA were dominated by genotype (67 and 68%), while AT was primarily subjected to the environmental effect (77%). NQ had an average FST and CTA content greater than that of UAN-8 (3355 ± 235 vs. 2685 ± 256 mg EAG 100 g⁻¹ MS and 718 ± 184 vs. 323 ± 73 mg EC3G 100 G-1 MS, respectively); the most abundant anthocyanins were delphinidin 3-sambubioside (52.7-71.6%) and cyanidin 3-sambubioside (23.5-43.2%). On the other hand, the average AT between environments was similar in both genotypes (20.0 ± 5.0 and 21.8 ± 3.9 %), although their behavior was different between varieties and production environments; the organic acids identified were oxalic, tartaric, malic, citric and succinic, of which the succinic acid was the highest in NQ (509.0 mg 100 g⁻¹) and UAN-8 (412.2 mg 100 g⁻¹). The content of FST, CTA and TA was significantly higher ($p \leq 0.05$) in Nayarit environments. Although the effects of genotype, environmental and the interaction G x A were significant, the genotype factor was the most important in FST and CTA content, while the environment factor modified to a greater extent the percentage of acidity. such effects did not alter the chromatographic profiles of CTA or those of organic acids.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, AMMI analysis, anthocyanins, titratable acidity, chromatographic profile.

3.3. INTRODUCCIÓN

La jamaica, como se le conoce en México a *Hibiscus sabdariffa* L., es una planta anual que se cultiva en regiones tropicales y subtropicales del país. La estructura de la planta con mayor valor comercial son los cálices, a partir de los cuales se prepara la tradicional “agua de jamaica”. Los

cálices de *H. sabdariffa* contienen abundantes cantidades de compuestos fenólicos, entre los que destacan los ácidos fenólicos, las antocianinas y otros flavonoides (Reyes-Luengas *et al.*, 2015; Borrás-Linares *et al.*, 2015; Segura-Carretera *et al.*, 2008). Las diferentes actividades biológicas y propiedades medicinales asociadas a los cálices de *H. sadbariffa* se deben a sus compuestos fenólicos (Zhang *et al.*, 2014; Robbins, 2003). La elevada actividad antioxidante se atribuye principalmente a sus antocianinas (Tsai *et al.*, 2002).

El contenido de compuestos fenólicos está determinado por el genotipo, y está estrechamente asociado con el color de los cálices (Christian y Jackson, 2009). Particularmente el contenido de antocianinas que es entre cuatro y siete veces más elevado en genotipos con cálices de color rojo oscuro que en los genotipos con cálices de color rojo claro (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). Además, el ambiente de producción también afecta la síntesis de estos flavonoides en los cálices de *H. sabdariffa* (Jakkola y Hohtola, 2010); por ejemplo, en genotipos de *H. sabdariffa* crecidos en diferentes ambientes, Juliani *et al.* (2009) observaron diferencias de hasta 70 % en el contenido de antocianinas al variar el ambiente de producción; los fenoles solubles totales mostraron un comportamiento similar.

Los consumidores eligen el “agua de jamaica” con base en su color y sabor; dentro de este último atributo, la acidez de la bebida es el factor más importante (Bechoff *et al.*, 2014), y se atribuye a la presencia de diferentes ácidos orgánicos, entre los que destacan los ácidos succínico y oxálico, además del ácido ascórbico (Wong *et al.*, 2002). En algunos trabajos se ha asociado la intensidad del color de los cálices con su acidez, y la mayor acidez se ha relacionado con los genotipos de cálices claros en comparación con los oscuros (Galicia-Flores *et al.*, 2008; Salinas-Moreno *et al.*, 2012). A pesar de la importancia de la acidez en la aceptabilidad del producto, se le ha dado poca atención en la caracterización físico-química de los cálices de *H. saddariffa*.

En México existe una gran cantidad de genotipos de *H. sabdariffa* que se emplean para la producción de cálices, los cuales difieren fenotípicamente en forma, tamaño, color (Torres-Morán *et al.*, 2011), y en contenido de compuestos fenólicos de interés nutracéutico. La mayor parte de este germoplasma se conoce como criollo, que comúnmente carece de uniformidad y de buenos rendimientos de cálices. Una parte relevante para mejorar la competitividad del cultivo de *H. sabdariffa* en México es contar con variedades mejoradas adaptadas a las diferentes zonas productoras, que destaquen en el rendimiento de cálices y en el contenido de bioactivos.

Para ello es necesario determinar primero el efecto de la variedad y el ambiente de producción sobre las variables determinantes para la calidad de los cálices. Por lo antes expuesto, los objetivos del presente estudio fueron: evaluar los efectos del genotipo (G), el ambiente de producción (A) y su interacción G x A, en dos variedades contrastantes de *Hibiscus sabdariffa*, Negra Quiviquinta y UAN-8, ambas crecidas en tres localidades ubicadas en tres estados productores en México, Colima, Nayarit y Oaxaca, para evaluar los cambios en los contenidos y perfiles cromatográficos de fenoles solubles totales, antocianinas y ácidos orgánicos.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Material vegetal

Se compararon dos variedades de *H. sabdariffa*, Negra Quiviquinta (NQ) y UAN-8, de cálices rojo claro y rojo oscuro respectivamente. Ambas variedades fueron crecidas y cosechadas en 2013 en tres localidades de tres estados mexicanos con tradición en la producción de jamaica (Cuadro 3.1). El manejo agronómico, de cosecha y de postcosecha aplicado en cada variedad fue el que se practica en cada región de producción, por lo que fueron considerados como parte del efecto ambiental, junto con la localidad geográfica (clima, suelo, altitud, etc.), ya que todos ellos

interactuaron con las dos variedades de *H. sabdariffa* evaluadas en este estudio. Las variedades en estudio constituyen parte del germoplasma experimental de esta especie en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), que están en evaluación para su próxima liberación al mercado (M. en C. Manuel Ovando Cruz¹, 2015, Com. pers.).

Cuadro 3.1. Ubicación geográfica y altitud de las localidades en las que se cultivaron los genotipos de *Hibiscus sabdariffa* bajo estudio.

Estado	Localidad	Coordenadas geográficas		Altitud (m)
		Latitud Norte	Longitud Oeste	
Colima	Comala	19° 18' 19.36"	103° 45' 12.03"	600
	Puerta de Anzar	19° 7' 14.81"	103° 32' 57.00"	465
	Trapichillos	19° 9' 38.00"	103° 31' 32.00"	550
Nayarit	Jala	21° 5' 23.15"	104° 26' 18.32"	1080
	Quiviquinta	22° 43' 45.98"	105° 20' 7.10"	80
	Xalisco	21° 27' 2.71"	104° 53' 55.94"	915
Oaxaca	Los Limones	16° 1' 34.27"	97° 29' 34.95"	30
	Río Grande	16° 0' 37.57"	97° 26' 0.63"	30
	Santa María Tonameca	15° 44' 47.69"	96° 32' 46.56"	40

3.4.2. Preparación de los extractos acuosos

Se empleó el método descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Brevemente, 2.5 g de cálices en base seca se depositaron en un vaso de precipitados de 600 mL y se adicionaron 100 mL de agua

¹Investigador del Programa de Jamaica del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, Oaxaca.

destilada; la mezcla se llevó a ebullición durante 15 min, para enseguida separar el extracto por decantación. La extracción se repitió bajo las mismas condiciones, y al final se hizo un solo extracto con la mezcla de ambas extracciones; posteriormente se procedió a filtrar con papel Whatman No. 4, para luego aforar a 200 mL con agua destilada. A partir de este extracto se realizaron todas las determinaciones, excepto la cuantificación y análisis de ácidos carboxílicos.

3.4.3. Fenoles solubles totales (FST)

Se usó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). De manera breve, a 100 μL del extracto acuoso se adicionó un volumen de 125 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich®), se agitó y se dejó reaccionar por 6 min en oscuridad; después se neutralizó con 1250 μL de carbonato de sodio (JT Baker®) a 19 % (p/v), y se ajustó el volumen a 3 mL con agua destilada. La muestra se agitó y se dejó reaccionar por 90 min en oscuridad. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro PerkinElmer® (Lamda 25 UV/Vis) a una longitud de onda de 760 nm. Se elaboró una curva patrón de ácido gálico (20 a 100 ppm; 20 a 100 mg L^{-1}), y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca (mg EAG 100 g^{-1} MS). Este análisis se realizó por cuadruplicado.

3.4.4. Contenido total de antocianinas (CTA)

Se midió la absorbancia en 3 mL de cada extracto acuoso, en cuatro repeticiones, diluido con agua destilada (factor de dilución = 5) con un espectrofotómetro PerkinElmer® (Lambda 25 UV/Vis), conforme al procedimiento descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Para su cuantificación se elaboró una curva estándar con cianidina 3-glucósido (Polyphenols®, Nw) con concentraciones en un rango de 0 a 30 ppm (0 a 30 mg L^{-1}), para expresar el contenido total de

antocianinas en mg equivalentes de cianidina 3-glucósido por 100 g de materia seca (mg EC3G 100 g⁻¹ MS).

3.4.5. Perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Cada muestra de extracto acuoso (3 mL) se filtró con un acrodisco de nailon 0.45 µm (Titan2®), y se depositó en un vial ámbar que se conservó a 4 °C por un día antes de su análisis. Se utilizó un equipo PerkinElmer® Series 200, equipado con una columna C18 Hypersil ODS (200 x 4.6 mm, 5 µm). El método de análisis empleado fue el descrito por Fossen *et al.* (2001), el cual utiliza un sistema de gradientes con dos disolventes: ácido fórmico (Merck®): agua (JT Baker®) (1:9 v/v); y ácido fórmico: agua: metanol (JT Baker®) (1:4:5 v/v/v). Todos los disolventes empleados fueron grado HPLC. El volumen de muestra inyectado fue de 10 µL y el tiempo de corrida de 21 min, con un flujo de solventes de 1.2 mL min⁻¹ a 25 °C. La detección de las antocianinas se hizo a 520 nm. La identificación de las antocianinas se realizó con estándares comerciales, y con base en lo reportado por Segura-Carretero *et al.* (2008).

3.4.6. Acidez titulable (AT)

Se determinó, en cuatro repeticiones, con base en el método 942.15 descrito por la AOAC (1998), en una alícuota de 10 mL que se diluyó hasta 200 mL con agua destilada. Se usó fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH 0.1 N (JT Baker®). El porcentaje de acidez titulable se expresó en miliequivalentes de ácido cítrico.

3.4.7. Extracción y análisis de ácidos carboxílicos

Para esta determinación, los cálices secos se molieron en un molino de martillos (IKA®, modelo MF 10), equipado con una malla de 0.5 mm. Las harinas se deshidrataron hasta llegar a

peso constante en una estufa de convección a 40 °C durante 12 h. La extracción se hizo a partir de 0.5 g de harina con 25 mL de agua bi-destilada. La muestra se colocó en un baño ultrasónico (Branson® 2510) durante 15 min, y posteriormente en agitación por 30 min (Gyratory Shaker®, modelo G10, USA), para después refrigerar a 4 °C por 90 min. La muestra se filtró en papel Whatman No. 4 y aforó en matraz volumétrico a 25 mL. Del extracto se tomaron 2 mL para ser filtrados por un acrodisco (Titan2®), con membrana de nailon de 0.45 µm, y se colocaron en viales ámbar que se almacenaron a 4 °C hasta su análisis por HPLC.

3.4.8. Análisis de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular por HPLC

Se realizó una selección de 5 muestras contrastantes en AT para evaluar su perfil cromatográfico y contenido relativo de cada ácido orgánico presente en los extractos. La identificación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular se realizó con el mismo equipo usado en el análisis de antocianinas. Las condiciones de trabajo se estandarizaron según lo descrito por Cen *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Como fase móvil se empleó una mezcla de fosfato de potasio 0.01M (pH 2.4, ajustado con ácido fosfórico) y metanol grado HPLC en proporción 95:5 (v/v). Se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (200 x 4.6 mm, 5 µm) a 30 °C con flujo de 1.0 mL min⁻¹, tiempo de corrida de 10 min y volumen de inyección de 10 µL. La detección se hizo a 214 nm. Los estándares empleados para la identificación fueron: ácido málico (de 100 a 500 ppm), los ácidos cítrico, oxálico y succínico (de 100 a 300 ppm), y el ácido tartárico (de 20 a 100 ppm), con los cuales se elaboraron curvas de calibración para su cuantificación

3.4.9. Análisis estadístico

Los resultados de los contenidos de FST, CTA y AT fueron sometidos a un análisis de varianza combinado mediante el modelo de efectos principales aditivos e interacción

multiplicativa (AMMI, por sus siglas en inglés), con el uso del método de medias ajustadas para estimar la influencia del genotipo (G), el ambiente de producción (A) y su interacción G x A. Luego se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$) para identificar diferencias estadísticas entre los genotipos y las localidades evaluadas debidas a la interacción G x A. El paquete estadístico empleado fue SAS System Versión 9.4.

La gráfica de dos dimensiones entre el CP1 y la variable respuesta (FST, CTA o AT) se hizo para mostrar las diferencias entre las variedades, las localidades (debido al efecto ambiental), y el grado de interacción entre las variedades y las localidades, así como su estabilidad en las localidades evaluadas. El efecto del genotipo y el ambiente en este tipo de gráficos se representa en el eje x, que explica según sea el caso, a cada una de las variables estudiadas (FST, CTA y AT) en la gráfica de dos dimensiones. Por lo tanto, un mayor valor obtenido entre las variedades o las localidades se asocia a un mejor desempeño en la variable analizada; mientras que el efecto de la interacción G x A dependió de los valores obtenidos en el eje del CP1 con respecto al eje x; así, las variedades y las localidades que tuvieron valores absolutos más bajos en el eje CP1 se consideraron más estables en la síntesis de FST, CTA, así como en su AT (eje x), y cuando presentaron valores elevados en el CP1 se consideró un mayor grado de interacción entre los genotipos y las localidades.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Análisis de varianza

El análisis AMMI reveló que todos los factores analizados, así como su interacción G x A, tuvieron efectos estadísticamente significativos ($p \leq 0.01$) en las tres variables evaluadas (Cuadro 3.2). De acuerdo con las sumas de cuadrados, los contenidos de FST y CTA estuvieron

influenciados principalmente por el genotipo, ya que este factor explicó 2/3 de la variación debida a tratamientos, respectivamente; el ambiente y la interacción G x A fueron responsables de 16 y 17 % de la variación restante en FST, y de 21 y 12 % en CTA. En contraste, la AT fue mayormente afectada por el ambiente (77 %), seguida de la interacción G x A (19 %) y el genotipo (5 %).

Estos resultados evidencian que la síntesis de estos compuestos antioxidantes (CTA y FST) depende primariamente del factor genotipo, de modo que en el proceso de mejoramiento genético la selección de genotipos sobresalientes es la principal vía para elevar la producción de cálices ricos en estos dos tipos de fitoquímicos. Resultados similares que muestran la relevancia del factor genético en la síntesis de fitoquímicos, han sido informados para cultivares de *H. sabdariffa* crecidos en otras latitudes (Ottai *et al.*, 2004).

Cuadro 3.2. Sumas de cuadrados resultantes del análisis AMMI para el contenido de fenoles solubles totales (FST), contenido total de antocianinas (CTA) y acidez titulable (AT) de cálices deshidratados de dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* crecidas en nueve localidades.

Fuente de variación	gl	Sumas de cuadrados					
		FST	%	CTA	%	AT	%
Genotipo (G)	1	8070287**	67	2815248**	68	47**	4
Ambiente (A)	8	1971888**	16	843075**	21	799**	77
Interacción (G x A)	8	2007202**	17	463566**	12	194**	19

**Significancia $p \leq 0.01$. gl: grados de libertad.

También se puede deducir que para lograr una mayor acidez en los cálices y en los extractos acuosos, la mejor forma es cultivar los cálices en los sitios en los que los genotipos hayan expresado una mayor síntesis de ácidos orgánicos. Ottai *et al.* (2004) también reportaron la superioridad del efecto ambiental (89 %) en los valores de acidez obtenidos en los cálices de *H. sabdariffa*. En cambio, Salinas-Moreno *et al.* (2012) detectaron un efecto significativo del genotipo en variedades crecidas en el estado de Oaxaca, sin haber reconocido el efecto ambiental en la expresión de la AT.

3.5.2. Variación del contenido de fenoles solubles totales (FST) y antocianinas (CTA)

Los compuestos fenólicos son los fitoquímicos antioxidantes más abundantes en los cálices deshidratados de *H. sabdariffa*, y la variación de su contenido en las variedades NQ y UAN-8 debida a genotipo, ambiente de producción e interacción G x A, determinados mediante el análisis AMMI, se muestran en la Figura 3.1. La variedad NQ (3355 mg EAG 100 g⁻¹ MS) tuvo un contenido promedio de FST a través de los ambientes probados significativamente superior ($p \leq 0.01$) al registrado en la variedad UAN-8 (2686 mg EAG 100 g⁻¹ MS), contraste que representó una diferencia de 25.0 % entre ambas variedades.

El ambiente en donde ambos genotipos expresaron su mayor potencial para la acumulación de FST (Figura 3.1) fue Santa María Tonameca (Oaxaca), donde el contenido promedio de FST cuantificado entre ambas variedades (3416 mg EAG 100 g⁻¹) superó en 10 a 18 % a los rendimientos de FST que estas variedades registraron en los demás ambientes de producción probados. Los ambientes en donde la acumulación de FST tuvo el desempeño más bajo fueron Comala (Colima) y Río Grande (Oaxaca), en donde el contenidos de FST entre ambos genotipos

fue de 2814 y 2817 EAG 100 g⁻¹, respectivamente. En los demás ambientes el contenido promedio de FST entre ambas variedades osciló de 2985 a 3065 EAG 100 g⁻¹.

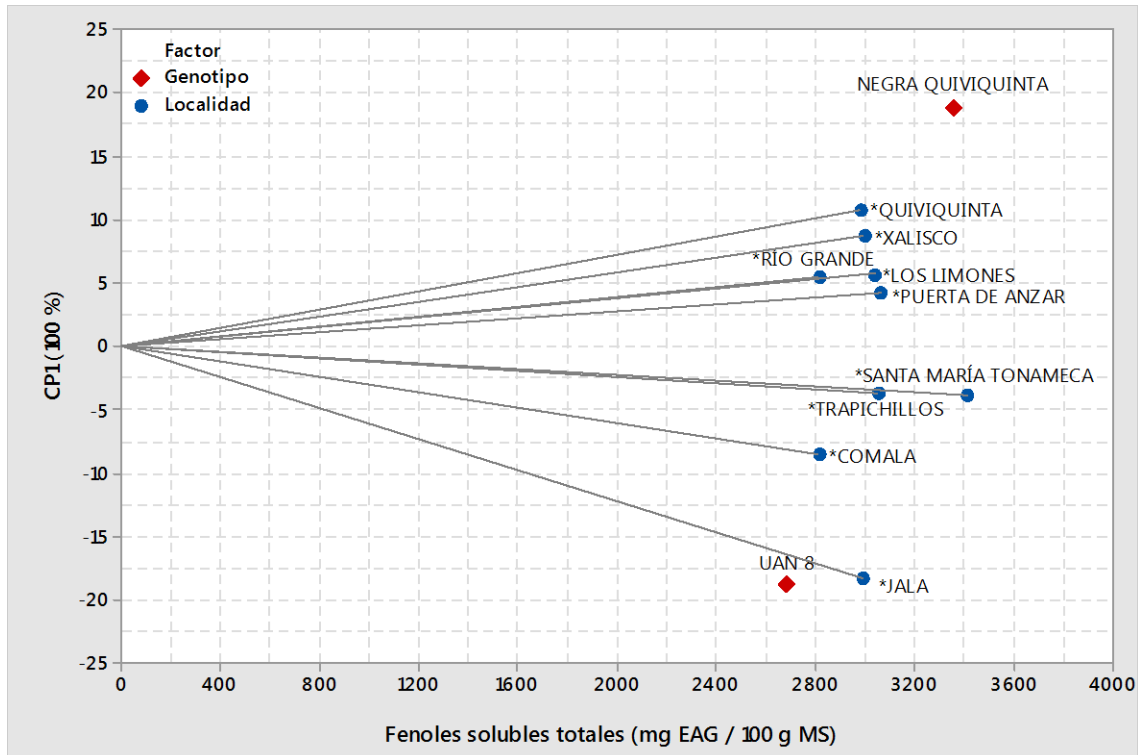


Figura 3.1. Efecto del genotipo, el ambiente y su interacción G x A en el contenido de fenoles solubles totales en dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* crecidas en nueve localidades de México.

El efecto de la interacción de las variedades NQ y UAN-8 de *H. sabdariffa* con los nueve ambientes probados fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3.2). La síntesis de FST en la variedad NQ resultó favorecida en las localidades de Quiviquinta, Xalisco, Río Grande, Los Limones y Puerta de Anzar, ya que en estas localidades su contenido de FST varió entre 3255 y

3520 EAG 100 g⁻¹, lo que representó un contenido mayor entre 31 a 44 % en comparación al registrado en la variedad UAN-8 en las mismas localidades (Figura 3.2).

Por su parte, la variedad UAN-8 tuvo una mejor adaptación en las localidades de Jala (Nayarit) y Comala (Colima); en la primera de ellas su rendimiento de FST fue de 3006 EAG 100 g⁻¹ (Figura 3.2), semejante al registrado en la variedad NQ (2982 EAG 100 g⁻¹), mientras que en la localidad de Comala su contenido fue de 2640 EAG 100 g⁻¹, inferior en 12 % al registrado en la variedad NQ crecida en la misma localidad.

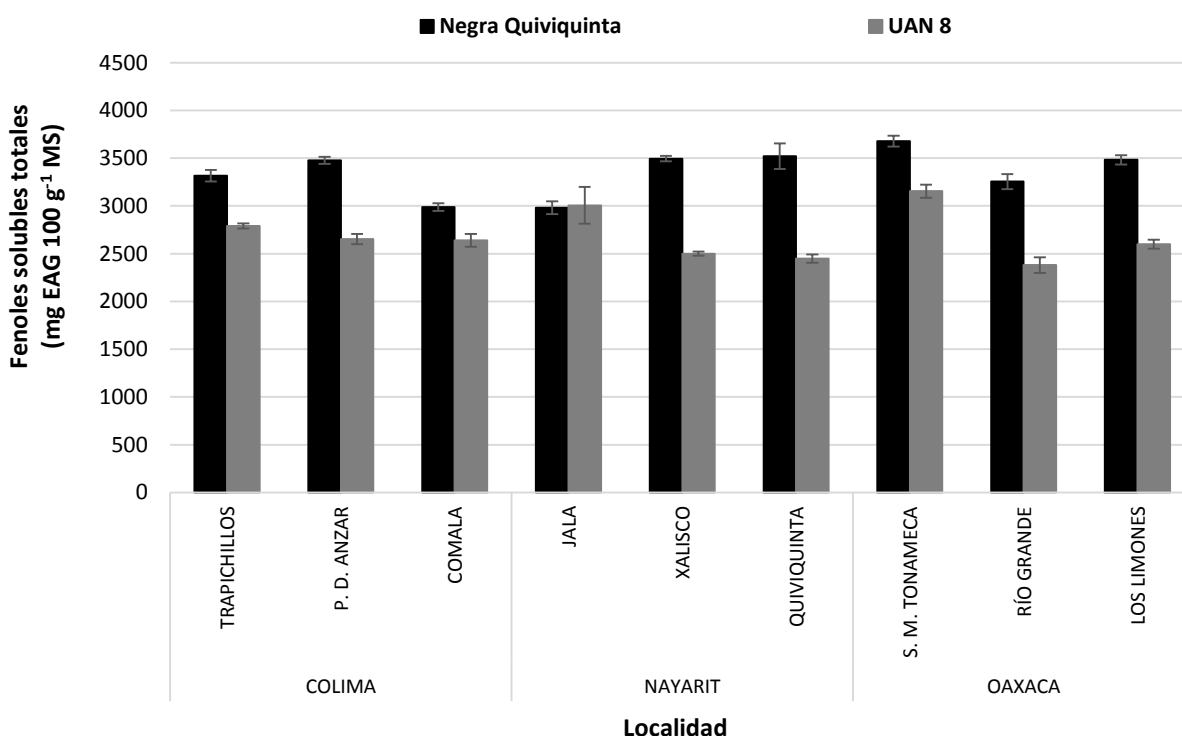


Figura 3.2. Efecto de la interacción G x A en el contenido de fenoles solubles totales en dos variedades de *H. sabdariffa* crecidas en nueve localidades de México. DMS = 197 mg EAG. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

En las localidades de Trapichillos (Colima) y Santa María Tonameca (Oaxaca) ambas variedades de *H. sabdariffa* tuvieron una producción más estable de este fitoquímico (Figura 3.2), con una diferencia de 19 y 17 % entre las localidades, respectivamente; destaca que en Santa María Tonameca fue mayor el contenido de FST en ambas variedades, principalmente en NQ (3678 EAG 100 g⁻¹).

Las antocianinas integran una fracción de fitoquímicos que pertenece a la familia de los compuestos fenólicos, y su importancia es debida a que son responsables del color y a que contribuyen con la mitad (50 %) de la actividad antioxidante de los extractos de *H. sabdariffa*. El CTA, a diferencia del contenido de FST, presentó una mayor variación entre las variedades y a través de las localidades probadas, como resultado de los efectos factoriales de estudio (genotipo, localidad e interacción G x A) (Figura 3.3).

El efecto del genotipo también fue determinante en el CTA, ya que el contenido promedio a través de localidades de la variedad NQ (718 mg EC3G 100 g⁻¹ MS) superó significativamente ($p \leq 0.01$) al registrado en la variedad UAN-8 (323 ± 73 mg EC3G 100 g⁻¹ MS) en 2.2 veces (Figura 3.3).

Los factores ambientales y de interacción G x A, aunque de menor relevancia que el genético, también ocasionaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en el CTA de las dos variedades de *H. sabdariffa* (Figura 3.3). Las interacciones más favorables para la variedad NQ, que estimularon una mayor síntesis y acumulación de su CTA, se dieron en las localidades de Quiviqinta y Xalisco (Nayarit) en donde su CTA fue de 1006 y 997 mg EC3G 100 g⁻¹ MS (Figura 3.4), contenidos que superaron en 3.4 y 2.3 veces el CTA de la variedad UAN-8.

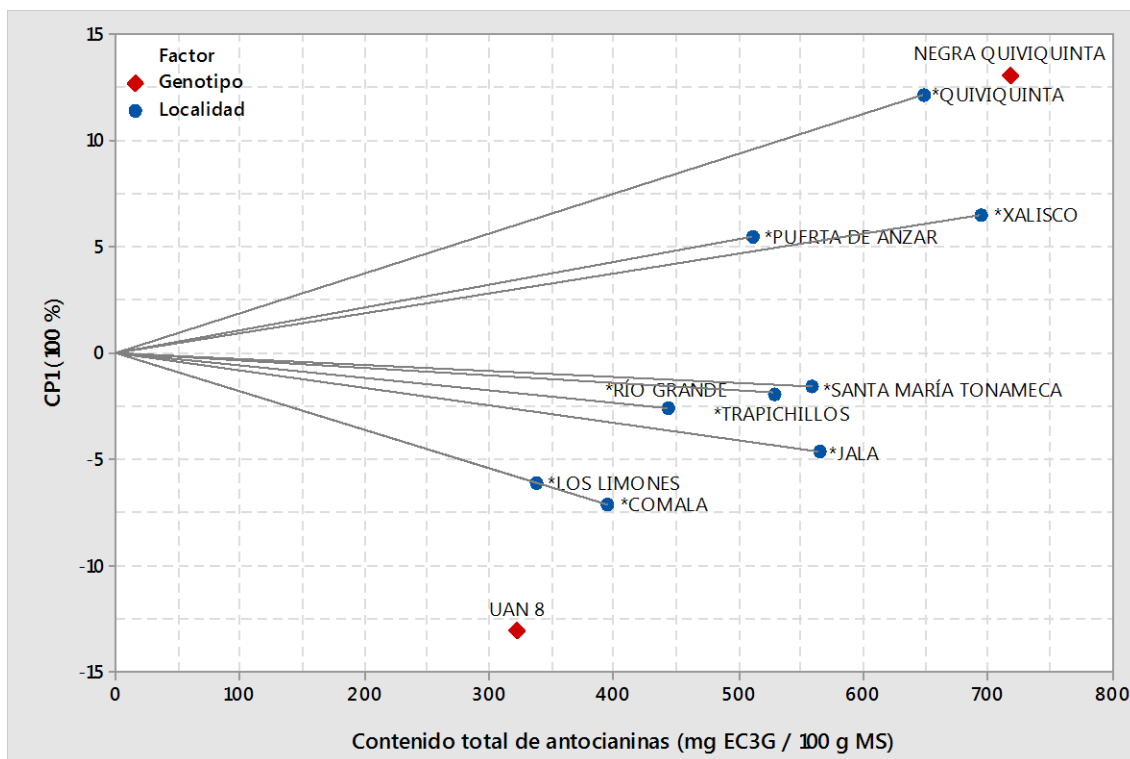


Figura 3.3. Efecto del genotipo, la localidad y su interacción G x A en el contenido total de antocianinas en dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* crecidas en nueve localidades de México.

Aunque la combinación de la variedad NQ y la localidad de Puerta de Anzar (Colima) también favoreció el desempeño de esta variedad en la acumulación de este fitoquímico, el CTA registrado fue inferior al obtenido en las localidades de Quiviquinta y Xalisco, localidad en la que el contenido de la variedad UAN-8 fue superado en 3.2 veces (Figura 3.4). Por el contrario, por efecto de la interacción la variedad NQ crecida en las localidades de Los Limones (Oaxaca) y Comala (Colima) causó que los valores de CTA fueran los más bajos para esta variedad (456 y 500 mg EC3G 100 g⁻¹ MS). En las localidades restantes el efecto de interacción hizo que su CTA variara entre 606 y 780 mg EC3G 100 g⁻¹ MS.

La interacción entre la variedad UAN-8 con las localidades probadas provocó una variación en su CTA que fue de 220 a 428 mg EC3G 100 g⁻¹ MS (Figura 3.4). El mejor desempeño de esta variedad se observó cuando se creció en las localidades de Jala, Xalisco, Trapichillos y Santa María Tonameca (355 a 428 mg EC3G 100 g⁻¹ MS); el efecto contrario se detectó en las localidades de Los Limones (Oaxaca) y Puerta de Anzar (Colima) donde su contenido descendió hasta 220 y 243 mg EC3G 100 g⁻¹ MS, respectivamente.

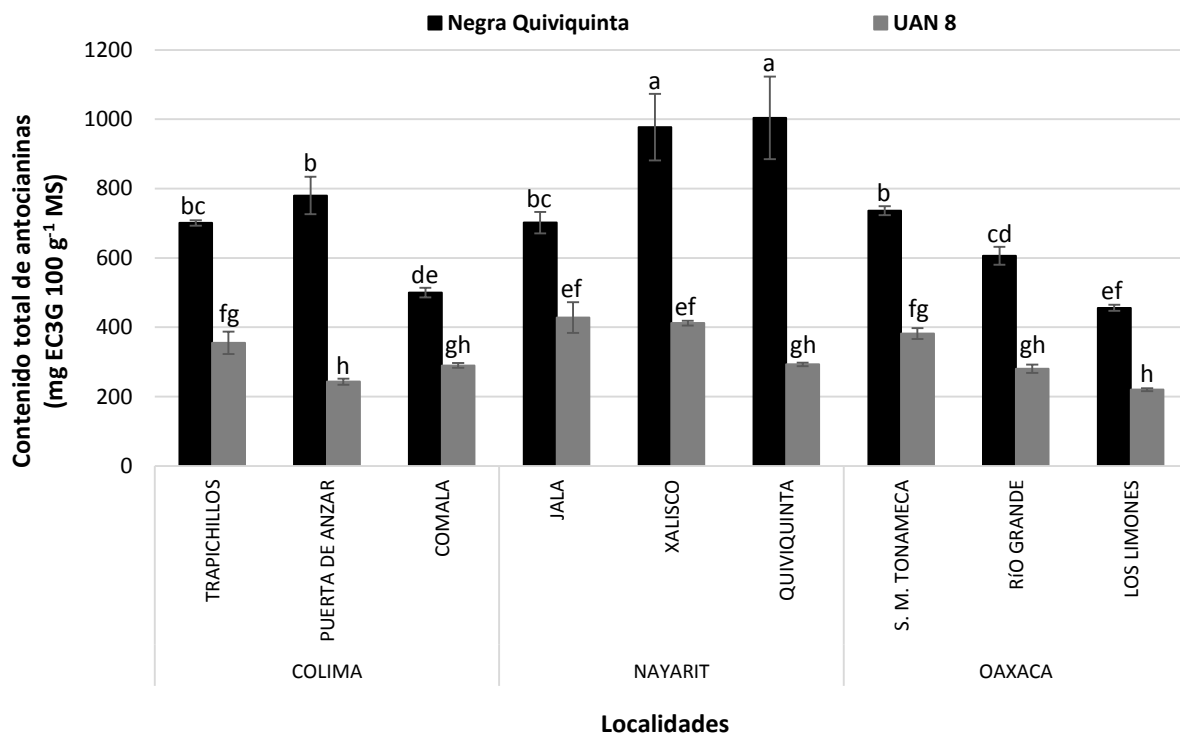


Figura 3.4. Efecto de la interacción G x A en el contenido total de antocianinas en dos variedades de *H. sabdariffa* crecidas en nueve localidades de México. DMS = 109 mg EC3G. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

En genotipos de *H. sabdariffa* el CTA es de mucha importancia porque determinan el grado de calidad que los cálices pueden tener, principalmente porque su contenido está estrecha y positivamente asociado con el color de los cálices y extractos (Sant'Anna *et al.*, 2013; Salinas-Moreno *et al.*, 2012), por lo que le CTA constituye un atributo de gran interés para los consumidores de extractos de *H. sabdariffa*.

Las diferencias genotípicas en el contenido FST y CTA en cálices de *H. sabdariffa* de pigmentación roja contrastante (oscuras y claras) han sido evaluadas previamente en genotipos crecidos en Nigeria (Juliani *et al.*, 2009), en Jamaica (Christian y Jackson, 2009) y en México (Borrás-Linares *et al.*, 2015; Salinas-Moreno *et al.*, 2012; Galicia-Flores *et al.*, 2008). Los resultados también muestran la superioridad en contenido de FST y CTA de genotipos de cálices de color rojo oscuro, como aquí Negra Quiviquinta vs. UAN-8.

Por tales razones el uso de genotipos con alto contenido de fitoquímicos es importante desde el punto de vista nutracéutico y medicinal. En este contexto, genotipos de cálices de color rojo oscuro como NQ son más convenientes como fuentes de FST, entre los que destacan las antocianinas por su abundancia. La fracción de FST, diferente de antocianinas, también es importante porque algunos son compuestos astringentes, como taninos o ácidos fenólicos (Reyes-Luengas *et al.*, 2015) que contribuyen al sabor y palatabilidad (Robbins, 2003) de sus derivados.

Es necesario enfatizar que en los resultados obtenidos en esta investigación se observó que la síntesis y acumulación de FST fue más estable al efecto de la interacción G x A en comparación con el comportamiento de la acumulación de antocianinas en las variedades de *H. sabdariffa* a través de las localidades evaluadas. Al respecto, Jakkola *et al.* (2010) mencionan que las antocianinas son fitoquímicos más sensibles a cambios ambientales, principalmente a factores

como la intensidad de luz, el fotoperiodo y los cambios en temperatura, entre los más importantes, que provocan cambios en su síntesis y acumulación.

3.5.3. Perfil cromatográfico de antocianinas

El perfil de antocianinas fue similar en las dos variedades de *H. sabdariffa* evaluadas (NQ y UAN-8), independientemente de la localidad de producción. La Figura 3.5 ilustra el perfil característico de antocianinas en los cálices de *H. sabdariffa*, que fue dominado por las antocianinas delphinidina 3-sambubiósido (D3S, pico 2) y cianidina 3-sambubiósido (C3S, pico 5). Por su parte, Segura-Carretero *et al.* (2008) reportaron una discreta presencia de delphinidina 3-glucósido (pico 1) y cianidina -3,5-diglucósido (pico 3) en el perfil cromatográfico de antocianinas en *H. sabdariffa*.

La información obtenida sobre los perfiles de antocianinas para las dos variedades de *H. sabdariffa* analizadas coincide con lo informado previamente por otros investigadores que han analizado variedades de *H. sabdariffa* crecidas en países como Senegal (Juliani *et al.*, 2009; Rodríguez-Medina *et al.*, 2009), Sudán (Cahlíkova *et al.*, 2015) y México (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011), lo que muestra que el perfil es una característica genética que no se modifica por el ambiente.

La localidad de producción provocó cambios en el contenido relativo de las antocianinas presentes en los cálices, variación que se consigna en el Cuadro 3.3. El contenido relativo para D3S mostró una variación de 52.2 a 71.6 %, en tanto que para C3S la variación fue de 23.5 a 37.0 %. Para ambos genotipos, la mayor variación en ambas antocianinas se observó en las localidades de Colima. La variación en el contenido relativo de estas dos antocianinas por efecto de genotipo fue mayor que el efecto de localidad, y así lo demuestran también los resultados de Borrás-

Linares *et al.* (2015) quienes reportaron una variación de 46 a 82 % para D3S y de 18 a 54 % para C3S entre variedades de *H. sabdariffa* mexicanas.

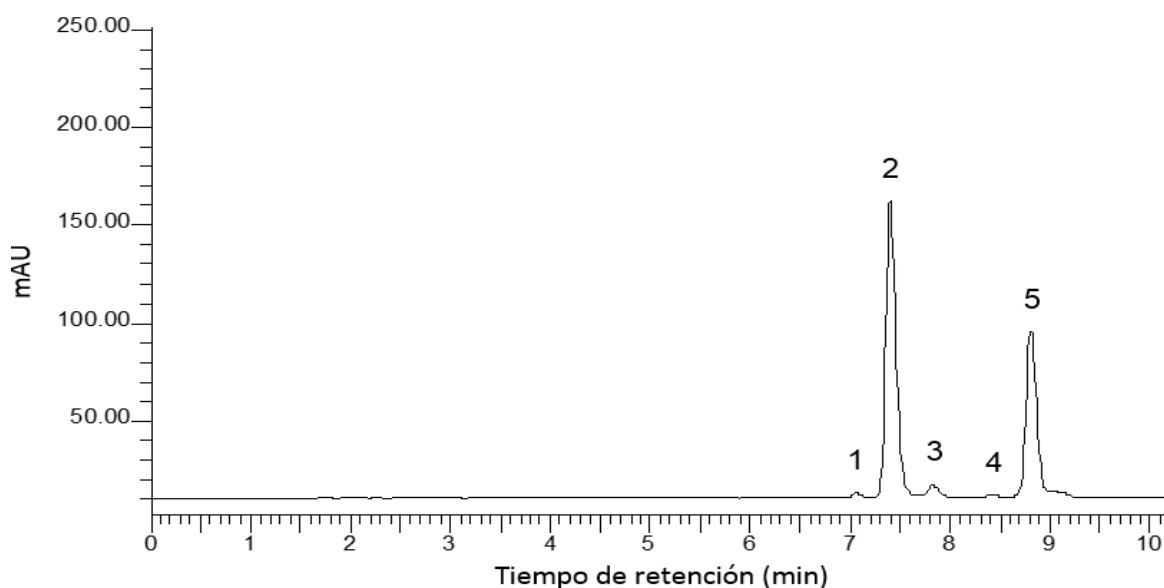


Figura 3.5. Perfil cromatográfico de antocianinas identificadas en extractos acuosos de cálices de *Hibiscus sabdariffa*, en los genotipos Negra Quiviquinta y UAN-8. Las antocianinas fueron: 1) delphinidina 3-glucósido, 2) Delfinidina 3-sambubiósido, 3) cianidina 3,5-diglucósido, 4) No identificada, 5) Cianidina 3-sambubiósido.

Según Daniel *et al.* (2012), las diferencias en los contenidos relativos de las antocianinas entre localidades podrían ser atribuidas a diferencias en los métodos de secado empleados para disminuir el alto contenido de agua en los cálices frescos, ya que un deshidratado severo con temperaturas elevadas y periodos prolongados de exposición a la luz no son favorables para preservar este tipo de compuestos.

Cuadro 3.3. Contenido relativo de antocianinas (D3S y C3S) en extractos acuosos de cálices deshidratados de dos genotipos de *Hibiscus sabdariffa* crecidos en diferentes localidades.

Genotipo	Estado	D3S (%)	C3S (%)
Negra Quiviquinta	Oaxaca	60.0 - 62.2	34.2 - 37.0
	Nayarit	61.6 - 71.6	23.5 - 30.8
	Colima	58.6 - 63.7	29.4 - 34.1
UAN-8	Oaxaca	52.7 - 62.5	31.1 - 43.2
	Nayarit	55.2 - 63.7	31.7 - 40.5
	Colima	53.5 - 71.4	24.7 - 41.9

D3S: delfinidina 3-sambubiósido; C3S: cianidina 3-sambubiósido.

3.5.4. Variación de la acidez titulable (AT)

El efecto dominante del factor ambiental sobre la AT (Cuadro 3.2), que es una medida de la palatabilidad de los extractos acuosos de *H. sabdariffa*, se confirma con los resultados del análisis AMMI obtenidos en las variedades NQ y UAN-8 (Figura 3.6), que muestran una menor relevancia del factor genotipo debido a que ambas variedades (NQ y UAN-8) registraron semejanzas en su acidez media, 17.6 y 19.2 % de ácido cítrico, obtenida de las nueve localidades evaluadas.

Los efectos de la localidad y la interacción G x A determinaron en mayor grado el nivel de acidez que expresaron las variedades NQ y UAN-8 (Cuadro 3.2), tal como se aprecia de manera clara para ambas variedades en las localidades de Nayarit (Quiviquinta, Jala y Xalisco) (Figura 3.6), donde expresaron una mayor acidez de manera conjunta: en Jala y Quiviquinta, localidades

en donde la acidez promedio entre ambas variedades fue de 22.5 % de ácido cítrico. Sin embargo, en la localidad de Jala el efecto de la interacción provocó que la variedad NQ tuviera una AT superior a la registrada por UAN-8 (24.8 vs. 20.0 % de ácido cítrico); en cambio, en la localidad de Quiviquinta el efecto de la interacción fue opuesto ya que se favoreció la AT de la variedad UAN-8, que superó a NQ (23.8 vs. 21.2 % de ácido cítrico). En Xalisco la AT de ambas variedades fue semejante (21.3 vs. 21.2 % de ácido cítrico).

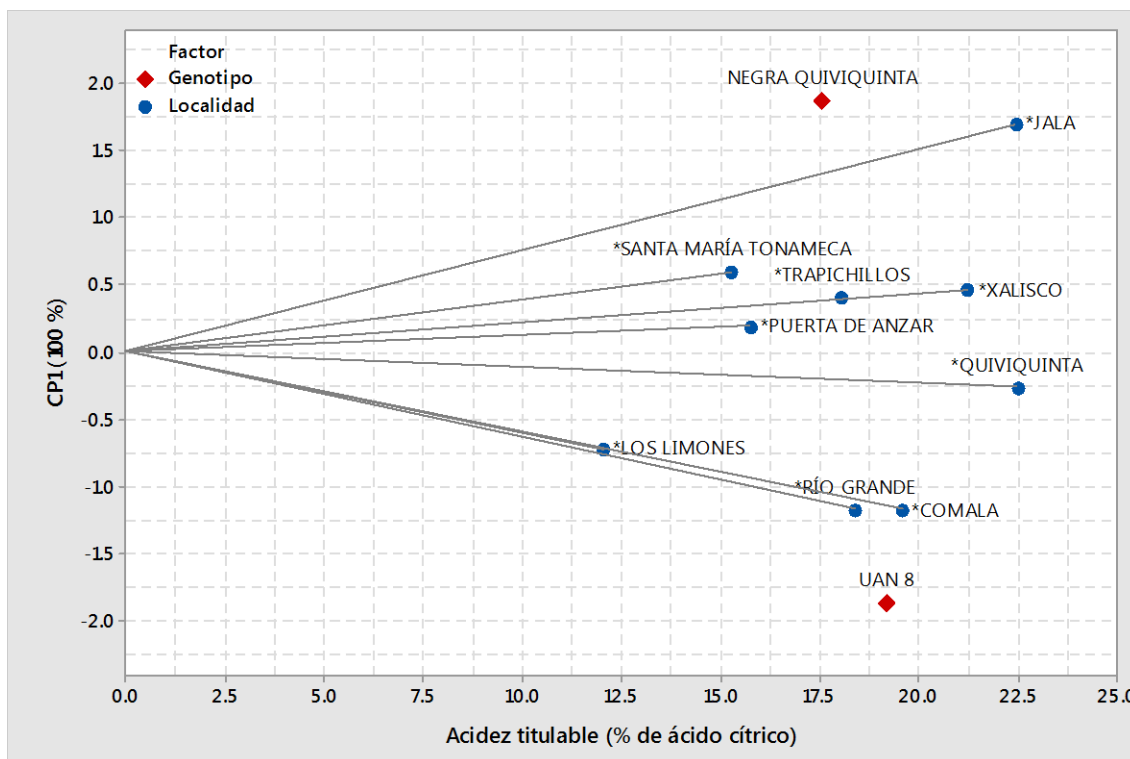


Figura 3.6. Efectos del genotipo, la localidad y su interacción G x A en la acidez de extractos acuosos de dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* crecidas en nueve localidades de México.

La AT de la variedad UAN-8 sobresalió más en las localidades de Río Grande (Oaxaca) y Comala (Colima), donde registró valores de 21.4 y 22.6 % de ácido cítrico (Figura 3.7); para NQ

los registros de AT logrados en estas localidades fueron de los más bajos (15.4 y 16.6 % de ácido cítrico) en comparación a lo obtenido en otras localidades. En Los Limones la AT de la variedad UAN-8 (12.1 % de ácido cítrico) también fue superior a la registrada por NQ (9.9 % de ácido cítrico). Sin embargo, el porcentaje de AT conseguido fue inferior al logrado en Río Grande y Comala.

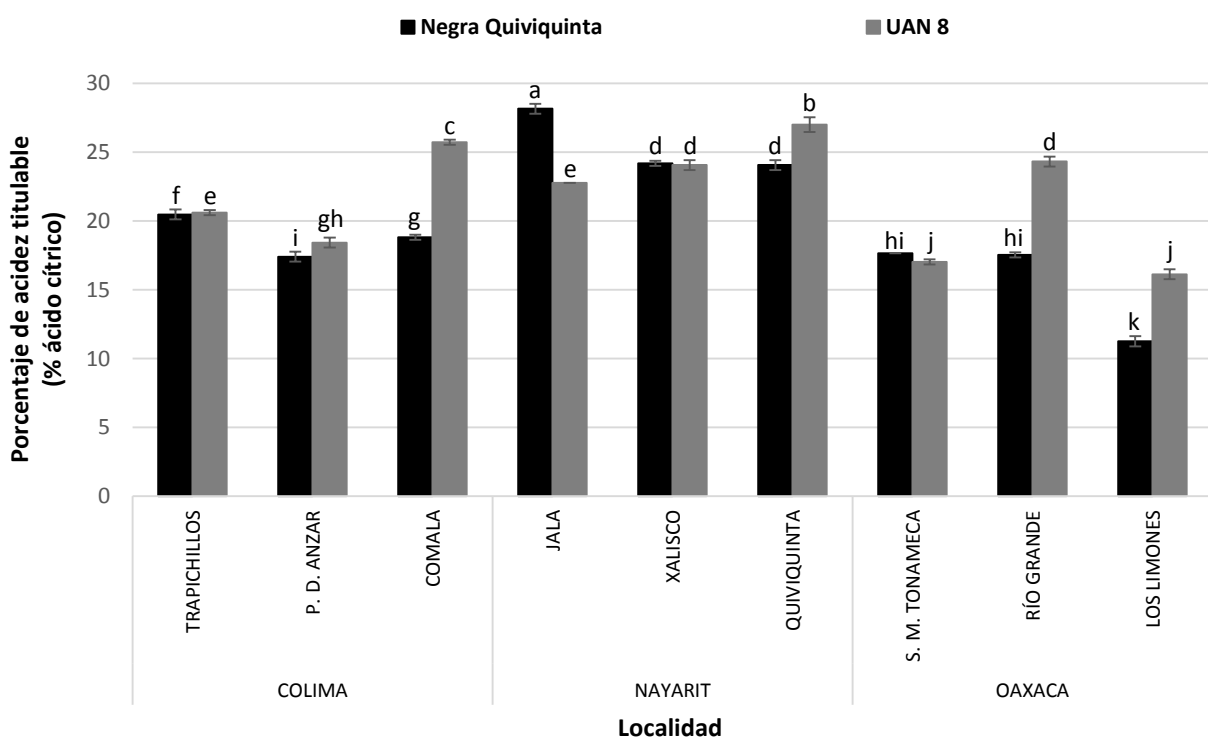


Figura 3.7. Efecto del genotipo y la localidad en el porcentaje de acidez titulable en dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* cada una crecida en nueve localidades. DMS = 0.81 % ácido cítrico. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

Además de la localidad de Xalisco, en Trapichillos, Puerta de Anzar y Santa María Tonameca, ambas variedades también mostraron diferencias mínimas en sus valores de AT (Figura 3.7), aunque con valores inferiores que fluctuaron de 15.0 a 18.1 % de ácido cítrico. Con esta información se infiere que en estas localidades, al igual que en Xalisco, la síntesis de los ácidos orgánicos que determinan el grado de acidez en estas dos variedades de *H. sabdariffa* fue más estable que en las demás localidades probadas.

Según trabajos previos que han reportado valores de AT en genotipos nacionales de *H. sabdariffa*, como el de Galicia-Flores *et al.* (2008) y el de Salinas-Moreno *et al.* (2012), se podría inferir que el efecto varietal es el más importante para obtener un mayor AT. Sin embargo, los resultados aquí mostrados demuestran que el nivel de acidez cambia primordialmente en función del ambiente de producción, posiblemente porque el ambiente afecta la expresión génica de enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos orgánicos, ya sea para favorecerla o demeritarla. Por tanto, al igual que en el comportamiento del contenido de FST y CTA, tampoco es apropiado generalizar los efectos que los sitios de producción y la interacción G x A pueden provocar en la AT de extractos elaborados a base de *H. sabdariffa*.

3.5.5. Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos

El perfil característico de los ácidos orgánicos detectados en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* se muestra en la Figura 3.8, donde se aprecia que dicho perfil fue estable entre localidades. El perfil estuvo integrado por: 1) ácido oxálico, 2) ácido tartárico, 3) ácido málico, 4) ácido cítrico y 5) ácido succínico, además de la presencia de otro ácido no identificado (NI).

3.5.6. Contenido de ácidos orgánicos

El contenido promedio de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (representado por la suma de los contenidos de los cinco ácidos identificados, en las cinco localidades) fue estadísticamente igual ($p \geq 0.05$) entre las variedades NQ (649.9 ± 209.6 mg 100 g⁻¹ de MS) y UAN-8 (555.2 ± 89.5 mg 100 g⁻¹ de MS) (Cuadro 3.4). En ambas variedades el contenido de ácido oxálico fue el que se encontró en menor proporción, mientras que el succínico fue el más abundante; el contenido de los ácidos oxálico, tartárico, málico y succínico fue semejante en las dos variedades. El contenido de ácido cítrico fue mayor en la variedad NQ (14.7 ± 5.4 mg 100 g⁻¹ de MS) en comparación con lo cuantificado en UAN-8 (8.5 ± 1.3 mg 100 g⁻¹ de MS).

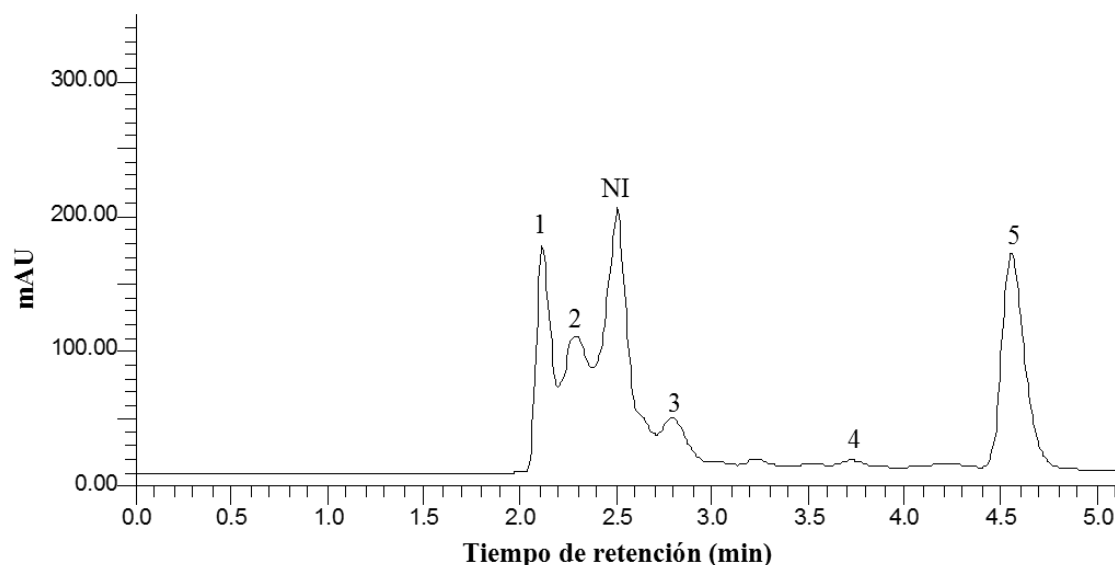


Figura 3.8. Perfil cromatográfico típico de ácidos orgánicos de cadena corta identificados en cálices de *Hibiscus sabdariffa* en los genotipos Negra Quiviquinta y UAN-8. La identidad de los picos fue: 1) ácido oxálico, 2) ácido tartárico, 3) ácido málico, 4) ácido cítrico y 5) ácido succínico. NI: No identificado.

En la variedad NQ el contenido total de ácidos orgánicos más elevado se dio en la localidad de Río Grande (Oaxaca), en donde acumuló 897.4 ± 8.6 mg 100 g^{-1} de MS, seguido de las localidades de Comala (Colima) y Jala (Nayarit), que tuvieron contenidos de ácidos orgánicos semejantes (754.5 ± 3.5 y 726.2 ± 16.7 mg 100 g^{-1} de MS) (Cuadro 3.4). El peor desempeño en esta variedad se dio en la localidad de Los Limones, donde registró un contenido total de ácidos orgánicos de 320.5 ± 4.1 mg 100 g^{-1} MS, inferior incluso al obtenido por la variedad UAN-8 (611.5 ± 2.4 mg 100 g^{-1} MS) en el mismo sitio; en esta localidad la variedad NQ también registró el valor de AT más bajo. Por su parte, la variedad UAN-8 sobresalió en las localidades de Comala (Colima) y Los Limones (Oaxaca), con contenidos de ácidos orgánicos de 690.4 ± 4.7 y 611.5 ± 2.4 mg 100 g^{-1} de MS, respectivamente.

La presencia de ácidos orgánicos como cítrico, málico, tartárico, oxálico, succínico, fórmico, acético e hibísico ha sido reportada previamente en *H. sabdariffa* (Ibrahim *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2002). Estos ácidos se consideran responsables en gran medida de la acidez que expresan los extractos acuosos de *H. sabdariffa*. El análisis de esta fracción de ácidos en otras investigaciones ha dado resultados contrastantes en la predominancia de estos compuestos. Según Cisse *et al.* (2009), los ácidos málico y oxálico son predominantes y pueden representar hasta 70 % del total de ácidos contenidos en cálices de *H. sabdariffa*. Por su parte, Wong *et al.* (2002) reportaron a los ácidos succínico y oxálico como predominantes en un genotipo crecido en Malasia, con contenidos de 510 y 430 mg 100 g^{-1} , respectivamente. Ibrahim *et al.* (2015) también reportaron la predominancia de oxálico ($342.5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) y succínico ($449 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

Los resultados de estas investigaciones y los que aquí se presentan, demuestran que los ácidos predominantes en los genotipos de *H. sabdariffa* analizados fueron el oxálico y succínico. El contenido de ácido succínico obtenido en los genotipos mexicanos analizados es comparable con

estos resultados, pero no así los contenidos de ácido oxálico, tartárico y cítrico que resultaron inferiores.

Cuadro 3.4. Concentración de ácidos orgánicos identificados en extractos acuosos de los genotipos de *Hibiscus sabdariffa* Negra Quiviquinta (NQ) y UAN-8, cada una crecida en cinco localidades.

		Ácidos orgánicos de bajo peso molecular					
Genotipo	Localidad	Oxálico	Tartárico	Málico	Cítrico	Succínico	Total
		mg 100 g ⁻¹ MS					
NQ	Comala	1.6±0.0f ^z	82.9±0.2ab	56.7±0.7de	13.0±0.5d	600.5±2.5b	754.5±3.5b
	Jala	2.4±0.1de	79.1±1.4b	56.4±0.6de	19.1±0.6b	569.2±16.8bc	726.2±16.7bc
	L. Limones	2.1±0.1ef	38.6±1.9d	60.5±2.3cd	20.5±0.2a	199.0±8.1g	320.5±4.1h
	Quiviquinta	17.7±0.3a	78.2±0.8b	62.9±13.3cd	14.2±0.0c	373.3±7.8e	546.3±22.2e
	Río Grande	3.0±0.1bc	47.5±0.4c	37.2±0.1f	6.9±0.1g	802.9±9.2a	897.4±8.6a
	Promedio	5.3±6.9A	65.2±20.6A	54.7±10.6A	14.7±5.4A	509.0±231A	649.0±209.6A
UAN-8	Comala	2.9±0.1c	47.1±0.8c	78.1±1.3bc	9.0±0.1ef	553.3±6.9cd	690.4±4.7c
	Jala	2.8±0.1cd	87.2±3.7a	111.7±4.1a	9.6±0.4e	313.9±10.4f	525.1±2.2ef
	L. Limones	1.8 ± 0.0f	45.0±1.2cd	31.3±1.4f	9.2±0.0ef	524.3±2.5d	611.5±2.4d
	Quiviquinta	3.2±0.1bc	82.7±1.6ab	90.6±0.8b	8.4±0.1f	308.2±5.4f	493.0±2.7fg
	Río Grande	3.5±0.1b	45.0±1.3cd	40.1±1.7ef	6.4±0.2g	361.2±5.4e	456.0±2.6g
	Promedio	2.8±0.6A	61.4±21.6A	70.4±32.1A	8.5±1.3B	412.2±118A	555.2±89.5A
DMS Genotipos		4.4	18.7	22.5	3.5	162.4	151.4
DMS Localidades		0.5	6.5	18.0	1.1	33.6	38.0

^z: Valores con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$), de acuerdo a la prueba de Tukey. Las letras mayúsculas representan las diferencias entre genotipos y letras minúsculas las diferencias entre localidades. DMS: Diferencia mínima significativa.

3.6. CONCLUSIONES

La calidad de los cálices de *H. sabdariffa* fue modificada por los factores genotipo, localidad y su interacción G x A. El factor principal que afectó el contenido de antocianinas y de fenoles solubles totales fue el genotipo, mientras que la acidez fue modificada principalmente por la localidad de producción. Las localidades que favorecieron a las variedades Negra Quiviquinta y UAN-8 para tener contenidos altos de fitoquímicos pero también un alto porcentaje de acidez titulable fueron los sitios del estado de Nayarit. De los ácidos orgánicos de bajo peso molecular identificados, el succínico fue el que se encontró en mayor contenido. Los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos carboxílicos no se alteraron por efecto ambiental, pero sus contenidos relativos sí fueron alterados.

3.7. LITERATURA CITADA

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1998. 16^a ed. St. Paul Minnesota, USA.

Bechoff A., M. Cissé, G. Fliedel, A.-L. Declémy, N. Ayessou, N. Akissoe, C. Touré, B. Bennet, M. Pintado, D. Pallet and K. I. Tomlins. 2014. Relationship between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of *Hibiscus* drinks. Food Chemistry 148: 112-119.

Borrás-Linares I., S. Fernández-Arroyo, D. Arráez-Román, P. A. Palmeros-Suárez, R. Del Valdía, I. Andrade-González, A. Fernández-Gutiérrez, J. F. Gómez-Leyva and A. Segura-Carretero. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Industrial Crops and Products 69: 385-394.

Cahlíková L., B. H. Ali, L. Havlíková, M. Ločárek, T. Siatka, L. Opletal and G. Blunden. 2015. Anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* calyces from Sudan. *Natural Products Communications* 10: 77-79.

Cen H., Y. Bao, Y. He and D.-W. Sun. 2007. Visible and near infrared spectroscopy detection of citric and tartaric acids in orange juice. *Journal of Food Engineering* 82: 253-260.

Christian R. K. and J. C. Jackson. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 663-667

Cisse M., M. Dornier, M. Sakho, A. Ndiaye, M. Reynes and O. Sock. 2009. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits* 64:179-193.

Fossen, T., R. Slimestad and Ø. M. Andersen. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canary grass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2318-2321.

Galicia-Flores L. A., Y. Salinas-Moreno, B. M. Espinoza-García y C. Sánchez-Feria. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 121-129.

Ibrahim S. K., B. A. Hasan and K. D. Khalaf. 2015. Separation and determination of some organic acids in dry calyces of Iraqui *Hibiscus sabdariffa* Linn. *Baghdad Science Journal* 12: 340-349.

Jaakola L. and A. Hohtola. 2010. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant Cell & Environment* 33: 1239-1247.

Juliani H. R., C. R. Welch, Q. Wu, B. Diouf, D. Malainy and J. E. Simon. 2009. Chemistry and quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science* 74: 113-121.

Daniel D. L., B. E. Barragan H., I. Anaya S. and M. G. Vizcarra M. 2012. Effect of fixed bed drying on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Industrial Crop and Products* 40: 268-276.

Ojeda D., E. Jiménez-Ferrer, A. Zamilpa, A. Herrera-Arellano, J. Tortoriello and L. Alvarez. 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-*O*-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 7-10.

Ottai M., A. Abdel-Moniem and R. A. El-Mergawi. 2004. Effect of variety and location on growth and yield components of roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. and its infestation whit the spiny bollworm *Earias insulana* (Boisd). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37: 215-231.

Ramirez-Rodrigues M. M., M. L. Plaza, A. Azeredo, M. O. Balaban and M. R. Marshall. 2011. Physicochemical and Phytochemical properties of cold and hot wáter extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science* 76: 428-435.

Reyes-Luengas A., Y. Salinas-Moreno Y., M. E. Ovando-Cruz, R. I. Arteaga-Garibay y M. D. Martínez-Peña. 2015. Analysis of phenolic acids and antioxidant activity of aqueous extracts of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) varieties with calyxes of different colors. *Agrociencia* 49: 277-290.

Robbin R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887.

Rodríguez-Medina I. C., R. Beltran-Debón, V. M. Molina, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, J. A. Menéndez, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez. 2009. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of Separation Science* 32: 3441-3448.

Salinas-Moreno Y., A. R. E. Zuñiga-Hernández, L. B. Jiménez-De la Torre, V. Serrano-Altamirano and C. Sánchez-Feria. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 395-407.

Sant'Anna V., P. D. Gurak, L. D. Ferreira M. and I. C Tessaro. 2013. Tracking bioactive compounds with color changes in foods – A review. *Dyes and Pigments* 98: 601-608.

Segura-Carretero A., M. A. Puertas-Mejía, S. Cortacero-Ramírez, R. Beltrán, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, G. Dinelli and A. Fernández-Gutiérrez. 2008. Selective extraction, separation and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis* 29: 2852-2861.

Singleton V. L. and J. A. Rossi. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Torres-Morán M. I., M. Escoto-Delgado, J. Ron-Parra, G. Parra-Tovar, S. Mena-Munguía, A. Rodríguez-García, A. Rodríguez-Sahagún and O. Castellanos-Hernández. Relationships among

twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Industrial Crops and Products* 34: 1079-1083.

Tsai, P.-J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.

Wong P.-K., S. Yusof, H. M. Ghazali and Y. B. Che M. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science* 32: 68-73.

Zhang B., G. Mao, D. Zheng, T. Zhao, Y. Zou, H. Qu, F. Li, B. Zhu, L. Yang and X. Wu. 2014. Separation, identification, antioxidant, and anti-tumor activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *Separation Science and Technology* 49: 1379-1388.

4. EFECTO DEL DESHIDRATADO EN LOS PERFILES CROMATOGRÁFICOS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÁLICES DE

Hibiscus sabdariffa

César Sánchez-Feria^{1*}, María Luisa Machuca-Sánchez², Francisco de Jesús Caro-Velarde³, Yolanda Salinas-Moreno⁴, Víctor A. González-Hernández¹, Ma. Carmen Ybarra-Moncada⁵ y R. Marcos Soto-Hernández⁶

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Fisiología Vegetal y ⁶Posgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ²Dirección de Fortalecimiento a la Investigación. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura Amado Nervo. 63190, Tepic, Nayarit. ³Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic – Compostela, km 9. 63780, Xalisco, Nayarit. ⁴Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP. km 8 Carretera Tepatitlán – Lagos de Moreno. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. ⁵Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Texcoco, Edo. México.

*Autor para correspondencia: safece_c@hotmail.com

4.1. RESUMEN

El deshidratado de cálices es un proceso necesario que reduce el elevado contenido de agua en los cálices de *H. sabdariffa* para poder conservarlos. El deshidratado tradicional consiste en la exposición directa de los cálices a la radiación solar, lo que incrementa los periodos de deshidratado y la proliferación de hongos en los cálices cuando aumenta la humedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos de deshidratado de cálices frescos (TDC) en los contenidos de fenoles solubles totales (FST), antocianinas (CTA) y ácidos

orgánicos en las variedades Negra Quiviquinta (NQ, cálices rojo oscuro), UAN-9 (cálices rojo claro) y UAN16-1 (cálices verde-amarillos) de *H. sabdariffa*, así como evaluar los cambios en los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos que indican la calidad de *H. sabdariffa*. Los TDC evaluados fueron: exposición directa al sol (TDCS), 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C. El efecto de la variedad fue el factor principal de variación en el contenido de FST y CTA en los extractos de las variedades NQ, UAN-9 y UAN 16-1. Sin embargo, los tratamientos TDCS y de 40 °C promovieron la mayor disminución de FST y CTA en los genotipos de *H. sabdariffa*, así como una mayor reducción de la acidez en los extractos de las variedades estudiadas. Los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos no fueron afectados por los TDC, en donde delfinidina 3-sambubiosido y cianidina 3-sambubiosido fueron las antocianinas más importantes; el ácido málico y succínico fueron los ácidos orgánicos que se encontraron en mayor proporción en los extractos acuosos. El uso de estufas deshidratadoras fue una opción que favoreció la preservación de los fitoquímicos contenidos en los cálices y extractos de *H. sabdariffa*.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, fenólicos solubles totales, antocianinas, color, acidez.

4.2. ABSTRACT

Dehydration is a necessary process to reduce the high water content in the calyces of *H. sabdariffa* in order to preserve them. Traditional dehydration consists of direct exposure of the calyces to solar radiation, which increases the dehydration period and promotes the proliferation of fungi in the calyces when the air moisture increases. The objective of this work was to evaluate the effect of different dehydration treatments of fresh calyces (TDC) on the contents of total soluble phenols (FST), anthocyanins (CTA) and organic acids in the varieties Negra

Quiviquinta (NQ, red dark calyces), UAN-9 (light red calyces) and UAN16-1 (green-yellow calyces) of *H. sabdariffa*, as well as to evaluate the changes in chromatographic profiles of anthocyanins and organic acids, variables that indicate the quality of *H. sabdariffa*. The dehydration treatments (TDC) evaluated here were: direct sun exposure (TDCS), 40 °C, 50 °C, 60 °C and 70 °C. The effect of the variety was the main factor of variation in the content of FST and CTA in the extracts of varieties NQ, UAN-9 and UAN 16-1. However, the TDCS and 40 °C treatments promoted the greatest decrease of FST and CTA in all the studied genotypes of *H. sabdariffa*, as well as a greater reduction of the acidity in their extracts. Chromatographic profiles of anthocyanins and organic acids were not affected by TDC, where delphinidin 3-sambubioside and cyanidin 3-sambubioside were the most important anthocyanins; the malic and succinic acids were the organic acids found in major proportion in the aqueous extracts. The use of dehydrating ovens is then an option for the phytochemicals preservation both in calyces and extracts of *H. sabdariffa*.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, total soluble phenols, anthocyanins, color, acidity.

4.3. INTRODUCCIÓN

Hibiscus sabdariffa L., malvácea originaria del Subsahara Africano (Wilson, 1994), se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales del mundo para aprovechar sus cálices en la elaboración de platillos culinarios, aunque su principal uso es como ingrediente de extractos y concentrados acuosos para elaborar bebidas refrescantes, debido a su color rojo y sabor ácido característicos (Cid-Ortega y Guerrero-Beltrán, 2015).

La calidad de los cálices de jamaica se define principalmente en función de sus atributos de color, acidez e inocuidad. El color es resultado del contenido de antocianinas, pigmentos

hidrosolubles responsables de la coloración roja en los cálices de jamaica (Christian y Jackson, 2009; Salinas-Moreno *et al.*, 2012); mientras que su acidez es debida al contenido y balance de ácidos orgánicos como son el cítrico, málico, oxálico, succínico y tartárico (Ibrahim *et al.*, 2015).

Los cálices frescos de *H. sabdariffa* contienen alrededor de 90 % de humedad, por lo que es necesario someterlos a un proceso de deshidratación hasta reducir su humedad a 12 % para su adecuada conservación, transportación y almacenamiento (NMX-FF-115-SCFI-2010). El proceso tradicional de deshidratado consiste en extender los cálices en el suelo y exponerlos directamente a la radiación solar por tres o cuatro días (Meza-Jiménez *et al.*, 2009), el periodo que puede alargarse si las condiciones ambientales no permiten lograr la pérdida de humedad requerida.

La deshidratación de los cálices previene la proliferación de microorganismos, muchos de ellos presentes desde la cosecha, al reducir su actividad de agua (a_w) (Hahn *et al.*, 2011), lo que a su vez limita la actividad de enzimas como polifenol oxidasa (responsable de la oxidación de compuestos fenólicos que pueden producir alteraciones de color) y poligalacturonasa (que degrada el ácido galacturónico de paredes celulares) (Ong y Law, 2010), que pueden demeritar la calidad de los cálices o provocar su descomposición. Sin embargo, algunos efectos negativos del deshidratado tradicional son el incremento de la carga microbiana debido al contacto de los cálices con el suelo y los periodos prolongados de exposición de los cálices a factores adversos, como son las altas temperaturas y la luz (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009), que reducen el contenido de fitoquímicos, principalmente el de antocianinas, y alteran el color de los cálices.

En años recientes la presencia de lluvias en algunas regiones productoras de Guerrero y Nayarit, han dificultado la cosecha y el adecuado deshidratado de los cálices, que han provocado pérdidas considerables de cálices por la proliferación de microorganismos (Hernández-Morales

2016²; Caro -Velarde 2015³, Com. pers.), por lo cual el uso de dispositivos deshidratadores es una opción para reducir el periodo de deshidratado y obtener cálices de mayor calidad en comparación con los obtenidos en el proceso tradicional (Meza-Jiménez, 2008).

Por tales razones, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tratamientos de deshidratado de cálices frescos en los contenidos de fenoles solubles totales, antocianinas y ácidos orgánicos de tres variedades de *H. sabdariffa*, así como evaluar los cambios en los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos que contribuyen en la calidad de *H. sabdariffa*.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Material vegetal

Se utilizaron tres variedades de *H. sabdariffa* L.: Negra Quiviquinta (cálices rojo oscuro), UAN 9 (cálices rojo claro) y UAN 16-1 (cálices verde-amarillos), crecidas y cosechadas en el año 2015 en el municipio de Acaponeta, Nayarit. El manejo agronómico aplicado en cada variedad fue el que comúnmente se practica en la región de producción.

4.4.2. Tratamientos de deshidratado de cálices (TDC)

Los TDC de *H. sabdariffa* se realizaron en un deshidratador comercial (EBERHARD® MFG. Co.), donde se aplicaron tres temperaturas (50, 60 y 70 °C, durante 8, 6 y 4 h, respectivamente). Para cada TDC se usaron 5 kg de cálices frescos por variedad. Un tratamiento adicional de

² Dr. Javier Hernández-Morales. Líder del proyecto de investigación “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerante a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”, financiado por el CONACyT. Profesor Investigador del Programa de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. México.

³ M. C. Francisco de Jesús Caro-Velarde. Fitomejorador e investigador de sistemas de producción de jamaica.

deshidratado de cálices a 40 °C se llevó a cabo en una estufa de convección de aire (Felisa modelo 132), ya que no fue posible aplicar esta temperatura en el equipo de deshidratación comercial; este tratamiento duró 96 h porque en las primeras 48 h hubo necesidad de eliminar el agua condensada al interior de la estufa.

El deshidratado por exposición directa al sol se hizo colocando los cálices sobre una superficie de concreto expuesta a radiación solar, durante 6 días debido a que las muestras se guardaban ante amenaza de lluvia. La presencia de días lluviosos y nublados, así como el largo periodo de este tratamiento, provocó la proliferación de hongos en los cálices.

Todas las muestras deshidratadas se conservaron en bolsas de plástico tipo ‘ziploc’ (USA) en condiciones de oscuridad, hasta su procesamiento en el laboratorio.

4.4.3. Preparación de los extractos acuosos

Se empleó el método descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008), en el cual 2.5 g de cálices en base seca y 100 mL de agua destilada se llevaron a ebullición durante 15 min en un vaso de precipitados de 600 mL, para enseguida separar el extracto por decantación. La extracción se repitió una vez más bajo las mismas condiciones, y al final se mezclaron ambas extracciones; posteriormente se procedió a filtrar la mezcla con papel filtro Whatman No. 4 para luego aforar a 200 mL con agua destilada. A partir de este extracto final se realizaron todas las determinaciones, excepto el análisis de ácidos orgánicos.

4.4.4. Fenoles solubles totales (FST)

Se usó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Un volumen de 100 µL de extracto acuoso se mezcló con 125 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma Aldrich®), se

dejó reaccionar por 6 min en oscuridad; después se neutralizó con 1250 μL de carbonato de sodio (JT Baker®) a 19 % (p/v), y el volumen final se ajustó a 3 mL con agua destilada. La muestra se agitó y se dejó reaccionar por 90 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (PerkinElmer®, Lambda 25 UV/Vis) a 760 nm, por cuadruplicado. Se elaboró una curva patrón de ácido gálico (20 a 100 ppm), y los contenidos se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca (mg EAG 100 g^{-1} MS).

4.4.5. Contenido total de antocianinas (CTA)

Se midió la absorbancia del extracto acuoso diluido (factor de dilución = 5) con un espectrofotómetro PerkinElmer® (Lambda 25 UV/Vis), conforme al procedimiento descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Se elaboró una curva estándar con cianidina 3-glucósido (Polyphenols®, Nw) con concentraciones que variaron de 0 a 30 ppm, para expresar el contenido de antocianinas totales como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido por 100 g de materia seca (mg EC3G 100 g^{-1} MS). Esta determinación se realizó por cuadruplicado.

4.4.6. Perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Cada muestra de extracto acuoso (2 mL) se filtró con un acrodisco de nailon (0.45 μm , Chromafil® Xtra), y se depositó en un vial ámbar que se mantuvo a 4 °C hasta su análisis. Se utilizó un equipo PerkinElmer® Series 200, equipado con una columna C18 hypersil ODS (200 x 4.6 mm, 5 μm). El método de análisis empleado fue el descrito por Fossen *et al.* (2001) que utiliza un sistema de gradientes con dos disolventes: ácido fórmico (Merck®):agua (JT Baker®) (1:9 v/v); y ácido fórmico:agua:metanol (JT Baker®) (1:4:5 v/v/v). Todos los solventes empleados fueron grado HPLC. El volumen de muestra inyectado fue de 10 μL y el tiempo de

corrida de 21 min a temperatura de 25 °C, con un flujo de 1.2 mL min⁻¹. La detección e identificación de las antocianinas se hizo a 520 nm, con estándares comerciales.

4.4.7. Color en extractos acuosos

Se utilizó un colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus (modelo 45/0-L) en la escala CIE L*a*b*, con iluminante D65 y un ángulo 10°. Se obtuvieron los valores de L* que representa la luminosidad de las muestras; además de los valores de a*, la coordenada que tiende al rojo (valores positivos) o hacia el verde (valores negativos), y b*, la coordenada que tiende al amarillo (valores positivos) o hacia el azul (valores negativos) (Jha, 2010). Un volumen de 50 mL de extracto acuoso se depositó en una copa de cristal (accesorio No. 04-7209-00), a la que se introdujo un aro negro que en su parte superior sostenía un mosaico blanco con 90 % de reflectancia (accesorio No. 02-4579-00). La copa de cristal se cubrió con una trampa de luz (accesorio No. 04-7209-00), y se tomó la lectura con el colorímetro para registrar los valores L*, a* y b*. La diferencia total de color (ΔE) se calculó de acuerdo con la Guía CIE 1976 (Sharma, 2003) mediante la expresión:

$$\Delta E^* = [(L^*-L_0)^2 + (a^*-a_0)^2 + (b^*-b_0)^2]^{1/2}$$

Donde los valores de L*, a* y b* corresponden a las respuestas de las variables bajo el efecto de los tratamientos a comparar (TDC, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C) y L₀, a₀ y b₀ a los del extracto de cálices frescos en cada variedad. Los valores de ΔE entre los TDC y el extracto de cálices frescos no deben exceder de 5 unidades para considerarse semejante. Los cuadros de referencia de color (RC*), también llamados espacios de color, se generaron al convertir los valores de L*, a* y b* mediante un convertidor de información (<http://colormine.org/color-converter>) y el programa PowerPoint de Microsoft Office® 2013.

4.4.8. Acidez titulable (AT)

Se cuantificó por cuadruplicado por el método 942.15 (AOAC, 1998), en una alícuota de 10 mL que se diluyó hasta 200 mL con agua destilada. Se usó fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH 0.1 N (JT Baker®). La acidez se expresó como porcentaje de ácido cítrico.

4.4.9. Extracción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular

Los cálices secos procedentes de los distintos TDC se molieron en un molino de martillos (IKA®, modelo MF 10), equipado con una malla de 0.5 mm. En esta determinación se emplearon cálices liofilizados en lugar de cálices frescos, para que el efecto del molido no afectara los resultados. Las harinas se deshidrataron hasta peso constante en una estufa a 40 °C durante 12 h. La extracción se hizo a partir de 0.5 g de harina en 25 mL de agua bi-destilada. La muestra se colocó en un baño ultrasónico (Branson® 2510) durante 15 min, y posteriormente en agitación horizontal (Gyratory Shaker®, modelo G10, USA) por 30 min, para después refrigerarse a 4 °C por 90 min. Las muestras fueron filtraron en papel Whatman No. 4 y aforadas a 25 mL. Del extracto se filtraron 2 mL en un acrodisco con membrana de nailon (0.45 µm, Chromafil® Xtra), y se almacenaron en viales ámbar a 4 °C hasta su análisis por HPLC.

4.4.10. Análisis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por HPLC

Este análisis se hizo con el mismo equipo empleado en el análisis de antocianinas. Las condiciones de trabajo se estandarizaron según lo descrito por Cen *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Como fase móvil se empleó una mezcla de fosfato de potasio 0.01M (pH 2.4, ajustado con ácido fosfórico) y metanol grado HPLC en proporción 95:5 (v/v). Se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (200 x 4.6 mm, 5 µm), el tiempo de corrida fue de 10 min con un

flujo de 1.0 mL min⁻¹, a una temperatura de trabajo de 30 °C. El volumen de muestra inyectado fue de 10 µL. La detección se hizo a 214 nm. Los estándares empleados para elaborar curvas de calibración para la identificación y cuantificación de ácidos orgánicos fueron: ácido málico (100 a 500 ppm), ácidos cítrico, oxálico y succínico (100 a 300 ppm), y ácido tartárico (20 a 100 ppm).

4.4.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada variable estudiada fueron sometidos a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado, con un arreglo de dos factores: 1) variedades (Negra Quiviquinta, UAN-9 y UAN 16-1), y 2) tratamientos de deshidratado de cálices (frescos, secado al sol, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C); el análisis de los cálices en estado fresco se incluyó como testigo para cuantificar la pérdida de fitoquímicos debida al deshidratado. Adicionalmente se realizó una comparación múltiple de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) para identificar a los tratamientos que disminuyeron en menor proporción el contenido de fitoquímicos, así como su acidez, en cada una de las variedades estudiadas. El paquete estadístico empleado fue SAS System Versión 9.0.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de humedad retenida en los cálices posterior a la aplicación de los tratamientos de deshidratado a los que fueron sometidos fue de entre 10 y 13 % para las tres variedades analizadas, por lo que todas las muestras de los diferentes tratamientos de deshidratado presentaron una humedad cercana al 12 %, que señala la norma (NMX-FF-115-SCFI-2010).

4.5.1. Análisis de varianza

El análisis de varianza reveló que el contenido de FST, CTA, la AT y las características de color (luminosidad, a* y b*) evaluadas en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* sufrieron

cambios significativos ($p \leq 0.01$) por efecto de los factores variedad (V) y tratamiento de deshidratado de cálices (TDC), así como por la interacción de ambos factores (V x TDC), aunque en distintas proporciones (Cuadro 4.1). Las sumas de cuadrados expusieron que los contenidos de FST y CTA en las variedades evaluadas fueron afectadas principalmente por el genotipo, ya que este factor explicó 86.2 y 93.5 % de la variación debida a tratamientos, respectivamente; mientras que los tratamientos de deshidratado de los cálices y la interacción V x TDC explicaron 12.5 y 1.3 % de la variación restante en FST y 4.6 y 1.9 % en el caso del CTA.

Al igual que las variables fitoquímicas, las variables descriptoras del color de los extractos acuosos (luminosidad, a^* y b^*) también fueron afectadas primordialmente por la variedad (69.2 a 99.3 %); los TDC y la interacción V x TDC representaron el resto de los efectos de los tratamientos, que fueron de 0.2 a 5.6 % en su conjunto; sólo en el caso de b^* el valor de la interacción representó 25.2 % del total de los efectos. Al igual que en evaluaciones previas de esta misma tesis, en el comportamiento de la AT se observó un resultado opuesto ya que los TDC afectaron de manera más contundente a esta variable (72.4 %) en comparación con los efectos de la variedad (25.7 %) y de la o su interacción V x TDC (1.9 %) (Cuadro 4.1).

El efecto tan elevado que presentó el factor variedad en las variables fitoquímicas y de color en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* evaluados, confirma lo reportado en los capítulos anteriores de esta tesis en cuanto al efecto de la variedad en los contenidos de FST, CTA y en sus características de color (luminosidad y sus valores de a^* y b^*), características determinadas primordialmente por el genotipo. Los resultados también confirman la supremacía del efecto ambiental en el comportamiento de la AT.

Cuadro 4.1. Sumas de cuadrados correspondiente al análisis de varianza aplicado a las variables FST, CTA, AT y descriptores de color (luminosidad, a* y b*) en extractos acuosos de cálices de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa* deshidratadas a seis es temperaturas.

Variable	Variedad (V)		TDC		Interacción G x TDC	
	gl = 2	%	gl = 5	%	gl = 10	%
FST	12743982**	86.2	1845001**	12.5	199420**	1.3
CTA	6582931**	93.5	325906**	4.6	135454**	1.9
AT	333**	25.7	937**	72.4	24**	1.9
Luminosidad	27111**	99.3	147**	0.5	48**	0.2
a*	27724**	98.9	176**	0.6	134**	0.5
b*	2150**	69.2	175**	5.6	782**	25.2

TDC: Tratamiento de deshidratado de cálices; FST: fenoles solubles totales; CTA: contenido total de antocianinas; AT: acidez titulable.

La interacción G y TDC, aunque estadísticamente significativa en todos los casos ($p < 0.01$), apenas representó de 0.2 a 1.9 % de la variación en todas las características (Cuadro 4.1), excepto en b* donde influyó con 25 %. Es decir, los genes son los principales responsables de la calidad de la jamaica, excepto en AT y en los valores de b*.

4.5.2. Fenoles solubles totales (FST)

Los FST de extractos acuosos de jamaica comprenden principalmente a los ácidos fenólicos, proantocianidinas, antocianinas y otros flavonoides. Los resultados muestran la reducción de esta fracción en las variedades evaluadas debida a los TDC evaluados ($p \leq 0.05$) (Figura 4.1). La variedad NQ presentó un contenido significativamente superior de FST en sus cálices en estado

fresco (3936 mg EAG 100 g⁻¹ MS) en comparación con las variedades UAN-9 (3241 mg EAG 100 g⁻¹ MS) y UAN 16-1 (2925 mg EAG 100 g⁻¹ MS).

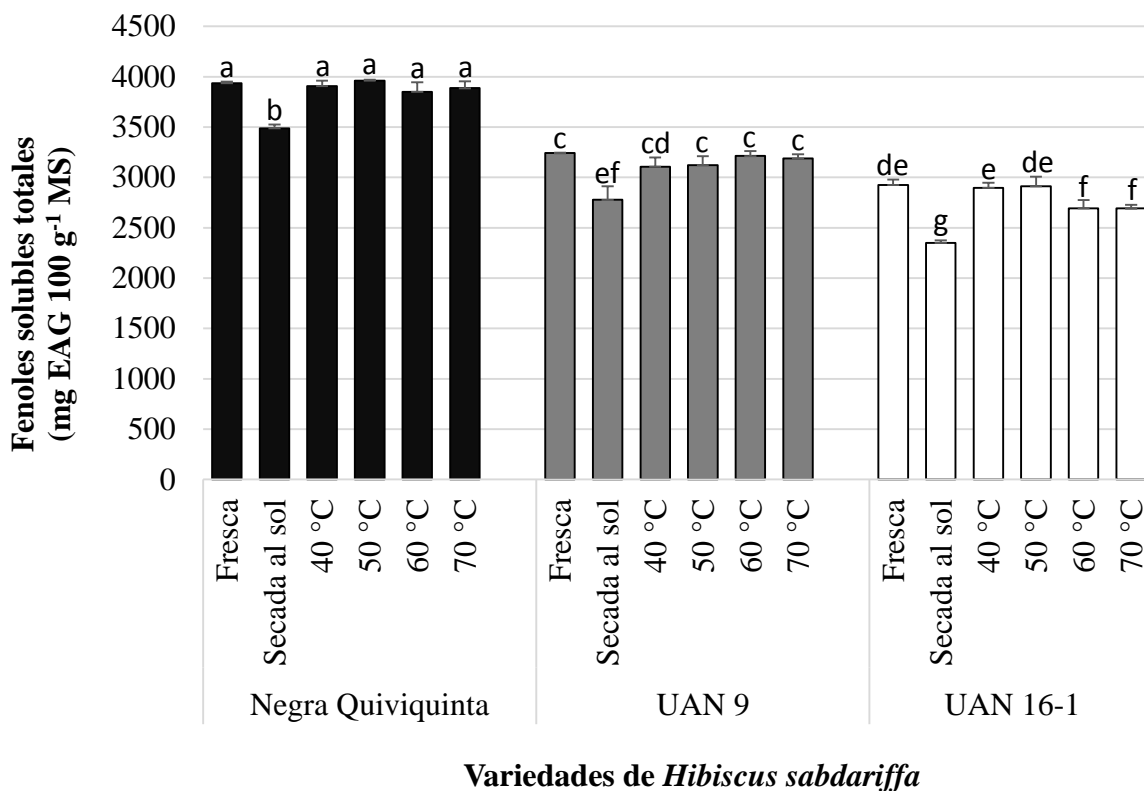


Figura 4.1. Efecto de tratamientos de deshidratado de cálices en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales (FST) en tres variedades de *Hibiscus sabdariffa*. DMS=197 mg EAG 100 g⁻¹ MS. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

Las variedades NQ y UAN-9, de cálices rojos, presentaron dentro de ellas un comportamiento semejante a través de los TDC evaluados. El TDC por exposición directa al sol (TDCS), causó las mayores pérdidas de FST (Figura 4.1), al reducir en 11.4 % (448 mg EAG 100 g⁻¹ MS) el

contenido de FST en NQ; en la variedad UAN-9 la pérdida de FST fue de 14.3 % (464 mg EAG 100 g⁻¹ MS). Los TDC restantes no modificaron el contenido de FST registrado en los cálices frescos de estas variedades ($p \leq 0.05$).

En la variedad UAN 16-1, que careció prácticamente de antocianinas, el TDCS disminuyó en 19.7 % (575 mg EAG 100 g⁻¹ MS) el contenido de FST (Figura 4.1), por lo que esta variedad fue la más afectada por este tratamiento; los TDC a 60 y 70 °C afectaron sólo en 8.0 % el contenido de FST (233 mg EAG 100 g⁻¹ MS). Los TDC de 40 y 50 °C no afectaron el contenido de FST con respecto al cuantificado en sus cálices frescos ($p \leq 0.05$).

La degradación de FST en el TDCS, puede explicarse debido a que el periodo de deshidratado fue muy prolongado (6 días) lo cual provocó: 1) la exposición de la fracción de antocianinas a condiciones de intensidad de luz, presencia de oxígeno y temperatura favorable para su degradación, como postularon Castañeda-Ovando *et al.* (2009); y 2) una mayor actividad de agua (a_w) debida a la paulatina reducción de agua en los cálices que permitió una mayor acción enzimática, por ejemplo de la polifenol oxidasa que es capaz de catalizar la oxidación del ácido clorogénico, principal ácido fenólico presente en cálices de jamaica (Segura-Carretero *et al.*, 2008), en su o-quinona (clorogenoquinona) (Petras *et al.*, 2010) de menor peso molecular. Debido a este efecto enzimático, el contenido de FST en la variedad UAN 16-1 pudo ser inferior, ya que las variedades de cálices verde-amarillos se caracterizan por tener un contenido mayor de ácido clorogénico y de sus derivados (Reyes-Luengas *et al.*, 2015), además la clorogenoquinona se relaciona con el color amarillo pardo característico de esta variedad.

4.5.3. Contenido de antocianinas totales (CTA)

El CTA en los extractos acuosos de los cálices deshidratados bajo diferentes TDC probados en las tres variedades de *H. sabdariffa* se muestran en la Figura 4.2. De acuerdo con lo esperado, la variedad de cálices oscuros (NQ) fue la de mayor contenido, tanto en sus cálices en estado fresco como en los deshidratados. En contraste en la variedad de cálices verde-amarillos (UAN 16-1) la presencia de antocianinas fue marginal. Los cálices frescos de las variedades NQ, UAN-9 y UAN 16-1 registraron un CTA de 964, 523 y 72 mg EC3G 100 g⁻¹ MS, respectivamente.

En las variedades de cálices rojos, el TDCS redujo en mayor cantidad el CTA, en tanto que los TDC a 50, 60 y 70 °C fueron los que menor degradación del CTA causaron. En la variedad NQ el tratamiento TDCS redujo el CTA en 35 % (335 mg EC3G 100 g⁻¹ MS). De los cuatro tratamientos de deshidratación en los que se aplicó calor, el de menor temperatura fue el que ocasionó una mayor degradación de antocianinas (Figura 4.2). Esto se atribuye al prolongado periodo de deshidratado (96 horas) que se aplicó en este tratamiento. Diversos autores han señalado que en los procesos de deshidratación de frutas y vegetales, el incrementar temperatura y reducir tiempo es en muchos de los casos más favorable para la preservación de estos compuestos que tiempos prolongados a bajas temperatura (Heras-Ramírez *et al.*, 2012; Vega-Gálvez *et al.*, 2012). Este mismo comportamiento se presentó durante la deshidratación de los cálices de jamaica.

Destaca que el efecto del método de deshidratado fue evidente en la variable CTA, pero no en los FST, ya que en las variedades NQ y UAN-9 únicamente el tratamiento TDCS abatió los FST lo suficiente como para ser estadísticamente menor ($p \leq 0.05$) a los FST del resto de los tratamientos (Figura 4.1). Dado que las antocianinas forman parte de los FST, debería observarse

una tendencia similar entre ambas variables por efecto del deshidratado. Sin embargo, esto no ocurre debido a que los productos de la degradación térmica de las antocianinas son ácidos fenólicos (como ácido protocatecuico y ácido *p*-hidroxibenzoico), cloroglucinaldehído (Petras *et al.*, 2010) y chalconas (Sadilova *et al.*, 2007) que son compuestos que reaccionan con el reactivo de Folin usado para la cuantificación de FST.

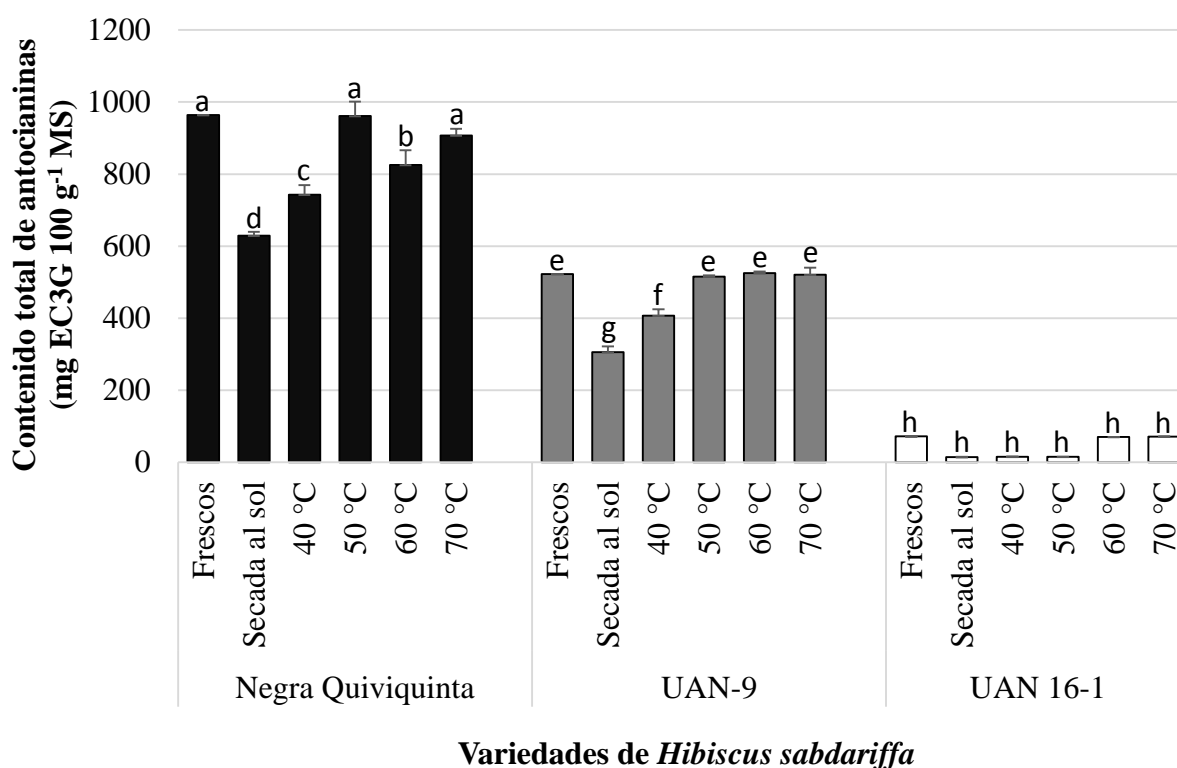


Figura 4.2. Efecto de los tratamientos de deshidratado de cálices en el contenido total de antocianinas de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa*. DMS = 71 mg EC3G 100 g⁻¹ MS. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

No se determinó la actividad antioxidante de los extractos, pero es muy posible que el comportamiento de esta variable fuera similar a lo observado en la variable CTA, ya que esta variable se relaciona en alto grado con la actividad antioxidante de los extractos (Fernández-Arrollo *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los tratamientos de deshidratado a temperaturas entre 40 y 70 °C y con periodos más breves de tiempo de deshidratado preservaron los FST contenidos en los cálices de las variedades rojas. En la variedad UAN 16-1 los TDC de 60 y 70 °C provocaron la degradación de una mayor cantidad de FST, en comparación con los TDC de 40 y 50 °C. Tal efecto puede ser resultado de la presencia de compuestos fenólicos más termosensibles, ya que se ha reportado diferencias entre la composición fenólica entre las variedades de *H. sabdariffa* de cálices color rojo y las variedades de cálices color verde-amarillos (Reyes-Luenga *et al.*, 2015), que presentan mayor contenido de compuestos derivados del ácido cinámico.

4.5.4. Análisis de antocianinas por HPLC

Los diferentes TDC no causaron cambios importantes en el perfil de antocianinas de los extractos acuosos de *H. sabdariffa*. La Figura 4.3 muestra los perfiles cromatográficos de las antocianinas para los TDC en la variedad NQ. Los porcentajes y contenidos de las dos antocianinas dominantes en los extractos de jamaica, delfinidina 3-sambubiósido (D3S) y cianidina 3-sambubiósido (C3S), en las variedades de cálices rojos se presentan en el Cuadro 4.2.

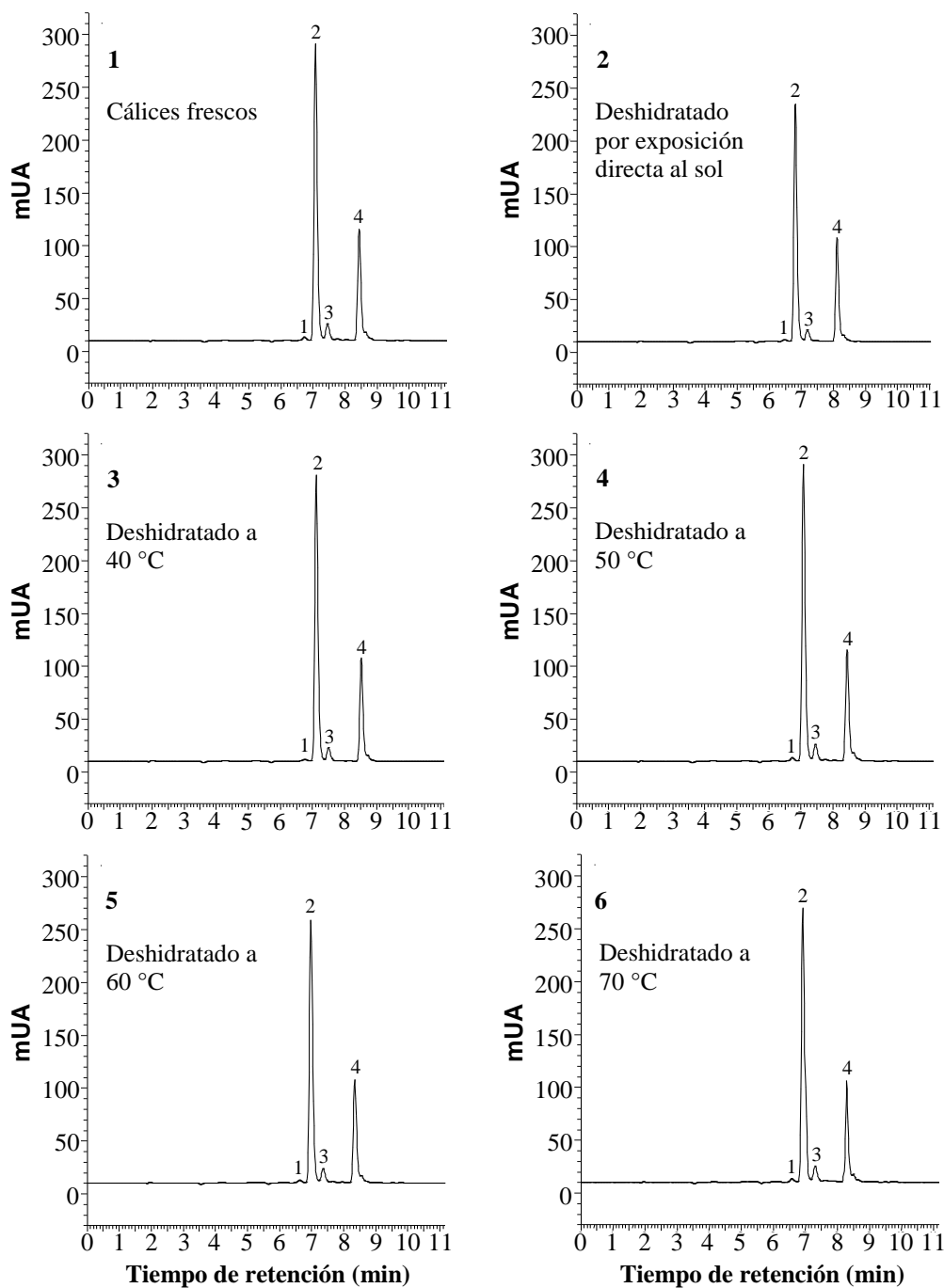


Figura 4.3. Perfil de antocianinas característico en extractos de cálices de la variedad Negra Quiviquinta de *Hibiscus sabdariffa* sometidos a diferentes tratamientos de deshidratado. La identidad de las antocianinas fue: 1) y 3) no identificadas, 2) delphinidina 3-sambubiósido y 4) cianidina 3-sambubiósido.

Cuadro 4.2. Contenido de delfinidina 3-sambubiósido (D3S) y cianidina 3-sambubiósido (C3S) en extractos de variedades de *H. sabdariffa* sometidas a distintos tratamientos de deshidratado de cálices.

Variedad	Tratamiento	D3S	D3S	C3S	C3S
		mg 100 g ⁻¹ MS	%	mg 100 ⁻¹ g MS	%
Negra Quiviquinta	Fresca	708 ± 0a	69	299 ± 0a	29
	Secado al sol	474 ± 2f	70	180 ± 1f	26
	40 °C	561 ± 3e	70	201 ± 1e	25
	50 °C	656 ± 2b	65	279 ± 1b	28
	60 °C	582 ± 3d	65	255 ± 1d	28
	70 °C	592 ± 2c	64	262 ± 1c	28
UAN-9	Fresca	355 ± 0g	66	153 ± 0h	28
	Secado al sol	211 ± 0l	65	92 ± 0k	28
	40 °C	268 ± 0k	65	116 ± 0j	28
	50 °C	339 ± 4h	62	163 ± 2g	30
	60 °C	294 ± 2j	63	134 ± 1i	29
	70 °C	305 ± 2i	62	149 ± 1h	30
DMS		8.2		3.8	

DMS: Diferencia mínima significativa ($p \leq 0.05$); los valores \pm corresponden a la desviación estándar resultante de dos réplicas en la cuantificación de D3S y C3S.

Se aprecia un ligero decremento en la fracción de D3S al incrementar la temperatura de los tratamientos de deshidratado, lo cual no sucedió en la fracción de C3S (Cuadro 4.2). Tal efecto de inestabilidad térmica de D3S ha sido reportado por Galicia-Flores *et al.* (2008) en el proceso de



















obtención de extractos acuosos de *H. sabdariffa* y por Sinela *et al.* (2017) durante el periodo de almacenamiento de extractos acuosos de *H. sabdariffa*. Este patrón se observó en las variedades de jamaica analizadas, ya que el porcentaje de C3S en los tratamiento de mayor temperatura fue numéricamente más alto que en los de baja temperatura y secado al sol.

Estos resultados sugieren que al deshidratar los cálices de *H. sabdariffa* en condiciones más severas de temperatura y mayor tiempo de deshidratado pueden provocar que el contenido relativo de D3S se reduzca, al grado de ser inferior al de C3S como reportaron Daniel *et al.* (2012), lo que pudo haber provocado cambios en la coloración de los cálices y extractos acuosos, al pasar de un color rojo-azulado a un color rojo naranja debido a la degradación de D3S como apuntaron Kong *et al.* (2003).

4.5.5. Parámetros de color en extractos acuosos

Los valores de luminosidad, a^* y b^* fueron distintos ($p \leq 0.05$) entre variedades, entre los TDC probados en cada una de las variedades estudiadas, y entre los extractos de cálices frescos comparados con los cálices deshidratados (Cuadro 4.3). Como era de esperarse los extractos derivados de la variedad UAN 16-1 fueron los más luminosos. Los tratamientos 40 °C, 60 °C y 70 °C tuvieron cada uno 57 % de luminosidad, valor que fue ligeramente inferior al obtenido en el tratamiento de 50 °C (58.0 %). La variedad NQ fue la que tuvo los extractos acuosos menos luminosos debido a los tratamientos de deshidratado (11.5 a 12.8 %) y en su extracto de cálices frescos (18.3 %) (Cuadro 4.3). En la variedad UAN-9, los tratamientos TDCS y de 50 °C tuvieron valores de luminosidad (21.0 y 21.5 %) semejantes al registrado en su extracto acuoso de cálices frescos (22.0 %), los demás tratamientos presentaron una luminosidad inferior (19.0 a 19.8 %).

Cuadro 4.3. Variación de luminosidad, a*, b*, diferencia total de color (ΔE) y referencias de color (RC*) en extractos acuosos de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa* sometidas a diferentes tratamientos de deshidratado.

Variedad	TDC	L* (%)	a*	b*	ΔE (%)	RC*
Negra Quiviquinta	Fresca	18.3 ± 0.5h	46.0 ± 0.0b	31.0 ± 0.0c	-	
	Al sol	12.8 ± 0.5i	36.5 ± 0.6g	18.5 ± 0.6jk	16.6 ± 1.0	
	40 °C	11.5 ± 0.6j	36.5 ± 0.6g	17.5 ± 0.6k	17.8 ± 1.1	
	50 °C	12.5 ± 0.6i	38.5 ± 0.6f	19.5 ± 0.6ij	14.9 ± 1.1	
	60 °C	12.0 ± 0.0ij	39.8 ± 0.5e	20.5 ± 0.6hi	13.7 ± 0.5	
	70 °C	12.3 ± 0.5ij	40.3 ± 0.5e	21.0 ± 0.0gh	13.0 ± 0.2	
UAN-9	Fresca	22.0 ± 0.0e	48.0 ± 0.0a	37.5 ± 0.6a	-	
	Al sol	21.5 ± 0.6ef	44.5 ± 0.6c	33.5 ± 0.6b	5.4 ± 1.3	
	40 °C	19.0 ± 0.0gh	43.0 ± 0.0d	29.5 ± 0.6d	9.9 ± 0.9	
	50 °C	21.0 ± 0.0f	46.0 ± 0.0b	33.0 ± 0.8b	5.0 ± 0.5	
	60 °C	19.3 ± 0.5g	46.0 ± 0.0b	33.0 ± 0.0b	5.7 ± 0.4	
	70 °C	19.8 ± 0.5g	46.5 ± 0.6b	33.8 ± 1.0b	4.7 ± 1.5	
UAN 16-1	Fresca	60.0 ± 0.0a	1.0 ± 0.0h	16.0 ± 0.0l	-	
	Al sol	56.0 ± 0.0d	1.0 ± 0.0h	28.8 ± 0.6d	13.4 ± 0.5	
	40 °C	57.0 ± 0.0c	1.0 ± 0.0h	23.5 ± 0.6e	8.1 ± 0.5	
	50 °C	58.0 ± 0.0b	2.0 ± 0.6h	20.5 ± 0.0hi	5.0 ± 0.5	
	60 °C	57.0 ± 0.0c	1.5 ± 0.6h	22.0 ± 0.0fg	6.8 ± 0.0	
	70 °C	57.0 ± 0.0c	1.5 ± 0.0h	23.0 ± 0.5ef	7.7 ± 0.0	
DMS		0.9	1.0	1.3		

Los valores de a^* (1.0 a 2.0) y b^* (20.5 a 28.8) en los extractos acuosos de la variedad UAN 16-1, indican que los colores de los extractos obtenidos de los cálices sometidos a diferentes TDC fueron de una tonalidad amarilla superior a la registrada en el extracto acuosos de cálices frescos (1.0 y 16.0), principalmente el extracto de TDCS que tuvo la diferencia total de color (ΔE) más elevada de 13.4 % con respecto al extracto obtenido de cálices frescos (Cuadro 4.3). En los demás TDC la diferencia total de color se ubicó entre 5.0 y 8.1 %, por lo cual se consideran semejantes entre ellos ya que no sobrepasan una diferencia de 5 unidades entre ellos, la cual es necesaria para que sensorialmente se identifiquen diferencias de color.

Las diferencias en la coloración de los extractos de cálices de la variedad UAN 16-1 se pueden observar en las referencias de color (RC^*) mostradas en el Cuadro 4.3. Estas diferencias en color, tal vez se debieron a que en los extractos acuosos hay una mayor expresión de pigmentos de tipo carotenoides y clorofilas, también contenidos en los cálices de *H. sabdariffa* (Gomes *et al.*, 2010), debida a la degradación del bajo contenido de antocianinas presente en esta variedad por los tratamientos de deshidratado de los cálices, provocando un incremento en los valores de la variable b^* en los extractos acuosos.

Resultados semejantes en el color de las diferentes variedades han sido reportados para extractos de *H. sabdariffa* por Ifie *et al.* (2016), Salinas-Moreno *et al.* (2012), Juliani *et al.* (2009) y Christian y Jackson (2009).

En las variedades de cálices rojos tales resultados pueden deberse a que la degradación de antocianinas en los distintos tratamientos no fue suficiente para provocar cambios contrastantes en las variables de color (luminosidad y valores de a^* y b^*) de los extractos acuosos, como se

observó en el análisis estadístico mostrado en el Cuadro 4.3 para las variables de color analizadas en este estudio.

4.5.6. Acidez titulable (AT)

La Figura 4.4 muestra los resultados obtenidos en las variedades y TDC evaluados. Las variedades UAN- 9 y UAN 16-1 tuvieron extractos más ácidos, tanto en cálices frescos como en los sometidos a los distintos TDC, en comparación con los obtenidos en la variedad NQ. En las tres variedades evaluadas la tendencia del cambio de acidez debida a los TDC fue similar; los extractos de los TDC de 50 °C, 60 °C y 70 °C fueron los que lograron una acidez semejante a la registrada en los extractos acuosos de cálices frescos de cada una de las variedades evaluadas; mientras que los tratamientos TDCS y de 40 °C provocaron una disminución de acidez en los extractos de 40 %.

Los resultados muestran que los compuestos químicos responsables de la acidez en los cálices y extractos acuosos pueden disminuir como efecto negativo de los tratamientos de deshidratado de cálices de *H. sabdariffa*, principalmente en aquellos donde el periodo de exposición es prolongado, como se observó en los TDCS y a 40 °C probados en esta investigación. Por lo cual se puede inferir que los tratamientos de deshidratado más adecuados para deshidratar los cálices de *H. sabdariffa* son aquellos en donde se exponen a temperaturas elevadas por periodos breves en estufa de secado.

4.5.7. Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos de bajo peso molecular

El perfil cromatográfico característico de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular identificados en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* se muestra en la Figura 4.5, perfil que no

se modificó con los TDC evaluados. La Figura 4.5A muestra el perfil característico de las variedades NQ y UAN-9 de cálices rojos y la Figura 4.5B muestra el de la variedad UAN 16-1 de cálices verde-amarillos, ambos perfiles fueron integrados por los ácidos: 1) oxálico, 2) tartárico, 3) málico, 4) cítrico y 5) succínico, además de la presencia de un pico no identificado (NI) que representó entre 30 y 45 % del contenido total relativo en las variedades evaluadas.

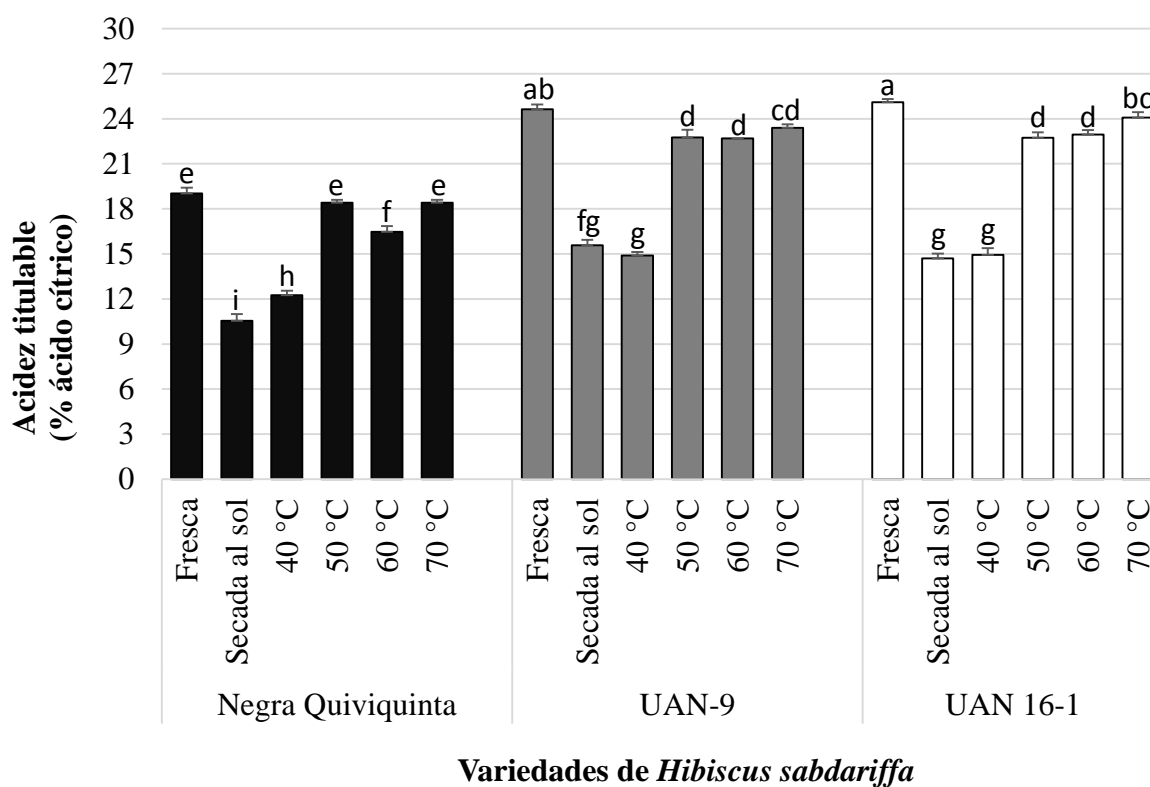


Figura 4.4. Efecto de los tratamientos de deshidratado de cálices en la acidez de extractos de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa*. DMS = .Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). Las líneas verticales en cada barra corresponden a las desviaciones estándar (n = 4).

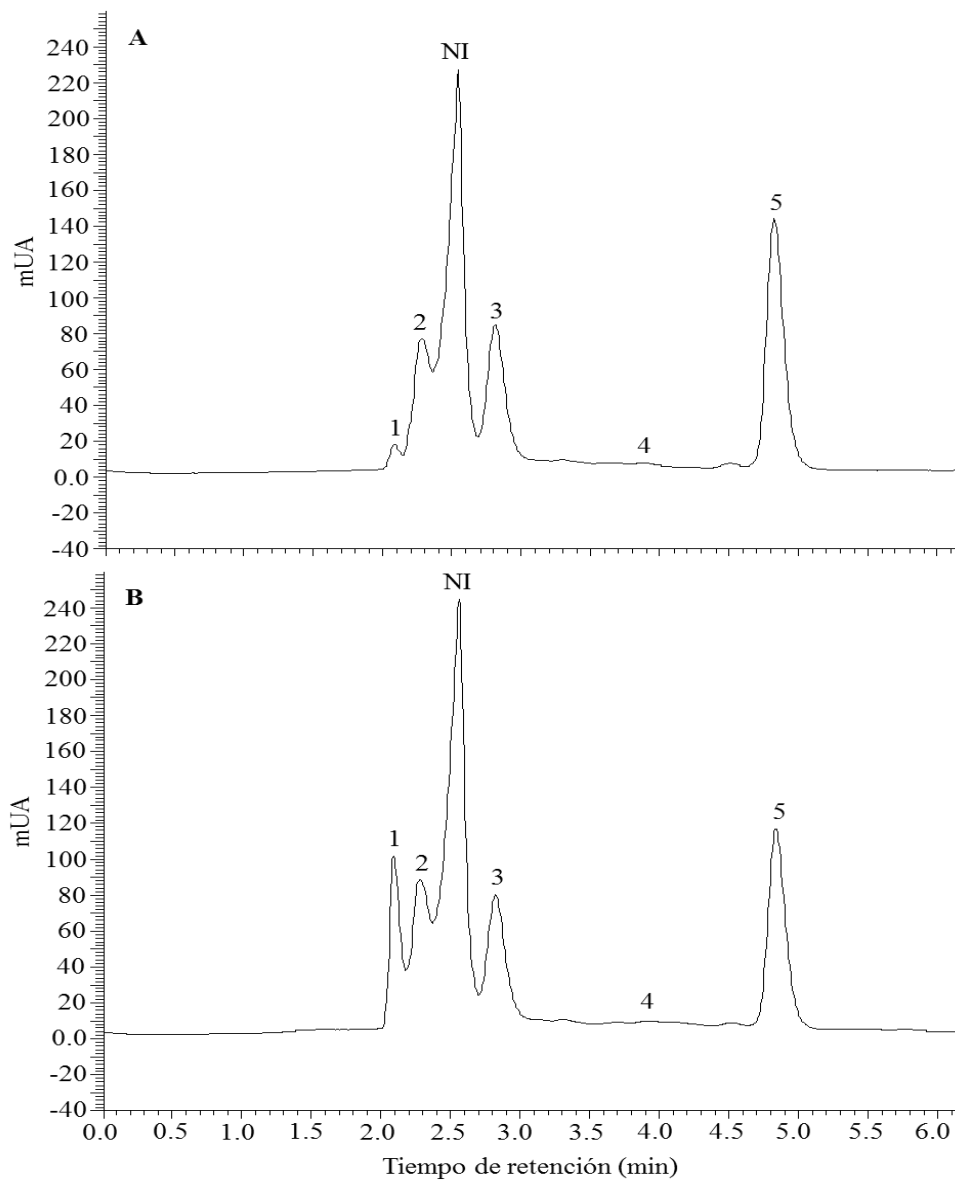


Figura 4.5. Perfiles cromatográficos de ácidos orgánicos de bajo peso molecular de las variedades de *Hibiscus sabdariffa* Negra Quiviquinta y UAN-9 (A) y UAN 16-1 (B). Los ácidos identificados en el perfil fueron: 1) oxálico, 2) tartárico, 3) málico, 4) cítrico y 5) succínico. NI: No identificado.

Según Da-Costa-Rocha *et al.* (2014) los principales ácidos orgánicos responsables de la acidez en los cálices y extractos de *H. sabdariffa* son: cítrico, hidroxicítrico, hibísico, succínico, málico y tartárico, y en menor cantidad el oxálico y ascórbico. Por lo tanto, el pico no identificado en este trabajo pueda corresponder al ácido hidroxicítrico o al ácido hibísico que son los más abundantes en cálices de *H. sabdariffa*, que pueden aportar hasta 24 % del total de los ácidos orgánicos contenidos en los cálices de *H. sabdariffa*.

4.5.8. Ácidos orgánicos de bajo peso molecular

El contenido de ácidos orgánicos dependió tanto de las variedades de *H. sabdariffa* como de los TDC aplicado ($p \leq 0.05$), cuyos resultados se muestran en el Cuadro 4.4. El ácido oxálico se encontró en menor proporción en relación a los demás ácidos identificados; en la variedad UAN 16-1 se registró un mayor contenido de este metabolito, tanto en su extracto de cálices liofilizados como en sus extractos de los TDC, y se observó que el incremento de la temperatura en los TDC provocó una disminución de este ácido en esta variedad, sólo el TDC a 70 °C preservó una mayor cantidad de ácido oxálico (7.6 mg 100 g⁻¹). Entre las variedades NQ y UAN-9 y sus TDC el contenido de ácido oxálico fue semejante.

La baja magnitud entre las diferencias de los contenidos de ácido tartárico y ácido cítrico no permitió identificar diferencias estadísticas específicas ($p \leq 0.05$) entre las tres variedades y sus TDC evaluados (Cuadro 4.4). La variación del ácido tartárico fue de 43.1 a 61.8 mg 100 g⁻¹ MS y la del ácido cítrico fue de 4.2 a 28.7 mg 100 g⁻¹ MS, entre variedades y los TDC estudiados.

En las variedades NQ y UAN-9 se cuantificó un mayor contenido de los ácidos málico (74.9 a 164.8 mg 100 g⁻¹) y succínico (78.2 a 371 mg 100 g⁻¹), en comparación al registrado en la variedad UAN 16-1. Estos ácidos fueron los más abundantes en las variedades de *H. sabdariffa*

evaluadas. Los tratamientos TDCS y 40 °C fueron los que redujeron más el contenido de ambos ácidos (Cuadro 4.4), por lo cual se infiere que son sensibles a periodos prolongados de deshidratado aunque se empleen temperaturas bajas; en la variedad UAN 16-1 los tratamientos de 50 °C y 60 °C provocaron la reducción de ácido málico en proporciones semejantes a la provocada por los tratamientos TDCS y 40 °C. El contenido de ácido succínico en los cálices liofilizados fue inferior al registrado en los extractos del TDC de 50 °C en la variedad NQ, y en las tres variedades evaluadas en el TDC de 70 °C; algo semejante ocurrió con el ácido málico en la variedad NQ. Este suceso puede indicar que durante el proceso de liofilizado hubo degradación de ácido succínico en los cálices durante su proceso de deshidratado.

Al respecto, Ardestani *et al.* (2015) mencionan que la exposición a temperaturas de congelación así como a la luz pueden inducir un decremento en que el contenido de ácidos orgánicos, como el málico y el succínico, por lo que el proceso de congelación de los cálices previo al proceso de liofilizado pudo provocar el decremento de estos ácidos en los cálices de *H. sabdariffa*. Además, los cálices de las tres variedades estuvieron expuestos a luz artificial durante el periodo de liofilizado. Por su parte, Adamczak *et al.* (2009) reportaron una mayor estabilidad de los ácidos ascórbico, málico, quínico y cítrico al proceso de liofilizado en comparación con el deshidratado térmico, lo que pudiera explicar que la NQ fuera la única de las tres variedades en presentar variación del ácido málico entre los extractos de los cálices liofilizados y con los obtenidos de los TDC de 50 °C, 60 °C y 70 °C.

Cuadro 4.4. Contenido de ácidos orgánicos en cálices de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa* sometidos a diferentes tratamientos de deshidratado.

Variedad	Tratamiento	Oxálico mg 100 g ⁻¹ MS	Tartárico	Málico	Cítrico	Succínico	Total
Nagra Quiquinta	Liofilizado	1.2 ± 0.1gh	50.7 ± 0.6fh	132.0 ± 3.3c	7.5 ± 0.6eg	325.2 ± 7.0c	516.5 ± 10.3bc
	Secada al sol	0.8 ± 0.0h	45.1 ± 0.4ij	87.3 ± 1.8de	21.6 ± 3.4ac	129.5 ± 4.0fg	284.3 ± 8.8gh
	40 °C	0.8 ± 0.0h	46.4 ± 3.1hj	88.8 ± 1.4d	24.9 ± 1.4ab	135.9 ± 7.1f	296.7 ± 10.2g
	50 °C	0.9 ± 0.0h	45.7 ± 0.3ij	149.5 ± 2.3b	5.9 ± 1.3fg	409.0 ± 9.1a	610.9 ± 12.9a
	60 °C	1.0 ± 0.0h	43.9 ± 0.7j	151.4 ± 4.4ab	28.3 ± 1.8a	309.0 ± 3.6dc	533.6 ± 10.4bc
	70 °C	0.9 ± 0.1h	43.1 ± 0.4j	159.8 ± 2.1ab	14.5 ± 3.6cf	328.8 ± 9.9c	547.0 ± 9.0b
UAN-9	Liofilizado	0.9 ± 0.1h	48.4 ± 0.3gi	153.0 ± 1.9ab	9.7 ± 1.0dg	284.3 ± 17.5d	496.3 ± 17.1cd
	Secada al sol	0.2 ± 0.0i	45.1 ± 0.7ij	74.9 ± 3.8eg	25.6 ± 1.6ab	78.2 ± 6.9h	224.0 ± 12.9i
	40 °C	0.2 ± 0.0i	45.6 ± 0.9ij	78.9 ± 4.3df	27.9 ± 2.8a	81.3 ± 6.4h	233.9 ± 14.4i
	50 °C	1.7 ± 0.0fg	52.8 ± 0.3dg	134.3 ± 5.0c	17.3 ± 6.3be	309.5 ± 15.6cd	515.6 ± 27.1bc
	60 °C	1.8 ± 0.4f	56.6 ± 0.8bd	120.7 ± 4.3c	28.7 ± 1.2a	239.8 ± 9.8e	447.6 ± 15.7de
	70 °C	0.8 ± 0.0h	51.0 ± 0.1eg	164.8 ± 0.1a	19.0 ± 0.6ad	371.9 ± 4.7b	607.4 ± 4.3a
UAN 16-1	Liofilizado	9.9 ± 0.1a	59.6 ± 0.8ab	122.0 ± 8.2c	6.6 ± 1.1fg	246.2 ± 6.4e	444.2 ± 3.8e
	Secada al sol	4.7 ± 0.0c	55.1 ± 0.0ce	64.3 ± 0.1g	27.1 ± 1.8ab	93.7 ± 2.6h	244.8 ± 4.4hi
	40 °C	4.3 ± 0.1c	56.1 ± 1.7bd	64.4 ± 2.3g	26.3 ± 3.5ab	97.9 ± 2.8gh	249.0 ± 1.5gi
	50 °C	3.5 ± 0.2d	53.9 ± 1.0cf	82.1 ± 2.0df	9.3 ± 2.4dg	245.0 ± 11.2e	393.9 ± 11.9f
	60 °C	2.8 ± 0.3e	58.2 ± 2.0ac	71.9 ± 2.4fg	4.2 ± 1.2g	221.3 ± 11.4e	358.5 ± 15.1f
	70 °C	7.6 ± 0.0b	61.8 ± 0.5a	120.8 ± 0.8c	19.2 ± 2.7ad	303.1 ± 4.3cd	512.3 ± 0.3bc
DMS		0.6	4.4	13.6	10.2	35.4	49.4

DMS: Diferencia mínima significativa.

4.6. CONCLUSIONES

El efecto de la variedad fue el principal factor de variación que causó las diferencias en contenido de fenoles solubles totales y antocianinas, así como en las diferencias de color en los extractos acuosos. La calidad de los cálices deshidratados, debida su contenido fitoquímico, también fue disminuida por los tratamientos de deshidratado probados, en especial por el deshidratado por exposición directa al sol y el deshidratado a 40 °C. El porcentaje de acidez de los extractos acuosos fue más sensible al deshidratado de cálices que a las variedades evaluadas. El método de deshidratado tradicional por exposición directa al sol junto con el de 40 °C fueron los que demeritaron más la calidad de los cálices de *H. sabdariffa*, al reducir en mayor proporción los contenidos de fenoles solubles totales y el contenido de antocianinas totales, abatir el porcentaje de acidez y modificar el color de los extractos. Los tratamientos de deshidratado que preservaron en mayor grado la composición de los cálices frescos fueron los de 60 °C y 70 °C. Los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos no fueron afectados por los tratamientos de deshidratado de cálices, pero los contenidos de los fitoquímicos si fueron modificados.

4.7. LITERATURA CITADA

Adamczak A., W. Buchwald, J. Kozłowski and S. Mielcarek. 2009. The effect of thermal and freeze drying on the content of organic acids and flavonoids in fruit of European cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.). *Herba Polonica* 55: 94-102.

Alarcón-Alonso J., A. Zamilpa, F. Alarcón A., M. Herrera-Ruíz, J. Tortoriello and E. Jimenez-Ferrer. 2012. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 751-756.

Ardestani S. B., M. A. Sahari and M. Barzegar. 2015. Effect of extraction and processing conditions on organic acids of barberry fruits. *Journal of Food Biochemistry* 39: 554-565.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1998. 16^a ed. St. Paul Minnesota, USA.

Castañeda-Ovando A., M. L. Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, J. A. Rodríguez and C. A. Galán-Vidal. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859-871.

Cen H., Y. Bao, Y. He and D-W Sun. 2007. Visible and near infrared spectroscopy detection of citric and tartaric acids in orange juice. *Journal of Food Engineering* 82: 253-260.

Christian R. K. and J. C. Jackson. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 663-667.

Cid-Ortega S. and J. A. Guerrero-Beltrán. 2015. Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *Journal of Food Science and Technology* 52: 6859-6869.

Da-Costa-Rocha I., B. Bonnlaender, H. Sievers, I. Pischel and M Heinrich. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L.: A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry* 165: 424-443.

Daniel D. L., B. E. Barragan H., I. Anaya S. and M. G. Vizcarra M. 2012. Effect of fixed bed drying on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Industrial Crop and Products* 40: 268-276.

Fernández-Arrollo S., I. C. Rodríguez-Medina, R. Beltrán-Debón, F. Pasini, J. Joven, V. Micol, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez. 2011. Quantification of the

polyphenolic fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. Food Research International 44: 1490-1495.

Fossen, T., R. Slimestad and Ø. M. Andersen. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canary grass (*Phalaris arundinacea*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2318-2321.

Galicia-Flores L. A., Y. Salinas-Moreno, B. M. Espinoza-García y C. Sánchez-Feria. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Revista Chapingo Serie Horticultura 14: 121-129.

Gomes M.E., H.R. Da-Costa, R. R. Moreira, H. J. A. Pegas, R. A. L. Lia-De-Paula and J. Saffi. 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. Food Chemistry 118: 1-10.

Hahn F., G. Hernández, J. Hernández, C. Pérez and J. M. Vargas. 2011. Optimization of roselle drying time and drying quality. Canadian Biosystems Engineering 53: 3.1-3.8.

Heras-Ramírez M. E., A. Quintero-Ramos, A. A. Camacho-Dávila, J. Barnard, R. Talamás-Abbud, J. V. Torres-Muñoz and E. Salas-Muñoz. 2012. Effect of Blanching and drying temperature on phenolic compounds stability and antioxidant capacity of Apple pomace. Food and Bioprocess Technology 5: 2201-2210.

Ibrahim S. K., B. A. Hasan and K. D. Khalaf K. 2015. Separation and determination of some organic acids in dry calyces of Iraqui *Hibiscus sabdariffa* Linn. Baghdad Science Journal 12: 340-349.

- Ifie I., L. J. Marshall, P. Ho and G. Williamson. 2016. *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extracts and wine: Phytochemicals profile, physicochemical properties, and carbohydrase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 4921-4931.
- Jha S. N. 2010. Color measurement and modeling. *In: Nondestructive evaluation of food quality*. S N Jha (ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp: 17-40.
- Juliani H. R., C. R. Welch, Q. Wu, B. Diouf, D. Malaini and J. E. Simon. 2009. Chemistry and quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science* 74: 113-121.
- Kong J. M., L. S. Chia, N. K. Goh, T. F. Chia and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Meza-Jimenez J., J. J. Ramirez-Ruiz and J. J. Diaz-Nenez. 2008. The design and proposal of a thermodynamic drying system for the dehydration of Rosell (*Hibiscus sabdariffa*) and other agro-industrial products. *African Journal of Agricultural Research* 3: 477-485.
- Meza-Jimenez J., J. J. Ramírez-Ruiz, G. Luna-Solano and I. Andrade-González. 2009. Low-cost solar thermodynamic drying system for the dehydration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *Drying Technology* 27: 621-624.
- Norma Mexicana NMX-FF-115-SCFI-2010. Productos agrícolas destinados para consumo humano – flor (cáliz) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) – especificaciones y métodos de prueba. 21 pp.
- Ong S. P. and C. L Law. 2010. Hygrothermal properties of various foods, vegetables y fruits. *In: Drying of food, vegetables and Fruits (Volume 1)*. S. V. Jangam, C. L. Law and A. S. Mujumdar (Eds). Pp: 31-58.

Patras A., N. P. Brunton, C. O'Donnell and B. K. Tiwari. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* 21:3-11.

Reyes-Luengas A., Y. Salinas-Moreno, M. E. Ovando-Cruz, R. I. Arteaga-Garibay y M. D. Martínez-Peña. 2015. Analysis of phenolic acids and antioxidant activity of aqueous extracts of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) varieties with calyxes of different colors. *Agrociencia* 49: 277-290.

Sadilova E., R. Carle and F. C. Stintzing. 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition Food Research* 51: 1461-1471.

Salinas-Moreno Y., A. R. E. Zuñiga-Hernández, L. B. Jiménez-De la Torre, V. Serrano-Altamirano and C. Sánchez-Feria. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 395-407.

Segura-Carretero A., M. A. Puertas-Mejía, S. Cortacero-Ramírez, R. Beltrán, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, G. Dinelli and A. Fernández-Gutiérrez. 2008. Selective extraction, separation and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis* 29: 2852-2861.

Sharma, G. *Digital Color Imaging Handbook*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2003.

Sinela A., N. Rawat, C. Mertz, N. Achir, H. Fulcrand and M. Dornier. 2017. Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extracts and evolution of its degradation products. *Food Chemistry* 214: 234-241.

Singleton V. L. and J. A. Rossi. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Tsai Pi-Jen, J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.

Tsai, P. J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*. 35: 351-356.

Vega-Gálvez A., K. Ah-Hen, M. Chacana, J. Vergara, J. Martínez-Monzó, P. García-Segovia, R. Lemus-Mondaca and K. Di-Scala. 2012. Effect of temperatura and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, color, texture and microstructure of apple. *Food Chemistry* 132: 51-59.

Wilson F. D. 1994. The genome biogeography of *Hibiscus* L. section *Furcaria* DC. *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 13-25.

5. DISCUSIÓN GENERAL

En México existe una amplia diversidad de variedades de *H. sabdariffa*, que difieren en su morfología, su color y su composición química y fitoquímica, características que generalmente se atribuyen al genotipo, como se ha reportado en diversas caracterizaciones de genotipos mexicanos de *H. sabdariffa*. Sin embargo, tales caracterizaciones no consideran el efecto ambiental en los resultados que obtuvieron. Las variedades de *H. sabdariffa* se clasifican generalmente por el color de sus cálices. La mayor parte de los genotipos presentan una coloración roja en sus cálices, ya sea oscura o clara; en menor proporción se encuentran los genotipos con cálices de color verde-amarillos.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación evidencian que los efectos de los factores genotipo (G), ambiente de producción (A), así como su interacción (G x A) tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la variación del color de los cálices deshidratados y de los extractos acuosos, así como en el contenido de fitoquímicos, el pH y la acidez de los extractos acuosos, aunque en diferente proporción para cada variable de calidad estudiada.

Las variables descriptoras del color, tanto en cálices deshidratados como en extractos acuosos, así como el contenido de fitoquímicos antioxidantes (fenoles solubles totales y antocianinas) fueron dominadas por el factor genotipo. Por tal razón, lo más conveniente si se desea tener un mayor rendimiento de fitoquímicos y colores más intensos en los cálices deshidratados es seleccionar los genotipos de *H. sabdariffa* con mayor desempeño en la acumulación de fenoles solubles totales (FST) y antocianinas (CTA), ya que estas características son altamente estables y heredables.

Un comportamiento diferente se observó en el pH y la acidez titulable, ambas variables relacionadas con la palatabilidad de los extractos acuosos, que fueron regidas por los factores ambiente de producción (A) y la interacción G x A. Por tales motivos se infiere, que si el objetivo es lograr la mayor acidez en los cálices de *H. sabdariffa*, lo primordial es ubicar las localidades que favorezcan la expresión de las enzimas responsables de la síntesis de ácidos orgánicos en los cálices de *H. sabdariffa*.

Dentro de las localidades evaluadas, las pertenecientes a Nayarit (Jala, Quiviquinta y Xalisco) favorecieron una mayor acumulación de fitoquímicos, así como una mayor expresión de acidez en los genotipos de *H. sabdariffa* evaluados. Este comportamiento puede deberse a que la mayor parte del germoplasma evaluado en esta investigación fue colectado en este estado, por lo cual presenta mayor adaptación a sus condiciones ambientales.

Estos resultados contribuyen en la identificación de los genotipos sobresalientes en la acumulación de fitoquímicos, además de ubicar las localidades más aptas para su producción. Así como en la identificación de las localidades más convenientes para una mayor expresión de acidez en los genotipos evaluados, información que es valiosa en los programas de mejoramiento genético, y para los productores de esta especie porque les permitirá hacer la selección de los genotipos más aptos para ser crecidos en sus localidades.

A pesar de que los efectos del ambiente de producción y la interacción G x A ocasionaron variación en el contenido total de antocianinas y ácidos orgánicos, estos factores no alteraron los perfiles cromatográficos de ambos compuestos. Las antocianinas dominantes en el perfil cromatográfico de las antocianinas fueron delfinidina 3-sambubiósido y cianidina 3-sambubiósido. Mientras que el perfil de ácidos orgánicos estuvo integrado por la presencia de los ácidos oxálico, tartárico, málico, cítrico y succínico, de los cuales este último fue el más abundante.

Con respecto a los tratamientos de deshidratado de cálices frescos, los resultados evidenciaron que el uso de aparatos deshidratadores a temperaturas entre 50 y 70 °C por periodos de 4 a 6 horas para realizar el deshidratado de cálices frescos de *H. sabdariffa*, favorecieron la preservación de un mayor contenido de FST y CTA, así como una mayor acidez en los cálices, incluso superior a la lograda con el proceso tradicional de deshidratado, que consiste en la exposición directa de los cálices a la radiación solar.

El efecto de la temperatura no alteró los perfiles cromatográficos de las antocianinas y los ácidos orgánicos. Sin embargo, en el caso de las antocianinas se observó que la delfinidina 3-sambubiósido es más sensible a temperaturas elevadas en comparación con la cianidina 3-sambubiósido.

El uso de deshidratadores es una opción recomendable y factible para acortar los periodos de deshidratados de los cálices y mantener la calidad de los cálices, principalmente en regiones como Guerrero y Nayarit, en donde en los últimos años la presencia de precipitaciones en la época de cosecha y deshidratado de cálices ha ocasionado la pérdida de un gran porcentaje de la producción de cálices de *H. sabdariffa*.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Los efectos de los factores genotipo, ambiente de producción, así como su interacción G x A modificaron de manera significativa la calidad de los cálices deshidratados de *H. sabdariffa*.

El genotipo fue el factor más importante en la variación del contenido de fitoquímicos (fenoles solubles totales y antocianinas), así como en la variación del color de los cálices y extractos acuosos. Los genotipos de cálices color rojo oscuro destacaron por su mayor contenido de fenoles solubles totales y antocianinas.

Las variedades de *H. sabdariffa* probadas potenciaron su producción de fenólicos solubles totales, antocianinas y expresaron su acidez en las localidades de Nayarit.

El perfil cromatográfico de antocianinas y ácidos orgánicos fue estable a los factores genotipo y ambiente de producción. Aunque el contenido relativo de estos fitoquímicos fueron afectados por tales factores.

La calidad de los cálices deshidratados, en lo referente al contenido de fitoquímicos, también fue mermada por los tratamientos de deshidratado de los cálices, principalmente por los tratamientos de exposición directa al sol y el deshidratado a 40 °C, que provocaron la mayor reducción de FST y CTA, así como la acidez en los extractos acuosos.

Los perfiles cromatográficos de antocianinas y ácidos orgánicos no fueron afectados por los tratamientos de deshidratado de cálices. El contenido de cianidina 3-sambubiósido tuvo mayor estabilidad térmica que delfinidina 3-sambubiósido.