

## COMPUESTOS BIOACTIVOS Y DEGRADACIÓN CINÉTICA DE ANTOCIANINAS EN EXTRACTOS DE HIBISCUS SABDARIFFA L.

(Bioactive compounds and kinetic degradation of anthocyanins in extracts of *Hibiscus sabdariffa* L.)

Jeanmar Villarroel<sup>1</sup>, Neida S. Sanabria<sup>1</sup>, Liz Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar, Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Edif. Aulas. Piso 3. Oficina 317<sup>a</sup>. Valle de Sartenejas, Baruta, Edo Miranda. <sup>2</sup>Iksir CA, Caracas, Venezuela  
e-mail: nsanabria@usb.ve

**Autor de correspondencia:** Neida S. Sanabria<sup>1</sup>

**Recibido:** 25-03-2020

**Aceptado:** 15-04-2020

### RESUMEN

*Hibiscus sabdariffa* L., conocida como Flor de Jamaica, se ha utilizado tradicionalmente en bebidas herba-les frías y calientes, siendo una fuente en antocianinas y otros compuestos bioactivos. Su estabilidad térmi-ca y cuantificación de compuestos antioxidantes a partir de tres condiciones de extracción fue el objetivo central del presente estudio. Las mayores concentraciones de los compuestos bioactivos tipo polifenoles y antocianos se observaron en el extracto de mayor concentración etanólica (96%), seguido del extracto eta-nólico al 50% y el extracto etanólico ligeramente acidificado con ácido cítrico. La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada considerando su capacidad para atrapar el radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidra-zil (DPPH). La tendencia de la actividad antioxidante fue la opuesta, con el extracto etanólico ligeramente acidificado mostrando el valor más bajo de IC50. La degradación de las antocianinas sigue una cinética de primer orden, lo que permite determinar las constantes de velocidad de reacción (k) y vida media ( $t=1/2$ ). La dependencia de la temperatura de la tasa de degradación de las antocianinas se modeló mediante la ecuación de Arrhenius, y se determinó la energía de activación asociada a la reacción (Ea) para cada uno de los extractos preparados. Los resultados sugieren que la estabilidad de antocianos en *Hibiscus sabdariffa* L. disminuye en aplicaciones que superen los 40°C y los 30 minutos, por lo que su empleo como ingrediente en formulaciones de alimentos debe considerar estas condiciones para mayor preservación de color.

**Palabras Clave:** *Hibiscus sabdariffa* L., antioxidantes, Arrhenius, energía de activación, antocianinas.

### SUMMARY

*Hibiscus sabdariffa* L., known as Flor de Jamaica, has traditionally been used in hot and cold herbal bevera-ges, being a source of anthocyanins and other bioactive compounds. Its thermal stability and quantification of antioxidant compounds from three extraction conditions was the central objective of the present study. The highest concentrations of the bioactive compounds like polyphenols and anthocyanins were observed in the extract with the highest ethanolic concentration (96%), followed by the ethanolic extract at 50% and the ethanolic extract slightly acidified with citric acid. The antioxidant activity of the extracts was evaluated considering their ability to trap the free radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH). The trend of antioxi-dant activity was the opposite, with the slightly acidified ethanolic extract showing the lowest IC50 value. The degradation of anthocyanins follows first-order kinetics, which allows determining the constants of re-acton rate (k) and half-life ( $t = 1/2$ ). The dependence of temperature on the degradation rate of anthocyanins was modeled using the Arrhenius equation, and the activation energy associated with the reaction (Ea) was determined for each of the prepared extracts. The results suggest that the stability of anthocyanins in *Hibis-cus sabdariffa* L. decreases in applications that exceed 40 °C and 30 minutes, so its use as an ingredient in food formulations should consider these conditions for greater color preservation.

**Key Words:** *Hibiscus sabdariffa* L., antioxidants, Arrhenius, anthocyanins, activation energy.

## INTRODUCCIÓN

*Hibiscus sabdariffa* L., comúnmente conocida como Flor de Jamaica, ha sido aceptada positivamente en Venezuela a través de sus diversas preparaciones. A nivel comercial, sus cálices deshidratados son apreciados debido a la obtención del color rojo natural, derivado de su composición en antocianinas, con aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica. Las fuentes de naturalidad constituyen hoy día tendencia en el mercado global, dado que colorantes artificiales que son comúnmente añadidos en alimentos, bebidas, postres, caramelos y productos horneados por su estabilidad y uniformidad, son no deseables debido a su naturaleza carcinógena (Pragalyaashree et al., 2018). A los extractos de rosa Jamaica se le atribuyen cualidades terapéuticas, por lo que su consumo para hipertensión, dislipidemia, hiperuricemia ha sido estudiado, así como su efectividad en atrapar especies reactivas de radicales libres además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la aglutinación de plaquetas (Garzón, 2008; Patricio, 2012; Castañeda y Cáceres, 2014; Castillo et al., 2017).

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, son responsables de un amplio abanico de colores en vegetales, que van desde el azul, pasando por el púrpura, el violeta, el magenta y el rojo hasta el amarillo (Damodaran et al., 2010). Su empleo a nivel tecnológico e industrial es afectado por condiciones de procesamiento tales como pH, exposición al oxígeno y temperaturas. En la actualidad el empleo de ingredientes naturales conteniendo sustancias bioactivas de interés propicia un aspecto particular en el procesamiento industrial y en el almacenamiento al tomar en cuenta la estabilidad de las mismas en productos elaborados. En Venezuela, el uso y aplicación tecnológica e industrial de los extractos provenientes de flor de jamaica no ha sido reportado, por ello el objetivo principal de esta investigación es evaluar la capacidad antioxidante, polifenoles y la cinética de degradación térmica de antocianinas en extractos de *Hibiscus sabdariffa* L., a partir de tres condiciones de extracción mediante la ecuación de Arrhenius, considerando variables la temperatura y el tiempo de exposición.

## MATERIALES Y METODOS

**Selección y tratamiento de la muestra.** Se utilizaron tres muestras deshidratadas y molidas de un

mismo lote de polvo de flor de Jamaica deshidratados provenientes de Nigeria – África Occidental (Iksir, 2019). Se aplicó tres tratamientos para la extracción de las antocianinas mediante lixiviación discontinua en la muestra en polvo, con variación en los solventes utilizados en la maceración, siguiendo la metodología planteada por Sotomayor et al. (2017): extracción con etanol al 96% (1), extracción con solución de etanol al 50% acidificado con ácido cítrico (2) y extracción con solución de etanol al 50% (3). Las extracciones fueron realizadas a 25°C, y las muestras se dejaron en reposo por 24 horas. Se empleó un rotaevaporador con velocidad de rotación de 10 rpm y vacío fijo para concentrar los extractos acuosos.

**pH.** Se evaluó con el uso del potenciómetro ThermoScientific® mediante el método AOAC 981.176 (2005). Las mediciones fueron por triplicado.

**Polifenoles totales.** Se determinó por método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, con una absorbancia de 765nm para lectura de los resultados. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100ml del concentrado (Singleton y Rossi, 1965).

**Contenido total de Antocianinas.** Se calculó utilizando el método de pH diferencial según Hellström et al. (2013) y Edilberto et al. (2018), para determinar la concentración de antocianinas monoméricas presentes a dos pH diferentes por espectrofotometría a dos longitudes de onda 520 y 700nm. El análisis se realizó por triplicado y los resultados se reportan en mg/L de cianidina-3-glucósido.

**Actividad antioxidante.** Se usó una adaptación del método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Giusti y Wrolstad (2005). En placas ELISA a 50µl de extractos se agregaron 150µl de DPPH. Después de la incubación por 30 minutos, se midió la absorbancia de las muestras a  $\lambda_{max}$  515nm y se comparó con una solución de control compuesta de 150µl de DPPH con 36 y 50 µl de metanol. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con la ecuación que se muestra a continuación:

“%” de Inhibición

$$= \frac{(\text{Absorbanciacontrol} - \text{Absorbanciamuestra})}{\text{Absorbanciacontrol} * 100} \%”$$

Medianteregresiónlinealentre las concentraciones y el porcentaje de inhibición se determinaron los valores de IC50, representando la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) del extracto necesario para reducir el 50% del radical DPPH.

**Estabilidad y Degradación cinética de los extractos.** A cada extracto se le aplicó tratamiento térmico por triplicado a tres temperaturas ( $40^{\circ}\text{C}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$  y  $100^{\circ}\text{C}$ ) por tres tiempos previamente establecidos (30 minutos, 60 minutos y 90 minutos). El orden de la cinética de degradación de las antocianinas fue determinado a través de la variación de su concentración en los extractos en función del tiempo de tratamiento térmico. El análisis estadístico de regresión fue empleado mediante el software Libre Office Calc 6.0. Se determinaron valores para el coeficiente de correlación (R) y de media del error absoluto (MEA) (Willmott et al., 2005). Se procedió a determinar mediante las ecuaciones y gráficas correspondientes los parámetros de constante de velocidad de reacción, tiempo de vida media y energía de activación. Con el objeto de determinar cuál de los modelos de orden reacción es el que describe mejor la cinética de degradación térmica de antocianinas se llevó a cabo un análisis de regresión. Pese a que los valores de R en ambos modelos exhiben gran similitud, los valores de MEA obtenidos sí mostraron una gran diferencia. Esta media del error absoluto describe la diferencia entre el valor obtenido de Y (en este caso concentración o  $\ln C/C_{\text{inicial}}$ ) para un valor de X específico (en este caso tiempo). Valores más pequeños de MEA sugieren un mejor ajuste. Por tanto, los mayores valores de MEA obtenidos para el modelo de orden cero en cada extracto indican que el modelo de orden cero no es el idóneo para describir la cinética de degradación de las antocianinas, lo que corresponde con lo previamente reportado (Garzón y Wrolstad, 2002; Wang y Xu, 2007). A partir de ello, los datos experimentales para la degradación térmica de antocianinas se ajustaron a una cinética de orden uno, por lo que los parámetros cinéticos de esta degradación (constante de velocidad, k y tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ ) fueron calculados a partir de las ecuaciones que correspondiente a cinética de primer

orden. Las energías de activación fueron calculadas mediante ecuación de Arrhenius (Loypimai et al., 2016), graficando  $\ln K$  contra el recíproco de la temperatura absoluta ( $1/T$ ), donde la pendiente de la gráfica lineal es equivalente a  $-E_a/R$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un factor esencial en la estabilidad del color de los extractos lo representa su valor de pH. Los valores bajos de pH obtenidos para cada uno de los extractos (Tabla 1), es consecuencia directa de la naturaleza ácida de los cálices, siendo los cationes flavilio el grupo que proporciona el color rojo característicos de los extractos a pH menores a 3 (Preosti et al., 2007). A valores de pH superiores a 5, la estructura del catión se ve modificada a la de base quinoidal, resultando en un cambio de coloración hacia azul (Medina-Carrillo et al., 2013), no presente en este caso de estudio.

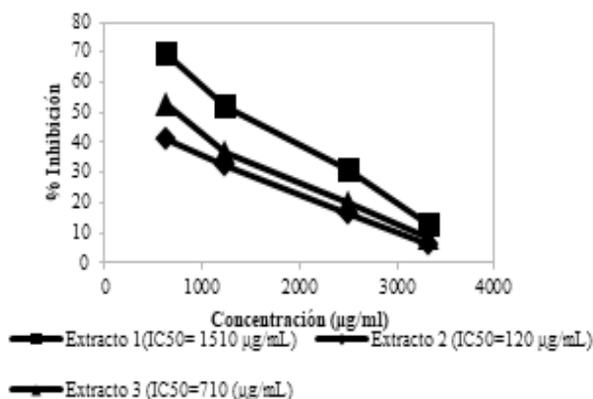
**Tabla 1.** pH, contenido de polifenoles y antocianinas en extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Extracto	pH	Polifenoles totales (mg ácido gálico/100g de muestra)	Antocianinas (mg/mL cianidina-3-glucósido)
1	2,64 $\pm$ 0,020a	254,40 $\pm$ 0,46a	372,51 $\pm$ 0,17a
2	2,27 $\pm$ 0,015b	195,02 $\pm$ 0,92b	346,40 $\pm$ 1,44b
3	2,69 $\pm$ 0,040a	208,81 $\pm$ 0,74c	358,38 $\pm$ 1,03c

En todos los casos se observa que un mayor contenido acuoso y la acidificación del medio afecta la extracción de compuestos polifenólicos y antociánicos, siendo la extracción etanólica al 96% el medio que proporciona mayor contenido de estos compuestos. Dado que las antocianinas son más solubles en etanol que en agua, los valores de concentración más elevados para el extracto 1 sugiere una baja presencia de antocianinas hidrofílicas en los extractos preparados (Mohamed et al., 2016).

### Capacidad antioxidante

La Figura 1 ilustra los valores de concentración inhibitoria media (IC50), determinados a partir de los distintos porcentajes de inhibición calculados.



**Figura 1.** Capacidad antioxidante en los extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

A pesar que el mayor contenido en polifenoles y compuestos antociánicos fue expresado en el extracto 1, la tendencia de la actividad antioxidante fue la opuesta, con el extracto etanólico ligeramente acidificado mostrando el valor más bajo de IC50 en el extracto 2. El menor valor de IC50 se traduce en un mayor poder antioxidante, siendo la alta eficacia antioxidante reportada para el ácido clorogénico y sus derivados, los cuales son los principales compuestos detectados en extracción en medio acuoso y que se ve estabilizado en pH ácidos (Wu et al., 2018), adicional a la contribución del ácido cítrico añadido, algo que concuerda con la mayor proporción de agua y el menor pH del extracto 2.

### Estabilidad y Evaluación cinética de la degradación térmica de antocianinas.

El incremento de temperatura tiene un efecto negativo en el contenido de antocianinas totales, por lo que el mantener las condiciones de alta temperatura elevada por tiempos prologados ocasiona mayor susceptibilidad a degradación térmica. Los resultados indican que temperaturas bajas como 40°C y tiempos cortos (30 minutos) se pueden obtener una menor incidencia en pérdida de pigmentos. La cinética de degradación durante el tratamiento térmico se estudió determinando en primer lugar las constantes de velocidad a una temperatura dada con respecto al tiempo, obteniéndose la Figura 2, donde los valores

de MEA (Willmott y Matsuura, 2005) obtenidos en cada extracto indican que la cinética de degradación de las antocianinas es una cinética de orden uno, lo que corresponde con lo previamente reportado (Wang y Xu, 2007). Se obtuvo los parámetros cinéticos de esta degradación constante de velocidad,  $k$  y tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , expresado como la mejor condición en ~ 76 días para el extracto 1 a una temperatura de 40°C, cercanamente seguido por el extracto 3 (Tabla 2), pudiendo disminuir a 70 días si se incrementa 30°C, pero con un mayor deterioro en contenido antociánico (datos no mostrados).

Los valores proporcionalmente crecientes para las constantes de velocidad de reacción con respecto a la temperatura confirman que su incremento va de la mano con la degradación de las antocianinas. Asimismo, al comparar los valores para los tiempos de vida media se puede concluir que a bajas temperaturas los extractos son menos susceptibles a la degradación, lo cual es cónsono con lo previamente reportado (Medina-Carrillo et al., 2013; Pragalyaashree et al., 2018).

Tabla 2. Parámetros cinéticos degradación de antocianinas en los extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Extracto	Pendiente (m)	Ea (J/molK)
1	-623,28a	5182,20
2	-228,59	1900,59
3	-642,65	5343,25

La dependencia de la constante de velocidad con respecto a la temperatura fue analizada mediante la ecuación de Arrhenius. En particular, la exposición a temperaturas elevadas resulta en valores altos de energía de activación, corroborando que los pigmentos antociánicos en *Hibiscus sabdariffa* L. son más susceptibles a deterioro por el incremento de temperaturas.

Considerando que la energía de activación es la energía mínima requerida para que se lleve a cabo una reacción química, la energía necesaria para proceder a la degradación de las antocianinas fue calculada y se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Energías de activación de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Extracto	Temperatura	k (min <sup>-1</sup> )	t ½ (min)
1	40	0,0091	76,15
	70	0,0099	70,00
	100	0,0126	55,00
2	40	0,0134	51,72
	70	0,0138	50,22
	100	0,0151	45,89
3	40	0,0099	70,00
	70	0,0129	53,72
	100	0,0137	50,58

Se puede establecer que el uso de un solvente de extracción más concentrado (etanol 96%) proporciona una mayor estabilidad ante la degradación por incremento de temperatura, lo cual concuerda con los valores determinados para los parámetros cinéticos de constante de velocidad de reacción y el tiempo de vida media.

## CONCLUSIONES

El extracto de *Hibiscus sabdariffa* L. obtenido usando como solvente de extracción etanol al 96% proporcionó los mayores rendimientos de antocianinas y polifenoles, mientras que la adición de ácido cítrico registró la mayor capacidad antioxidante expresada como menor valor de IC50. El estudio cinético bajo modelo de reacción de primer orden para los distintos extractos de *Hibiscus sabdariffa* L. complementó el resultado de estabilidad térmica, resultando que en condiciones de temperatura 40°C y corto tiempo de calentamiento (30 min) se evidencian bajos valores para la constante de velocidad de reacción y una vida media elevada (76 días), y una Ea de 5182 J/molK.

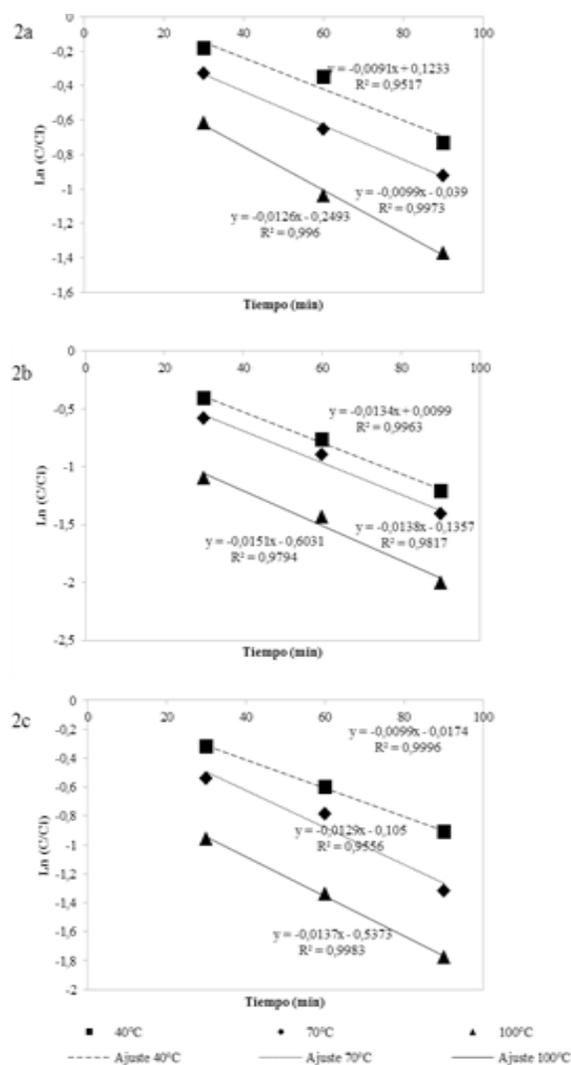
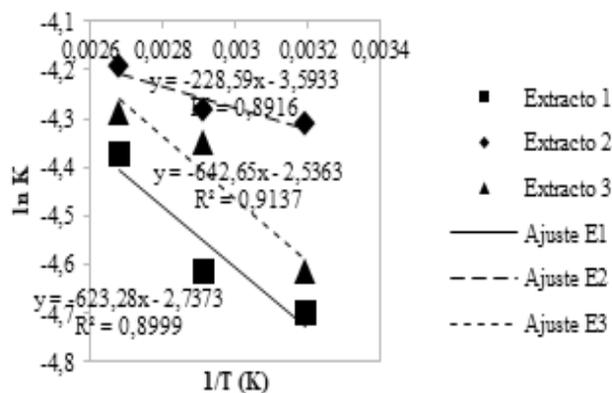


Figura 2. Degradación cinética de los extractos 1 (2a), extracto 2 (2b) y extracto 3 (2c) de *Hibiscus sabdariffa* L. a temperaturas de 40, 70 y 100°C.



**Figura 3.** Gráfico de Arrhenius para degradación de antocianinas en los extractos de Hibiscus sabdariffa L.

### AGRADECIMIENTOS

A Iksir Extractos Esenciales, C.A, por su apoyo y donación de la muestra de estudio.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18<sup>o</sup> ed. Washington D.C.

Castañeda R., Cáceres A. 2014. Compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas de los cálices de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Revista Científica, 24(1):7-24.

Castillo R. L., Escuela A., Panamericana A., Honduras Z.25 de Octubre de 2019. Efecto de uso del extracto de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) como colorante natural y fuente de antioxidantes en las características fisicoquímicas de yogur sabor a fresa. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6206/1/AGI-2017-014.pdf>

Damodaran, S., Parkin, K.L. y Fennema, O. 2010. Química de los Alimentos. 3a Ed., pp. 1154, Editorial Acribia, S.A Zaragoza – España.

De Leonardis, A., Pizzella L., Macciola, V. 2008. Evaluation of chlorogenic acid and its metabolites as potential antioxidants for fish oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110(10), 941–948.

Edilberto F., Flores A. Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays* L.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp). 2018. Fac. Ciencias e Ing. Biológicas y Químicas, Esc. Prof. Ing. Ind. Aliment. 29(2), 175–184.

Garzón, G.A., Wrolstad, R.E. 2002. Comparison of the stability of pelargonidin-based Anthocyanins

in strawberry juice and concentrate. J. Food Sci. 67(4), 1288–1299.

Garzón GA. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Dep. Química, Univ. Nac. Colomb.13(3).

Giusti M., Wrolstad R.E. 2005. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. Handb. Food Anal. Chem. 2–2 19–31.

Hellström J., Mattila P., Karjalainen R. 2013. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. J. Food Compos. Anal. 31(1), 12–19.

Medina-Carrillo I.R.E., Sumaya-Martínez D.M.T., Machuca M.C.M.L., Sánchez-Herrera D. L.M., Balois-Morales R., Jiménez-Ruiz E.I. 2013. Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de fenólicos y antocianinas totales. Rev. Ciencias Técnicas Agropecu. 22:41–44.

Mohamed K., Gibriel A.Y., Rasmy N.M.H., Abu-salem F.M. 2016. Extraction of anthocyanin pigments from evaluation of their antioxidant activity *Hibiscus sabdariffa* L. and evaluation of their antioxidant activity. Middle East J. Appl. Sci. 6(4), 856–866.

Naranjo Andrade A.A., Jativa C. 2013. Evaluación de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivada en Pomona, Pastaza - Ecuador. Fac. Ciencias Bachelor, 105.

Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J EnolVitic. 16:144-158.

Sotomayor F., David C., Arroyo V., Agr E.16 de agosto de 2019. Optimización de extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante secado por aspersión. [on line] <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6071/1/AGI-2017-049.pdf>.

Pragalyaashree M.M., Tiroutchelvame D., Sashikumar S. 2018. Degradation kinetics of anthocyanin extracted from roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). Journal of Applied Pharmaceutical Science, 8(11): 057-063.

Prenci E., Berto S., Daniele P. G., Toso S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction

- and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. Food Chem. 100(2), 433–438.
- Wang W.D., Xu S.Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. J. Food Eng. 82(3), 271–275.
- Willmott C. J., Matsuura K. 2005. Advantages of the mean absolute error (MAE) over the root mean square error (RMSE) in assessing average model performance. Clim. Res. 30(1), 79–82.
- Wu H.Y., Yang K.M., Chiang P.Y. 2018. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. Molecules 23(6).