

Extracción de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) asistida por ultrasonidos de potencia

K.P. García-Santoyo¹, C. Ozuna-Lopez¹, E. Mares-Mares^{1,2}

¹Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ²Instituto Tecnológico Superior de Guanajuato. Carr. Guanajuato-Puentecillas Km 10.5 Col. Puentecillas. Guanajuato, Gto.

e.maresmares@ugto.mx

RESUMEN: De las propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), destaca su capacidad antioxidante, la cual, está relacionada con su alto contenido de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos y flavonoides. Las tecnologías no convencionales como la extracción asistida por ultrasonidos de potencia (UP) contribuye a intensificar el proceso de extracción de estos compuestos. El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de la aplicación de UP en la extracción de compuestos bioactivos a partir de la flor de jamaica. Muestras de harina de flor de jamaica fueron mezcladas con metanol al 80% a una relación de 1:20(p/v). Posteriormente, fueron sometidas en baño ultrasónico (40 kHz y 120 W) durante 15, 30 y 45 min a temperaturas de 30, 40 y 50°C. Se evaluó el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH. El contenido de compuestos fenólicos totales oscilaron de 23.54±3.11 a 28.88±5.91 mg EAG/g P.S., para flavonoides se obtuvieron concentraciones de 11.42±0.47 a 15.45±1.44 mg ER/g P.S y la capacidad antioxidante de 6.56±0.30 a 7.71±0.10 mg ET/g P.S. Los resultados demostraron que el empleo de UP optimiza la extracción de los compuestos bioactivos y mantiene su capacidad antioxidante.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, compuestos bioactivos, ultrasonidos de potencia.

ABSTRACT: Of the functional properties of the jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), its antioxidant capacity stands out, which is related to its high content of bioactive compounds, such as phenolic compounds and flavonoids. The unconventional technologies like power ultrasound assisted (UP) extraction to intensify the extraction process of these compounds. The purpose of this research was to study the effect of the application of UP on the extraction of bioactive compounds from the flower of Jamaica. Samples of Jamaican flower flour were mixed with 80% methanol at a ratio of 1:20 (w/v). Subsequently, they were subjected to ultrasonic bathing (40 kHz and 120 W) for 15, 30 and 45 min at temperatures of 30, 40 and 50°C. The content of phenolic compounds and total flavonoids was evaluated, as well as the antioxidant capacity through the inhibition of DPPH radical. The content of the total phenolic compounds ranged from 23.54±3.11 to 28.88±5.91 mg EAG/g P.S., for flavonoids were obtained 11.42 ± 0.47 to 15.4519 ± 1.44 mg ER/g P.S., and the antioxidant capacity of 6.56 ± 0.30 to 7.71 ± 0.10 mg ET/g P.S. The results will show that the use of UP optimizes the extraction of bioactive compounds and their antioxidant capacity.

Keywords: Antioxidant capacity, bioactive compounds, power ultrasound.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en estudiar las propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), debido a su alto contenido en compuestos fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, β - caroteno y polisacáridos. Así mismo, estas moléculas son las responsables de las propiedades funcionales, como su potencial antioxidante, antimicrobiano, entre otros efectos benéficos para la salud (Hirunpanich *et al.*, 2006). Sin embargo, según datos estadísticos emitidos por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de México (2009), la jamaica presenta una baja industrialización en donde el 95% del consumo es en forma de cálices deshidratados que tienen como destino bebidas frescas e infusiones, teniendo un valor bajo en el mercado.

En la ciencia de alimentos, ha crecido el interés de extraer compuestos bioactivos a través de nuevas técnicas que permitan la automatización del proceso, la reducción de tiempos y la disminución en el uso de solventes orgánicos; ya que los métodos de extracción convencionales suelen requerir tiempos prolongados y su eficiencia es baja (Prakash *et al.*, 2017). En años recientes, ha cobrado un gran impulso el desarrollo de tecnologías limpias de extracción de gran eficiencia que permiten el aislamiento efectivo de componentes biológicamente activos, sin que ocurra pérdida de la actividad biológica, con un buen rendimiento y una elevada pureza. Dentro de ellos se encuentra la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción acelerada con microondas (Katsampa *et al.*, 2015).

De las últimas técnicas de extracción desarrolladas, la extracción asistida por ultrasonidos puede contribuir a intensificar el proceso de extracción de compuestos y disminuir el costo del proceso, permitiendo aumentar la calidad y bioactividad de los extractos obtenidos (Chemat *et al.*, 2017). Su aplicación resulta muy oportuna cuando la estabilidad de la materia prima o del componente activo a extraer se afecta con las temperaturas elevadas de los procesos convencionales. Compuestos tales como, aceites esenciales, compuestos aromáticos, isoflavonoides, polifenoles, azúcares, saponinas, y pigmentos han sido aislados eficientemente dado el efecto beneficioso del ultrasonido sobre la cinética y el rendimiento de la extracción (Azmira *et al.*, 2013).

El fundamento de extracción de los UP consiste en la aplicación de ondas acústicas que producen el fenómeno de cavitación. Este fenómeno provoca la variación de presiones acústicas, las cuales inducen la producción de microburbujas que se expanden y colapsan al mismo tiempo que promueven el fenómeno de implosión. Durante la implosión se libera la energía acumulada ocasionando un choque mecánico a la estructura de la célula, logrando así que, el solvente entre a la célula y favorezca la extracción de los compuestos bioactivos (Chemat *et al.*, 2017). El objetivo principal de esta investigación fue estudiar el efecto de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el proceso de extracción de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y flavonoides totales) de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) y evaluar su capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los cálices frescos de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) variedad “Cotzaltzin” de la marca Member’s Mark del Estado de México, fueron deshidratados en un horno de calentamiento directo (CE3F, Shel Lab, Estados Unidos) a 60°C (Gutierrez, *et al.*, 2017) durante 24 horas. Posteriormente a su deshidratación, la muestra se pulverizó y tamizó en malla No. 14 hasta la obtención de una harina, para la extracción de los compuestos bioactivos. La harina se almacenó en la obscuridad a temperatura de 25°C.

Extracción asistida por ultrasonidos de potencia

Se mezclaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 5 g de harina de flor de Jamaica y 100 mL de metanol al 80% (Padro *et al.*, 2019). La mezcla se colocó en un equipo de baño ultrasónico de capacidad de 5 litros (ULTRASONOS HD, Selecta S.A., España). Se probaron diferentes tratamientos combinados de extracción, donde se evaluó el efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y temperatura de extracción (30, 40 y 50°C). Como constantes de los ultrasonidos, se utilizó una frecuencia de 40 kHz y una potencia nominal máxima de 120 W. Posteriormente, se determinó la concentración de compuestos bioactivos (Fenoles y Flavonoides Totales) y su capacidad antioxidante. Se obtuvieron tres réplicas técnicas por cada tratamiento de extracción.

Determinación de compuestos bioactivos

Para la cuantificación de **fenoles totales**, se utilizó el método propuesto por Singleton, *et al.*, (1999) con ciertas modificaciones. Los valores de absorbancia de los extractos fueron leídos a 765 nm a través

de un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS 10S, Thermo Scientific™, EUA). El contenido de Fenoles Totales de las muestras se reportó en mg de equivalente de ácido gálico por gramo de peso seco de extracto (mg EAG/g P.S). El contenido de **flavonoides totales** se determinó de acuerdo el método descrito por Khanam *et al.*, (2012). Los valores de absorbancia de los extractos fueron leídos a 415 nm. El contenido de flavonoides totales fue reportado como mg de equivalentes de rutina por gramo de peso seco de extracto (mg ER/g P.S).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos se realizó a través del método de inhibición del radical libre DPPH propuesto por Brand *et al.*, (1995), en donde los valores fueron leídos a 515 nm a través de un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS 10S, Thermo Scientific™, EUA). Los resultados fueron expresados en miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de peso seco (mg ET/g P.S).

Análisis estadístico

Las cuantificaciones de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante se realizaron por quintuplicado. Los resultados fueron expresados como la Media \pm Desviación estándar. Para conocer la diferencia en la variación del efecto de los tratamientos (Tiempo y temperatura de extracción) se realizó un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad y una prueba de comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos fenólicos totales (CFT)

De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido de CFT de los extractos metanólicos de flor de jamaica se encuentran en un rango de concentración de 23.54 ± 3.11 a 28.88 ± 5.91 mg EAG/g P.S. La Figura 1, muestra el efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y la temperatura (30, 40 y 50°C) de extracción de CFT asistida por ultrasonidos de potencia (40 kHz y 120 W) a partir de flor de jamaica deshidratada a 60°C durante 24 h.

Los valores obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Almahy *et al.*, (2017) para extractos de jamaica obtenidos por ultrasonidos de potencia. En dicho estudio, se realizó la extracción de CFT con etanol al 80% durante 20min a 30°C. En otro estudio reportado por Padró *et al.*, (2019), se extrajeron los compuestos fenólicos totales de la flor de jamaica (Var. Cotzaltzin) con metanol al 80%, obteniendo un contenido promedio de 17.91 mg EAG/g. P.S. Sin embargo, las condiciones de extracción fueron a temperatura ambiente y durante 24 horas de agitación (método convencional).

En contraste con lo obtenido en la presente investigación, el uso de ultrasonidos de potencia permitió la obtención de un 46% más del contenido de CFT con respecto al método convencional de extracción.

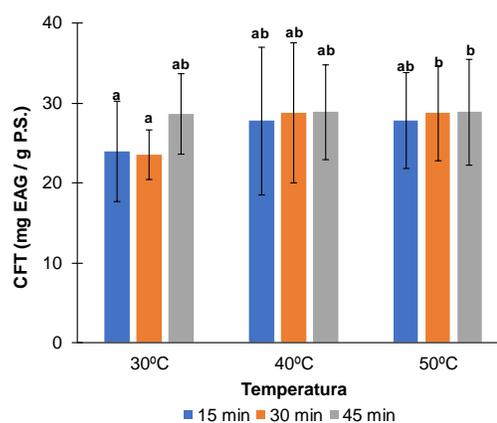


Figura 1. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción asistida por ultrasonidos de potencia sobre la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de flor de jamaica. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos de extracción (prueba de Tukey, $p < 0.05$).

De acuerdo con el análisis estadístico, las variables de tiempo y temperatura en conjunto no mostraron un efecto significativo sobre la concentración de CFT de los extractos metanólicos de flor de jamaica ($p>0.05$). El valor promedio de CFT obtenido de los 9 tratamientos combinados de extracción asistidos con ultrasonidos fue de 26.21 ± 4.51 mg EAG/g P.S.

Flavonoides totales (FT)

La Figura 2 muestra el efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y la temperatura (30, 40 y 50°C) de extracción de flavonoides totales (FT) asistida por UP (40 kHz y 120 W) a partir de flor de jamaica deshidratada a 60°C durante 24 h. Las concentraciones obtenidas de FT de los extractos de flor de jamaica oscilaron de 11.42 ± 0.47 a 15.4519 ± 1.44 mg ER/g P.S.

Sandopu *et al.*, (2014) reportó un valor promedio de 19.09 mg ER/g P.S. para extractos metanólicos de flor de jamaica (Var. Roselle) deshidratada a la sombra durante 4 días, en dicho estudio se utilizó el método convencional de extracción (30 minutos y 100 x g de agitación). El valor es superior al obtenido en esta investigación, sin embargo, Sandopu *et al.*, (2014) realizaron la extracción en dos fases, la primera consistió en la extracción directa de FT con metanol y posteriormente el pellet resultante fue redissuelto en metanol y se repitió el proceso de extracción. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y cuantificados. Por otro lado, Vivas-Leguizamón *et al.*, (2014), realizaron una maceración de flor de jamaica a 4°C empleando etanol al 50% como solvente, obteniendo concentraciones de FT de 0.50 a 1.35 mg ER/g P.S.

De acuerdo al análisis estadístico, las variables de tiempo y temperatura en conjunto mostraron un efecto significativo sobre la concentración de FT de los extractos metanólicos de flor de jamaica ($p<0.05$). Con la prueba de contraste de medias con el método de Tukey se determinó que, a una temperatura de 50°C, a mayor tiempo de extracción, aumenta la concentración de FT ($p<0.05$). El valor promedio de FT obtenido de los 9 tratamientos combinados de extracción asistidos con ultrasonidos fue de 13.43 ± 0.95 mg ER/g P.S.

Capacidad antioxidante (CA)

La capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de flor de jamaica osciló entre 6.56 ± 0.30 y 7.71 ± 0.10 mg ET/g P.S en los tratamientos combinados de extracción. La Figura 3 se muestran los resultados del efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y la temperatura (30, 40 y 50°C) de extracción asistida por UP (40 kHz y 120 W) en la capacidad antioxidante de flor de jamaica deshidratada.

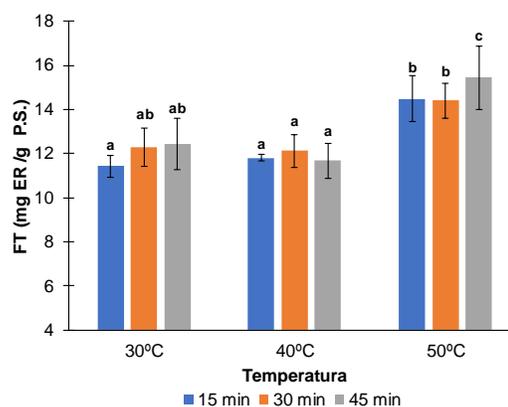


Figura 2. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción asistida por ultrasonidos de potencia sobre la concentración de flavonoides totales (FT) de flor de jamaica. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos de extracción (prueba de Tukey, $p<0.05$).

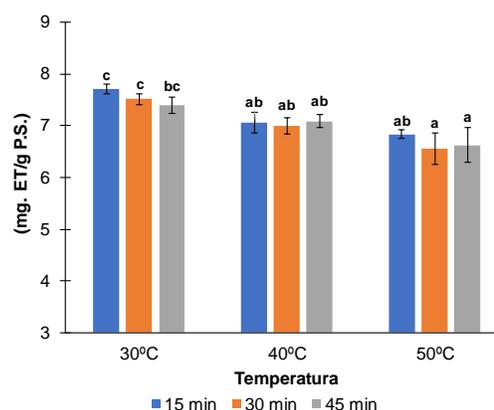


Figura 3. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción asistida por ultrasonidos de potencia sobre la capacidad antioxidante (CA) de flor de jamaica. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos de extracción (prueba de Tukey, $p<0.05$).

En un trabajo reportado por Cid-Ortega y Guerrero-Beltran (2016), determinaron la capacidad antioxidante de extractos etanólicos (etanol al 50%) de flor de jamaica (Var. Roselle). En dicha investigación, los autores determinaron una capacidad antioxidante de 8.20 mg ET/g P.S. Sin embargo, la relación de flor de jamaica pulverizada y solvente para la extracción fue de 1:10 (p/v) y la temperatura de extracción fue de 50°C (método convencional).

Cabe resaltar, que en esta investigación se obtuvieron valores muy similares de CA con el empleo de los ultrasonidos de potencia en la extracción y a una relación de mezcla inferior de flor de jamaica deshidratada y solvente de 1:20 (p/v). De acuerdo con el análisis estadístico, solamente la variable temperatura, mostró un efecto significativo sobre la CA de los extractos metanólicos de flor de jamaica ($p < 0.05$). El incremento de la temperatura de extracción (30 a 50°C) provocó una disminución significativa en la capacidad antioxidante de los extractos. La variable tiempo, no mostró efecto significativo en la CA ($p > 0.05$). El valor promedio de la CA obtenida de los 9 tratamientos combinados de extracción asistidos con ultrasonidos fue de 7.13 ± 0.20 mg ET/g P.S.

En resumen, la Tabla I muestra las condiciones de tiempo y temperatura que junto con los ultrasonidos de potencia a 40 kHz y 120 W coadyuvan al aumento de la concentración en la extracción de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de la flor de jamaica deshidratada.

Tabla I. Condiciones óptimas de tiempo y temperatura para la extracción de compuestos bioactivos asistida por ultrasonidos de potencia.

Determinación	Condiciones de extracción asistida por ultrasonidos de potencia	Concentración
Fenoles Totales	45 min a 30°C	28.60 mg EAG/g P.S.
Flavonoides totales	45 min a 50°C	15.45 mg ER/g P.S.
Capacidad Antioxidante	15 min a 30°C	7.71 mg ET/g P.S.

CONCLUSIONES

El empleo de ultrasonidos de potencia permite optimizar la extracción de compuestos bioactivos de la flor de jamaica y mantener su capacidad antioxidante en comparación con métodos convencionales como es la agitación mecánica. En la presente investigación se ha demostrado, que la aplicación de ultrasonidos puede ser una alternativa prometedora para intensificar el proceso de extracción de biocomponentes con actividad biológica. Ya que con su empleo se obtuvo una concentración de flavonoides y capacidad antioxidante similar a lo reportado sin importar que el extracto fue obtenido a partir de un 50% menos de muestra en comparación con el método convencional.

BIBLIOGRAFÍA

- Almahy, H., Abdel-Razik, H., El-Badry, Y., & Ibrahim, A. (23 de Septiembre de 2017). Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanin Pigments from Hibiscus sabdariffa (Rosella) and its Phytochemical Activity at Kingdom of Saudi Arabia. *International Journal of Chemical Sciences*, 15(4).
- Azmira J. Zaidula ISM, Rahmana M.M, Sharifa KM, Mohameda A, Sahenab F. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4): 426–36.
- Brand, W. W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 1(28), 25-30.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted of extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

- Cid-Ortega, S., & Guerrero-Beltran, J. (27 de Marzo de 2016). Antioxidant and Physicochemical Properties of Hibiscus Sabdariffa Extracts from Two Particle Sizes. *Journal of Food Research*, 5(2).
- Gutiérrez, M. R., Franco, A. R., Cerón, A. G., Abraham, R. J., & Ozuna, C. L. (2017). Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales del sector agroalimentario del Estado de Guanajuato. *Jovenes en la Ciencia*, 1(2), 1334-1339.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., & Suthisang, C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 103(2), 252-260.
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., Makris, D.P., 2015. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products* 77, 535-543.
- Khanam, U., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 979-987.
- Padró, N. D., Abraham, J. M. R., Cerón, G. A. Del Rincón C. M. C., Gómez, S. J. A., Herrera, C. F. L. M. y Mares, M. E. (2019). Funcionalización de recubrimientos comestibles de quitosano y alginato de sodio a partir de compuestos fenólicos de jamaica (hibiscus SABDARIFFA). *Revista de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* (4), 429-435.
- Prakash, J. M., Manikandan, S., Vigna Nivetha, C., & Dinesh, R. (2017). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), 1145-1157.
- SAGARPA. (2009). Anuario estadístico. Recuperado el Febrero de 2019, de www.sagarpa.gob.mx
- Sandopu, S., Prabhakaran, M., Nandini, P., & Parvatam, G. (20 de Agosto de 2014). Effect of different drying methods on chlorophyll, ascorbic acid and antioxidant compounds retention of leaves of Hibiscus sabdariffa L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9).
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Foli-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*(299), 152-178.
- Vivas Leguizamón, L. V., Marcelo L., W., & Ricco, R. A. (30 de Abril de 2014). Control de calidad farmacobotánico y fitoquímico de Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae). *Dominguezia*, 30(1).