

## Tesis de Maestría

# Control de calidad de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): estudio farmacobotánico, análisis de polifenoles y actividad antioxidante aplicables en un laboratorio de baja complejidad

Vivas Leguizamón, Laura Vanessa

2014-12-10

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vivas Leguizamón, Laura Vanessa. (2014-12-10). Control de calidad de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): estudio farmacobotánico, análisis de polifenoles y actividad antioxidante aplicables en un laboratorio de baja complejidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vivas Leguizamón, Laura Vanessa. "Control de calidad de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): estudio farmacobotánico, análisis de polifenoles y actividad antioxidante aplicables en un laboratorio de baja complejidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-10.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

**Control de calidad de *Hibiscus sabdariffa* L. (malvaceae): Estudio farmacobotánico, análisis de polifenoles y actividad antioxidante aplicables en un laboratorio de baja complejidad**

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Autora: Laura Vanessa Vivas Leguizamón

Director de tesis: Rafael Alejandro Ricco

Lugar de trabajo: Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

Buenos aires, 2014

**CONTROL DE CALIDAD DE *HIBISCUS SABDARIFFA* L. (MALVACEAE):  
ESTUDIO FARMACOBOTÁNICO, ANÁLISIS DE POLIFENOLES Y ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE APLICABLES EN UN LABORATORIO DE BAJA  
COMPLEJIDAD**

**RESUMEN**

*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), conocida como “Hibiscus” y “Flor de Jamaica”, es empleada en la elaboración de té y de bebidas refrescantes libres de cafeína. El objetivo del trabajo fue determinar los parámetros farmacobotánicos y fitoquímicos (polifenoles) aplicables al control de calidad de muestras de “Hibiscus” en el marco de un laboratorio de baja complejidad. Se analizaron muestras comerciales de “Hibiscus” y se realizaron disociados leves, infusiones y extractos etanólicos. El análisis microscópico permitió observar la presencia de una epidermis con estomas anomocíticos; tricomas eglandulares cónicos y flexuosos; tricomas glandulares no capitados y capitados; tráqueas espiraladas y drusas. El análisis fitoquímico permitió determinar un perfil de antocianos caracterizado por la presencia de delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido. En algunas muestras se detectó un tercer compuesto, en baja concentración, que correspondería a cianidina-3-glucósido. Estos compuestos se presentaron como importantes marcadores fitoquímicos permitiendo determinar su presencia en muestras complejas. Si bien el perfil de polifenoles se presentó sin modificaciones entre las diversas muestras analizadas, se observó una marcada variación cuantitativa entre las mismas. Tanto los extractos acuosos como los etanólicos presentaron importantes contenidos de polifenoles y una promisorio actividad antioxidante. En líneas generales, en el extracto etanólico se determinaron las mayores concentraciones de fenoles, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y particularmente de antocianos, como así también una mayor actividad antioxidante, respecto de los valores obtenidos en los extractos acuosos. Las técnicas empleadas son de rápida realización y bajo costo, aplicables en laboratorios de baja complejidad.

**PALABRAS CLAVES:** *Hibiscus sabdariffa*, “Hibiscus”, “Flor de Jamaica”, tricomas, antocianos, delfinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, fenoles totales.

***QUALITY CONTROL OF HIBISCUS SABDARIFFA L. (MALVACEAE): STUDY PHARMACOBOTANIC, ANALYSIS OF POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN A LOW COMPLEXITY LABORATORY***

**ABSTRACT**

*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), known as “Hibiscus” and “Jamaica flower”, is employed in the making of tea and refreshing caffeine-free beverages. The aim of this study was to determine the pharmacobotanical and phytochemical (polyphenols) parameters applicable to the quality control of “Hibiscus” samples in a low complexity laboratory.

Commercial samples of “Hibiscus” were analyzed, and mild dissociation, infusions, and ethanol extracts were performed.

Microscopic analysis revealed the presence of an epidermis with anomocytic stomata; conic and flexuous eglandular trichomes; non-capitated and capitated glandular trichomes; spiral trachea and druses.

Phytochemical analysis helped identify an anthocyanin profile characterized by the presence of delphinidin-3-sambubioside, and cyanidin-3-sambubioside. In some samples, a third compound was identified, in low concentration, which would agree with cyaniding-3-glucoside. Given that these compounds were significant phytochemical indicators, their presence was allowed to be determined in complex samples.

Even though polyphenol profile showed no modifications in the different analyzed samples, a strong quantitative variation was observed among them.

Both aqueous, and ethanol extracts, showed high content of polyphenols, and a promising antioxidant activity. In general, the highest concentration of phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and specifically anthocyanins were determined in ethanol extract, as well as, higher antioxidant activity compared to the values obtained in aqueous extract.

The techniques employed are low cost and can be performed rapidly, applicable in low complexity laboratories.

**KEYWORDS:** *Hibiscus sabdariffa*, “Hibiscus”, “Flor de Jamaica”, trichomes, anthocyanins, delphinidin-3-sambubioside, cyanidin-3-sambubioside, flavonoids, hydroxycinnamic acids, total phenols.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en primer lugar a Dios por iluminarme y acompañarme durante este proceso y por bendecirme para llegar hasta donde he llegado.*

*Al Dr. Rafael Ricco, mi Director de Tesis, por su presencia incondicional, por la orientación, esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia, su motivación y apoyo lograron seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión de la misma. Muchas gracias.*

*A mis padres Stella y Pedro, a quienes agradezco por su guía, apoyo y confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunada por contar siempre con su amor incondicional, comprensión y ejemplo; que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para saber cómo iba mi proceso. Las palabras nunca serán suficientes para expresar a estas dos personitas que son el orgullo de mi corazón y mi infinito agradecimiento.*

*Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.*

*A todos muchas gracias.*

Resultados parciales contenidos en el presente trabajo fueron presentados en el XI Simposio Argentino y XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica y I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales:

*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Control de calidad farmacobotánico y fitoquímico de polifenoles aplicables en laboratorios de baja complejidad.

Laura V. Vivas Leguizamón, Marcelo L. Wagner & Rafael A. Ricco.

Resultados parciales contenidos en el presente trabajo han sido aceptados para su publicación:

Vivas Leguizamón, L.V., Wagner, M.L., Ricco, R.A. 2014. Control de calidad Farmacobotánico y Fitoquímico de *Hibiscus sabdariffa* L. -Malvaceae. *Dominguezia* 30(1).

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1	<b>ORIGEN Y DISTRIBUCION</b> .....	<b>9</b>
1.2	<b>DESCRIPCIÓN BOTÁNICA</b> .....	<b>9</b>
1.3	<b>HÁBITAT</b> .....	<b>10</b>
1.4	<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i></b> .....	<b>10</b>
1.4.1	ANTOCIANOS Y OTROS POLIFENOLES.....	11
1.4.2	POLISACÁRIDOS MUCILAGINOSOS .....	13
1.4.3	ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	13
1.4.4	OTROS COMPONENTES DE INTERÉS.....	14
1.5	<b>CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES</b> .....	<b>16</b>
1.5.1	ANTOCIANINAS O ANTOCIANOS .....	17
1.5.2	FLAVONOIDES .....	21
1.5.3	FENILPROPANOIDES (ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS) .....	23
1.6	<b>USOS DE <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i></b> .....	<b>24</b>
1.6.1	USO ALIMENTICIO.....	24
1.6.2	USOS MEDICINALES.....	26
1.6.3	OTROS USOS.....	29
1.7	<b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>32</b>
2.1	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>32</b>
2.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>33</b>
2.3	<b>HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	<b>MATERIAL VEGETAL A ANALIZAR</b> .....	<b>34</b>
3.1.1	MUESTRAS SIMPLES .....	34
3.1.1.1	Muestra N°1: Material de referencia .....	34
3.1.1.2	Muestra N°2.....	35
3.1.1.3	Muestra N°3.....	35
3.1.1.4	Muestra N°4.....	35
3.1.1.5	Muestra N°5 .....	35
3.1.1.6	Muestra N°6.....	35
3.1.1.7	Muestra N°7 .....	35
3.1.1.8	Muestra N°8.....	35
3.1.1.9	Muestra N°9.....	35
3.1.1.10	Muestra N°10.....	36
3.1.2	MUESTRAS COMPLEJA .....	36
3.1.2.1	Muestra N°1.....	36
3.1.2.2	Muestra N°2.....	36
3.1.2.3	Muestra N°3.....	36
3.2	<b>ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO</b> .....	<b>37</b>
3.2.1	ANÁLISIS MACROSCÓPICO .....	37
3.2.2	ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	37

<b>3.3</b>	<b>ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO (INFUSIÓN) .....	38
3.3.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO .....	38
<b>3.4</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	CUANTIFICACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES .....	39
3.4.2	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES .....	39
3.4.3	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS TOTALES .....	39
3.4.4	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS .....	40
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS POLIFENOLES.....</b>	<b>40</b>
3.5.1	PERFIL DE ANTOCIANOS .....	41
3.5.2	ESTUDIO DE LOS ANTOCIANOS .....	41
3.5.2.1	Aislamiento de los antocianos .....	41
3.5.2.2	Identificación de los antocianos .....	41
3.5.2.2.1	Determinación de los valores de Rf en distintos sistemas de solventes: 41	
3.5.2.2.2	Estudios de espectroscopia UV-visible: .....	42
3.5.2.2.3	Estudio de los productos de hidrólisis ácida:.....	42
<b>3.6</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....</b>	<b>42</b>
3.6.1	MÉTODO DEL ABTS .....	43
3.6.2	ENSAYO DEL DPPH .....	43
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO.....</b>	<b>45</b>
4.1.1	ANÁLISIS MACROSCÓPICO .....	45
4.1.2	ANÁLISIS MICROSCÓPICO .....	46
4.1.2.1	Muestras simples .....	46
4.1.2.2	Muestras complejas .....	51
4.1.2.3	ANÁLISIS DEL TRANSCORTE .....	65
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>CUANTIFICACION DE POLIFENOLES .....</b>	<b>66</b>
4.3.1	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	66
4.3.1.1	Muestras simples .....	66
4.3.1.2	Muestras complejas .....	67
4.3.2	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES .....	68
4.3.2.1	Muestras simples .....	68
4.3.2.2	Muestras complejas .....	69
4.3.3	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.....	70
4.3.3.1	Muestras simples .....	70
4.3.3.2	Muestras complejas .....	71
4.3.4	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS .....	72
4.3.4.1	Muestras simples .....	72
4.3.4.2	Muestras complejas .....	73
<b>4.4</b>	<b>ANALISIS CUALITATIVO DE POLIFENOLES.....</b>	<b>75</b>
4.4.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL.....	75
4.4.1.1	Perfil cromatográfico de la muestra de referencia.....	75
4.4.1.2	Perfil cromatográfico de las muestras complejas .....	76



4.4.2	ANÁLISIS DE ANTOCIANOS.....	80
4.4.2.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANOS PARA LA MUESTRA DE REFERENCIA .....	80
4.4.2.2	Aislamiento de los antocianos:.....	81
4.4.2.3	Identificación de antocianos .....	82
4.4.2.3.1	Determinación de valores de Rf .....	82
4.4.2.3.2	Estudios de espectroscopia UV-visible: .....	82
4.4.2.3.3	Estudio de los productos de hidrólisis ácida:.....	83
4.4.2.3.3.1	Determinación de los valores de RF x100 del hidrolizado.....	84
4.4.2.3.4	Estudio espectroscópico .....	84
4.4.2.4	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANOS PARA LAS MUESTRAS COMERCIALES.....	85
<b>4.5</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....</b>	<b>86</b>
4.5.1	MUESTRAS SIMPLES .....	86
4.5.2	MUESTRAS COMPLEJAS .....	88
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
<b>5.1</b>	<b>ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO.....</b>	<b>91</b>
5.1.1	ANÁLISIS MACROSCÓPICO .....	91
5.1.1.1	Muestras simples .....	91
5.1.1.2	Muestras complejas .....	91
5.1.2	ANÁLISIS MICROSCÓPICO .....	92
5.1.2.1	ANÁLISIS DE LOS TRANSCORTES.....	94
<b>5.2</b>	<b>ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....</b>	<b>95</b>
5.2.1	CUANTIFICACION DE POLIFENOLES .....	95
5.2.1.1	Análisis de muestras simples .....	95
5.2.1.1.1	Fenoles totales .....	95
5.2.1.1.2	Flavonoides.....	97
5.2.1.1.3	Ácidos hidroxicinámicos .....	97
5.2.1.1.4	Antocianos.....	98
5.2.1.2	Análisis de las muestras complejas .....	99
<b>5.3</b>	<b>ESTUDIO DE ANTOCIANOS .....</b>	<b>100</b>
<b>5.4</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....</b>	<b>103</b>
5.4.1	Actividad antioxidante muestras complejas .....	105
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>108</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCION

*Hibiscus sabdariffa* L., perteneciente a la familia Malvaceae (Wong y col., 2002), es una especie originaria de la India oriental, Asia, África tropical y Sudan y posteriormente introducida en Egipto, Tailandia, Jamaica, México, América Central y del Sur y sudeste asiático (India, Malasia, Senegal y Etiopía), lugares donde suele crecer silvestre o se cultiva (Domínguez López y col., 2008; Morton, 1987; Blanquer hernandez y col., 2009). Es conocida popularmente como Hibisco o “Hibiscus”, Rosa de Jamaica, Rosa de Abisinia o “Flor de Jamaica” (Mexico y Guatemala), Sorrel (Costa rica), viñuela, Quimbombó (Panamá y Cuba), Carcadé, ibisco (Italia), Roselle, Karkadé (Francia), Malven Tee (Alemania), Mesta (India) (Alonso, 2004).

## 1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta subarborescente anual propia de climas secos subtropicales, montañosos, de matorral espinoso, que puede alcanzar de 1 a 3 metros de altura. Presenta un tallo subleñoso, cilíndrico, robusto y de color rojizo, que posee hojas verdes, enteras, ovadas y trilobadas. Presenta flores solitarias, formadas por un cáliz carnoso de color rojo-parduzco, con una corola acampanada, de color amarillo pálido, rosado o blanco, compuestas por cinco pétalos, provistos de una mancha oscura de coloración púrpura en la parte interna. Después de un corto tiempo la corola se marchita y desaparece, quedando sólo los cálices (5 grandes sépalos con forma de copa) y el epicáliz (calículo, formado por 8 a 12 brácteas puntiagudas delgadas situadas alrededor de la base), los cuales se alargan y se tornan carnosos de un color rojo intenso brillante constituyendo la parte empleada de ésta especie (Hidalgo Villatoro y col., 2009; Sayago Ayerdi y Goñi, 2010). El fruto o cápsula es seco, ovalado, densamente veloso, con 1,25 a 2 cm de largo, de color verde en el estado

inmaduro; presenta cinco lóbulos y contiene alrededor de 4 a 20 semillas, las cuales son reniformes (forma de riñón), de color marrón claro a negro y de 3 a 5 mm de largo (Martínez y col., 2000).

La clasificación botánica correspondiente al “Hibiscus” o “Flor de Jamaica” es la siguiente:



Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Malvales  
Familia: Malvaceae  
Genero y especie: *Hibiscus sabdariffa* L.

**Foto 1.** “Flor de Jamaica”

### 1.3 HÁBITAT

Para su crecimiento, la planta requiere suelo profundo, en especial arenoso – arcilloso, rico en materia orgánica y potasio, cuyo pH oscile entre 4,5 y 8,0, expuesto a pleno sol, siempre y cuando no estén sometidos a inundaciones ni presenten encharcamiento. Requiere de 4 a 8 meses de crecimiento, tolerando temperaturas mínimas de 7 a 10 °C, con temperaturas nocturnas de 20 °C. La calidad del material vegetal se determina de acuerdo a diversos factores: las condiciones locales de cultivo, el tiempo de cosecha, el manejo poscosecha y sobre todo, la etapa de secado. Es susceptible al ataque de hongos, virus y bacterias, como también a los insectos.

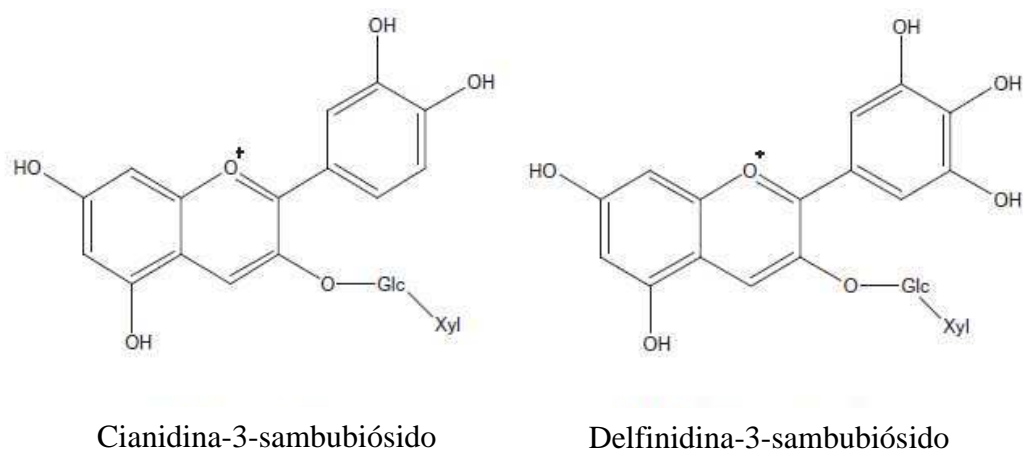
### 1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *HIBISCUS SABDARIFFA*

Entre los componentes presentes en los cálices y calículos del “Hibiscus”, pueden destacarse la presencia de tres tipos de compuestos principales: los antocianos, los polisacáridos y los ácidos orgánicos, entre otros.

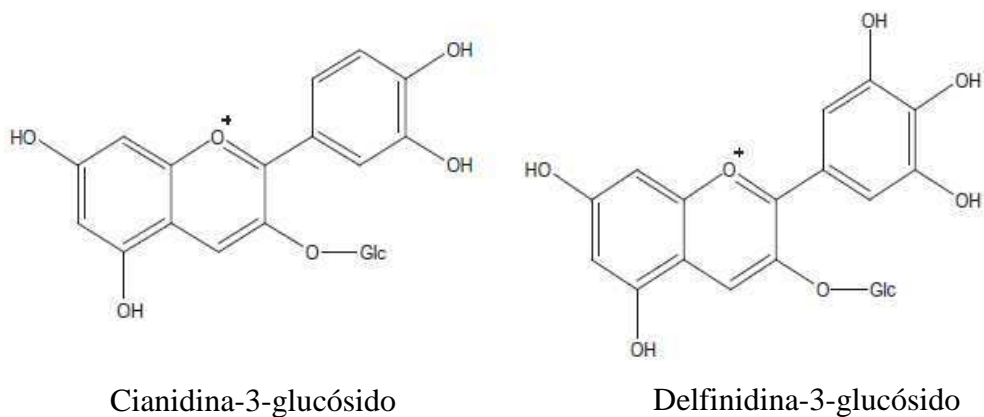
### 1.4.1 ANTOCIANOS Y OTROS POLIFENOLES

Como se mencionó anteriormente, los cálices y cálculos presentan un intenso color rojo, producto de la presencia de cuatro antocianos, dos de ellos se presentan en mayor proporción, como son delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido (Figura 1) (Galicia Flores y col., 2008; Cissé y col., 2009; Juliani y col., 2009) y dos compuestos en menor cuantía como cianidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido (Figura 2) (Ramirez Rodrigues y col., 2011; Salazar González y col., 2012), descritos también por Ali y colaboradores (2005) y Gradinaru y colaboradores (2003) en sus investigaciones.

Puede considerarse que el color es uno de los atributos más importantes de la calidad organoléptica de un alimento y en especial para “Hibiscus”, ejerciendo una gran influencia en su valor estético y sirve de base para la aceptación de una amplia variedad de productos alimenticios por parte del consumidor (Stringheta, 1991).

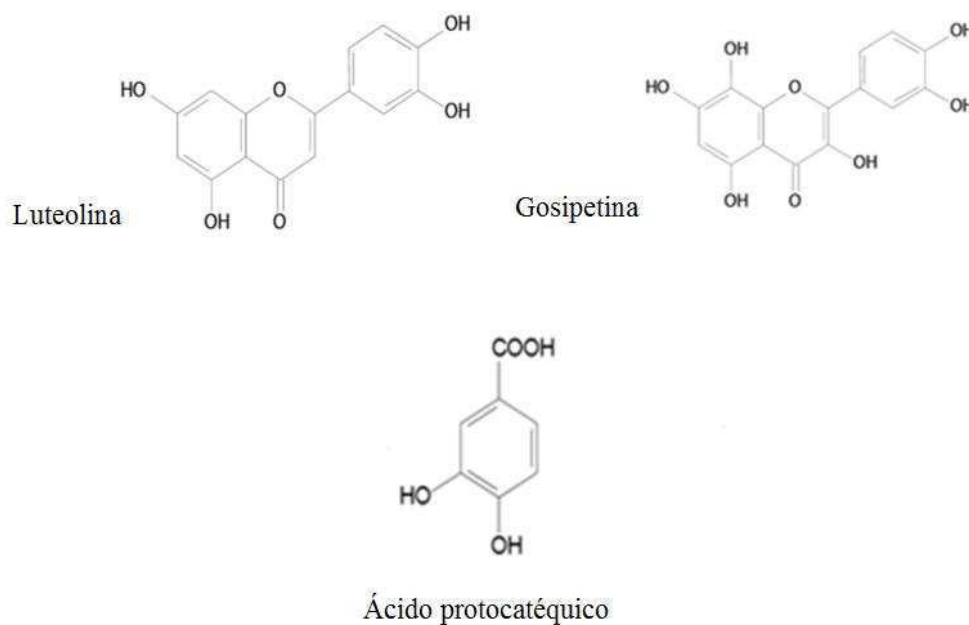


**Figura 1.** Antocianos principales



**Figura 2.** Antocianos presentes en menor proporción

Adicionalmente se reporta la presencia de otros polifenoles (flavonoides), como se observan en la Figura 3 (gospipetina, quercetina, luteolina, hibiscina y sus respectivos glucósidos) (Ali y col., 2005; Babalola y col., 2001; Tsai y col., 2002, 2004). Además se menciona la presencia del ácido protocatéquico (Lee y col., 2002) que se produce naturalmente en el cáliz. Todos estos compuestos se caracterizan por presentar actividad antioxidante. (Wong y col., 2002; Sayago Ayerdi y col., 2007).



**Figura 3.** Polifenoles presentes en *H. sabdariffa*

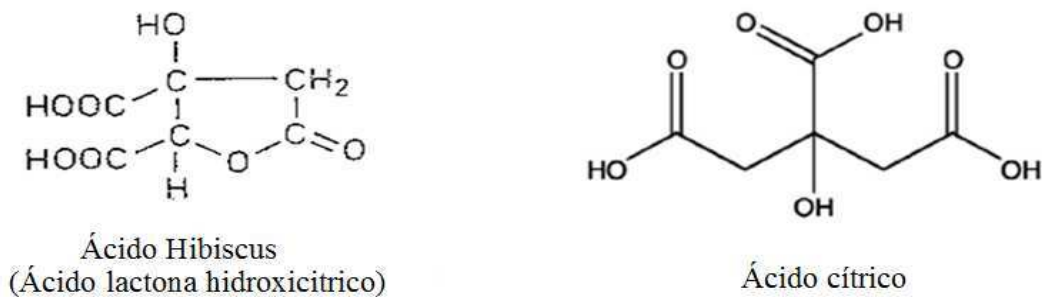
## 1.4.2 POLISACÁRIDOS MUCILAGINOSOS

Los polisacáridos son otro grupo clave de compuestos presentes en grandes cantidades en los cálices de “Hibiscus”. Alrededor de un 50 % lo constituyen los ácidos urónicos, encontrándose además, monosacáridos como la ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa (Müller y col., 1989).

En lo que respecta a su acción fisiológica en la planta, los azúcares solubles (sacarosa), juegan un papel central en el control del desarrollo de la planta y en la respuesta al estrés, como son la sequía, la salinidad del suelo, la alta irradiación solar, el frío y la presencia de herbicidas (Couée y col., 2006; Gibson, 2005).

## 1.4.3 ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los cálices, que se secan de forma natural a la luz del sol y el aire (Meza Jiménez y col., 2009), contienen entre un 15 al 30 % de ácidos orgánicos, que le brindan a las bebidas de “Hibiscus” un sabor ácido agradable (Augstburger y col., 2000). Los principales son el ácido oxálico y el ácido succínico (Fasoyiro y col., 2005), aunque pueden encontrarse también el ácido cítrico (12 al 20 %), ácido málico (2 al 9 %), ácido esteárico, ácido tartárico (8 %), ácido ascórbico (0.02 al 0,05 %) y el ácido Hibiscus (lactona del ácido hidroxícitrico, con una concentración de 15,3 % en los cálices secos) (Hirunpanich y col., 2005; Eggensperger y Wilker, 1996; Schilcher, 1976; Carvajal Zarrabal y col., 2005).



**Figura 4.** Ácidos orgánicos

#### 1.4.4 OTROS COMPONENTES DE INTERÉS

La flor de “Hibiscus” (cálices), constituye una importante fuente de minerales (Tabla 1), principalmente calcio, potasio y en menor cuantía, hierro, magnesio y fósforo; además presenta oligoelementos como: cromo (Cr), cobre (Cu), cobalto (Co), flúor (F), Yodo (I), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), selenio (Se), vanadio (V), cinc (Zn), níquel (Ni), silicio (Si), arsénico (As) y estaño (Sn) (Alarcón Corredor, 2009; Rao, 1996; Ali Bradeldin y col., 2005; Babalola y col., 2001; Jung y col., 2013).

Por otro lado, Hochmuth y colaboradores (2004), detalla la presencia y cuantifica los diversos minerales presentes en las hojas de “Hibiscus”.

Elemento	Glew y col., (1997)	Babalola y col., (2001)	Ortiz-Márquez (2008)	Cid-Ortega y col., (2010)
Calcio (mg/100 g)	1130.00	1584.00	122.06	1230.00
Fósforo (mg/100 g)	163.00	-	-	-
Magnesio (mg/100 g)	309.00	316.00	4403.87	500.00
Potasio (mg/100 g)	-	2060.00	-	2030.00
Sodio (mg/100 g)	3.83	5.50	-	10.17
Hierro (mg/100 g)	6.14	37.80	224.71	8.82
Manganeso	10.00	-	-	8.77
Cobre	-	-	24.19	0.35
Níquel	-	-	11.51	-
Cobalto	-	-	-	0.19
Zinc (mg/100 g)	2.71	7.50	118.57	1.45

**Tabla 1.** Composición (mg/100g de materia seca) en macro y micro minerales de la “Flor de Jamaica”. (Adaptado de Cid Ortega y Guerrero Beltrán, 2012)

Además, el cáliz constituye un importante aporte de fibra, la cual es una excelente fuente de compuestos antioxidantes naturales (Sáyago Ayerdi y col., 2007; Carvajal Zarrabal y col., 2005; Ajiboye y col., 2011). Adicionalmente, contiene diversos compuestos, entre los que se hallan alcaloides, anisaldehído  $\beta$ -caroteno, eugenol y ceras (Ali Bradeldin y col., 2005; Hirunpanich y col., 2005; Duke y col., 2003; Li, 2002; Franz y Franz, 1988; Muller y Franz, 1992). Es también una fuente de vitaminas, como niacina, tiamina y riboflavina (Babalola, 2000; Morton, 1987; Sáyago Ayerdi y Goñi, 2010; Mahadevan y col., 2009).

Con respecto al contenido de aminoácidos, los cálices aportan la mayoría de los aminoácidos esenciales a excepción del triptofano (Tabla 2).

Por otro lado, en las semillas se determinó la presencia de pectina y fitosteroles ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, ergosterol, estigmasterol) (Ali Bradeldin y col., 2005 Hirunpanich y col., 2005)

Aminoácidos	Morton (1987)	Glew y col., (1997)
Ácido aspártico	16.30	10.50
Ácido glutámico	7.20	8.85
Prolina	5.60	5.82
Leucina	5.00	4.21
Lisina	3.90	2.77
Glicina	3.80	2.47
Valina	3.80	3.33
Alanina	3.70	3.46
Arginina	3.60	4.48
Serina	3.50	2.65
Isoleucina	3.00	2.70
Treonina	3.00	2.36
Tirosina	2.20	1.44
Histidina	1.50	1.19
Cistina o Cisteína	1.30	0.87
Metionina	1.00	0.65
Fenilalanina	1.00	2.32

**Tabla 2.** Contenido de aminoácidos (mg/g materia seca) en la “Flor de Jamaica”.

(Adaptado de Cid Ortega y Guerrero Beltrán, 2012)

En la siguiente tabla (Tabla 3) se mencionan, en forma detallada, los distintos componentes presentes en cada uno de los órganos de *Hibiscus sabdariffa* L.



Parte de la planta	Componentes químicos
<b>Flor</b>	Los hidratos de carbono, arabinanos, manosa, sacarosa, tiamina, xilosa, mucílago, la niacina, la pectina, proteínas, grasas, arabinogalactanos, rhamnogalacturans, riboflavina, $\beta$ -caroteno, fitoesteroles, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácidos de frutas, ácido maleico, ácido málico, ácido hibiscic, ácido oxálico, ácido tartárico, (+)-ácido alloxycitronic-lactona, alhydroxycitric-ácido, ácido glicólico, ácido utalonic, ácido protocatéquico, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiosido, cianidina-3-xyloglucoside, delphinidina, delphinidina-3-glucósido, delphinidina-3-sambubiosido, delphinidina-3-xyloglucoside, delphinin, gosipetina, gosipetina-3-glucósido, hibiscetin, hibiscin, hibiscitrin, sabdaretin, sabdaritrin, fibra (crudo), resina, fibra (dietetica), minerales y cenizas.
<b>Semilla</b>	Proteína, grasa y fibra dietética, fósforo, magnesio, calcio, lisina, almidón, colesterol, celulosa, hidratos de carbono, campesterol, $\beta$ -sitosterol, ergosterol, ácido propiónico, pentosanos, ácido pelargónico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, metanol, ácido malvalico, ácido linoleico, ácido estercúlico, ácido caprílico, ácido fórmico, ácido esteárico, cis-12,13-epoxi-cis-9-ácido octadecenoico, alcohol isopropílico, alcohol isoamílico, etanol, 3-metil-1-butanol.
<b>Hoja</b>	proteínas, grasas, hidratos de carbono, calcio, fósforo, hierro, tiamina, $\alpha$ -acetato de terpinilo, anisaldehído, $\beta$ -caroteno, $\beta$ -sitosterol, $\beta$ -D-galactósido, $\beta$ -sitosteril benzoato, niacina, grasa, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, metanol, 3-metil-1-butanol, alcohol bencílico, etanol, ácido málico, fibra y cenizas.
<b>Frutas</b>	$\alpha$ -acetato de terpinilo, pectina, anisaldehído, ácido ascórbico, oxalato de calcio, ácido caprílico, ácido cítrico, ácido acético, etanol, ácido fórmico, ácido pelargónico, ácido propiónico, alcohol isopropílico, metanol, alcohol bencílico, 3-metil-1-butanol, benzaldehído y minerales.
<b>Caliz</b>	Pectina, hierro, fósforo, calcio, manganeso, de aluminio, de magnesio, sodio y de potasio. Mucílago, citrato calcio, ácido ascórbico, gosipetina

**Tabla 3.** Componentes químicos de *Hibiscus sabdariffa* L (Adaptado de Mahadevan y col., 2009)

## 1.5 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES

Hay muchas razones para investigar los polifenoles de las plantas. Desde las estructuras más sencillas, hasta las más complejas, los polifenoles exhiben un rango muy variado de propiedades biológicas que los hacen productos naturales únicos. Desde el punto de vista de la salud humana, los polifenoles son micronutrientes presentes en nuestra dieta y cumplen una función muy importante en la prevención de enfermedades degenerativas, tales como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Haslam (1998) define a los polifenoles como compuestos solubles en agua, que tienen una masa molecular comprendido entre 500 y 3.000 a 4.000 Da y poseen de 12 a 16 grupos hidroxilos fenólicos sobre 5 o 7 anillos aromáticos por cada 1.000 Da de masa molecular.

Dentro de éste amplio grupo de compuestos, pueden mencionarse a las antocianinas (antocianos), los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos, compuestos de especial interés en el presente trabajo.

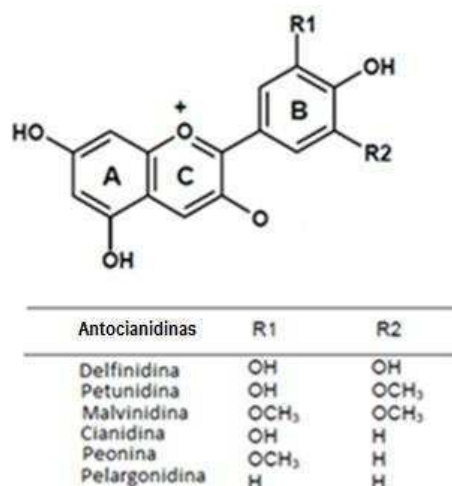
### **1.5.1 ANTOCIANINAS O ANTOCIANOS**

La relación del hombre con las antocianinas se remonta a los albores de la civilización, empleándose extractos ricos en estos compuestos como pigmentos utilizados en el arte de la pintura y la autodecoración de sus cuerpos. El primer uso de las antocianinas como colorante de alimentos data de 1 500 a.c., cuando los egipcios utilizaban vino para mejorar el color de los caramelos. En la actualidad, con la llegada de los alimentos preparados y procesados, se han convertido en importantes colorantes de alimentos naturales (Francis, 1989; Bridle y Timberlake, 1996; Downham y Collins, 2000).

El término antocianina, que deriva del griego anthos = flor y kianos = azul, fue propuesto en 1853 por Marquart para referirse a los pigmentos azules de las flores (Brouillard, 1982). Se presentan habitualmente en la forma de cationes flavilio y son pigmentos naturales solubles en agua que se almacenan principalmente en la vacuola (Giusti y Wrolstad, 2001).

Las antocianinas se basan químicamente en una estructura aromática única, la cianidina, donde todos los demás compuestos se derivan de este pigmento. Las diferencias entre las distintas antocianinas son, principalmente, el número de grupos hidroxilo unidos a la estructura base, el grado de metilación de estos grupos y el número de azúcares unidos a la molécula. (Gradinarua y col., 2003; Stringheta, 1991). Estas modificaciones resultan necesarias para el almacenamiento estable de las antocianinas (Boss y col., 1996; Tohge y col., 2005; Mol y col., 1998; Harborne y Williams, 2000).

La hidrólisis ácida de estos compuestos originan las denominadas antocianidinas, como se observa en la figura 5:



**Figura 5.** Estructuras de antocianidinas (Adaptado de Ross y Kasum, 2002; Harborne, 1984)

La biosíntesis de los antocianos es activada por la exposición a la radiación UV (Takahashi y col., 1991; Méndez y col., 1999; Singh y col., 1999; Markham, 1982; Giusti y col., 1999), y sus funciones en los órganos vegetativos son la de amortiguar el daño por radiación UV de los tejidos vegetales (Takahashi y col., 1991; Koostra, 1994) y la captación de radicales libres actuando como agentes antioxidantes (Tsai y col., 2002; Weisel y col., 2006; Noda y col., 2000; Kähkönen y Heinonen, 2003; Halliwell y Gutteridge, 1999). Estos radicales pueden aumentar su producción en las células por factores de estrés ambientales, como la saturación de flujo de luz o altos niveles de radiación UV (Gould, 2003).

El fraccionamiento, separación y análisis de las antocianinas se pueden lograr a través varias técnicas que incluyen cromatografía de capa fina (TLC) (Strack y Wray, 1989) y cromatografías en columna (CC) (Rivas Gonzalo, 2003), entre otros. La detección de las antocianinas se puede lograr utilizando espectroscopía UV-Vis (Wulf y Nagel, 1978) y la espectroscopia infrarroja (Damberg y col., 2006) entre otras.

Las antocianinas son el grupo más importante y generalizado de compuestos colorantes presentes en los vegetales. En general, en medio ácido (pH 1-2), las antocianinas tienen un intenso color rojizo, que corresponde al equilibrio entre el catión flavilo y una estructura conocida como carbinol pseudobase. Aumentando el pH a 6,5 - 8, se produce la formación de una estructura de color violeta denominada anhidrobases. Los pigmentos derivados de pelargonidina y cianidina producen un color que va del rosa al rojo-púrpura, mientras que los de delphinidina muestran un color púrpura-azulado (Goto y Kondo, 1991).

Estos pigmentos son responsables de los atractivos colores rosa, escarlata, rojo, malva, violeta y azul, de los pétalos, hojas y frutos (Mazza y Miniati, 1993; Markakis, 1982; Francis, 1982, 1989) actuando principalmente como atrayentes para los polinizadores y contribuyendo en gran medida a la calidad estética de los productos derivados de las plantas. El color de los cálices de "Hibiscus" varía desde verde- amarillento hasta rojo intenso, donde los cálices oscuros poseen mayor contenido de antocianinas (Christian y Jackson, 2009; Babalola y col., 2001).

Estos compuestos son relativamente inestables y pueden ser degradados durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Durst y Wrolstad, 2001). De hecho, la temperatura (Garzón, 2008), el pH (Giusti y Wrolstad, 2001), la luz (Rein, 2005), el oxígeno (Garzón, 2008), la presencia de metales (Poo, 2005), de ácidos orgánicos (Garzón, 2008), de azúcares (Rein, 2005), de enzimas (López Munguía y col., 2002), y la copigmentación (Rein, 2005), pueden afectar tanto la estructura como la estabilidad de las antocianinas, resultando en modificaciones importantes del color.

En lo que respecta a la distribución dentro de la planta, las antocianinas pueden localizarse en las hojas, raíces, tubérculos, tallos, semillas, frutos, pétalos o cálices (Mazza y Miniati, 1993). En *Hibiscus sabdariffa* L se encuentran en los cálices, brindando un llamativo color púrpura, los cuales se utilizan ampliamente para elaborar bebidas refrescantes.

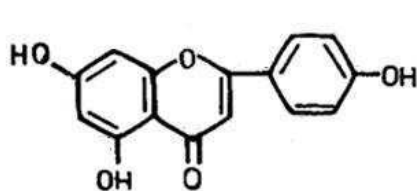
Además de sus características de color, las antocianinas presentan un gran interés debido a sus posibles efectos sobre la salud humana. Varios estudios evidencian que este grupo fitoquímico podría exhibir múltiples efectos biológicos actuando como antiinflamatorio (Wang y Mazza, 2002; Youdim y col., 2002), como agentes antimicrobianos (Gould y Lister, 2006), en la cicatrización de heridas (Lila, 2004), en el tratamiento de la retinopatía diabética y la prevención de la aterosclerosis inducida por el colesterol (Clifford, 2000; Espín y col., 2000).

Otros estudios (Hou, 2003) han reportado que su ingesta inhibe el desarrollo de algunos tipos de cáncer actuando como quimiopreventivo (Lala y col., 2006; Kamei y col., 1995; Kang y col., 2003; Katsube y col., 2003; Zhang y col., 2005); en enfermedades coronarias (Renaud y Delorgeril, 1992) mediante la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (SatueGracia y col., 1997) o como vasoprotectores (Lietti y col., 1976), como así también favoreciendo un mejor comportamiento cognitivo (Chen y col., 2004; Hirunpanich y col., 2006; Cao y col., 1997; Wang y col., 1997; Clifford, 2000; Scalbert y Williamson, 2000).

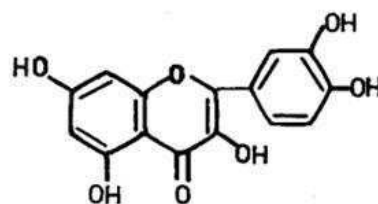
Las antocianinas contribuyen con el 51 % de la actividad antioxidante total reportada para la “Flor de Jamaica” según Tsai y colaboradores (2002), por lo que su consumo en forma de “bebidas frescas” a partir de los extractos es altamente recomendable si se considera la relación que existe entre una dieta rica en antioxidantes y la menor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (Juliani y col., 2009).

## 1.5.2 FLAVONOIDES

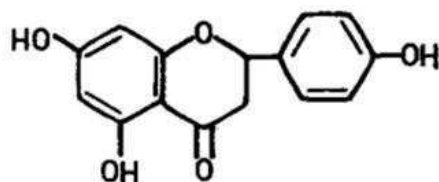
Los flavonoides son sustancias fenólicas polihidroxiladas que constan de dos anillos aromáticos unidos a través de tres átomos de carbono, constituyendo una estructura base denominada C6-C3-C6. Se pueden clasificar de acuerdo a la estructura del anillo C3, quien determina la naturaleza de los compuestos (Bohm, 1998), que incluyen a las flavonas (apigenina, luteolina, etc.), los flavonoles (quercetina, miricetina), las flavanonas (naringenina y hesperidina), las catequinas (catequina y galocatequina), las antocianidinas (cianidina y pelargonidina), y las isoflavonas (genisteína y daidezina), entre otros (Ross y Kasum, 2002).



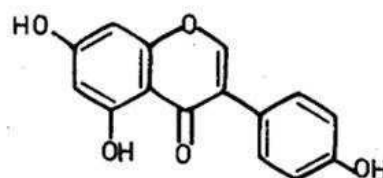
Apigenina



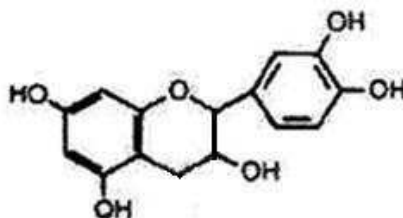
Quercetina



Naringenina



Genisteína



Catequina

**Figura 6.** Formulas químicas de los flavonoides (Adaptado de Ferraro, 1983)

La biosíntesis de los flavonoides es el resultado de la unión de dos rutas biosintéticas, la ruta del ácido shikímico (o vía aromática) y la ruta del acetato (vía malonato) y ha sido estudiada extensamente en una amplia gama de plantas (Winkel Shirley, 2001; Marles y col., 2003; Broun, 2005; Dixon y col., 2005; Koes y col., 2005).

Los flavonoides son uno de los grupos más estudiados de metabolitos secundarios en las plantas superiores. Están ampliamente distribuidos en alimentos y bebidas de origen vegetal, como frutas, verduras, té, cacao y vino (Kelm y col., 2005; Schreier, 2005). Realizan una amplia variedad de funciones fisiológicas y ecológicas y son conocidos por ser sintetizados por las plantas como compuestos de defensa contra microorganismos patógenos, insectos y herbívoros, entre otros. Su actividad es probablemente debido a su capacidad para formar complejos con proteínas y con las paredes celulares bacterianas (Marjorie, 1999). Estos resultados están de acuerdo con García Alonso y colaboradores (2006), quienes encontraron que los polifenoles de las plantas han demostrado un alto potencial antibacteriano. Adicionalmente presentan funciones que incluyen una mediación en las interacciones entre el polen y el estigma, la atracción de insectos para la polinización y dispersión de semillas, la protección contra los efectos perjudiciales de la radiación UV (Wiseman y col., 1996), como reguladores de la actividad hormonal (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Dixon y Steele, 1999; Koes y col., 1994; Shirley, 1996) y pueden actuar además como potentes agentes antioxidantes.

Por otro lado, algunos estudios realizados describen a los flavonoides como eficaces agentes quimiopreventivos. Estos estudios demostraron que los flavonoides inhiben la carcinogénesis *in vitro* y hay pruebas fehacientes de que también lo hacen *in vivo* (Caltagirone y col., 2000; Miyagi y col., 2000). Esta inhibición se produce al afectar los eventos moleculares en la iniciación, promoción y etapas de progresión del cáncer, como lo demuestran algunos estudios utilizando diferentes modelos celulares, los cuales sugirieron que ciertos flavonoides pueden inhibir la iniciación como la progresión del tumor (Deschner y col., 1991; Makita y col., 1996; Tanaka y col., 1999; Kandaswami y col., 1991). Un ejemplo de ello es el papel de las isoflavonas en la prevención del cáncer de

mama y de próstata (Cornwell y col., 2004; Dixon, 2004; Adlercreutz, 2002; Greenwald, 2004; Holzbeierlein y col., 2005; Magee y Rowland, 2004).

Adicionalmente, su empleo cobra importancia en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad. La mayoría de estos informes se centran en las características antioxidantes de las dietas ricas en flavonoides y su mejora en la salud cardiovascular (Mitchell y col., 1998; Wiseman y col., 2000).

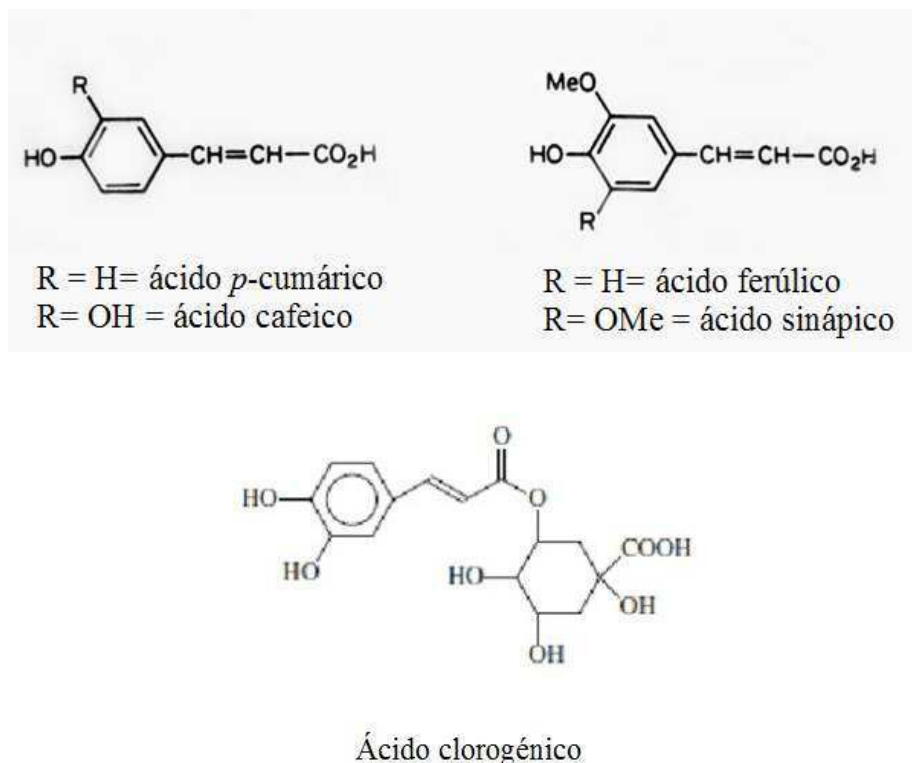
### **1.5.3 FENILPROPANOIDES (ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS)**

Los fenilpropanoides son compuestos naturales que tienen un anillo aromático al que está unido una cadena lateral de tres átomos de carbono. Biosintéticamente derivan del aminoácido aromático fenilalanina y pueden contener uno o más residuos C6-C3.

Dentro de este grupo de compuestos, los más destacados son los ácidos hidroxicinámicos, que son importantes no solo como elementos esenciales en la constitución de la lignina, sino también en relación con la regulación del crecimiento y resistencia a las enfermedades, ya que poseen actividad antimicrobiana (Padmavati y col., 1997; Werlein y col., 2005).

Cuatro son los ácidos hidroxicinámicos más comunes en la naturaleza: ferúlico, sinápico, cafeico y *p*-cumárico. Su separación es simple mediante el empleo de técnicas de cromatografía planar (por ejemplo TLC) y son fácilmente detectados por su fluorescencia azul-verdosa a la luz UV. Estos compuestos se presentan normalmente en las plantas bajo la forma de ésteres, como el ácido clorogénico, que es un éster formado por los ácidos cafeico y quínico.





**Figura 7.** Ácidos hidroxicinámicos

## 1.6 USOS DE *HIBISCUS SABDARIFFA*

### 1.6.1 USO ALIMENTICIO

Los primeros reportes del uso alimenticio del “Hibiscus” datan del siglo XVII, como especie cultivada en Brasil. Fue introducido en Jamaica en el siglo XVIII y empleado como aromatizante ácido, utilizando los cálices de las flores para tal fin. En 1840 Guatemala cultivaba el “Hibiscus” para su utilización alimenticia y en 1899, en los mercados de México, se vendían los cálices secos. El “Hibiscus” llega a Europa a fines del siglo XIX, empleándose en la elaboración de bebidas refrescantes. Actualmente forma parte de ceremonias de devoción en la India, considerándose sagrada dentro de ese contexto, en el culto brindado al dios elefante Ganesh. A causa de su importancia económica, ha sido investigada desde principios del siglo XX y existen en la actualidad numerosos cultivos en el mundo con el fin de mejorar su calidad (Alonso, 2004).

El uso más común de los cálices de “Hibiscus” es para obtener una infusión aromática que es de color rojo-púrpura, denominada Té de Jamaica (AbouZid y col., 2011). También es empleado como aromatizante ácido y colorante en jaleas, jarabes, mermeladas, salsas y como corrector del sabor de bebidas o de medicamentos (Blanquer hernandez y col., 2009; Serra y col., 2013; Galicia Flores y col., 2008). Los cálices son ricos en Vitamina C, esencial en la prevención del escorbuto, que proporciona además un marcado efecto antibacterial y contribuye a la absorción de iones metálicos. Es probable que la sensación de frescura que se percibe al tomar una bebida fría de “Flor de Jamaica” esté relacionada con esta característica (Prenesti y col., 2007).

Es muy común encontrar en el comercio concentrados de “Flor de Jamaica”, ya sea en forma líquida o en polvo, para la preparación de bebidas instantáneas e infusiones, empleándose además para teñir vinos. En la India occidental se utiliza como ingrediente de color y sabor del ron (Sayago Ayerdi y Goñi, 2010) y en Costa Rica en vísperas navideñas, los afrocostarricenses emplean el “Hibiscus” junto con el jengibre como refresco.

Por otro lado, se detalla el empleo de sus hojas, que pueden ser consumidas frescas o cocidas. En Sudán, las hojas se comen verdes o secas, cocidas con cebolla y nueces molidas y en Malasia, se comen como vegetales, después de su cocción, en la preparación de sopas y salsas. Además son un excelente forraje y son bien aceptadas por el ganado y aves (Augstburger y col., 2000; Alonso, 2004).

Adicionalmente se utilizan las semillas para consumo humano y animal, constituyendo una muy buena fuente de proteínas (El Adawy y Khalil, 1994), de ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes solubles en lípidos y para la obtención de aceite vegetal rico en fitoesteroles y otros tocoferoles (especialmente  $\beta$ -sitosterol y  $\gamma$ -tocoferol). En África, las semillas se tuestan y muelen hasta obtener un polvo que luego se utiliza en sopas y salsas para el consumo humano. Por su alta proporción de ácido linolénico (ácido graso esencial para el ser humano) puede formar parte de la dieta diaria ya que el organismo no lo sintetiza. Se emplean también, en la alimentación animal, los tallos tiernos como follaje para cabras y ganado vacuno y las semillas en alimento para gallinas.

Los pétalos proporcionan compuestos glucósidos y compuestos fenólicos (Wong y col., 2002; Sayago Ayerdi y col., 2007) y son potencialmente una buena fuente de agentes antioxidantes (Prenesti y col., 2007; Segura Carretero y col., 2008; Tsai y col., 2002). También se reporta la presencia de flavonoides que tienen relevancia nutricional dada su actividad biológica ya que son abundantes en los alimentos de origen vegetal (Rice Evans y Miller, 1997)

### **1.6.2 USOS MEDICINALES**

Como es común en la familia de las Malváceas, el contenido en mucílago le proporciona a esta especie propiedades antiinflamatorias, útiles en casos de constipación e irritación de vías respiratorias; en el tratamiento de los resfriados despeja la nariz tapada y calma la tos. También posee propiedades digestivas y es empleado en la prevención de enfermedades hepáticas y como ferífugo (Liu y col., 2002; Ali Bradeldin y col., 2003, 2005).

Los cálices y las flores de “Hibiscus”, bajo la forma de infusión, son empleados en la medicina tradicional como diurético, colerético, antiespasmódico y como hipotensor, propiedades atribuidas a los flavonoides (Bisset, 1994; Peris y col., 1995). En Europa, las flores se recomiendan como refrescantes para tratar enfermedades del tracto respiratorio superior y trastornos circulatorios. Los extractos provenientes de los cálices se han utilizado en el tratamiento de pacientes que presentan cálculos renales, debido a su efecto uricosúrico (Prasongwatana y col., 2008). En Egipto se emplea el “Hibiscus” para tratar enfermedades nerviosas y cardíacas.

En Nigeria, la decocción de las semillas se utiliza tradicionalmente para mejorar o inducir la lactancia (Gaya y col., 2009) y en algunas comunidades de Taiwan son empleadas como laxante (mediante la estimulación de la peristalsis intestinal) y tónico (Duke, 1983), o en Myanmar, donde son utilizadas para tratar la debilidad (Perry, 1980). Se registra también su empleo contra la neurosis, presentando además acción astringente, emoliente y sedativa. (Mati y Boer, 2011; Seeram y col., 2002; Alonso, 2004; Sayago Ayerdi y Goñi, 2010; Blanquer hernandez y col., 2009; Serra y col., 2013; Duke y col., 2003; Tsai y col., 2002).

Respecto de otras actividades biológicas reconocidas para los extractos de “Hibiscus” podemos citar:

**1. Acción sobre el sistema cardiovascular**, mediante un efecto antihipertensivo (Ngamjarus y col., 2010; Ngamjarus Wahabi y col., 2010; Christian y col., 2006; Mojiminiyi y col., 2007; Ajay y col., 2007; Blanquer Hernandez y col., 2009; Beltrán Debón y col., 2010; McKay y col., 2010; Herrera Arellano y col., 2004). La infusión o decocción de “Hibiscus” ha demostrado, en animales de laboratorio, propiedades hipotensoras, sin evidenciar efectos adversos y reduciendo tanto la presión sistólica como diastólica (Kerharo, 1971; Onyeneke y col., 1999).

En plan de dilucidar el mecanismo de acción, se puede decir que el efecto antihipertensivo de los extractos de los cálices no es mediado a través de una inhibición de los nervios del sistema simpático sino por efectos vasorrelajantes, mediados principalmente por el flavonoide gossipetina (Owolabi y col., 1995; Odigie y col., 2003; Herrera Arellano y col., 2004; Ali y col., 2005).

Adicionalmente, un estudio demostró que el extracto metanólico de los cálices de *Hibiscus sabdariffa L.* induce un efecto vasodilatador de forma espontánea en ratas hipertensas (Ajay y col., 2007). En otros trabajos, se informa el empleo de infusiones de las hojas y de las flores en el tratamiento de la presión arterial (Alzweiri y col., 2011). Por otro lado, el ácido clorogénico ha mostrado actividad antihipertensiva reduciendo de manera significativa la presión arterial (Watanabel y col., 2006).

Un efecto cardioprotector ha sido demostrado por Jonadet y colaboradores (1990) y Chen y colaboradores (2003), entre otros. Dicho efecto se ha corroborado *in vivo* en ratas Sprague-Dawley, manifestando la reducción del ritmo cardiaco entre ratas tratadas (suministrándole extracto de la planta en el agua de la bebida) y no tratadas (solo agua) (Ali y col., 2005).

**2. Efecto diurético** (Alarcón Alonso y col., 2012; Gurrola Díaz y col., 2010; Mozaffari Khosravi y col., 2009; Herrera Arellano y col., 2007; Blanquer hernandez y col., 2009; Prasongwatana y col., 2008; Aguwa y col., 2004; Odigie y col., 2003). Los alimentos con propiedades diuréticas tienen la capacidad de favorecer la eliminación de líquidos y toxinas del organismo constituyendo ésta es una de las propiedades de los extractos acuosos de la “Flor de Jamaica”.

En estudios *in vivo* realizados en ratas Wistar- Kyoto, se pudo comprobar el efecto diurético de las infusiones de “Hibiscus” en ratas hipertensas, acompañado de un aumento en la excreción de sodio, potasio y ácido úrico (Ali y col., 2005; Cáceres y col., 1987). Dicha actividad fue también evaluada en sujetos voluntarios sanos, pero a través de la toma de un jugo de “Hibiscus” (16g/día), observándose un descenso en el nivel de excreción de creatinina en orina, ácido úrico, citrato, tartrato, calcio, sodio, potasio y fosfato (Mojiminiyi y col., 2000; Prasongwatana y col., 2008; Aguwa y col., 2004).

**3. Efecto hipolipemiante e hipocolesterolemiante** (Hirunpanicha y col., 2006; Fernandez Arroyo y col., 2011; Blanquer hernandez y col., 2009; Herrera Arellano y col., 2004). Se entiende por hipolipemiante a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de lípidos en la sangre.

Se ha estudiado el efecto que ejercen los extractos de “Hibiscus” en ratas albinas machos alimentados con una mezcla de colesterol y ácido cólico durante 12 semanas; el efecto hipolipemiante fue evidente en cuanto a la disminución del nivel de lípidos totales, colesterol y triglicéridos (El Saadany y col., 1991). Otros estudios concuerdan con los resultados anteriormente mencionados los cuales demostraron que los extractos de “Hibiscus” reducían los triglicéridos, el colesterol y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Lee y col., 2002; Blanquer Fernandez y col., 2009; Chen y col., 2003, 2004; Kao y col., 2009; Fernández Arroyo y col., 2011; Lin y col., 2007).

Es de destacar que los polifenoles y carotenoides ejercen su principal acción biológica a través de mecanismos de antioxidación y secuestro de radicales libres, mientras que el principal efecto de los fitoesteroles como el  $\beta$ - sitoesterol y ergoesterol se produce a través de la inhibición de la absorción intestinal de colesterol (Saura Calixto y col., 2005; Wang y Ng, 1999).

**4. Efecto hipoglucemiante** (Yi Sun y col., 2013). Se ha demostrado que los extractos de *Hibiscus sabdariffa* L, presentan efectos hipoglucemiantes (Wen chin y col., 2009), los cuales actúan sobre la glucosamina, un compuesto tóxico para las células beta de los islotes de Langerhans, responsables de la producción de insulina. Resultados similares fueron reportados por Sini y colaboradores (2001), mientras que Hand y Chawla Maninde (1989), demostraron una reducción significativa en la glucosa sanguínea y el peso corporal.

**5. Acción antimicrobiana.** Los extractos obtenidos de los cálices presentan efectos antibacterianos frente a gérmenes gram positivos y negativos, como *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, lo que sugiere que pueden poseer una acción terapéutica en el tratamiento de trastornos gastrointestinales y en enfermedades de la piel (Rogger y col., 1990). Por ejemplo, el ácido protocatéquico puede inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* como así también de hongos (Fernández y col., 1996; Aziz y col., 1998). El aceite extraído de las semillas ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre algunas bacterias y hongos *in vitro* (Mohamed y col., 2007).

### **1.6.3 OTROS USOS**

Algunos de sus usos más frecuentes derivan del empleo de los tallos, los cuales proporcionan una fibra excelente muy similar al yute, la cual resulta útil en la fabricación de prendas de vestir, ropa de cama, redes de pesca, cuerdas y artículos similares (Clydesdale y col., 1979). Por otro lado, podría utilizarse también como relleno en aislantes térmicos para materiales de construcción prensado o para prevenir y controlar la erosión.

En lo que respecta a su uso en cosmética, de las semillas se obtiene un aceite de baja viscosidad, propiedad muy valorada por los fabricantes de cosméticos. En Malasia, las semillas se utilizan para producir exfoliantes y jabones.



**Figura 8.** *Hibiscus sabdariffa L.* y sus actividades biológicas validadas hasta el momento.

## 1.7 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Actualmente los seres humanos estamos expuestos a un gran número de agentes oxidantes, producto de la contaminación ambiental, compuestos químicos que se añaden a los alimentos (que mejoran sus propiedades sensoriales o su conservación), o simplemente como productos de las reacciones bioquímicas que se lleva a cabo en el organismo, resultado en la formación de radicales libres, compuestos con electrones libres (es decir, no apareados) muy reactivos, responsables del daño oxidativo a las moléculas de las célula con efectos negativos en el metabolismo celular (Venereo, 2002). Los compuestos capaces de eliminar dichos radicales se conocen como agentes antioxidantes (Birute Guzmán y col., 2009).

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o propagación de las reacciones en cadena mediada por radicales libres. Entre los antioxidantes más conocidos se encuentran la vitamina C y la vitamina E. Algunos estudios han demostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano pueden causar daño oxidativo a las diferentes moléculas, tales como

lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y por lo tanto, están involucrados en la fase de iniciación de algunas enfermedades degenerativas (Faudale y col., 2008) que incluyen procesos tumorales (Kimula y Crapo, 2004), enfermedades cardiovasculares (Singh y Jialal, 2006), enfermedad de Alzheimer (Smith y col., 2000), Párkinson (Bolton y col., 2000), aterosclerosis (Upston y col., 2003) y enfermedades hepáticas por consumo de alcohol (Arteel, 2003), entre otras.

Es así, que la actividad atrapadora de radicales libres constituye, en muchos casos, la base molecular de las acciones farmacológicas atribuidas a los extractos vegetales. Por lo tanto, la determinación de la actividad antioxidante en *Hibiscus sabdariffa L.* es quizás una de las actividades biológicas más estudiadas para dicha especie (Büyükbalci y El, 2008; Oboh y Rocha, 2008; Vankar y Srivastava, 2008; Frank y col., 2012; Leyva y col., 2012; Fernández Arrollo y col., 2012; Salazar González, 2012). Esta acción está principalmente mediada por los polifenoles y debido a que el perfil de éstos compuestos puede variar por interacción de la planta con agentes bióticos y abióticos, se decide llevar a cabo la determinación de dicha actividad, con el objeto de conocer y comparar las actividades antioxidantes de los diversos materiales analizados.

Los antioxidantes, incluyendo flavonoides, carotenoides y vitamina C (Howard y col., 2003), pueden neutralizar el efecto oxidativo de los radicales libres (Yanishlieva maslarova, 2001) y hay varios métodos basados en la captura de dichos radicales, como son el DPPH (2,2 - difenil- 1 - picrilo- hidracilo) (Kanner y german, 1987) y el reactivo ABTS (2,2' azino-bis (3 -etilbenzo tiazolina- 6 -sulfónico) (Re y col., 1999). El método de ABTS se ha utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de extractos de plantas con características hidrófilicas o lipófilicas: el radical  $ABTS^+$ , sintetizado artificialmente, es atrapado por los antioxidantes de los extractos vegetales, por lo que la desaparición del color del radical indica la capacidad antioxidante del extracto. Este método ha sido validado positivamente debido a que es económico en comparación con otros (Kuskoski y col., 2004).



## **2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general planteado abarca el estudio de ésta especie desde distintas áreas del conocimiento: farmacobotánica, fitoquímica y actividad biológica, aplicables al control de calidad de muestras y extractos de “Hibiscus” en un laboratorio de baja complejidad.

Se realizará el análisis de un material vegetal de referencia (que constituirá un punto de referencia en el diagrama de estudio) y de muestras del comercio, con el objeto de evaluar la autenticidad de las muestras desde el punto de vista botánico, el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante.

Dado que la composición química de polifenoles puede verse afectada por factores genéticos y ambientales, y que éstos compuestos son responsables de las diversas actividades anteriormente mencionadas, es que se propone el análisis de muestras provenientes del comercio, con el objeto de determinar aquellas que presenten la mayor actividad ensayada, constituyéndose en probables fuentes de compuestos con actividad antioxidante.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer los parámetros farmacobotánicos de un material de referencia para su posterior empleo en el análisis del control de calidad de muestras comerciales (suplementos dietarios).
2. Realizar el análisis de los polifenoles presentes en el material de referencia y en las muestras comerciales. Dicho análisis comprenderá:
  - 2.1. Obtención de extractos acuosos (infusión) y etanólico, sobre los que se realizarán:
    - 2.1.1. Estudio del perfil de polifenoles: antocianos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y fenoles totales.
    - 2.1.2. Cuantificación de los polifenoles: fenoles totales, antocianos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos.
3. Determinación de la actividad antioxidante para los extractos anteriormente mencionados (material de referencia y muestras comerciales).

## **2.3 HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO**

Como hipótesis de trabajo se plantea que los caracteres microscópicos presentes pueden ser empleados en el control de calidad de muestras de “Hibiscus”.

Además, es conocida la presencia de polifenoles, pero dado que la composición química de polifenoles puede verse afectada por factores genéticos y ambientales, se propone determinar el perfil de polifenoles presente. Las variaciones esperadas se verán reflejadas en la actividad antioxidante que presentan los extractos de ésta especie.

La metodología empleada es la actualmente utilizada en los estudios farmacobotánicos, de análisis de polifenoles y de actividad antioxidante.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental estará basado en dos instancias de análisis. En una primera instancia se procederá al análisis farmacobotánico, fitoquímico y de actividad antioxidante, de un material de referencia. Se obtendrán aquí los resultados que constituirán los caracteres de referencia que serán empleados posteriormente en el control de calidad de muestras comerciales. En una segunda etapa, se analizarán las muestras comerciales, que serán sometidos al mismo protocolo. Dichos materiales podrán ser tisanas monodrogas o constituyentes de mezclas.

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL A ANALIZAR

##### 3.1.1 MUESTRAS SIMPLES

###### 3.1.1.1 Muestra N°1: Material de referencia

Muestra proveniente de la colección de material de referencia botánico perteneciente a la Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA –Buenos Aires (Argentina). Material vegetal determinado por el Ingeniero Agrónomo Hernán Bach, INTA Castelar. Constituida por los cálices y epicálices (cálculo) enteros de las flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Fecha: Julio del 2013.



**Foto 2.** Material de referencia: *Hibiscus sabdariffa* L

### **3.1.1.2 Muestra N°2**

Muestra comercial rotulada como “Flor de Jamaica” cultivada y cosechadas en el departamento del Tolima (Colombia). Constituida por cálices y epicálices (calículo) enteros. Fecha: Agosto del 2013.

### **3.1.1.3 Muestra N°3**

Muestra comercial sin rótulo. Adquirida en la ciudad de Bogotá (Colombia). Constituida por los cálices y epicálices (calículo) enteros. Fecha: Agosto del 2013.

### **3.1.1.4 Muestra N°4**

Muestra comercial sin rótulo. Adquirida en Buenos Aires (Argentina). Constituida por material vegetal triturado. Fecha: Septiembre del 2013.

### **3.1.1.5 Muestra N°5**

Muestra comercial rotulada como “Flor de Jamaica”. Empacada y distribuida por comercializadora el panal (Colombia). Constituida por los cálices y epicálices (calículo) enteros. Fecha Septiembre del 2013.

### **3.1.1.6 Muestra N°6**

Muestra comercial rotulada como “Flor de Jamaica”. Adquirida en la ciudad de Bogotá (Colombia). Constituida por material vegetal triturado. Fecha: Octubre del 2013.

### **3.1.1.7 Muestra N°7**

Muestra comercial rotulada como “Flor de Jamaica”. Adquirida en la ciudad de Bogotá (Colombia). Constituida por material vegetal triturado. Fecha: Octubre del 2013.

### **3.1.1.8 Muestra N°8**

Muestra comercial sin rótulo. Adquirida en Buenos Aires (Argentina). Constituida por material vegetal finamente triturado. Fecha: Noviembre del 2013

### **3.1.1.9 Muestra N°9**

Muestra comercial sin rótulo. Adquirida en Buenos Aires (Argentina). Constituida por material vegetal finamente triturado. Fecha: Noviembre del 2013.

### **3.1.1.10 Muestra N°10**

Muestra comercial rotulada como Té Rosella. Elaborado en Misiones (Argentina). Constituida por material vegetal finamente triturado. Fecha: Diciembre del 2013.

## **3.1.2 MUESTRAS COMPLEJA**

### **3.1.2.1 Muestra N°1**

Muestra comercial adquirida en Buenos Aires (Argentina). Fecha: Septiembre del 2013. Muestra constituida por material vegetal finamente triturado, donde se presentan los siguientes componentes: Cereza, “Hibiscus”, Rosa mosqueta, cáscara de manzana y cáscara de naranja.

### **3.1.2.2 Muestra N°2**

Muestra comercial adquirida en Buenos Aires (Argentina). Fecha: Octubre del 2013. Muestra constituida por material vegetal triturado, con los siguientes componentes: “Hibiscus”, rosa mosqueta, cáscara de manzana y cáscara de naranja.

### **3.1.2.3 Muestra N°3**

Muestra comercial adquirida en Buenos Aires (Argentina). Fecha: Noviembre del 2013. Muestra constituida por material vegetal triturada, con los siguientes componentes: “Hibiscus”, rosa mosqueta, canela, papaya, manzana, lemongrass, hojas de blackberry, mango y pétalos de rosa.

## **3.2 ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO**

El análisis farmacobotánico comprendió el análisis macroscópico y microscópico de las muestras vegetales.

### **3.2.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO**

Forma de presentación

Caracteres organolépticos: color, sabor, olor.

Determinación de materia extraña

### **3.2.2 ANÁLISIS MICROSCÓPICO**

Observación de las muestras en polvo

Análisis de disociados

Análisis de cortes (si el material vegetal lo permite)

Micrometría (microscopía cuantitativa)

Se realizaron disociados leves con el objeto de determinar los caracteres microscópicos relevantes empleados en el análisis del control de calidad de las muestras comerciales.

El método de disociado leve consistió en someter el material vegetal a la acción de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %, durante 5 min, a ebullición. Luego se enfrió y se lavó el material disociado con agua destilada y se observaron al microscopio. El disociado se observó mediante el empleo de microscopía de campo claro. Ésta técnica ha sido seleccionada dado su facilidad de ejecución, poco tiempo de desarrollo y economía, indispensables en un laboratorio de baja complejidad. Se empleó un microscopio Zeiss Axioscop 2 Plus provisto de una cámara digital Sony Exawave HAD.

Se realizó, además, un estudio de microscopía cuantitativa, que consiste en la medición de los elementos celulares relevantes (tricomas, drusas, fibro-esclereidas, tráqueas, etc). Para las mediciones se empleó un ocular graduado Zeiss 10X.

### **3.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO**

Sobre el material vegetal mencionado, se llevaron a cabo las extracciones correspondientes, que consistieron en extractos acuosos (infusión) y etanólicos.

Para cada extracto se determinó su perfil cromatográfico, se cuantificaron los fenoles totales, antocianos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y se determinó la actividad antioxidante.

#### **3.3.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO (INFUSIÓN)**

Se realizaron infusiones al 5 % según la Farmacopea Nacional Argentina VI° edición.

A 0.5 g de los cálices pulverizadas, contenidos en un erlenmeyer, se adicionaron 10 mL de agua destilada hirviendo y se dejó actuar durante 20 min. Luego se filtró y el residuo se lavó con agua destilada hasta volumen final de 10 mL de extracto.

#### **3.3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO**

Se partió de 0.5 g de material seco y molido. La extracción se llevó a cabo con 10 mL de etanol acuoso al 50 %, se colocó en el ultrasonido durante 15 minutos y se dejó en la heladera a 4 °C, durante 24 h. Posteriormente se filtró y se descartó el marco.

### **3.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES**

#### **3.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES**

Se determinó mediante el método de Folin–Ciocalteu de acuerdo con Makkar y colaboradores (1993). Alícuotas (50 µL) de los extractos fueron transferidas a tubos de ensayos y el volumen llevado a 500 µL con agua desionizada. Se adicionaron a continuación 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 mL (1250 µL) de solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %. Luego de 40 minutos se midió la absorbancia a 725 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico. El contenido de los fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (EAG: mg ácido gálico/g material seco) Scalbert y colaboradores (1989). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

#### **3.4.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES**

(Adaptación de las técnicas de Woisky y Salatino, 1998; Chang y col., 2002).

Alícuotas de 0,1 mL de cada extracto se mezclaron con 1.5 mL de etanol 95 %. Se agregaron posteriormente 0.1 mL de una solución acuosa de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10 % (p/v) y 0.1 mL de una solución acuosa 1 M de acetato de sodio. Se llevó a un volumen final de 5 mL con agua destilada y la mezcla y se dejó reposar por 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 415 nm. Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresó como equivalentes de rutina (ER: mg rutina g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por duplicado.

#### **3.4.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS TOTALES**

Se determinó mediante una modificación del método de Dao y Friedman (1992).

Alícuotas de 50 µL de cada extracto se llevaron a volumen (2 mL) con etanol absoluto. Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco). Los ensayos se realizaron por duplicado.



### 3.4.4 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS

Se realizó mediante la técnica de cuantificación por espectroscopia diferencial, según una modificación de la técnica de Lee y colaboradores (2005). Brevemente, a una alícuota del extracto se le adicionó una solución buffer KCl pH 1,0. Se realizaron las lecturas a 520 nm y 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Hewlett 8452A (Packard Diode Array Spectrophotometer). Luego se efectuaron nuevamente las lecturas en buffer acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) pH 4,5. Se calcularon las diferencias de absorbancia:  $(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH1}} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH4,5}}$ . Y se expresaron los contenidos de antocianos como equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG: mg de cianidina-3-glucósido/g material seco).

### 3.5 ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS POLIFENOLES

Se realizó por medio de cromatografías bidimensionales en capa delgada de celulosa (TLC y HPTLC), según metodología estándar de Mabry y colaboradores (1970) y Markham (1982).

Para el análisis bidimensional de los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos, se emplearon el sistema de solventes BAA (butanol-ácido acético-agua, relación 6:1:2) para la primera dimensión y ácido acético al 15 % para la segunda dimensión. Los cromatogramas se observaron a la luz ultravioleta ( $\lambda=366 \text{ nm}$ ) antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco. Se observaron manchas violetas lo cual indica presencia de ácidos hidroxicinámicos y posteriormente se revelaron los flavonoides con el reactivo de productos naturales (AEDBE 1 % MeOH) (Wagner y Bladt, 1996) observados nuevamente a la luz ultravioleta de 366 nm. De esta manera se obtuvo el patrón de distribución de los compuestos para el material en estudio que orienta acerca de su composición cualitativa.

### **3.5.1 PERFIL DE ANTOCIANOS**

Se llevó a cabo mediante la realización de cromatografías en TLC de Sílica Gel empleando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26). Los cromatogramas se observan a la luz visible.

### **3.5.2 ESTUDIO DE LOS ANTOCIANOS**

#### **3.5.2.1 Aislamiento de los antocianos**

Un método común, sencillo, barato y relativamente rápido para la separación de compuestos es la cromatografía descendente en papel. Esta técnica consiste en aplicar una pequeña cantidad del extracto sobre un soporte inerte que contiene la fase estacionaria (celulosa), se deja secar (ya sea a temperatura ambiente o con el uso de aire caliente) y la placa se coloca entonces en un recipiente de vidrio (cuba cromatográfica) que contiene la fase móvil, BAA (6:1:2), la cual se moverá en forma descendente como resultado de la acción capilar. Debido a que cada compuesto tendrá una forma única de interactuar con la matriz y el solvente, algunos compuestos se moverán más rápido que otros. Luego se deja secar la placa y se toma el valor de Rf que es la relación entre la distancia de migración del compuesto dividido por la distancia que el disolvente ha migrado (frente de solvente) y que tiene por definición un valor máximo de 1. El valor de Rf tiende a ser constante para una combinación dada de compuesto, solvente y la matriz. Posteriormente, cada banda se eluyó con HCl 0.01 % en metanol.

#### **3.5.2.2 Identificación de los antocianos**

##### **3.5.2.2.1 Determinación de los valores de Rf en distintos sistemas de solventes:**

El estudio cromatográfico se llevó a cabo en TLC en sílica gel, utilizando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua, 100:11:11:26 (SV1) y en soportes de celulosa, utilizando como fases móviles BAA (butanol-ácido acético-agua, relación 6:1:2, (SV2)) y n-butanol-ácido clorhídrico 2N (1:1, fase superior, (SV3)).

#### 3.5.2.2.2 Estudios de espectroscopia UV-visible:

Se realizaron los espectros de absorción entre 400 y 800 nm de los antocianos aislados en HCl 0.01 % V/V en metanol. Además se realizaron los espectros luego del agregado de una solución de AlCl<sub>3</sub> 5 % en metanol, que permite determinar el patrón de hidroxilación de los compuestos.

#### 3.5.2.2.3 Estudio de los productos de hidrólisis ácida:

Se realizó la separación de los azúcares de los antocianos mediante hidrólisis ácida. Una alícuota de extracto se somete a una hidrólisis con HCl 2N a 100 °C, durante 60 minutos. El hidrolizado se dejó enfriar, se filtró y se le agregó 3 ml de acetato de etilo para luego extraer el aglicón utilizando 3 mL de alcohol amílico, permaneciendo los azúcares en la fase acuosa ácida. La fracción amílica (de color rojo) se evaporó hasta sequedad y el residuo se volvió a disolver en HCl 0.01 % en metanol.

Esta solución fue estudiada aplicando los métodos cromatográficos anteriormente mencionados: determinación de valores de R<sub>f</sub> en los solventes Forestal (ácido acético-ácido clorhídrico concentrado-agua, 30:3:10) y BAA y mediante el estudio de los espectros UV-Visible.

### **3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Se estudió la actividad antioxidante total hidrosoluble de los extractos anteriormente mencionados, empleando como sondas ABTS y DPPH.

### **3.6.1 MÉTODO DEL ABTS**

Se realizó siguiendo la metodología descrita en Chanda y Dave (2009). El ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazolina- 6-sulfónico) reacciona con persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) para generar el radical catión  $ABTS^+$ . Este radical libre es neutralizado en presencia de una sustancia antioxidante, que en este caso será el extracto vegetal a ensayar.

Brevemente, una mezcla (1:1, v/v) de ABTS (7,0 mM= 3.84g/L) y persulfato de potasio (4,95 mM=1.34g/L) se mezclaron y se dejaron en reposo durante la noche, a temperatura ambiente en la oscuridad, con el fin de formar radicales  $ABTS^+$ . Se tomaron 20 ml de la solución de radicales  $ABTS^+$  y se mezclaron con 300 mL de ETOH abs para obtener el reactivo para las 10 muestras. Una alícuota de 0,1 mL de la mezcla de ABTS y persulfato de potasio y se mezcló con 2,5 mL ETOH abs para obtener el 100 % de reacción. Para realizar la medición se toman 4 tubos de ensayo con concentraciones de 175, 150, 100, 50  $\mu$ L de ETOH abs y se mezclaron con concentración de 25, 50, 100 y 150  $\mu$ L de cada extracto respectivamente, seguido a esto se le agregaron 2800  $\mu$ L de reactivo en oscuridad a cada tubo de ensayo y se determinó la disminución de la absorbancia a 734 nm, después de 10 min a 37 °C en la oscuridad.

### **3.6.2 ENSAYO DEL DPPH**

Este método se basa en la medición de la habilidad de compuestos antioxidantes para reducir el radical DPPH el cual se encuentra en medio metanólico, a partir del decremento en absorbancia de la reacción, en función del tiempo (Prior y col., 2005). Esta reacción produce un cambio de color en la solución y se monitorea espectrofotométricamente a 517 nm.

Brevemente, alícuotas de cada extracto 25, 50, 100  $\mu$ L se mezclaron y fueron llevadas a 0,5 mL con metanol absoluto y luego se incorporó 1 mL de la solución de DPPH. Luego de 20 minutos, a temperatura de 25 °C, se determinó la disminución de la absorbancia a 517 nm, en oscuridad.

### **3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En todos los casos, los resultados cuantitativos se expresaron como valor promedio  $\pm$  desvío estándar. El análisis entre extractos se efectuó mediante el análisis comparativo de las medias (t-test), mediante el empleo del programa SigmaStat 3.5®.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO

#### 4.1.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO

El material vegetal analizado se presentó bajo la forma de material entero, triturado y finamente triturado. En el caso de los materiales enteros, éstos constan de los cálices, constituidos por 5 sépalos, de 20 a 35 mm, por lo general con una nervadura central clara y prominente y de los epicálices (calículos), de 8 a 12 brácteas, de 6 a 15 mm de largo. El cáliz y epicáliz son carnosos, de color rojo-morado intenso, más pálido en la base y en el interior.

Todas las muestras presentaron sabor dulce y olor característico. En ninguno de los materiales analizados se detectó, macroscópicamente, la presencia de material extraño.



**Foto 3.** Cálices enteros de las flores



**Foto 4.** Muestra de “Hibiscus” triturada



**Foto 5.** Muestras de “Hibiscus” finamente trituradas

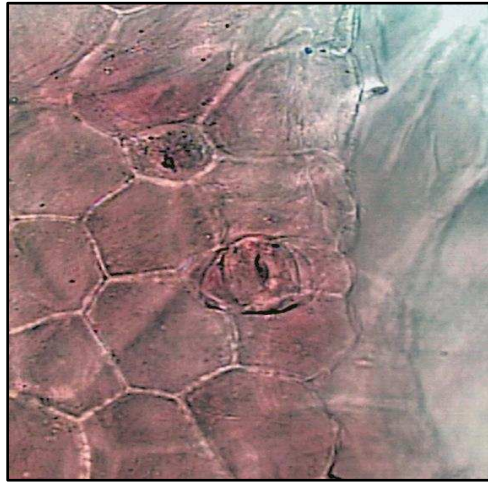
## 4.1.2 ANÁLISIS MICROSCÓPICO

### 4.1.2.1 Muestras simples

El análisis de las muestras simples (monodrogas) comprendió el estudio de 10 muestras.

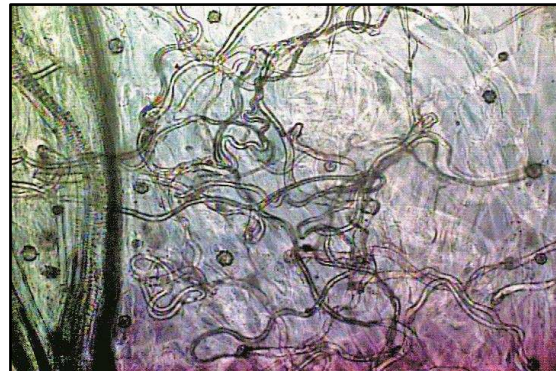
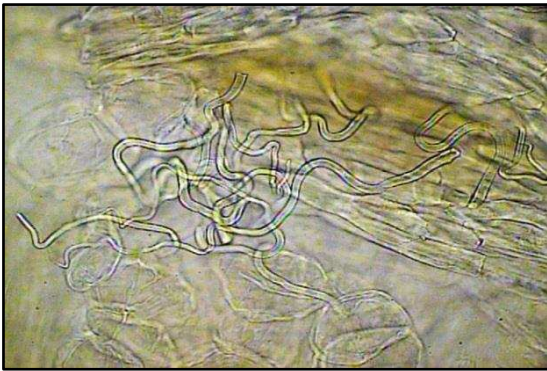
En primera instancia, se analizó la **muestra de referencia** (N° 1) que permitió determinar la presencia de diferentes caracteres microscópicos de relevancia. A continuación se detallan dichos caracteres:

1. Epidermis con estomas: Se observan principalmente estomas del tipo anomocítico. Los estomas tienen tamaños comprendidos entre 25 a 30  $\mu\text{m}$ .



**Foto 6.** Epidermis con estomas

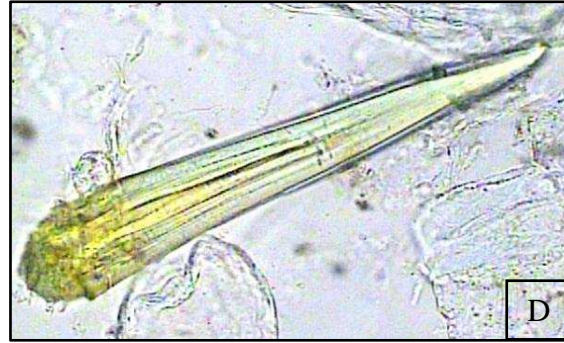
2. Tricomas glandulares unicelulares flexuosos.



**Foto 7.** Tricomas flexuosos

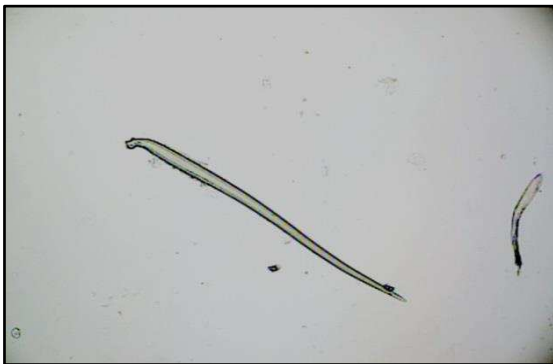


3. Tricomas eglandulares cónicos unicelulares, de pared gruesa, con longitudes comprendidas entre 100 a 1000  $\mu\text{m}$ .



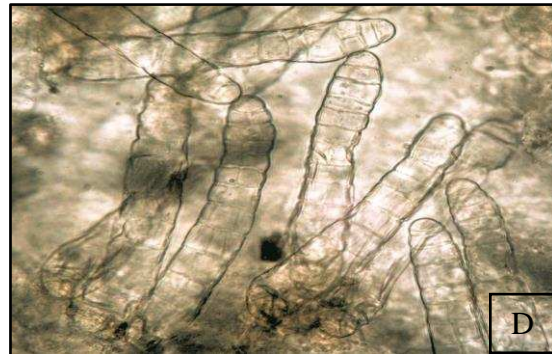
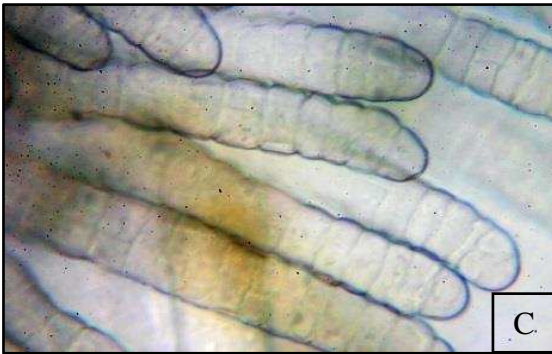
**Foto 8.** Tricomas cónicos, de pared delgada (A, B, C) y de pared gruesa (D)

4. Tricomas eglandulares unicelulares finos (500 a 900  $\mu\text{m}$ ).



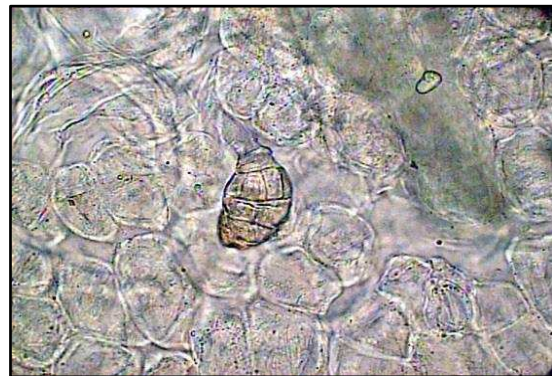
**Foto 9.** Tricomas finos

5. Tricomas glandulares pluricelulares no capitados (150 a 200  $\mu\text{m}$ ).



**Foto 10.** Tricomas glandulares no capitados (A y B); agregados de tricomas glandulares no capitados (C y D)

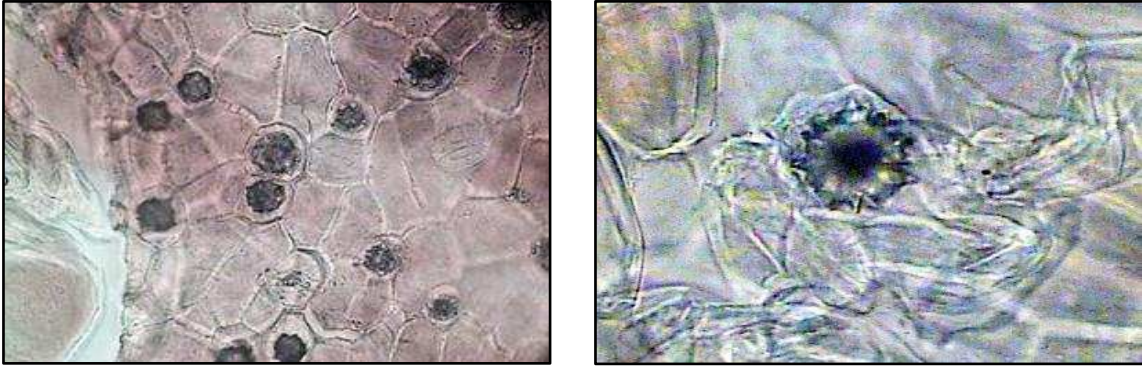
6. Tricomas glandulares capitados de pie unicelular y cabeza pluricelular (60 a 90  $\mu\text{m}$ )



**Foto 11.** Tricomas glandulares capitados

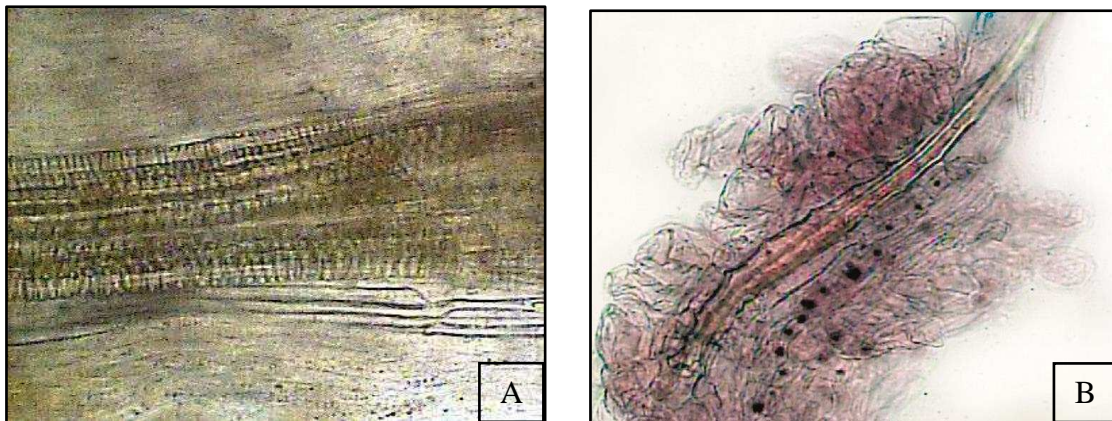


7. Drusas (pequeños cristales de oxalato de calcio) con tamaños comprendidos entre 15 a 30  $\mu\text{m}$ .



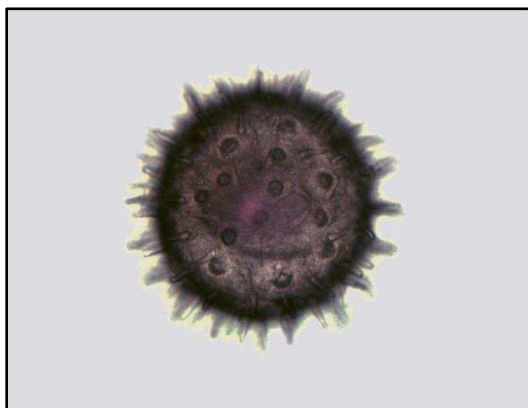
**Foto 12.** Drusas

8. Tráqueas espiraladas, fibroesclereidas (750 a 1000  $\mu\text{m}$ ) y fibras.



**Foto 13.** Tráqueas espiraladas (A), fibroesclereidas (B)

## 9. Grano de polen



**Foto 14.** Grano de polen

En lo que respecta al análisis de las **muestras comerciales** (N° 2 al N° 10), independientemente de su forma (material entero, triturado y finamente triturado), todas presentaron los mismos caracteres observados para la muestra de referencia.

Cabe destacar, que si bien todos los caracteres se hallaron presentes, estos se encontraron en diferentes proporciones relativas.

### 4.1.2.2 Muestras complejas

Se realizó el análisis de tres **muestras complejas** (Rotuladas como muestras N° 1 al N° 3), que incluían al “Hibiscus” en su composición.

La técnica empleada para todas ellas correspondió, en un primer paso, a la separación del material macroscópicamente afín a “Hibiscus” del resto de los demás componentes.

Una vez separados, se procedió al análisis microscópico (polvo y disociado leve), que permitió detectar la presencia de:

- **Muestra N° 1**

Muestra constituida por: Cereza, “Hibiscus”, Rosa mosqueta, cáscara de manzana y cáscara de naranja.



**Foto 15.** Muestra N° 1

El análisis microscópico nos permitió determinar la presencia de “Hibiscus” en la muestra visualizándose los mismos caracteres mencionados en la muestra de referencia, particularmente los tricomas flexuosos, eglandulares finos y gruesos, drusas, traqueas y los tricomas glandulares capitados y no capitados.

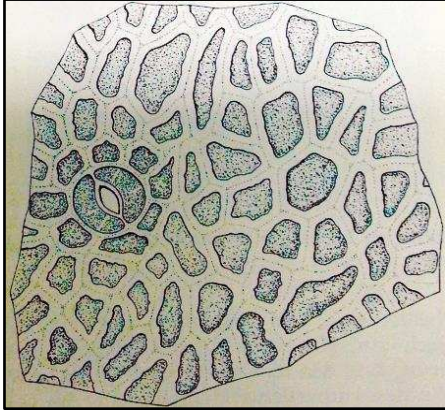
Respecto de los otros componentes de la muestra, se detallan a continuación las características principales:

- **Cereza**

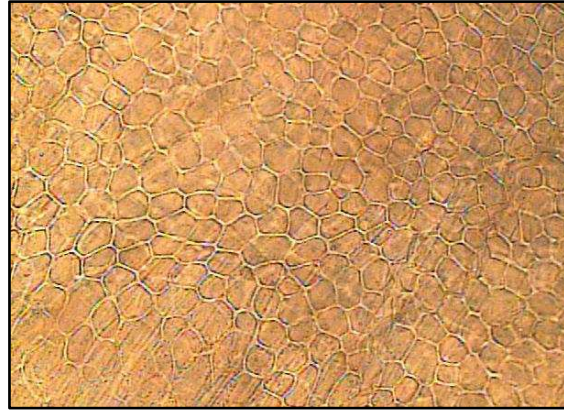
Con el nombre de cereza se conoce a los frutos de diversas especies del género *Prunus*. *Prunus cerasus* L. (Rosaceae) es el nombre científico del cerezo o guindo, cuyo fruto presenta una piel superior (epidermis o epicarpio) compuesta por células a menudo casi triangulares, de paredes gruesas de forma irregular, entre las que pueden presentarse estomas. El mesocarpio está compuesto principalmente de células parenquimáticas en las que se encuentran comúnmente drusas cristalinas de oxalato de calcio. Además pueden observarse los tejidos conductores. El endocarpio se compone de células y fibras moderadamente engrosadas, conteniendo a la semilla en su interior.

El elemento preponderante presente en la muestra correspondió al epicarpio del fruto.





**Figura 9.** Epicarpio del fruto.  
Esquema de referencia

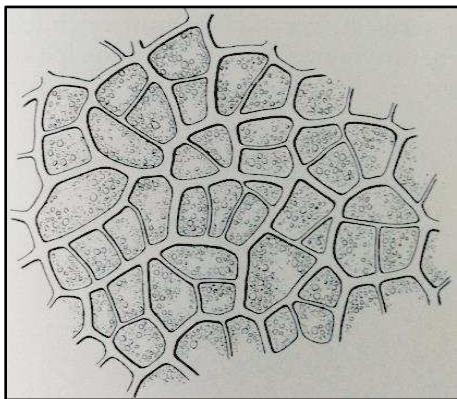


**Foto 16.** Epicarpio de cereza de la muestra

#### ▪ **Cáscara de manzana**

Origen botánico: *Malus sylvestris* Mill. (Rosaceae)

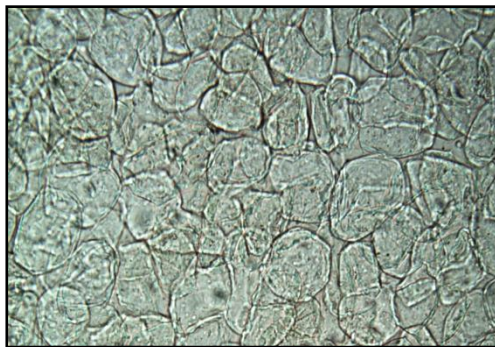
La epidermis de la cáscara de la manzana está constituida por células poliédricas e irregulares de paredes delgadas. La “pulpa de la manzana” se compone de células parenquimatosas predominantemente redondas de 80  $\mu\text{m}$ . Esta epidermis fue observada en la muestra.



**Figura 10.** Esquema de referencia



**Foto 17.** Cáscara de manzana de la muestra



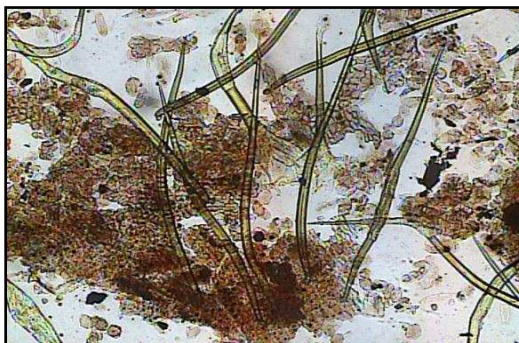
**Foto 18.** Células del parénquima de la muestra

- **Rosa mosqueta**

Origen botánico: *Rosa eglantheria* L. (Rosaceae).

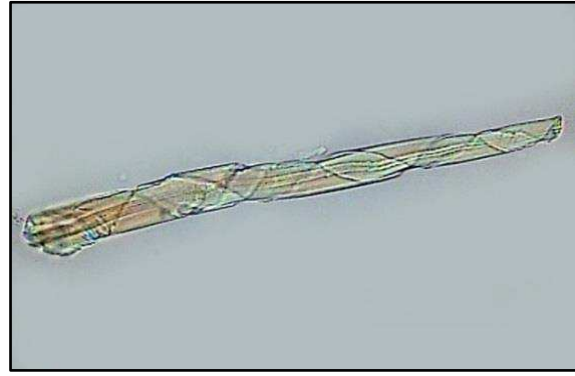
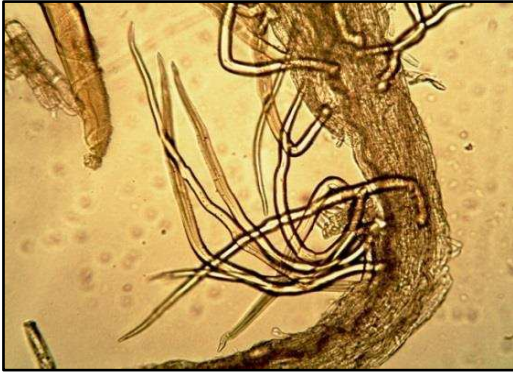
Se conoce con el nombre de *Rosa rubiginosa* L. o *Rosa eglantheria* L. Es un arbusto silvestre de la familia de las rosáceas. Es una planta nativa de Europa, donde se cultiva sobre todo en el Reino Unido por su bella flor de color rosa pálido, cuyo fruto deshidratado se usan fundamentalmente como infusiones, té medicinal, materia prima para la fabricación de jugos y sopas y principalmente en la elaboración de mermeladas.

El fruto presenta una epidermis constituida por células cuadrangulares, con cutícula delgada y tricomas unicelulares con paredes gruesas, drusas y fibroesclereidas (Torres y col., 1998). Todos estos elementos se hallaron presentes en la muestra analizada.



**Foto 19.** Tricomas presentes en rosa mosqueta. Detalle de la pared y base de los tricomas.  
(Material de Referencia)





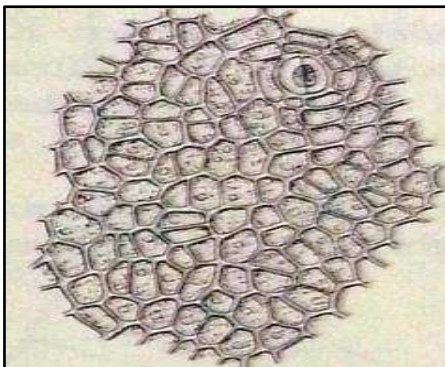
**Foto 20.** Tricomas presentes en rosa mosqueta (Muestra analizada)

- **Naranja**

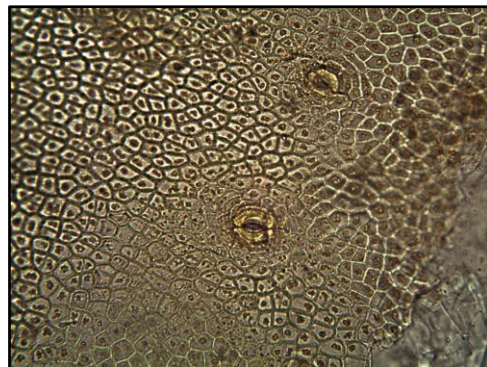
Origen botánico: *Citrus x sinensis* Osbeck (Rutaceae).

Los frutos, conocidos como hesperidios, presentan un epicarpio formado por una epidermis glandulosa que presenta células poligonales, de color amarillo, que técnicamente se denomina flavedo. Se pueden encontrar estomas en número moderado. Debajo de las capas superiores se encuentra gradualmente un tejido de color blanquecino, con estructura esponjosa llamado albedo, que constituye el mesocarpio y por último un endocarpio constituido por células productoras de jugo.

Tanto la epidermis del fruto, como el flavedo y el albedo, fueron encontrados en la muestra analizada.

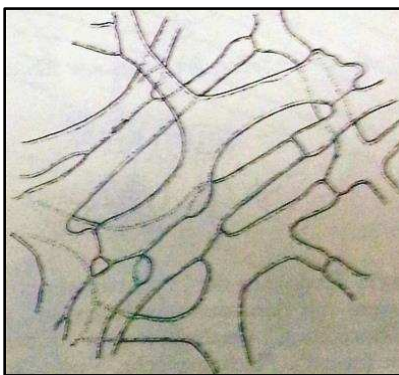


**Figura 11.** Parte superior de la cáscara de naranja (Flavedo). Esquema de referencia.



**Foto 21.** Flavedo de la muestra.





**Figura 12.** Esquema de referencia (Albedo)



**Foto 22.** Parénquima esponjoso del mesocarpio de la cáscara de naranja presente en la muestra

- **Muestra N° 2**

Muestra constituida por: “Hibiscus”, rosa mosqueta, cáscara de manzana y cáscara de naranja.



**Foto 23.** Muestra N° 2

El análisis microscópico de esta muestra permitió visualizar los elementos correspondientes al “Hibiscus”. También se determinó la presencia de rosa mosqueta, cáscara de manzana y de naranja, cuyos caracteres microscópicos observados concuerdan con los anteriormente mencionados.

- **Muestra N° 3**

Muestra constituida por: “Hibiscus”, rosa mosqueta, canela, papaya, manzana, lemongrass, hojas de blackberry, mango y pétalos de rosa.



**Foto 24.** Muestra N° 3

En el estudio microscópico, tanto para el “Hibiscus” como para rosa mosqueta y manzana, se observaron los caracteres identificadorios detallados anteriormente.

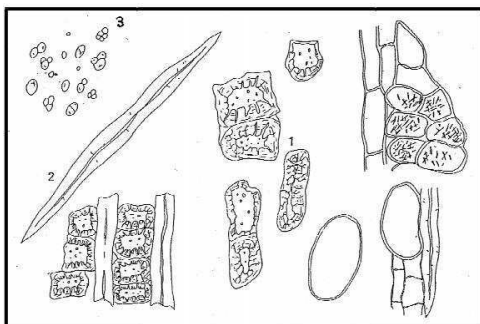
Respecto de los otros componentes de la muestra, se detallan a continuación sus características principales:

- **Canela**

Origen botánico: *Cinnamomum zeylanicum* Nees (Lauraceae).

Se conoce como canela de Ceylán a la corteza interna desecada de *Cinnamomum zeylanicum* Nees. Se presenta habitualmente como canutos enrollados o bajo la forma de polvo, ambos de color marrón rojizo, con olor y gusto aromático. En cuanto a sus características microscópicas, se puede destacar que presenta células pétreas aisladas o en pequeños grupos de forma y tamaño diferentes, aunque generalmente son más o menos isodiamétricas, con las paredes engrosadas, estrecho lumen con numerosas puntuaciones y estriaciones visibles. Presenta además parénquima con células oleíferas, almidón y abundantes fibras lignificadas.

En la muestra analizada, pudo determinarse la presencia de células pétreas (esclereidas) aisladas o en grupo, como así también de fibras lignificadas.



**Figura 13.** Esquema de referencia



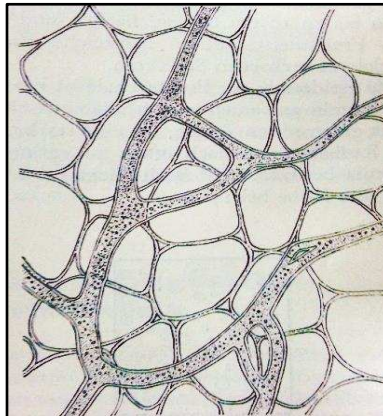
**Foto 25.** Celulas pétreas y fibras lignificadas de la muestra.

- **Papaya**

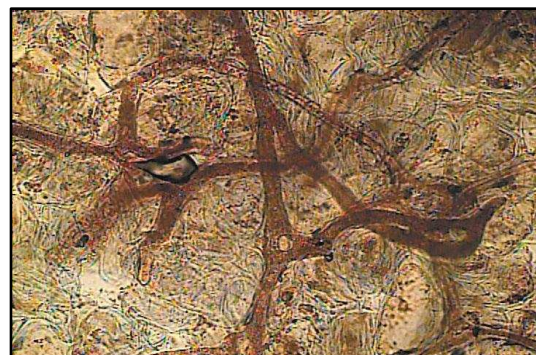
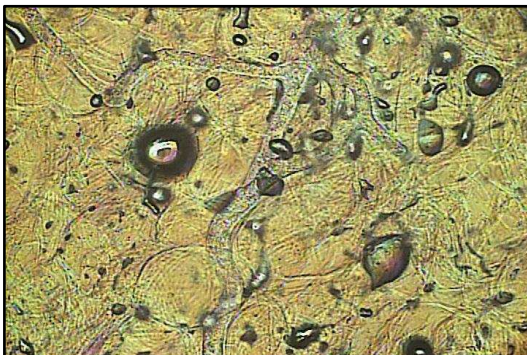
Nombre científico de la papaya es *Carica papaya* L. (Caricaceae).

Las células de la epidermis del fruto (epicarpio) presentan tamaños entre 15 a 25  $\mu\text{m}$ , poligonales o casi cuadradas, observándose regularmente estomas y ausencia de tricomas. En las capas hipodérmicas, se pueden encontrar drusas de oxalato de calcio. Los elementos micrográficos relevantes de la papaya son los tubos laticíferos, en su mayoría ramificados, que están a través de toda la pulpa desde las capas más internas hasta justo debajo de la epidermis.

En la muestra analizada, pudo observarse la presencia de los tubos laticíferos mencionados.



**Figura 14.** Esquema de referencia



**Foto 26.** Tubos laticíferos de la muestra



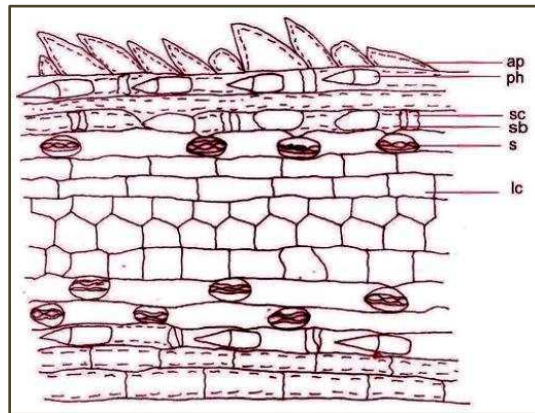
### ▪ Lemongrass

Origen botánico: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Gramineae).

Se conoce como lemongrass o pasto limón a las hojas de *Cymbopogon citratus*.

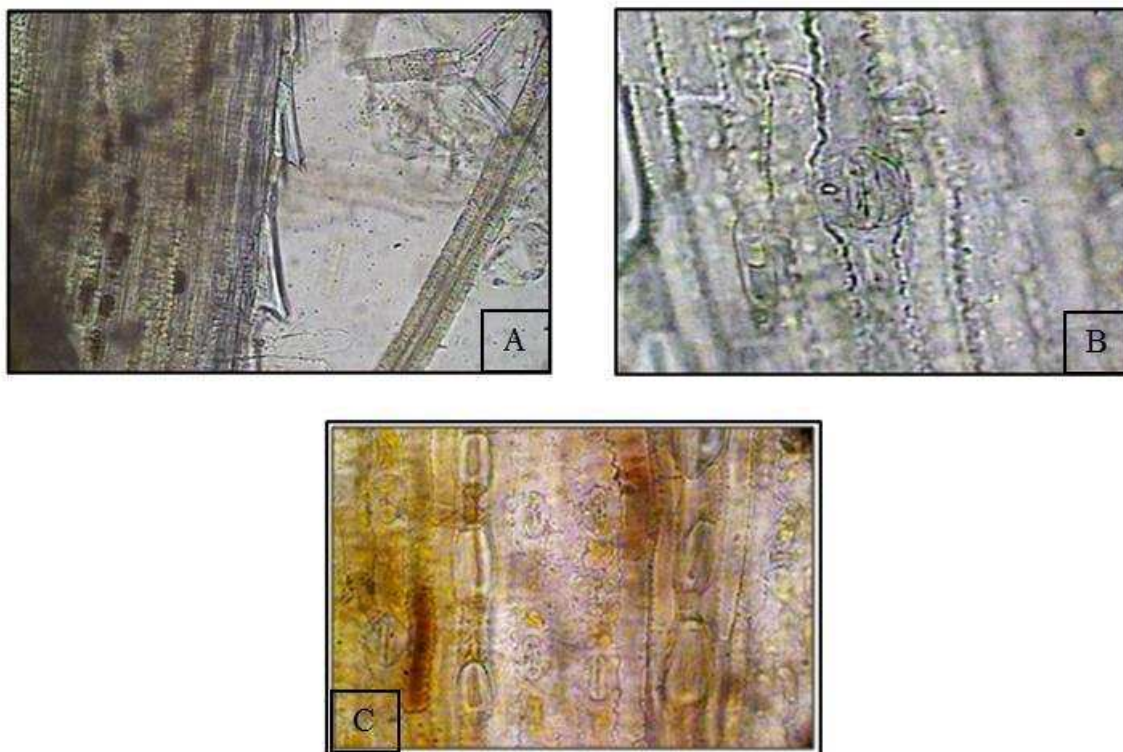
La descripción microscópica para esta especie destaca la presencia de tricomas que se distribuyen escasamente, en la epidermis adaxial y espinas angulares desiguales, con extremo en punta y bases ensanchadas, como también alargadas, dispuestas en filas en los márgenes de las hojas. La epidermis presenta células largas rectangulares y de pared celular ondulada. Además se observa la abundancia de estomas grandes, en forma de cúpula, en la epidermis adaxial.

En la muestra analizada, pudo determinarse la presencia de una epidermis constituida por células rectangulares de pared ondulada, estomas y espinas y tricomas en punta.



**Figura 15.** Esquema de referencia de la epidermis de la hoja de *Cymbopogon citratus*.

ap - espina angular; pH – tricoma en punta; sc - célula corta; lc - célula larga; sb - cuerpo de sílice; s – estomas.



**Foto 27.** Tricomas en punta (A) y estomas (B y C) de la epidermis de la muestra

- **Hojas de blackberry**

Nombre científico: *Rubus fruticosus* L. (Rosaceae) comúnmente conocido como zarza o zarzamora.

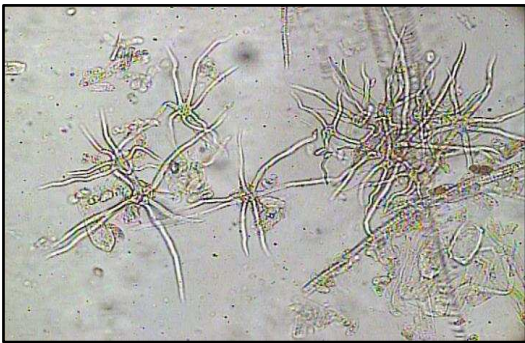
Las hojas presentan tricomas unicelulares cónicos, de paredes gruesas y lignificadas, tricomas estrellados, tricomas unicelulares rizados, tricomas glandulares con una cabeza pluricelular y un tallo multicelular, que se pueden observar en la zona de la nervadura central y de las venas más grandes de la hoja. Se presentan además drusas y tráqueas con engrosamientos en espiral o anular.

Habitualmente las hojas de blackberry son adulteradas con las provenientes del raspberry (frambuesa), muy pubescente (tomento) en la epidermis inferior, presentando gran cantidad de tricomas delgados, enmarañados.

En la muestra analizada, se determinó la presencia de todos los tricomas anteriormente mencionados.



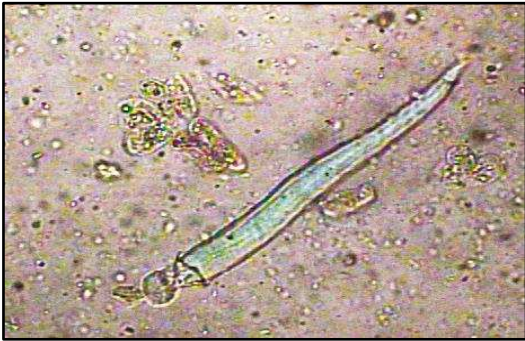
**Foto 28.** Tricomas gruesos erizados.



**Foto 29.** Tricomas estrellados.



**Foto 30.** Tricomas glandulares.



**Foto 31.** Tricoma unicelular de pared Gruesa.

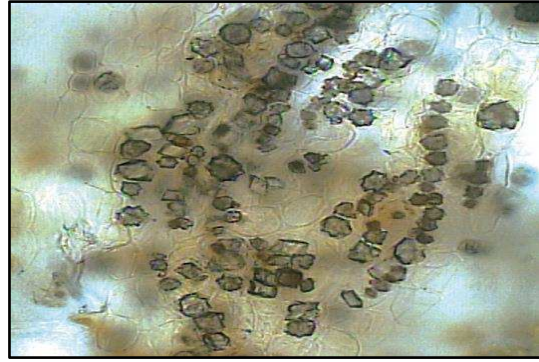


**Foto 32.** Tricoma unicelular de pared Delgada.





**Foto 33.** Cicatrices en la epidermis.



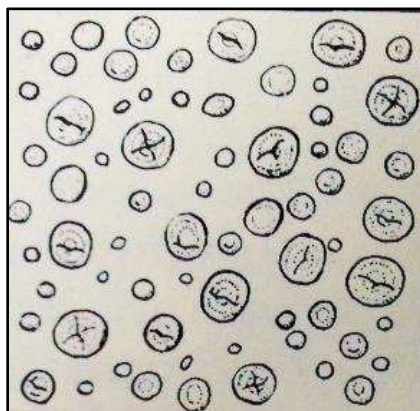
**Foto 34.** Drusas en acúmulos.

- **Mango**

Origen botánico: *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae).

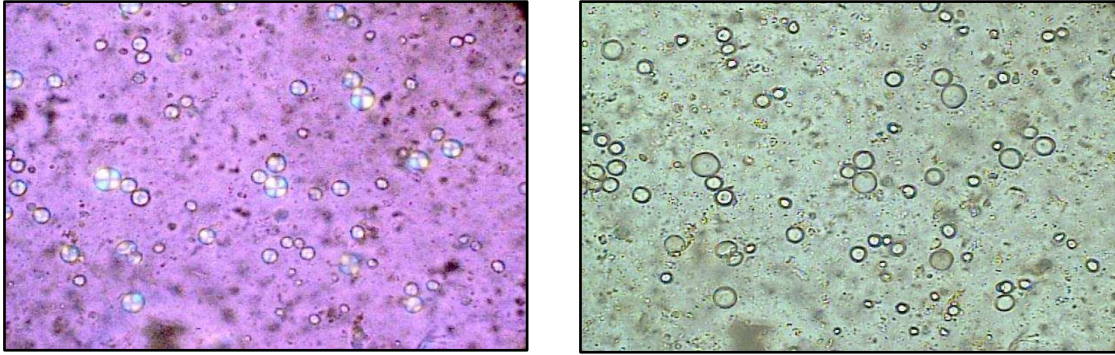
La epidermis de la piel de la fruta no presenta tricomas. El mesocarpio está compuesto de células redondas casi isodiamétricas, llenas de granos de almidón. Los granos de almidón son esféricos y por lo general tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$ , con tamaños comprendidos entre 4  $\mu\text{m}$ , y 11  $\mu\text{m}$ . También están presentes las drusas, dispuestos individualmente o en filas.

En la muestra analizada se determinó la presencia de células del mesocarpio (parénquima) conteniendo principalmente granos de almidón, que responden a las características mencionadas.



**Figura 16.** Esquema de referencia.





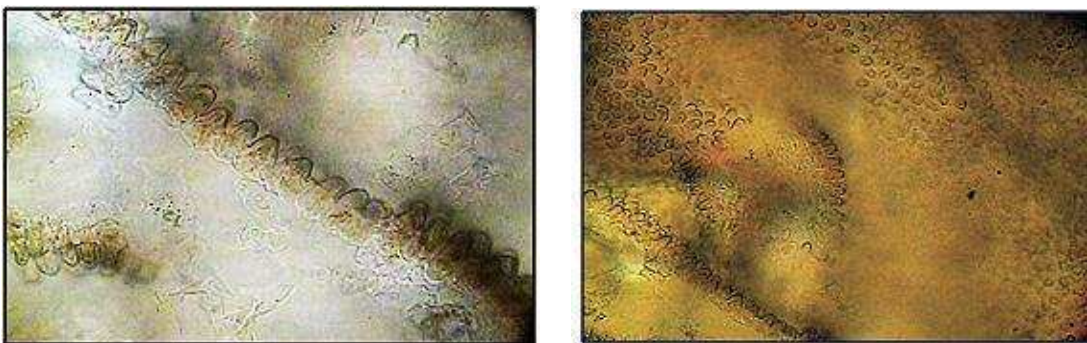
**Foto 35.** Granos de almidón de mango de la muestra (izquierda con luz polarizada, mostrando la característica Cruz de Malta)

▪ **Pétalos de rosa**

Origen botánico: *Rosa centifolia* L. (Rosaceae).

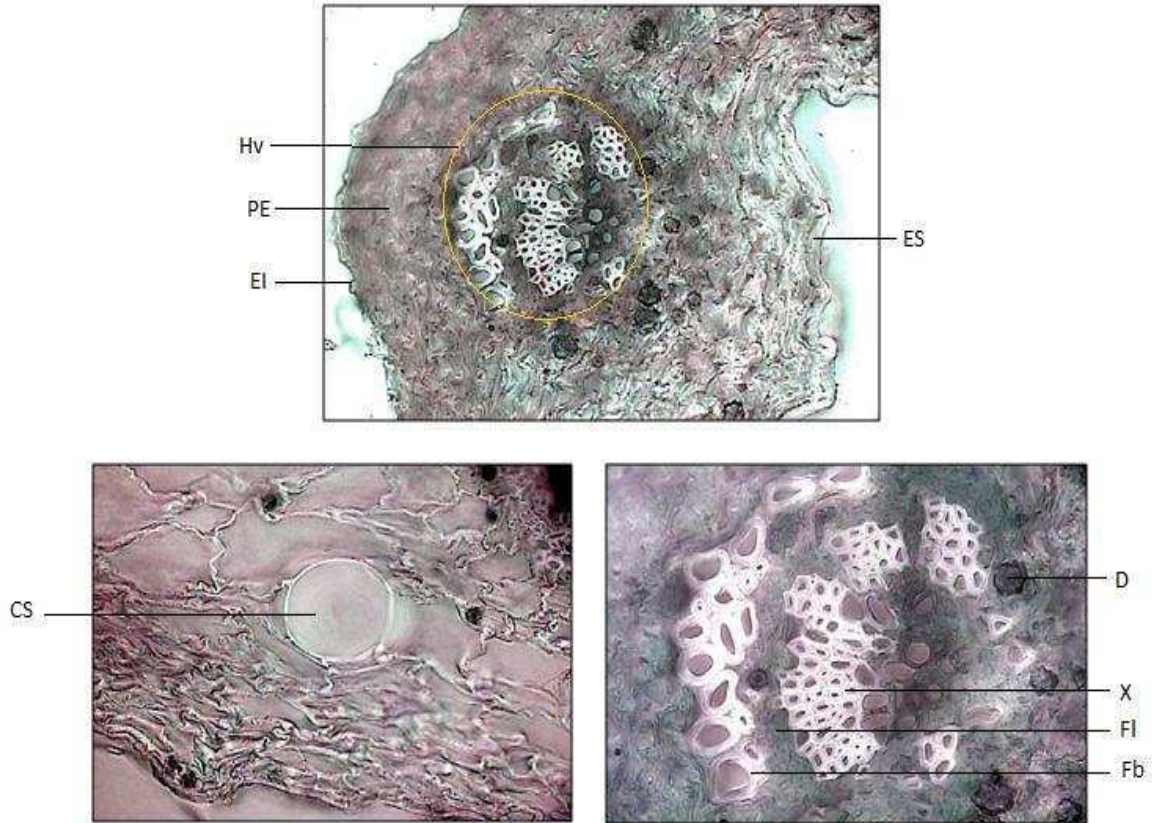
Los pétalos son obovados, retusos y de color rosa; olor fragante, de rosa; sabor dulzón ligeramente amargo y astringente. Poseen una epidermis donde se observa, como característica principal, la presencia de abundantes papilas. Puede observarse además estomas, tejido parenquimático y tráqueas.

En la muestra analizada se observó la epidermis de dichos pétalos donde se presentan las papilas características.



**Foto 36.** Papilas observadas en los pétalos de rosa de la muestra.

### 4.1.2.3 ANÁLISIS DEL TRASCORTE



**Foto 37.** Hv- Haz Vascular; PE- Parénquima esponjoso; EI- Epidermis Inferior; ES- Epidermis Superior; CS- Cavity secretoras; D- Drusas; X- Xilema; FI- Floema; Fb- Fibras

La observación del transcorte de los cálices de “Hibiscus” nos permitió visualizar los siguientes caracteres anatómicos:

- Epidermis superior (interna) e inferior (externa) constituida por una única capa de células.
- Parénquima esponjoso
- Haces vasculares colaterales (abiertos)
- Paquete de fibras asociadas al haz vascular
- Cavidades secretoras
- Drusas
- Tricomas

## 4.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

En el análisis fitoquímico se realizaron las cuantificaciones de los polifenoles, estudio que abarcó el estudio de fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y antocianos.

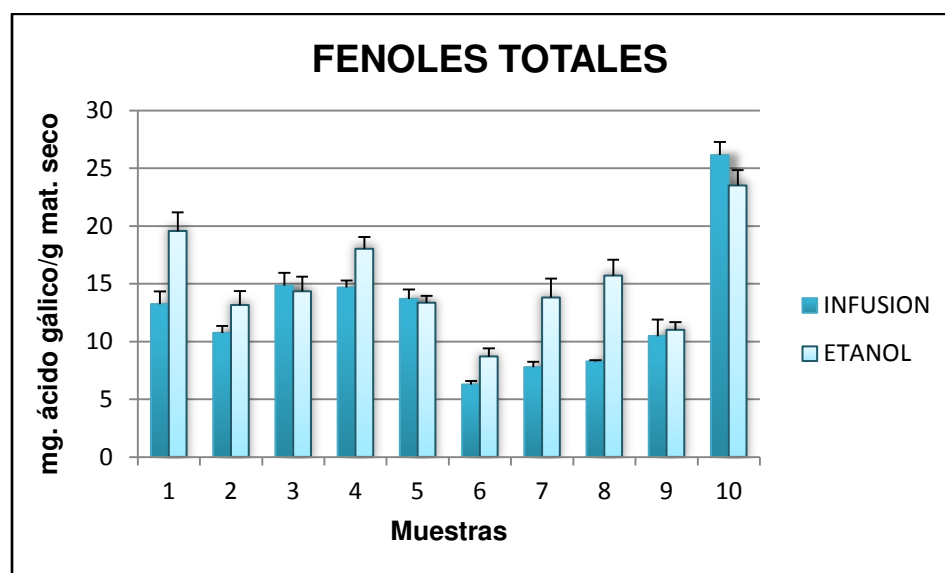
Se analizaron 13 muestras, donde la muestra N°1 correspondió a la muestra de referencia, mientras que las muestras N° 2 a la N° 10 correspondieron a las muestras comerciales constituidas solo por “Hibiscus”. De igual manera se realizó el análisis para 3 muestras complejas que declaraban contener “Hibiscus” entre sus componentes.

## 4.3 CUANTIFICACION DE POLIFENOLES

### 4.3.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

#### 4.3.1.1 Muestras simples

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de fenoles totales de los extractos acuosos y etanólicos, correspondientes a las muestras N° 1 a la N° 10.

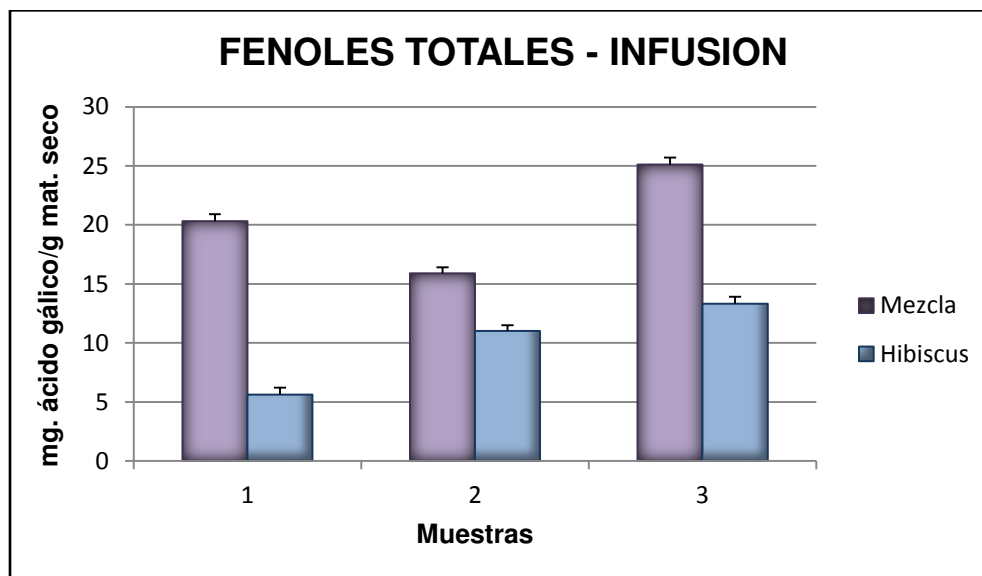


**Gráfico 1.** Cuantificación de fenoles totales, expresados como EAG (EAG: mg ácido gálico/g material seco)

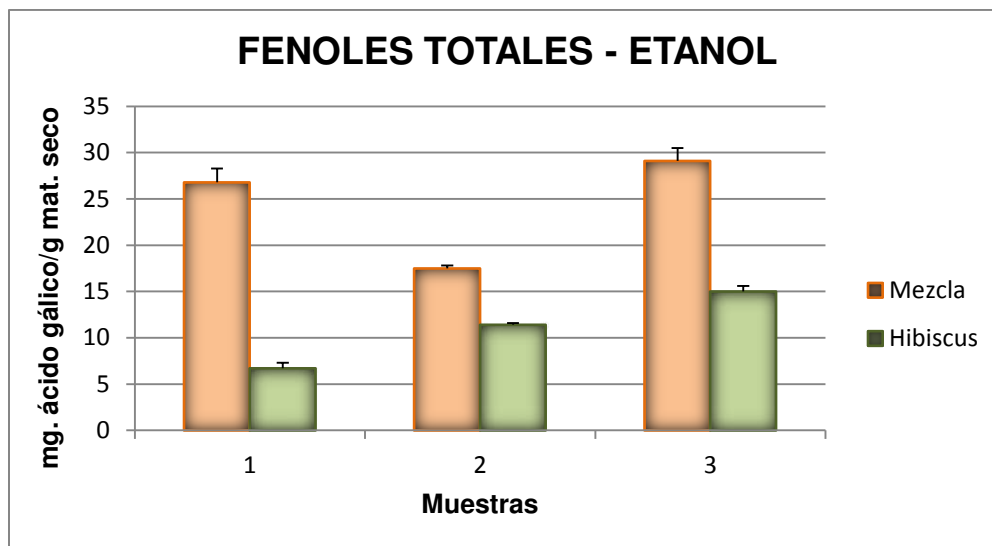
### 4.3.1.2 Muestras complejas

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de fenoles totales de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras complejas.

En el análisis de las muestras complejas se cuantificó el contenido total de fenoles y se determinó el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.



**Gráfico 2.** Cuantificación de fenoles totales en el extracto acuoso, expresado como EAG (EAG: mg ácido gálico/g material seco)

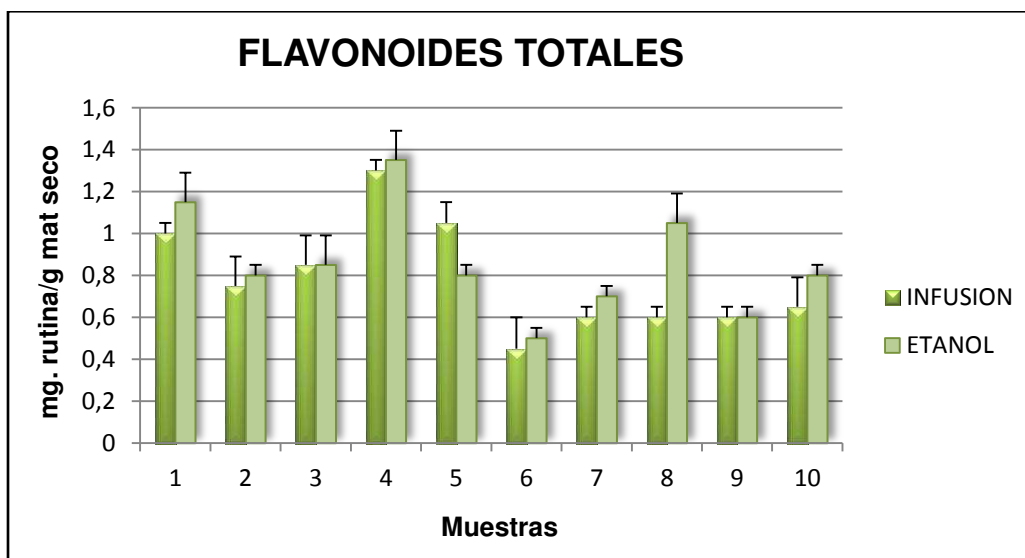


**Gráfico 3.** Cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico, expresado como EAG (EAG: mg ácido gálico/g material seco)

#### 4.3.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

##### 4.3.2.1 Muestras simples

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de flavonoides de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras N° 1 a la N° 10.

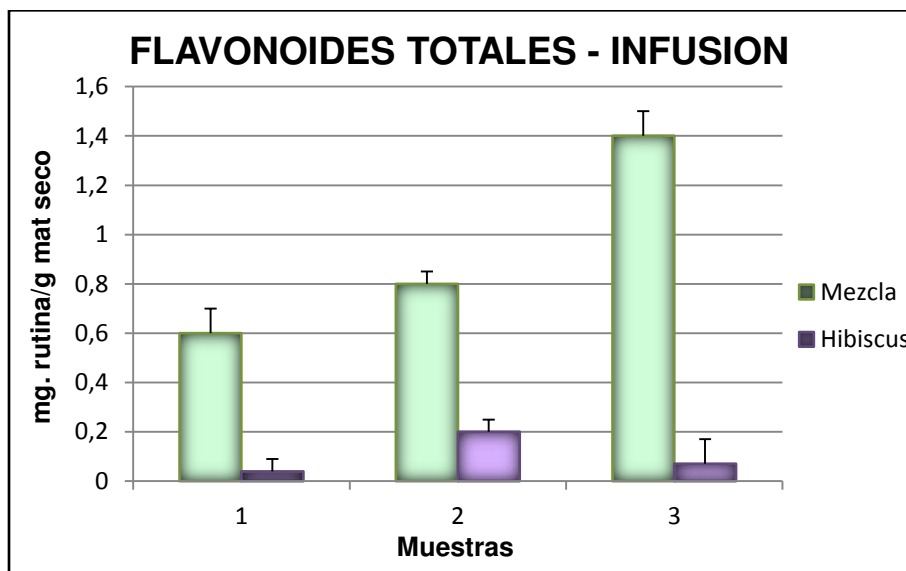


**Gráfico 4.** Cuantificación de flavonoides totales, expresado como ER (ER: mg rutina/g material seco)

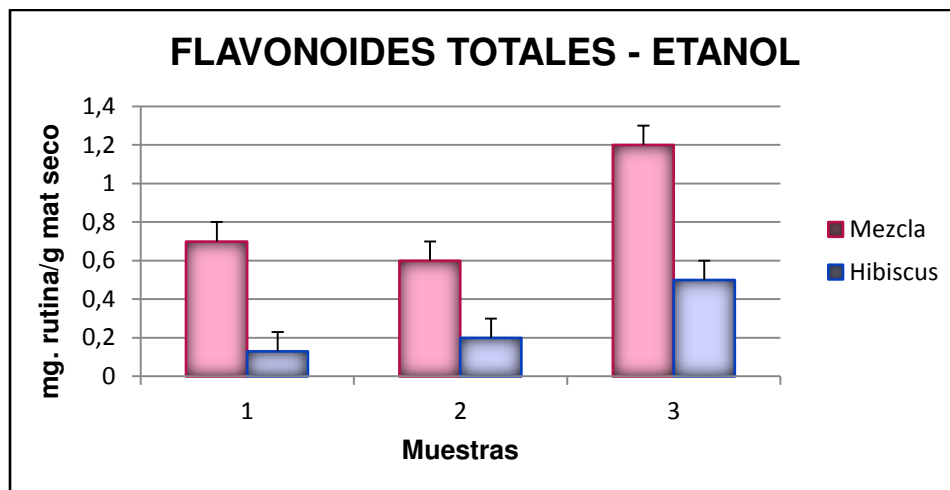
### 4.3.2.2 Muestras complejas

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de flavonoides de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras complejas.

En el análisis de las muestras complejas se cuantificó el contenido total de flavonoides y se determinó el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.



**Gráfico 5.** Cuantificación de flavonoides totales en el extracto acuoso, expresado como ER (ER: mg rutina/g material seco)

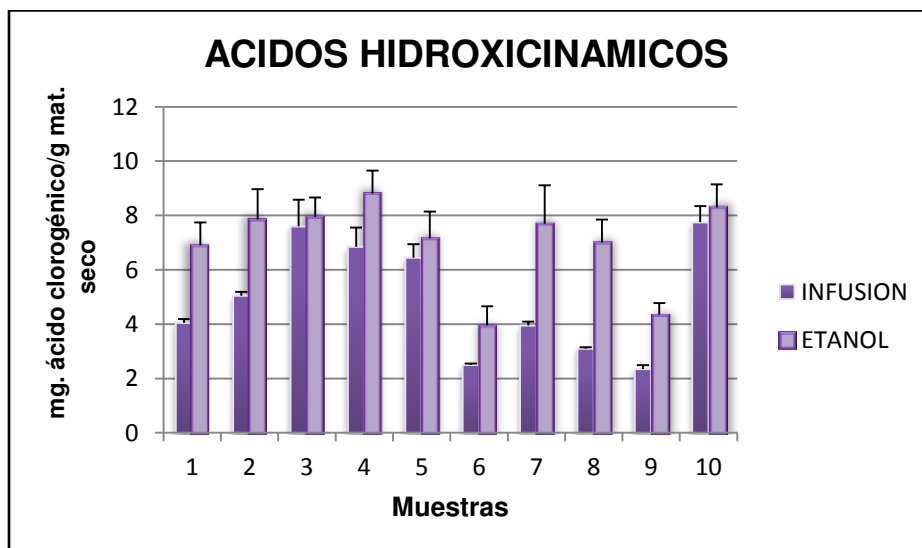


**Gráfico 6.** Cuantificación de flavonoides totales en el extracto etanólico, expresado como ER (ER: mg rutina/g material seco)

### 4.3.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

#### 4.3.3.1 Muestras simples

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de ácidos hidroxicinámicos de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras N° 1 a la N° 10.



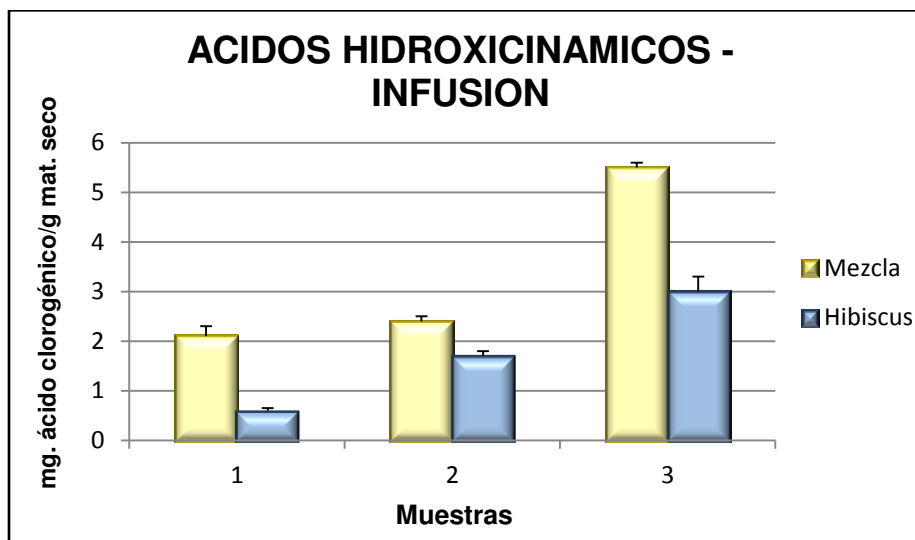
**Gráfico 7.** Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales, expresado como EAC (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco)



### 4.3.3.2 Muestras complejas

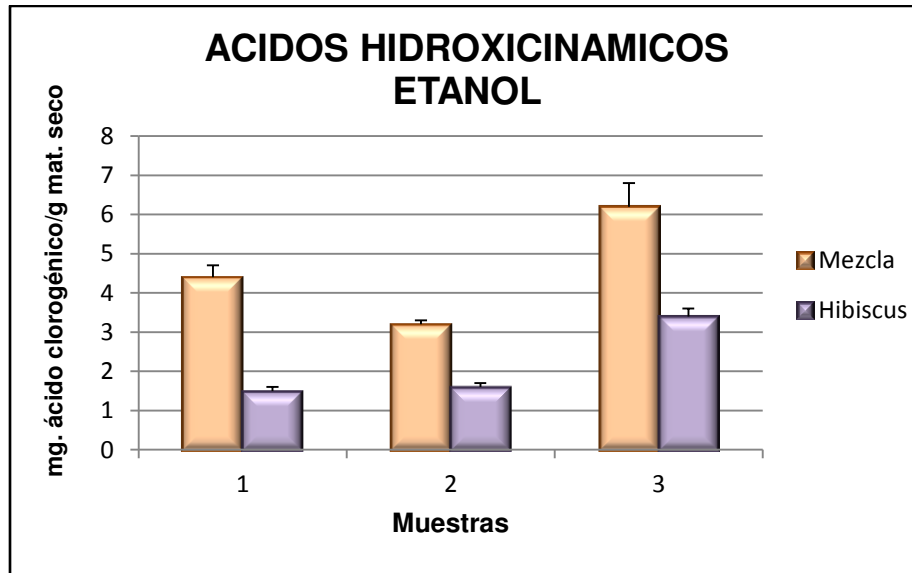
El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de ácidos hidroxicinámicos de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras complejas.

En el análisis de las muestras complejas se cuantificó el contenido total de ácidos hidroxicinámicos y se determinó el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.



**Gráfico 8.** Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos en el extracto acuoso, expresado como EAC (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco)



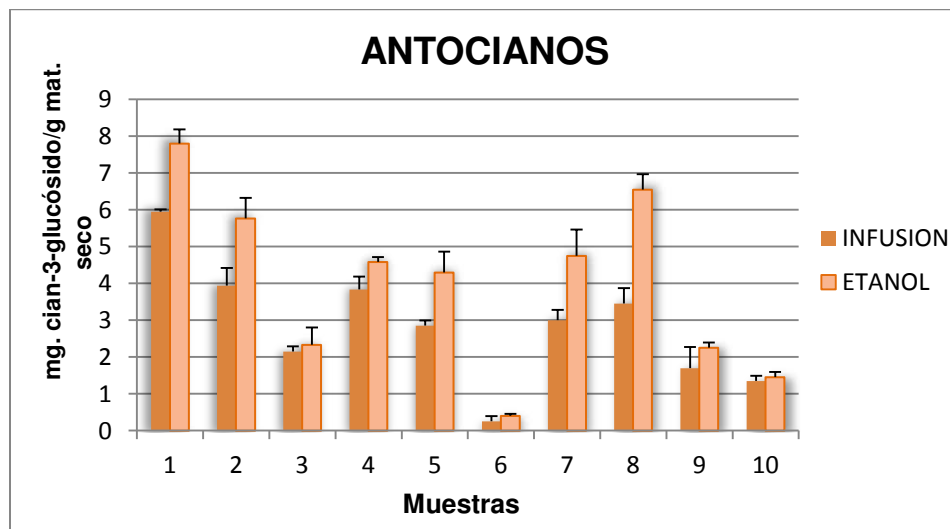


**Gráfico 9.** Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos en el extracto etanólico, expresado como EAC (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco)

#### 4.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS

##### 4.3.4.1 Muestras simples

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de antocianos de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras N° 1 a la N° 10.

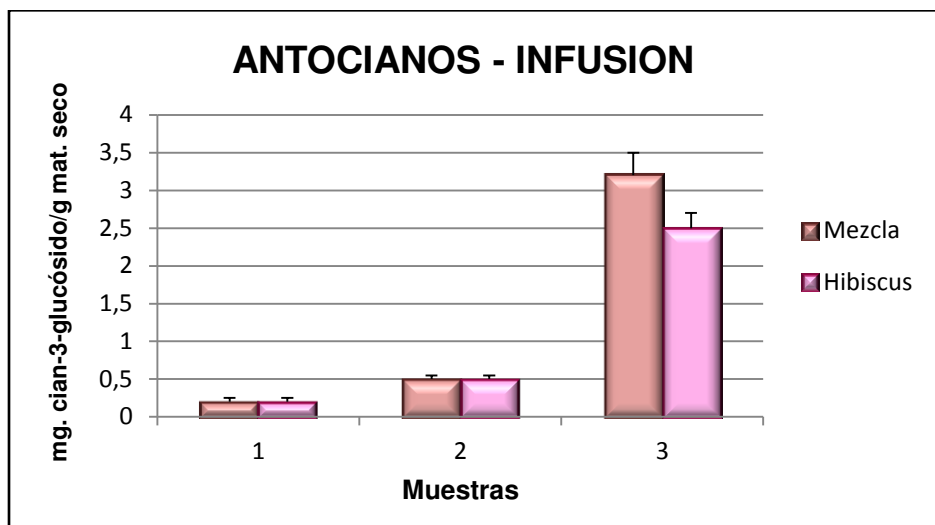


**Gráfico 10.** Cuantificación de antocianos totales, expresado como ECG (ECG: mg de cianidina-3-glucósido / g material seco)

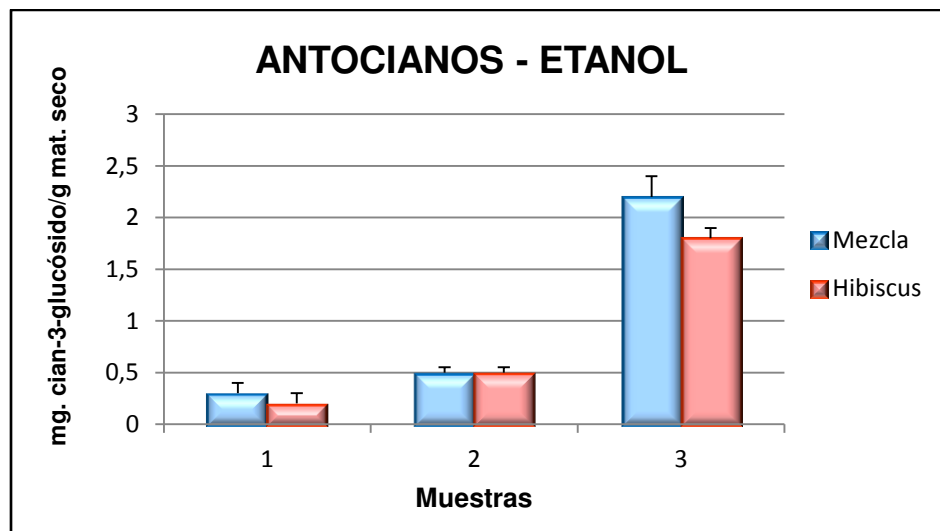
#### 4.3.4.2 Muestras complejas

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de antocianos de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras complejas.

En el análisis de las muestras complejas se cuantificó el contenido total de antocianos y se determinó el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.



**Gráfico 11.** Cuantificación de antocianos totales en el extracto acuoso, expresado como ECG (ECG: mg de cianidina-3-glucósido / g material seco)



**Gráfico 12.** Cuantificación de antocianos totales en el extracto etanólico, expresado como ECG (ECG: mg de cianidina-3-glucósido / g material seco)

Para obtener los cálculos del contenido de antocianos de cada extracto analizado se empleó la siguiente ecuación:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH=1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH=4.5}$$

$$mg \text{ cyn-3-glu/gMS} = \frac{A * MW * F * V}{\epsilon * l}$$

Donde A es la diferencia de las absorbancias medidas en los dos diferentes valores de pH, Mw es el peso molecular (449,2 g.mol),  $\epsilon$  es la absortividad molar (26900 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), F es el factor de dilución y V es el volumen utilizado en cada extracto. Los resultados se registraron como equivalentes de mg de cianidina-3-glucósido / g material seco.

## **4.4 ANALISIS CUALITATIVO DE POLIFENOLES**

### **4.4.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL**

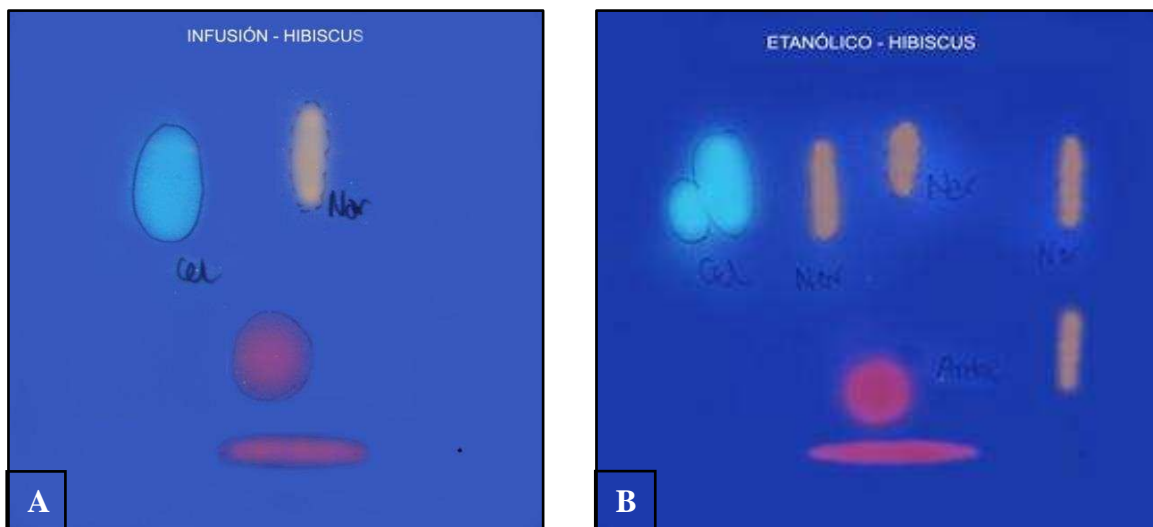
#### **4.4.1.1 Perfil cromatográfico de la muestra de referencia**

El análisis del perfil de polifenoles se realizó empleando cromatografías en capa delgada (TLC), en soportes de celulosa, utilizando como fases móviles: Butanol-ácido acético-agua (6:1:2) para la primera dimensión y ácido acético al 15 % para la segunda dimensión.

Los cromatogramas fueron observados a la luz ultravioleta de 366 nm y revelados con el reactivo de productos naturales (AEDBE: éster del ácido difenilbórico).

Tanto para el extracto acuoso como para el etanólico de la muestra de referencia (Muestra N°1), se observó un perfil de polifenoles caracterizado por la presencia de tres grupos principales de compuestos: los flavonoides, los antocianos y los derivados de ácidos hidroxicinámicos. Estos compuestos mostraron diferentes colores frente a la reacción con el reactivo de productos naturales (AEDBE), donde los flavonoides mostraron un color anaranjado, los antocianos color rojo-violáceo y los ácidos hidroxicinámicos color celeste brillante, cuando son observados a la luz ultravioleta, como puede observarse en la Figura 17. Cabe mencionar que los antocianos presentan color rojo-violáceo a la luz visible.

En los extractos etanólicos se observó una mayor presencia de compuestos respecto de los extractos acuosos, resultados que concuerdan con una mayor concentración de polifenoles en los extractos etanólicos (Gráficas 1, 4, 7 y 10).



**Figura 17.** Cromatogramas bidimensionales de la infusión (A) y del extracto etanólico (B) correspondiente a la muestra de referencia (Muestra N° 1). Las figuras han sido optimizadas digitalmente.

En lo que respecta a las muestras comerciales (Muestras N°2 a la N° 10) se determinó el mismo comportamiento cromatográfico observado en la muestra de referencia, observándose variaciones del tipo cuantitativo en dichos perfiles.

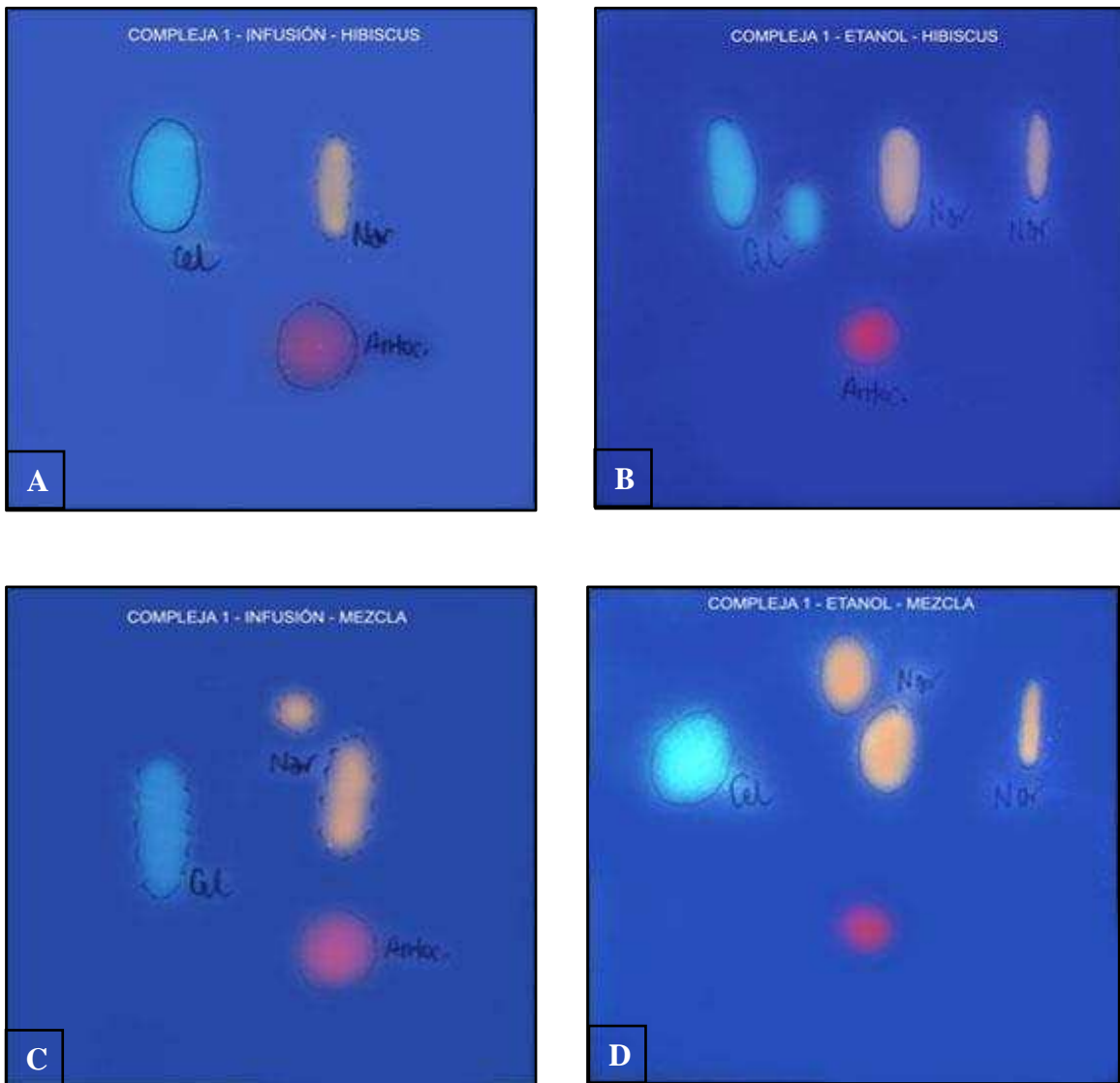
#### 4.4.1.2 Perfil cromatográfico de las muestras complejas

En el análisis de las muestras complejas se determinó el perfil de los polifenoles para la muestra entera y, por otro lado, el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.

Puede observarse una mayor complejidad en los cromatogramas provenientes de los extractos etanólicos, lo que evidencia un mayor poder de extracción de este solvente respecto del acuoso. Además es posible determinar el perfil de “Hibiscus” en las muestras complejas, similar al observado en la muestra de referencia.

- **Muestra N° 1**

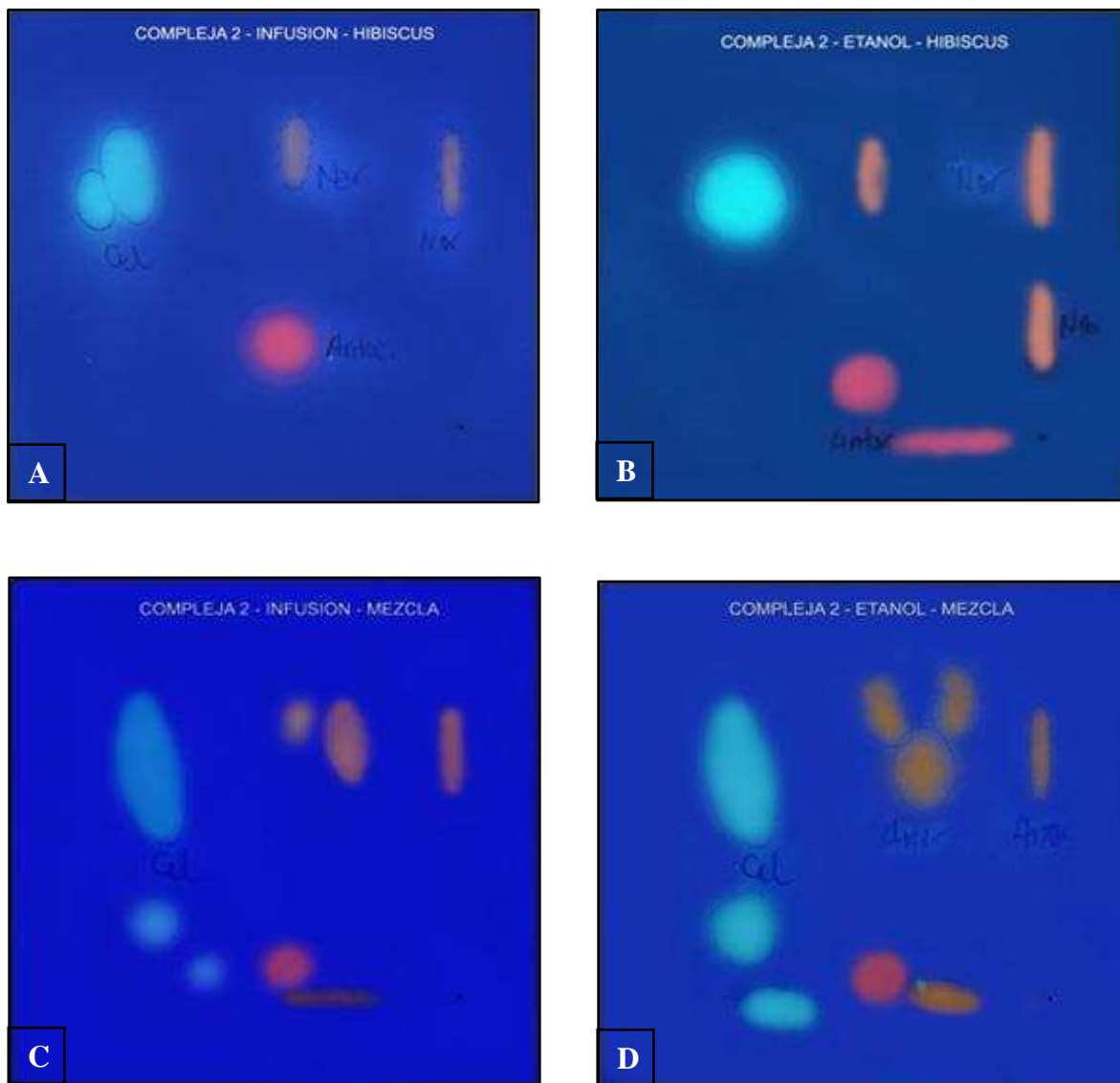
En la muestra N° 1 se pueden observar los antocianos en la parte inferior de color rojo, los derivados de ácidos hidroxicinámicos (celestes) exhibiendo una mancha grande en la parte izquierda y los flavonoides de color naranja en la parte media de la placa. Analizando las cromatografías se puede determinar el aporte del “Hibiscus” al total de la muestra.



**Figura 18.** Cromatogramas bidimensionales de la infusión y el extracto etanólico correspondientes a la muestra compleja N° 1: A y B aporte del “Hibiscus” a la muestra; C y D muestra total. Las figuras han sido optimizadas digitalmente.

- **Muestra N° 2**

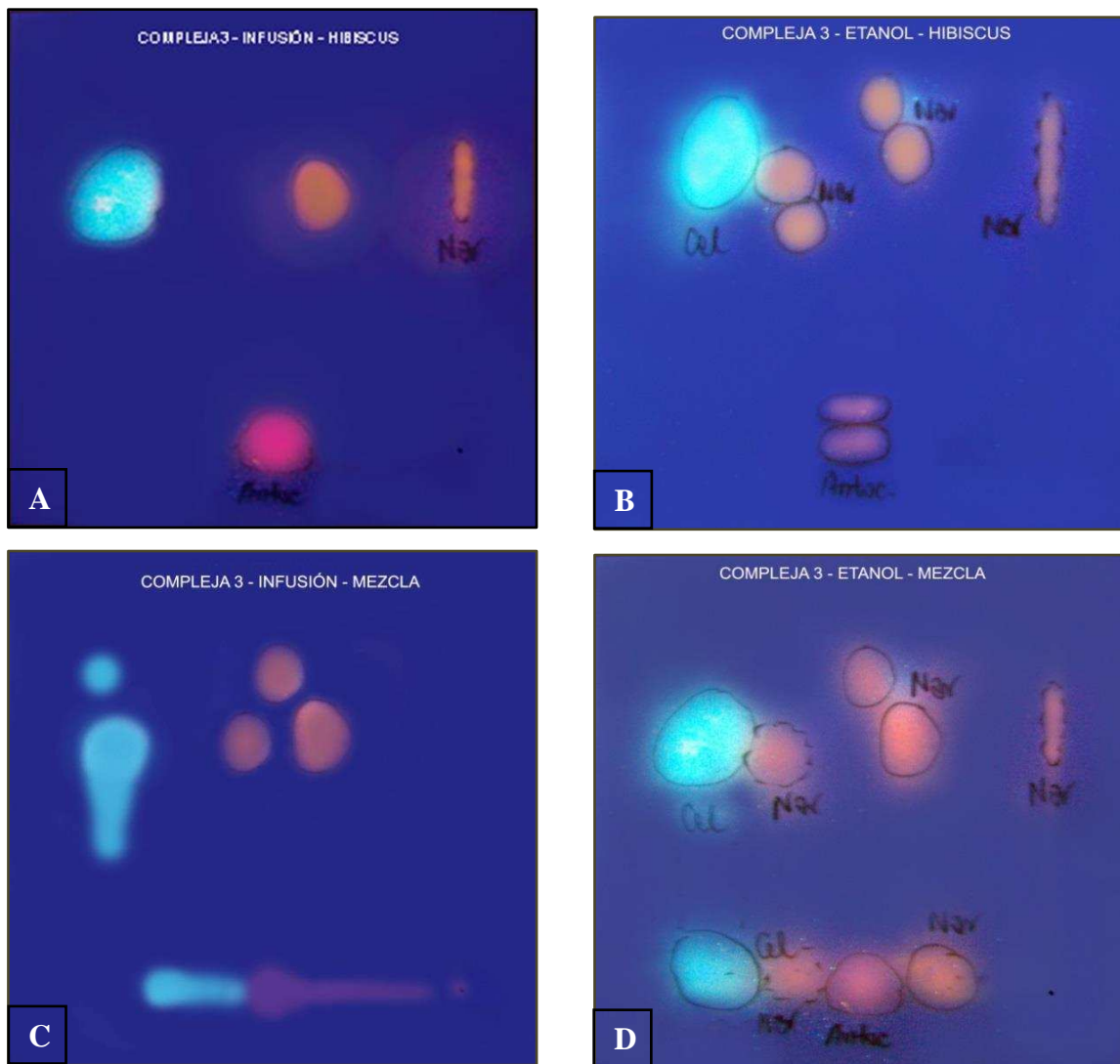
En líneas generales, en la muestra N° 2 se repite la distribución de compuestos tal como se mencionó para la muestra N° 1. Se observaron evidentes cambios dados por la presencia de polifenoles provenientes de los otros componentes de la mezcla, los cuales representan un aporte significativo al total de polifenoles.



**Figura 19.** Cromatogramas bidimensionales de la infusión y el extracto etanólico correspondientes a la muestra compleja N° 2: A y B aporte del “Hibiscus” a la muestra; C y D muestra total. Las figuras han sido optimizadas digitalmente.

- **Muestra N° 3**

En la muestra N° 3 se puede observar los antocianos en la parte inferior (rojo), los ácidos hidroxicinámicos (celestes) en la parte izquierda tanto zona superior como inferior y los flavonoides (naranja) en la parte media e inferior del cromatograma. En estos cromatogramas se puede observar un gran aporte de polifenoles por parte de los otros componentes de la muestra. Aquí también puede determinarse el aporte del “Hibiscus” al total de polifenoles.



**Figura 20.** Cromatogramas bidimensionales de la infusión y el extracto etanólico correspondientes a la muestra compleja N° 3: A y B aporte del “Hibiscus” a la muestra; C y D muestra total. Las figuras han sido optimizadas digitalmente.



## **4.4.2 ANÁLISIS DE ANTOCIANOS**

### **4.4.2.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANOS PARA LA MUESTRA DE REFERENCIA**

El análisis del perfil cromatográfico de antocianos presentes en la muestra de referencia (Muestra N°1), se realizó mediante el empleo de cromatografías en capa delgada (TLC) en sílica gel, utilizando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua, 100:11:11:26.

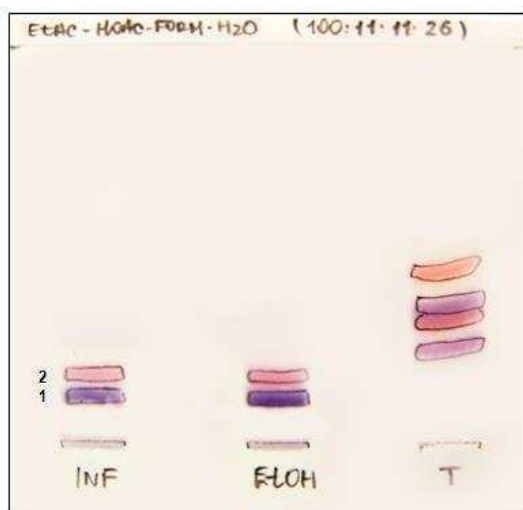
Tanto para la infusión como para el extracto etanólico, el perfil cualitativo de antocianos se encuentra caracterizado por la presencia de dos bandas principales que muestran los siguientes valores promedios de  $R_f \times 100$ :

Banda 1: 17

Banda 2: 24

Estas bandas se corresponden con los pigmentos delphinidina-3-sambubiósido (Banda 1) y cianidina-3-sambubiósido (Banda 2), compuestos reportados en bibliografía como los antocianos predominantes.

Se empleó como testigo un extracto proveniente de “Estrella Federal”, donde pueden visualizarse cuatro compuestos: cianidina-3-rutinósido, pelargonidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido y pelargonodina-3-glucósido.



**Foto 38.** Perfil de antocianos (TLC) para la muestra de referencia:  
1. Delfinidina-3-sambubiósido; 2. Cianidina-3-sambubiósido.

#### 4.4.2.2 Aislamiento de los antocianos:

Se realizó mediante cromatografías descendentes de partición en papel (celulosa), empleando como fase móvil BAA, donde se aislaron dos bandas principales, correspondientes a los compuestos mayoritarios anteriormente mencionados. Las bandas observadas se eluyeron con MeOH/H<sup>+</sup>.



**Foto 39.** Antocianos: derivado de delfinidina (morado) y derivado de cianidina (rosado)

### 4.4.2.3 Identificación de antocianos

#### 4.4.2.3.1 Determinación de valores de Rf

Se efectuó mediante el empleo de cromatografías en capa delgada (TLC) en sílica gel, utilizando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua, 100:11:11:26 (SV1) y en soportes de celulosa, utilizando como fases móviles BAA (butanol-ácido acético-agua, relación 6:1:2, (SV2)) y n-butanol-ácido clorhídrico 2N (1:1, fase superior, (SV3)).

Los valores de Rf x100 para cada banda aislada son:

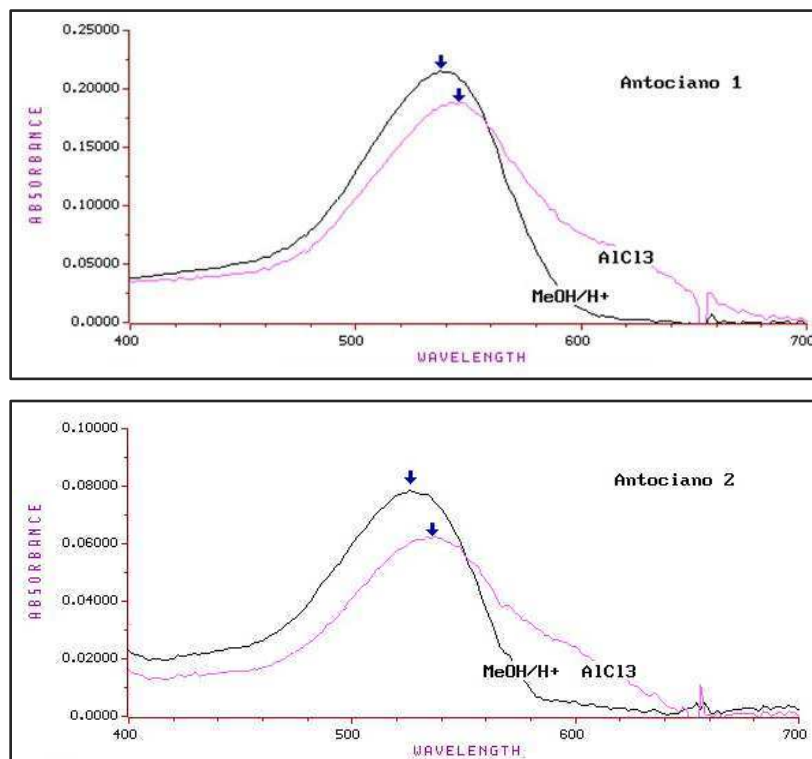
<b>Compuesto 1 (Antociano 1):</b>	17 (SV1)	20 (SV2)	17 (SV3)
<b>Compuesto 2 (Antociano 2):</b>	24 (SV1)	30 (SV2)	24 (SV3)

Estos valores corresponden a los pigmentos delphinidina-3-sambubiósido (**Compuesto 1**) y cianidina-3-sambubiósido (**Compuesto 2**), compuestos reportados en bibliografía como los antocianos predominantes.

#### 4.4.2.3.2 Estudios de espectroscopia UV-visible:

A cada compuesto aislado se le realizó un estudio de espectroscopía UV-Visible correspondiente en la determinación del espectro original y el desarrollo de la reacción con  $AlCl_3$ , que permite determinar el grado de hidroxilación del anillo B del antociano.

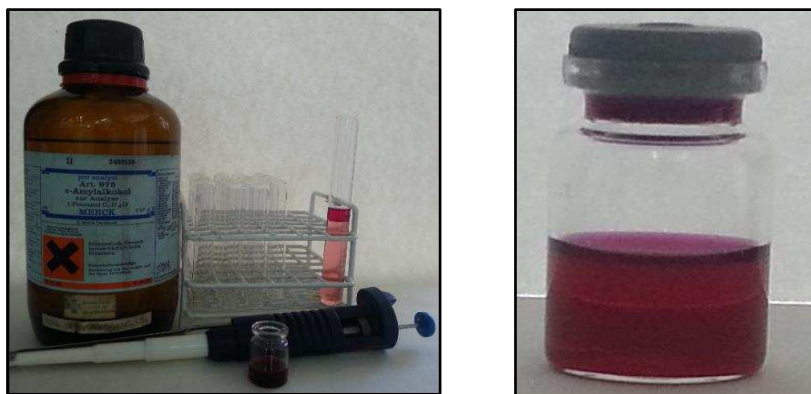
Al observar los espectros, se puede ver que el **Antociano 1** (delphinidina-3-sambubiósido) presenta un máximo a 534 a 536 nm mientras que el **Antociano 2** (cianidina-3-sambubiósido) entre 528 a 530 nm. Luego del agregado de la solución de  $AlCl_3$  al 5 % MeOH se observa un desplazamiento batocrómico para ambos espectros (Figura 21).



**Figura 21.** . Espectro UV visible correspondientes a el antociano 1 (delfinidina-3-sambubiósido) y antociano 2 (cianidina-3-sambubiósido)

#### 4.4.2.3.3 Estudio de los productos de hidrólisis ácida:

Cada antociano fue sometida a un proceso de hidrólisis ácida, con posterior extracción en alcohol amílico. Se determinaron los valores de R<sub>f</sub> en los sistemas Forestal (SV1) y BAA (SV2) y se efectuó el espectro UV-Visible correspondiente a cada compuesto.

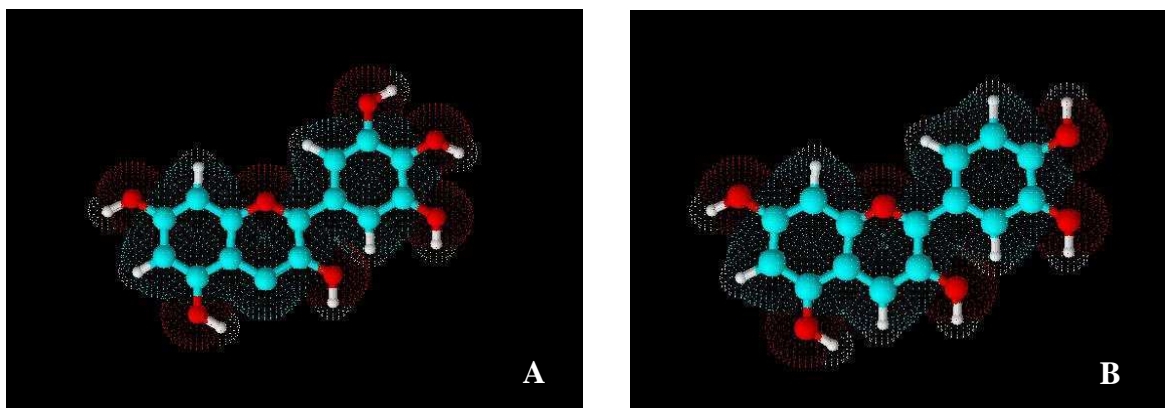


**Foto 40.** Hidrolisis ácida de *Hibiscus sabdariffa* L.

#### 4.4.2.3.3.1 Determinación de los valores de RF x100 del hidrolizado.

**Antocianidina 1.** Delfinidina: Rf. 32 (SV1) 43 (SV2)

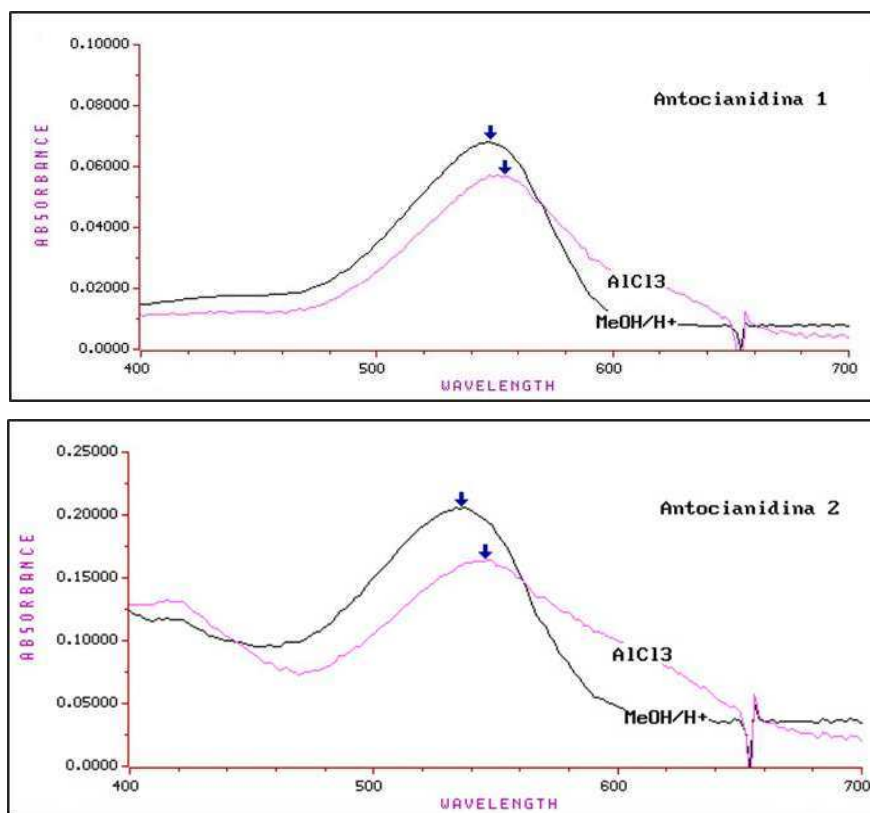
**Antocianidina 2.** Cianidina: Rf. 49 (SV1) 68 (SV2)



**Figura 22.** Modelos moleculares correspondientes a Delfinidina (A) y Cianidina (B)

#### 4.4.2.3.4 Estudio espectroscópico

Al observar los espectros UV-Visibles, se puede ver que la **antocianidina 1** (Delfinidina) presenta un máximo a 546 nm mientras que la **antocianidina 2** (Cianidina) presenta un máximo a 533 nm. Luego del agregado de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 5 % en MeOH se observa un desplazamiento batocrómico para ambos espectros (Figura 23), lo que permitió determinar la presencia de hidroxilos adyacentes.

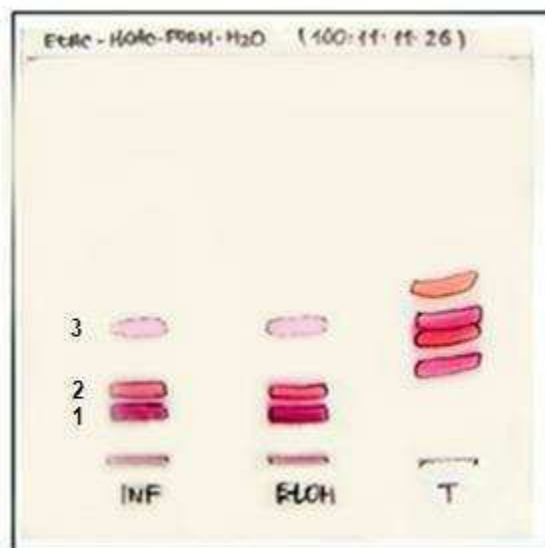


**Figura 23.** Espectros correspondientes a la antocianidina 1 (Delfinidina) y la antocianidina 2 (Cianidina).

#### 4.4.2.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANOS PARA LAS MUESTRAS COMERCIALES

En lo que respecta al análisis de antocianos para las muestras comerciales simples (Muestras N° 2 a la N° 10), como así también para las tres muestras complejas, se determinó el mismo comportamiento cromatográfico que el observado en la muestra de referencia, determinándose los mismos valores de Rf en los tres sistemas de solventes.

En algunas muestras (N°1, 3, 5 y 7), adicionalmente se detectó una banda de menor intensidad, con valores promedios de Rf x100 comprendidos entre 30 y 35, que correspondería a delfinidina-3-glucósido o cianidina-3-glucósido según valores de bibliografía (Ali y col., 2005; Wagner y Bladt, 1996), y que concuerdan en este estudio con el correspondiente a cianidina-3-glucósido presente en el testigo.



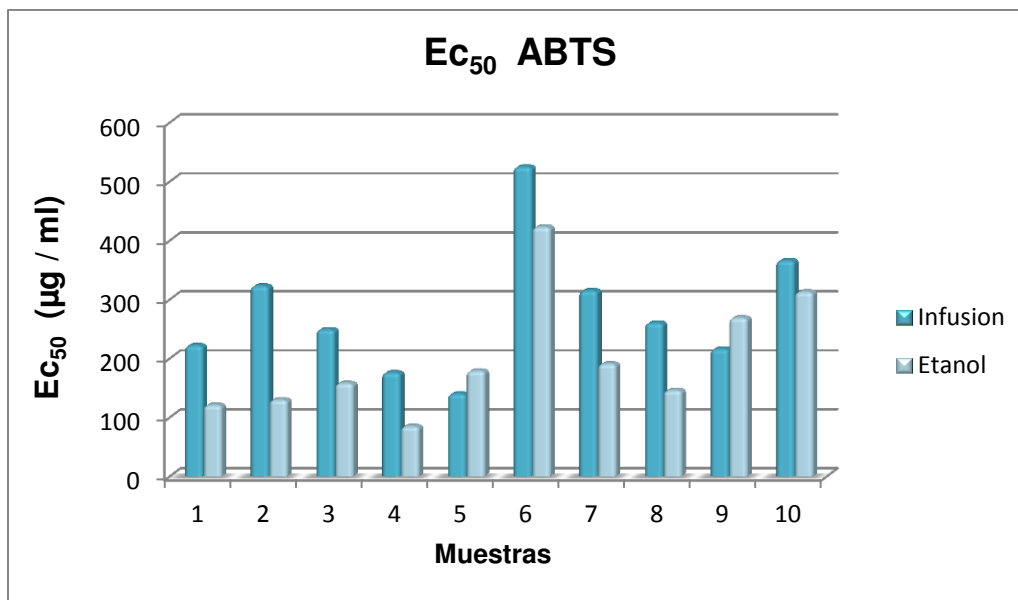
**Foto 41.** Perfil de antocianos TLC: 1. Delfinidina-3-sambubiósido; 2. Cianidina-3-sambubiósido; 3. Cianidina/Delfinidina-3-glucósido

## 4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para el análisis de actividad antioxidante se emplearon dos métodos: ABTS y DPPH. Se analizaron 10 muestras, donde la muestra N° 1 correspondió a la muestra de referencia y las muestras N° 2 a la N° 10 correspondieron a las muestras comerciales constituidas solo por “Hibiscus”. De igual manera se realizó el análisis para las 3 muestras complejas que incluían al “Hibiscus” como uno de los componentes.

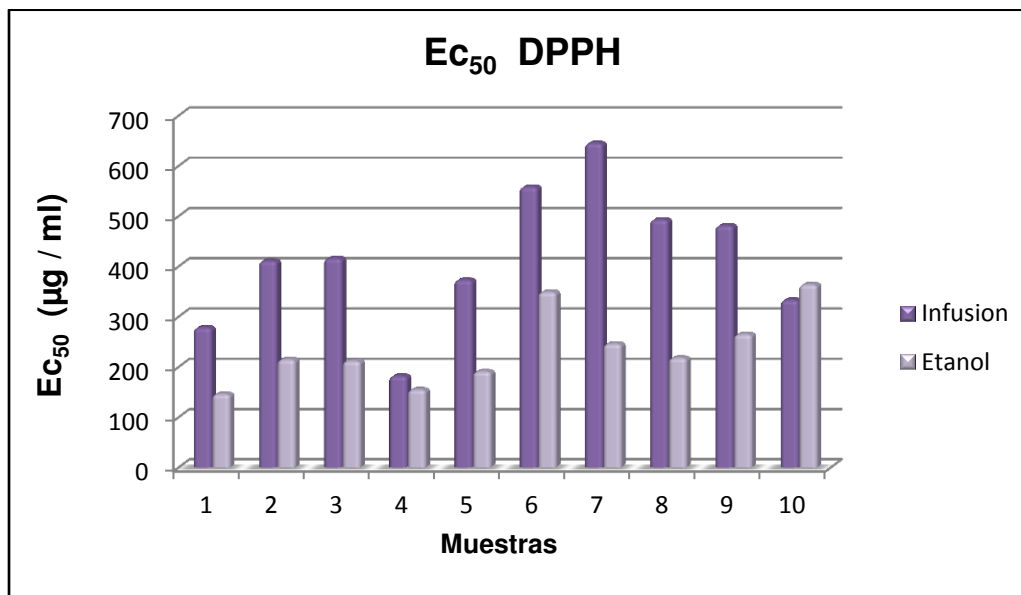
### 4.5.1 MUESTRAS SIMPLES

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante mediante el método de ABTS de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras N°1 a la N°10.



**Gráfico 13.** Cuantificación de la actividad antioxidante utilizando el método de ABTS para las muestras de "Hibiscus"

El siguiente gráfico muestra los resultados de la cuantificación de actividad antioxidante mediante el método de DPPH de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras N° 1 a la N° 10.



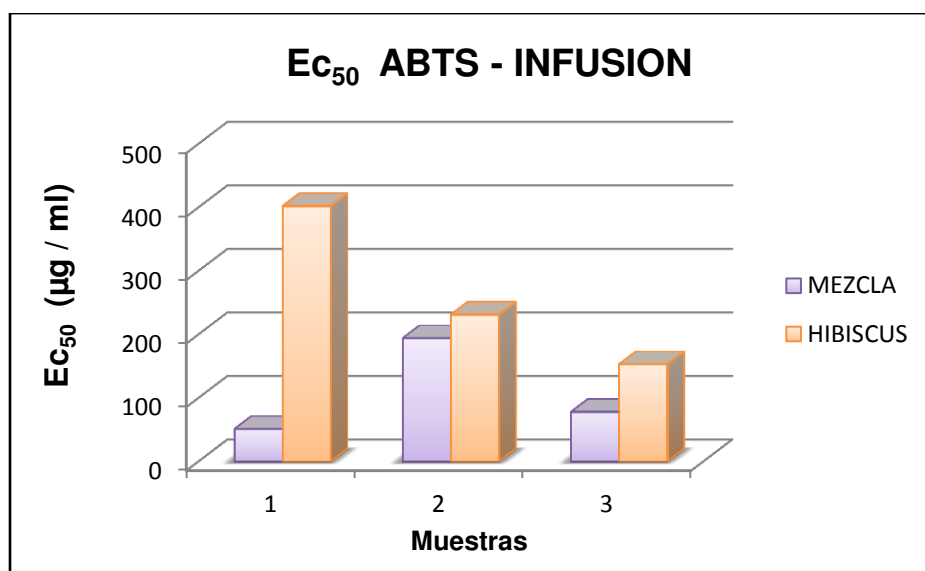
**Gráfico 14.** Cuantificación de la actividad antioxidante empleando el método de DPPH para las muestras de "Hibiscus"



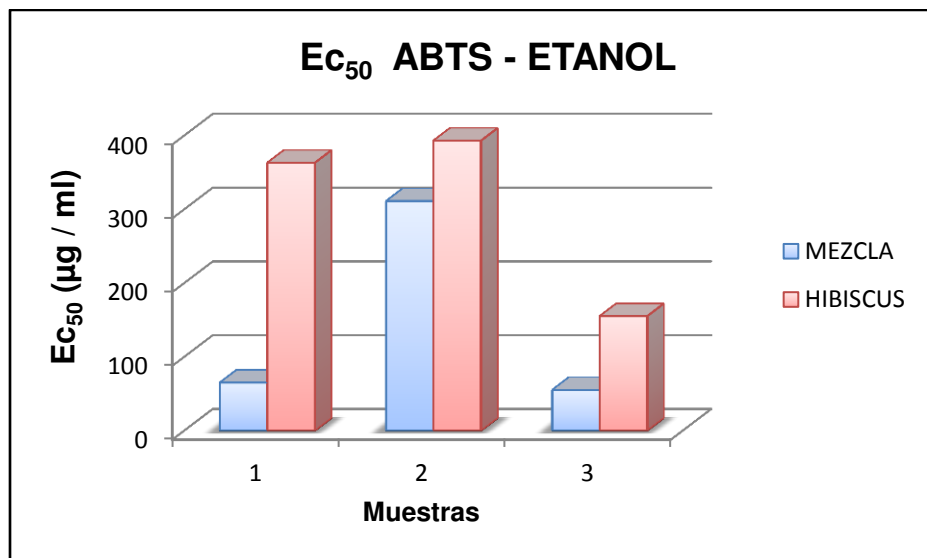
#### 4.5.2 MUESTRAS COMPLEJAS

Los siguientes gráficos muestran los resultados de la cuantificación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos correspondientes a las muestras complejas.

Se realizó el análisis de las muestras complejas por el método de ABTS para cuantificar la actividad antioxidante total, como así también determinar el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.

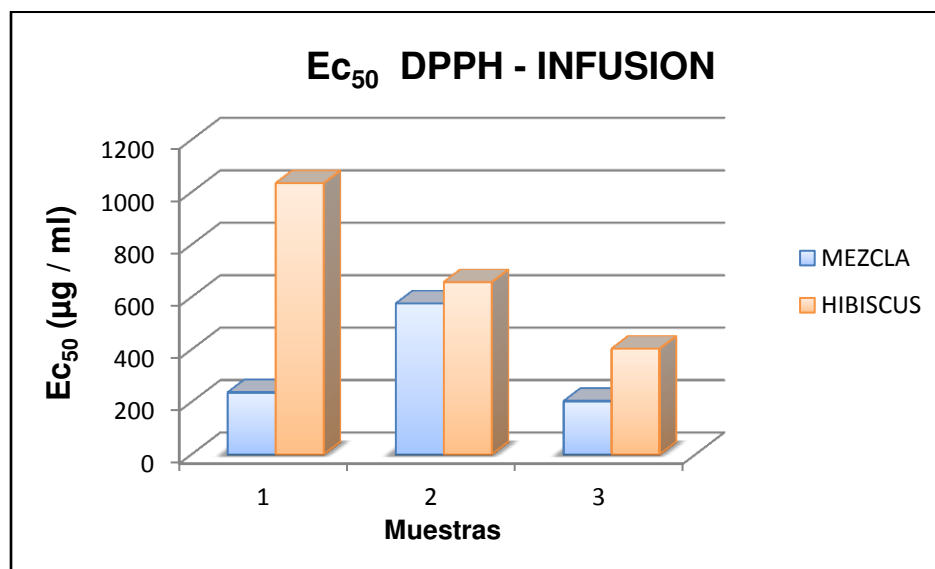


**Gráfico 15.** Cuantificación de la actividad antioxidante empleando el método de ABTS del extracto acuoso para muestras complejas

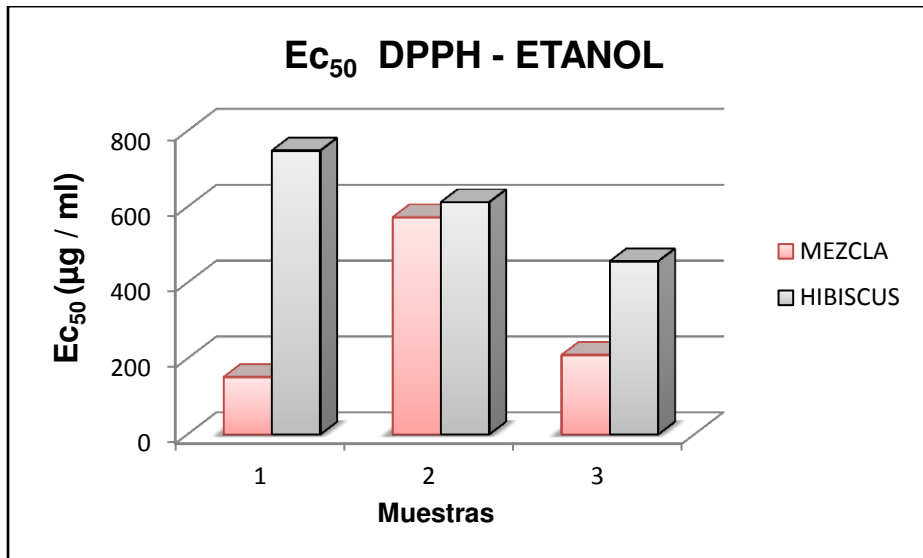


**Gráfico 16.** Cuantificación de la actividad antioxidante empleando el método de ABTS del extracto etanólico para muestras complejas

Se realizó el análisis de las muestras complejas para cuantificar la actividad antioxidante total por el método de DPPH y así determinar el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.



**Gráfico 17.** Cuantificación de la actividad antioxidante empleando el método de DPPH del extracto acuoso para muestras complejas



**Gráfico 18.** Cuantificación de la actividad antioxidante empleando el método de DPPH del extracto etanólico para muestras complejas

## **5 DISCUSIÓN**

### **5.1 ANÁLISIS FARMACOBOTÁNICO**

#### **5.1.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO**

##### **5.1.1.1 Muestras simples**

En el análisis de las muestras comerciales se pueden distinguir tres diferentes tipos de presentaciones: muestras enteras, trituradas y finamente trituradas.

Los cálices enteros, de 20 a 35 mm, con longitud promedio de 30 mm, se presentaron con diferentes colores que van del rojo-morado intenso a rojo-amarronado, con sabor dulce y olor característico (Foto 3), resultados que concuerdan con el trabajo realizado por Menben y Staesche (1974). Para las muestras trituradas y finamente trituradas se observaron las mismas características organolépticas (Fotos 4, 5).

En lo que respecta al análisis de materia extraña, tanto para las muestras enteras, como para las que se presentaron en diferente grado de trituración, no se observó macroscópicamente material extraño, lo que permite inferir que las muestras son puras y no presentaron contaminación, adulteración o sustitución evidente.

##### **5.1.1.2 Muestras complejas**

En el caso de las muestras complejas, estas se presentaron en forma triturada y finamente triturada. En cada caso, presentaron diversos colores, olores y sabores correspondientes a las diferentes especies presentes en cada muestra (Por ejemplo, “Hibiscus”, cereza, manzana, naranja, rosa mosqueta, etc.).

Para determinar la presencia de “Hibiscus” en cada muestra, se procedió a la separación bajo lupa de los componentes presentes, tomando inicialmente como características distintivas el color y la textura, correspondiendo al “Hibiscus” un color rojo-morado, con textura rugosa. Otros componentes de las muestras, como cereza o rosa mosqueta, podrían inicialmente confundirse con el “Hibiscus” por su color, sin embargo sus texturas resultaron diferentes, visualizándose al microscopio estereoscópico como trozos lisos y brillantes. En ninguna de las muestras analizadas se evidenció la presencia de material extraño al detallado en el rótulo.

### **5.1.2 ANÁLISIS MICROSCÓPICO**

En lo que respecta al análisis microscópico, en primera instancia se procedió al análisis de la muestra de referencia (Muestra N°1), que permitió determinar los caracteres microscópicos relevantes para el “Hibiscus” (Estomas, tricomas, cristales de oxalato de calcio, tráqueas, fibroesclereidas, entre otros) (Fotos 6 a 13), resultados que se emplearon posteriormente como criterio de identidad, en el análisis de las demás muestras.

Independientemente de la forma de presentación de la muestra vegetal (entera, triturada y finamente triturada), mediante el empleo del disociado leve, se pudo determinar la presencia de todos los caracteres mencionados, resultando particularmente abundantes los tricomas flexuosos. Si bien los elementos detallados se presentaron en todas las muestras analizadas, la frecuencia de aparición no era la misma para todas ellas.

Para un análisis más profundo, en aquellas muestras que presentaron los cálices enteros, se realizaron tres cortes con el objeto de determinar la localización espacial de los diferentes tricomas.

Inicialmente se observó, en la parte superior de los cálices, una mayor presencia de tricomas eglandulares unicelulares flexuosos (Foto 7) y tricomas glandulares capitados de pie unicelular y cabeza pluricelular, con un tamaño comprendido entre 60 a 90  $\mu\text{m}$  (Foto 11).

En la parte media del cáliz se presentaron en mayor medida los tricomas eglandulares flexuosos; tricomas eglandulares cónicos de pared gruesa, en los que se pudieron distinguir tres poblaciones caracterizadas por sus longitudes (largos, medianos y cortos), con tamaños comprendidos entre 100 a 1000  $\mu\text{m}$  (Foto 8d); tricomas eglandulares unicelulares finos con longitudes de 500 a 900  $\mu\text{m}$  (Foto 9), y estomas (principalmente del tipo anomocítico) con tamaños comprendidos entre 25 a 30  $\mu\text{m}$  (Foto 6).

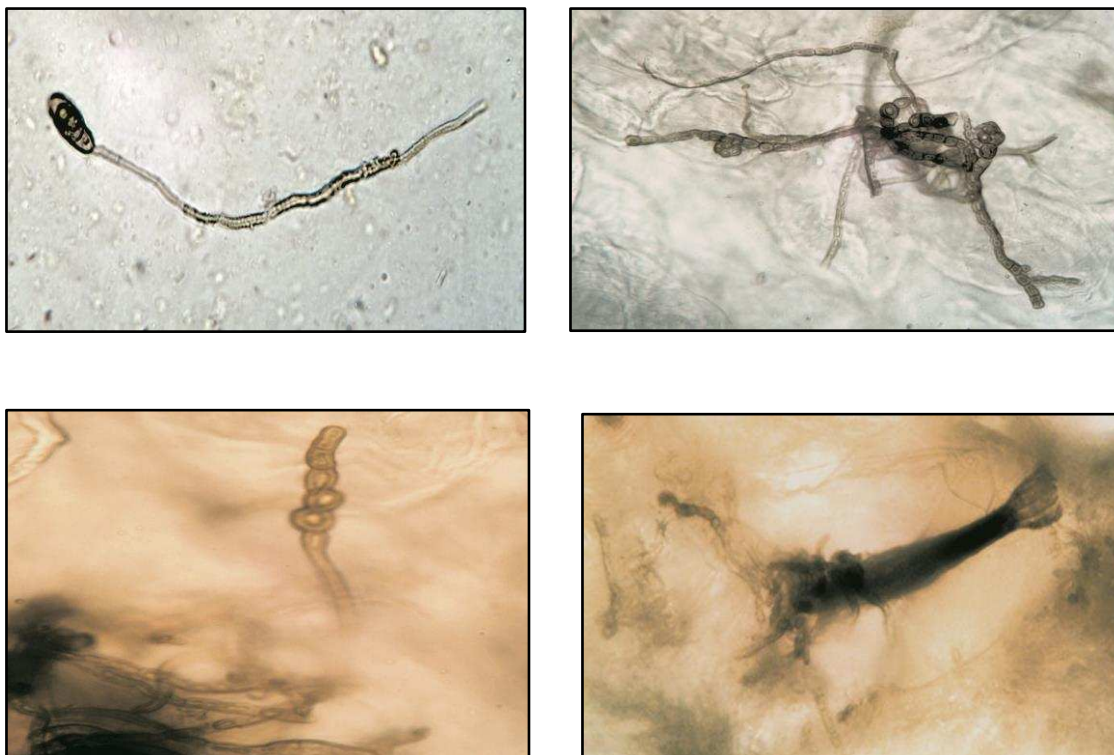
Los tricomas glandulares no capitados (150 a 200  $\mu\text{m}$ ) se hallaron principalmente en el tercio inferior de dichos cálices, en la zona comprendida por el epicáliz (calículo), formando parte de agregados de tricomas, como se muestra en las Fotos 10 c y d.

Adicionalmente se observó la presencia de drusas (de 15 a 30  $\mu\text{m}$ ) (Foto 12) y tráqueas espiraladas (Foto 13a) en todo el tejido vegetal, resultando particularmente abundantes en la base de los cálices.

El interés científico del estudio de los tricomas se basa en su importancia funcional y taxonómica. Los diferentes tipos de tricomas no sólo son útiles en la identificación de las especies vegetales, sino también de sus correspondientes partes, resultando de gran importancia en farmacognosia, arqueobotánica, paleobotánica y agronomía (Rao y Ramayya, 1977).

Estudios realizados por Bayer y Kubitzki (2003), utilizaron tricomas eglandulares para la caracterización de diferentes especies de la familia Malvaceae. La compleja taxonomía de Malvaceae se basa principalmente en la estructura morfológica de los tricomas y de los pétalos de la corola (Celka y col., 2006). En lo que respecta al género *Hibiscus*, uno de los artículos más recientes es el trabajo de Shaheen y colaboradores (2009), que abarca el análisis de tricomas foliares de diferentes especies de éste género.

Adicionalmente a este estudio, en una de las muestras analizadas (Nº7), se observó la presencia de un desarrollo filamentoso, cuyas características morfológicas son afines a *Curvularia sp.* (Ascomycota), dadas las características de sus hifas, esporangióforo y esporas (Foto 42).



**Foto 42.** Hongo filamentoso, *Curvularia sp.*

#### 5.1.2.1 ANÁLISIS DE LOS TRASCORTES

La observación de los transcortes de los cálices de “Hibiscus” permitió determinar una serie de caracteres anatómicos relevantes para el estudio farmacobotánico. Se observó una epidermis superior y una epidermis inferior constituida por una única capa de células, con la presencia de tricomas. Se observaron principalmente estomas de tipo anomocítico.

El mesófilo está constituido por un parénquima esponjoso donde se observaron haces vasculares colaterales abiertos, con paquetes de fibras asociadas al haz vascular. Adicionalmente se encontraron cavidades secretoras y cristales de oxalato de calcio bajo la forma de drusas.

La realización de los transcortes, bajo la modalidad de obtención a mano alzada, presentó gran dificultad debido a la presencia de polisacáridos mucilaginosos que dificultaron la obtención de los cortes, confiriéndole al material una consistencia sumamente blanda. Se escogió la modalidad de obtención de cortes a mano alzada ya que es la frecuentemente empleada en laboratorios de baja complejidad que no dispongan de micrótomos y además permite obtener información relevante en un tiempo corto de desarrollo.

## **5.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO**

### **5.2.1 CUANTIFICACION DE POLIFENOLES**

El análisis fitoquímico de las muestras de “Hibiscus” comprendió el estudio de los polifenoles, que abarcó la cuantificación de fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxycinámicos y antocianos. Se realizaron dos tipos de extractos: infusión y etanólico y se realizó un análisis comparativo entre ambos.

#### **5.2.1.1 Análisis de muestras simples**

##### **5.2.1.1.1 Fenoles totales**

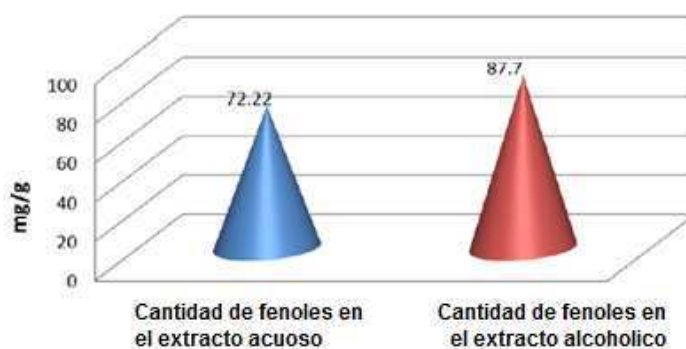
La cuantificación de los fenoles totales presentes en las infusiones permitió determinar valores comprendidos entre 6,27 y 18,02 EAG, con valor de  $13,23 \pm 1,10$  EAG para la muestra de referencia y un promedio total de  $11,80 \pm 3,71$  EAG. Se observó que el valor correspondiente a la muestra de referencia se ubica entre los más elevados de fenoles totales, junto con las muestras N° 3, 4 y 10. Se destaca que la muestra N°6 presentó el valor más bajo (6,27 EAG) (Gráfico N° 1).

Para los extractos etanólicos, los valores se ubican entre 8,70 y 20,5 EAG, con un valor de  $19,56 \pm 3,63$  EAG para la muestra de referencia, y un promedio total de  $14,81 \pm 3,72$  EAG. Como puede observarse, el valor obtenido para la muestra de referencia se ubica entre los más elevados, junto con las muestras N°4 y N°10. Aquí también se observa el mismo comportamiento para la muestra N°6 (Gráfico N° 1).



Como puede observarse, tanto para las infusiones como para los extractos etanólicos, se presentaron amplios rangos de concentraciones entre las diferentes muestras analizadas, lo que demuestra importantes variaciones cuantitativas para estos metabolitos. Dicha variación podría deberse a múltiples factores, abióticos o bióticos, que normalmente afectan la presencia y concentración de polifenoles, si bien las diferencias observadas para los valores promedios en el presente estudio no resultan estadísticamente significativas cuando se comparan ambos tipos de extractos.

Según la bibliografía disponible, la decocción de los extractos acuosos proporciona un alto contenido de polifenoles, ya que el agua caliente provoca una extracción más eficiente de estos compuestos (aunque por tan solo 3 a 5 min de contacto) (Galicia Flores y col., 2008). Sin embargo, en lo que respecta al estudio aquí realizado, los extractos etanólicos presentaron mayores concentraciones de polifenoles que las observadas en las infusiones, resultados que concuerdan con los estudios realizados por Al-Hashimi (2012), (Figura 24); Anokwuru y colaboradores (2011), Camelo Méndez y colaboradores (2013).



**Figura 24.** Contenido de fenoles totales en extractos de “Flor de Jamaica”.

Adaptado de Al-Hashimi (2012)

Estos resultados pueden explicarse a partir de la solubilidad de los compuestos fenólicos, que es función tanto de su naturaleza química como de la polaridad de los disolventes utilizados, resultando el etanol un buen medio para la extracción de polifenoles (Shi y col., 2005).

#### 5.2.1.1.2 Flavonoides

En lo que respecta a la cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos acuosos, ésta permitió establecer valores comprendidos entre 0,45 y 1,30 ER, con un valor de  $1,00 \pm 0,05$  ER para la muestra de referencia y un promedio total de  $0,79 \pm 0,26$  ER. Se observa además que el valor correspondiente a la muestra de referencia se ubica entre los más elevados, junto con las muestras N°4 y N°5, resaltando que la muestra N°6 presentó el valor más bajo de contenido de flavonoides (0,45 ER) (Gráfico N° 4).

Para los extractos etanólicos, los valores se ubican entre 0,50 y 1,35 ER, valor promedio total de  $0,86 \pm 0,26$  ER y de 1,15 ER para la muestra de referencia. De la misma manera, el valor obtenido en éste extracto para la muestra de referencia se ubica entre los más elevados, junto con las muestras N°4 y N°8, estableciéndose una diferencia respecto de lo observado para la infusión. Aquí también se observa el mismo comportamiento para la muestra N°6 (Gráfico N° 4).

Se presenta aquí una situación similar a la detallada para el análisis de fenoles totales, con una gran variación intermuestral. Cuando se comparan los valores promedios para ambos extractos (Infusión y etanólico), no se observó una diferencia significativa en el contenido de flavonoides.

#### 5.2.1.1.3 Ácidos hidroxicinámicos

La cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos presentes en las infusiones permitió determinar valores comprendidos entre 2,35 y 7,75 EAC, con valor de  $4,05 \pm 0,14$  EAC para la muestra de referencia y un promedio de  $4,97 \pm 2,07$  EAC para la totalidad de las muestras. En este caso, el valor correspondiente a la muestra de referencia se ubica cercano al valor promedio, mientras que las muestras N°3 y N°10 presentan los valores más elevados de ácidos hidroxicinámicos. Se destaca que la muestras N° 6 y N°9 presentaron los valores más bajos (2,50 y 2,35 EAC, respectivamente) (Gráfico N° 7).

Para los extractos etanólicos, los valores se ubican entre 3,95 y 8,80 EAC, con un valor de 6,90 EAC para la muestra de referencia y un valor promedio total de  $7,0 \pm 1,61$  EAC. Como puede observarse, el valor obtenido para la muestra de referencia se ubica muy cercano al valor promedio, mientras que las muestras N°4 y N°10 presentan los valores más elevados. Se hace resaltar que la muestra N°6 sigue siendo la que presenta niveles más bajos junto con la muestra N°9, presentando ambas muestras los menores valores de ácidos hidroxicinámicos para ambos extractos (Gráfico N° 7).

Cuando se comparan los valores promedios para ambos extractos (Infusión y etanólico), no se observó una diferencia significativa en el contenido de derivados hidroxicinámicos, pero sí se observó una importante variación entre las concentraciones correspondientes a las diferentes muestras analizadas.

#### 5.2.1.1.4 Antocianos

La cuantificación de los antocianos en las infusiones permitió determinar valores comprendidos entre 0,25 y 5,95 EC, con un valor de  $5,95 \pm 0,48$  EC para la muestra de referencia y un promedio de  $2,85 \pm 1,60$  EC para la totalidad de las muestras. Aquí también la muestra de referencia (N°1) presentó un elevado contenido de antocianos, junto con las muestras N°2 y 4 (Gráfico N°10).

Para los extractos etanólicos, los valores se ubican entre 0,40 y 7,80 EC, con un valor de 7,80 EC para la muestra de referencia y un valor promedio de  $7,0 \pm 1,61$  EC para la totalidad de las muestras (Gráfico N°10).

Como puede observarse, el valor obtenido para la muestra de referencia se ubica entre los valores más elevados, mientras que la muestra N°6 presentó el valor más bajo de antocianos en ambos extractos.

Aquí también puede observarse un amplio rango de concentraciones cuando se comparan las muestras entre sí. Por otro lado, cuando se compara el contenido promedio de antocianos entre los extractos acuosos y etanólicos, es posible determinar una diferencia significativa entre ambos.

La alta concentración de antocianos en los extractos etanólicos, probablemente debido a las características químicas de éstos compuestos, postularía la elección de este solvente para la obtención de extractos ricos en antocianos provenientes de los cálices del “Hibiscus”.

#### **5.2.1.2 Análisis de las muestras complejas**

Dada la gran variabilidad cuali-cuantitativa entre los componentes de las diferentes muestras, no se realizó un estudio comparativo entre ellas. El análisis cuantitativo de los diferentes metabolitos (Fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y antocianos) se efectuó teniendo en cuenta el aporte del “Hibiscus” al contenido total de cada muestra.

En el análisis de fenoles totales para la muestra N°1 se pudo determinar que el “Hibiscus” aporta un 25 % (extracto etanólico) y un 27 % (infusión) al total de polifenoles de la muestra. Para la muestra N°2 el aporte varía entre el 65 % para el extracto etanólico y un 69 % para la infusión. En la muestra N°3, entre un 52 % (extracto etanólico) y 53 % (infusión) fue el aporte del “Hibiscus” al total de polifenoles (Gráficos N° 2 y 3).

El análisis de flavonoides permite determinar que el “Hibiscus” aporta un 7 % (infusión) y un 18 % (extracto etanólico) al total de flavonoides para la muestra N°1. Para la muestra N°2 varía entre un 25 % para la infusión y 33 % para el extracto etanólico, mientras que para la muestra N°3, se determinó una gran variación entre los extractos de la misma muestra con valores entre un 5 % (infusión) y un 42 % (extracto etanólico) del aporte del “Hibiscus” al total de flavonoides (Gráficos N° 5 y 6).

En el estudio de ácidos hidroxicinámicos la muestra N°1 mostro un aporte del 28 % para la infusión y un 34 % del extracto etanólico al total de derivados hidroxicinámicos. Para la muestra N°2 se encontró un aporte que varía entre un 50 % para el extracto etanólico y un 71 % para la infusión. Para la muestra N°3, un 54 % para la infusión y un 55 % para el extracto etanolico correspondieron al aporte del “Hibiscus” (Gráficos N° 8 y 9).

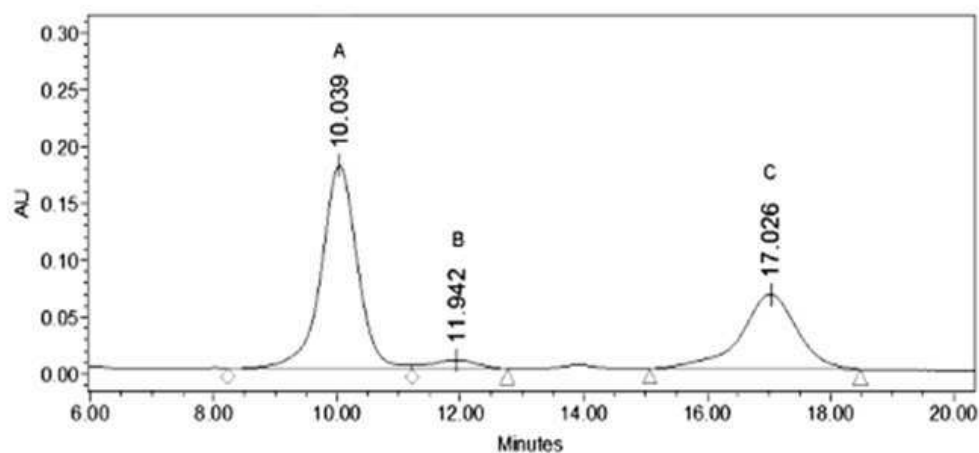
Para el contenido de antocianos, se determinó que en la muestra N°1 un 67 % (extracto etanólico) y un 100 % (infusión) del total correspondió al contenido de “Hibiscus”. Para la muestra N°2 el aporte del “Hibiscus” sería del 100 % para ambos extractos (infusión y etanólico). En la muestra N°3, la contribución del “Hibiscus” varía entre un 78 % (infusión) y un 82 % (extracto etanólico), al total de antocianos (Gráfico N° 11 y 12).

Como puede observarse, las diferencias entre las concentraciones de los diversos metabolitos analizados se verían afectadas por la gran heterogeneidad de las muestras, resultando en una gran variación en el contenido de polifenoles totales y en el aporte del “Hibiscus” en cada una de ellas.

### **5.3 ESTUDIO DE ANTOCIANOS**

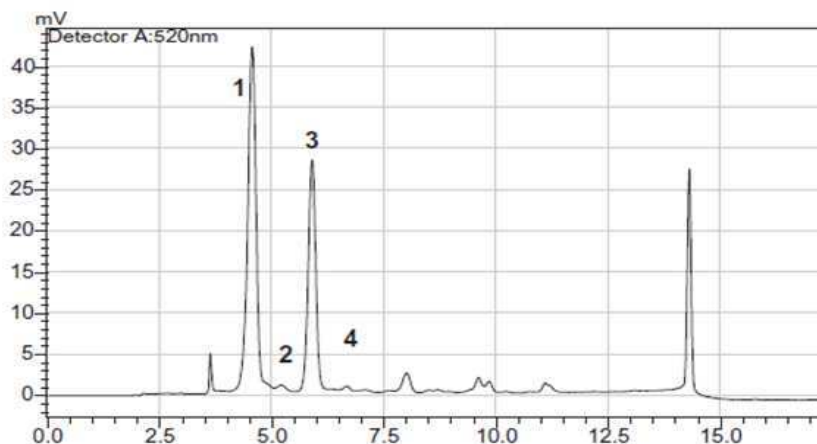
Como se mencionó anteriormente, mediante el empleo de una técnica sencilla, rápida y de bajo costo (TLC), pudo determinarse el perfil cualitativo de antocianos (Foto 38), caracterizado por la presencia de dos compuestos principales, que corresponden a cianidina-3-sambubiósido y delphinidina-3-sambubiósido (Figura 1), según resulta del análisis cromatográfico y espectroscópico y que concuerdan con los datos observados en bibliografía. También cabe mencionar la presencia de un tercer compuesto, cuyas características fisicoquímicas corresponderían a cianidina-3-glucósido (Wagner y Bladt, 1996).

Estos resultados concuerdan con los estudios previos realizados por Tsai y Ou (1996), Cissé y colaboradores (2009) y Tsai y colaboradores (2002), quienes observaron, mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la presencia de un pigmento púrpura identificado como delfinidina-3-sambubiósido y un pigmento de color rojo-rosado identificado como cianidina-3- sambubiósido (Figura 25).



**Figura 25.** Cromatograma por HPLC de un extracto etanólico: A) Delfinidina- 3- sambubiósido, B) Delfinidina- 3- glucósido y C) cianidina- 3- sambubiósido.

Adicionalmente, Ali y colaboradores (2005), destacan además la presencia de cianidina-3- glucósido y delfinidina-3-glucósido, en menor concentración, junto a los componentes principales anteriormente mencionados (Figura 26).



**Figura 26.** Cromatograma por HPLC de un extracto acuoso: 1) Delfinidina- 3-sambubiósido, 2) Delfinidina- 3- glucósido, 3) cianidina- 3- sambubiósido y 4) cianidina- 3- glucósido.

Estos compuestos son los responsables de los colores rojos a púrpura característicos de los cálices de las flores de “Hibiscus”. Estas características cromáticas son afectadas por el patrón de sustitución del anillo de B de la molécula del antociano, donde un aumento del grado de hidroxilación resulta en un desplazamiento batocrómico del espectro desde un color rojo a un color violeta (Cianidina → Delfinidina).

En lo que respecta a la glicosilación de la antocianidina, la naturaleza del azúcar unido (glucosa, arabinosa, rutinosa, sambubiósido, etc.), y su posición, son también factores estructurales importantes que influyen en el tono del color de éstos pigmentos.

Entre los factores que influyen en la estabilidad del color de los antocianos, se debe mencionar la acidez de los extractos. Según estudios publicados por Prenesti y colaboradores (2007), el pH del extracto es un factor fundamental en la estabilidad del color, pues determina la estructura química de la antocianina. Es importante que la estructura predominante sea la del catión flavilio, que confiere el color rojo brillante a los extractos y que es estable a pH menor de 3. Esta acidez juega un papel protector en las moléculas fenólicas, preservando así el color y el poder antioxidante. Por otro lado, la presencia de grupos acilo en la molécula también aumenta su estabilidad (Goto y col., 1978; Saito Anet y col., 1995; Haslam, 1980; Figueiredo y col., 1999).

Respecto de la presencia de estos metabolitos en las muestras de “Hibiscus”, se hallaron tanto en la muestra de referencia como en las muestras comerciales analizadas, ya sean simples o complejas, constituyéndose en sus marcadores químicos. Es necesario destacar que la intensidad de las bandas no ha sido la misma para todos los materiales vegetales analizados, lo que sugiere una variación de tipo cuantitativo, que se verificó en la determinación del contenido de antocianos.

Cabe mencionar que esta técnica cobra importancia en los estudios de control de calidad cuando el material vegetal se encuentra finamente triturado (reducido a polvo), ya que la detección de compuestos diferentes a los aquí mencionados estaría informando la presencia de material vegetal ajeno a “Hibiscus”.

#### **5.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

La metodología aquí empleada es la más utilizada para la determinación de este tipo de actividades (Prior y col., 2005), debido a la facilidad con que puede llevarse a cabo, ya que sólo se requiere de un espectrofotómetro UV-Visible para su determinación.

En la cuantificación de la actividad antioxidante utilizando el método de ABTS, para las muestras comerciales simples, se puede observar que la muestra de referencia (Muestra N°1), junto con las muestras N°4 y N°5, presentaron las mayores actividades. Se destaca que la muestra N°6 presentó la más baja actividad antioxidante (Gráfico 13).

Cuando se compara la actividad antioxidante entre ambos extractos (infusión y etanólico), se observó una mayor actividad antioxidante en los extractos etanólicos, con excepción de las muestras N° 5 y N°9 donde las infusiones demostraron ser más activas.

Si consideramos a la muestra de referencia (Muestra N°1), podemos observar una alta capacidad antioxidante (Gráfico 13), que es respaldada por un alto contenido en fenoles totales y dentro de ellos principalmente los antocianos (Gráficos 1 y 10).



Es interesante observar el comportamiento para la muestra N°10, que presentó altos valores de fenoles totales, acompañados de bajos niveles de antocianos y una baja actividad antioxidante. Podría postularse que aquí los antocianos juegan un papel importante en el total de la actividad antioxidante, que concuerdan con estudios previos que reportan que del total de la actividad antioxidante que presentan los extractos de “Flor de Jamaica”, el 51 % es debido a las antocianinas presentes y un 24 % a los demás compuestos fenólicos que se encuentran en la solución (Galicia Flores y col., 2008; Ersus y Yurdagel, 2006).

Por otro lado, si bien para algunas muestras se observó una relación directa entre el contenido de antocianos y la actividad antioxidante, adquiere importancia la presencia de otros compuestos, como los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, como es el caso de las muestras N°4 y N°5 (Gráficos 4 y 7). Tsai y colaboradores (2002), afirman que son varios los constituyentes con actividad antioxidante presentes en los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., entre los que se incluyen a las antocianinas, quercetina, ácido ascórbico y ácido protocatéquico, por lo que esta propiedad no es exclusiva de las antocianinas.

En lo que respecta al análisis de la actividad antioxidante de las muestras comerciales simples utilizando el método de DPPH, se observó que la muestra de referencia (Muestra N°1), junto con la muestra N°4, presentaron una muy buena actividad antioxidante en comparación con las demás muestras analizadas (Gráfico N°14). La muestra de referencia presenta un comportamiento similar al observado para el método de ABTS, que también puede observarse en los casos de las muestras N°4, 6 y 10 (Gráfico N° 13).

Un análisis comparativo de la actividad antioxidante entre ambos extractos (infusión y etanólico), permitió determinar una mayor actividad antioxidante en los extractos etanólicos, con una única excepción de la muestra N°10 donde la infusión demostró una mayor actividad, pero sin ser significativa dicha diferencia.

En líneas generales, y teniendo en cuenta la estrecha relación entre actividad antioxidante y contenido de polifenoles, se puede destacar el comportamiento observado en la muestra N°6, donde se verifica una relación lineal entre la baja actividad antioxidante y los reducidos niveles para todos los metabolitos analizados (Fenoles totales, flavonoides, derivados hidroxicinámicos y antocianos).

#### **5.4.1 Actividad antioxidante muestras complejas**

Al igual que para las muestras simples, el análisis de la actividad antioxidante se efectuó mediante las técnicas de ABTS y DPPH y se determinó el aporte del “Hibiscus” en cada extracto analizado.

Tanto para el método de ABTS (Gráficos 15 y 16), como para la técnica de DPPH (Gráficos 17 y 18), se pudo observar en la muestra N°1 un escaso aporte por parte del “Hibiscus” al total de dicha actividad. La muestra N° 2 exhibe el mayor aporte del “Hibiscus” al total de la capacidad antioxidante de las muestras analizadas, situación que puede asimilarse al aporte del “Hibiscus” al total de antocianos” (Gráficos 11 y 12), compuestos relevantes para la acción antioxidante. La muestra N°3 presenta una contribución del “Hibiscus” de aproximadamente un 50 % a la actividad antioxidante total.

Si consideramos la correlación entre los valores de fenoles y actividad antioxidante, tanto para las infusiones como para los extractos etanólicos, se esperaría observar una mayor actividad antioxidante para la muestra N°3, situación que no coincide cuando se consideran los valores de fenoles totales, evidenciando una compleja relación entre actividad antioxidante y niveles de polifenoles. Para la muestra N°2, se determina una relación directa entre contenido de fenoles y actividad antioxidante, donde bajos niveles de fenoles totales se acompañan de una baja actividad antioxidante. En la muestra N°1 los altos niveles de fenoles totales se acompañan de una alta actividad antioxidante.

## 6 CONCLUSIONES

Las técnicas empleadas son de fácil, rápida realización y de bajo costo, aplicables en laboratorios de baja complejidad. Permiten obtener información relevante, constituyendo un punto de partida para la validación de los diferentes parámetros empleados en el análisis del control de calidad de muestras y extractos de “Hibiscus”.

La técnica de disociado leve es de gran utilidad para el control de calidad de muestras de “Hibiscus”, y cobra especial importancia en el análisis de muestras que se presentan trituradas o finamente trituradas.

La presencia y distribución de los diversos tricomas hallados (glandulares y eglandulares) puede constituir una valiosa herramienta para el control de calidad de muestras comerciales de *Hibiscus sabdariffa* L.

El presente estudio indica que tanto los extractos acuoso como etanólicos del cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. tienen importantes contenidos de polifenoles y una promisorio actividad antioxidante. Si bien el perfil de polifenoles determinado por TLC se presentó sin modificaciones entre las diversas muestras, se observó un amplio rango de concentraciones, evidenciando una importante variación cuantitativa entre las muestras analizadas.

En el análisis cuali-cuantitativo de los polifenoles presentes en las muestras complejas, pudo observarse una gran variación en lo que respecta al aporte del “Hibiscus” al total de cada muestra, producto principalmente de las distintas proporciones en que éste se encontraba respecto de los demás componentes.

Las antocianos son los principales metabolitos de los cálices de “Hibiscus”, constituyéndose en compuestos útiles en el control de calidad de esta especie. Delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido se hallaron presentes en todas las muestras simples analizadas, permitiendo además determinar la presencia de “Hibiscus” en las muestras complejas.

Si bien el “Hibiscus” es empleado principalmente bajo la forma de infusión, la realización de extractos etanólicos-acuosos presentaría una alternativa interesante como fuente de compuestos bioactivos, con especial interés en los antocianos, dadas sus reconocidas propiedades antioxidantes y como fuente de colorantes naturales.

En líneas generales, pudo observarse que en el extracto etanólico (etanol 50%) se determinaron las mayores concentraciones de polifenoles (fenoles, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y antocianos), como así también una mayor actividad antioxidante, cuando se lo compara con los extractos acuosos.

En el análisis cuantitativo de la actividad antioxidante, empleando las técnicas de ABTS y DPPH, si bien se evidencia una relación directa de dicha actividad con el contenido de polifenoles, dicha relación es compleja, donde no sólo debe considerarse el total de polifenoles, sino también deben ser ponderados cada uno de metabolitos analizados.

## 7 REFERENCIAS

- AbouZid, S.F., Mohamed, A.A. 2011. Survey on medicinal plants and spices used in Beni-Sueif, Upper Egypt. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 7:18.
- Adlercreutz, H. 2002. Phytoestrogens and cancer. *The Lancet Oncology* 3: 32–40.
- Aguwa, C.N., Ndu, O.O., Nwanma, C.C., Udeogaranya, P.O., Akwara, N.O. 2004. Verification of the folkloric diuretic claim of *Hibiscus sabdariffa* L. petal extract. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Research* 3.
- Ajay, M., Chai, H.J., Mustafa, A.M., Gilani, A.H., Mustafa, M.R. 2007. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *Journal Ethnopharmacology* 109: 388–393.
- Ajiboye, T.O., Salawu, N.A., Yakubu, M.Y., Oladiji, A.T., Akanji, M.A., Okogun, J.I. 2011. Antioxidant and drug detoxification potentials of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanin extract. *Drug Chemical Toxicology* 34:109-115.
- Al Hashimi Alaa, G. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science* 6(21): 506-511.
- Alarcón Alonso, J., Zamilpa, A., Alarcón Aguilar, F., Herrera Ruiz, M., Tortoriello, J., Jiménez Ferrera, E. 2012. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 139 (3): 51–756.
- Alarcón Corredor, O.M. 2009. Los elementos traza. *Revista Médica de la extensión potuguesa* 4 (3): 107-124.

Ali Bradeldin, H., Mousa, H.M., El Mougy, S. 2003. The effect of a wáter extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamolinduced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research* 17: 56–59.

Ali-Bradeldin, H., Al-Wabel, N., Gerald, B. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: A review. *Phytotherapy Research* 19(5): 369-375.

Alonso, J. 2004. *Tratado de Fitofarmacos y Nutraceuticos*. 1 Ed. Argentina, Rosario, Corpus libros.

Alzweiri, M., Sarhan, A.A., Mansi, K., Hudaib, M., Aburjai, T. 2011. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia region. *Journal Ethnopharmacology* 137:27–35.

Anokwuru, P., Esiaba, I., Ajibaye, O., Adesuyi, O. 2011. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Research Journal of Medicinal Plant* 5:557-566.

Arteel, G.E. 2003. Oxidative and antioxidants in alcohol induced liver disease. *Gastroenterol* 124: 778-790.

Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J., Streit, C. 2000. Asociación Naturland. Producción Ecológica de Hibisco 1-13.

Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93:43-54.

Babalola, S.O. 2000. Chemical analysis of roselle leaf (*Hibiscus Sabdariffa*), In Proceeding of 24th annual conference of NIFST 228 – 229.

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

Bayer, C., Kubitzki, K. 2003. Malvaceae. In: Kubitzki, K. and C. Bayer (eds.), *Flowering Plants, Dicotyledons: Malvales, Capparales, and Non-betalain Caryophyllales* 225–311.

Beltrán Debón, R., Alonso Villaverde, C., Aragonès, G., Rodríguez Medina, I., Rull, A., Micol, V., *et al.* 2010. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein 1 in humans. *Phytomedicine* 17: 186–191.

Biruete Guzmán, A., Juárez Hernández, E., Sieiro Ortega, E., Romero viruegas, R., Silencio Barrita, J.L. 2009. Los nutraceuticos lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de pediatría* 76 (3):136-145.

Bisset, N. 1994. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals* 566.

Blanquer hernandez, A., Herrera arellano, A., Zamilpa alvarez, A., Olivar rivas, T., Martinez garcia, M. 2009. Interés de la flor de hibisco en problemas cardiovasculares. *Revista de fitoterapia* 9 (1): 25-33.

Bohm, B.A. 1998. *Introduction to Flavonoids*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J. 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13: 135- 160.

Boss, P.K., Davies, C., Robinson, S.P. 1996. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* 32: 565–569.

Bridle, P., Timberlake, C.F. 1996. Anthocyanins as natural food colourants selected aspects. *Food Chemistry* 58: 103–109.

Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins; Em: Anthocyanins as food colors Markakis, P., ed; Academic Press: New York (1).

Broun, P. 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. Current Opinion in Plant Biology 8: 272–279.

Büyükbalci, A., El, S.N. 2008. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. Plant Foods for Human Nutrition 63: 27–33.

Cáceres, A., Giron, L., Martínez, A. 1987. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. Journal Ethnopharmacology 19: 233-45.

Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F.O., Natali, P.G., Brunetti, M., Aiello, F.B., Piantelli, M. 2000. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. International Journal of Cancer 87: 595-600.

Camelo Mendez, G.A., Ragazzo Sanchez, J.A., Jimenez Aparicio, A.R., Vanegas Espinoza, P.E., Paredes Lopez, O., Del Villar Martinez, A.A. 2013. Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by multivariable analysis. Plant Foods for Human Nutrition.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine 22: 749–760.

Carvajal Zarrabal, O., Waliszewski, S.M., Barradas Dermitz, D.M., Orta Flores, Z., Hayward Jones, P.M., Nolasco Hipolito, C., Angulo Guerrero, O., Sánchez Ricano, R., Infanzón, R.M., Trujillo, P.R.L. 2005. The consumption of *Hibiscus sabdariffa* dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. Plant Foods for Human Nutrition 60: 153-159.



Celka, Z., Szkudlarz, P., Biereznój, U. 2006. Morphological variation of hairs in *Malva alcea* L. (Malvaceae). *Biodiversity Research and Conservation* 3: 258–261.

Chanda, S., Dave, R. 2009. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Journal of Microbiology Research* 3 (13): 981-996.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis* 10: 178-182.

Chen, C.C., Chou, F.P., Ho, Y.C., Lin, W.L., Wang, C.P., Hao, E.S., *et al.* 2004. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L., extract on low density lipoprotein oxidation and antihyperlipidemia in fructose fed and cholesterol fed rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:1989 - 1996.

Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E.S., Ho, Y.C., Wang, C.J. 2003. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 5472-5477.

Christian, K., Nair, M., Jackson, J. 2006. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 778–783.

Christian, R.K., Jackson, J.C. 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., Guerrero Beltrán, J.A. 2012. Propiedades funcionales de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* (6-2): 47- 63

Cid Ortega, S., Navarro Frómata, A.E., Rostagno, M.A., López Méndez, E.M., Monterrosas Fuentes, A. 2010. Sugar free hibiscus wáter production: process design and economic evaluation. Memorias del XXXI Encuentro nacional de la AMIDIQ 4947-4952.

Cissé, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., Sock, O. 2009a. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. Fruits 64 (3):179–193.

Clifford, M.N. 2000. Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1063–1072.

Clifford, M.N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1033–1043.

Clydesdale, F.M., Main, J.H., Francis, F.J. 1979. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins as colorants for beverages and gelatin desserts. Journal of Food Protection 42(3): 204–207.

Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. 2004. Dietary phytoestrogens and health. Phytochemistry 65:995–1016.

Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 57: 449–459.

Damberg, R.G., Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Janik, L., Gishen, M. 2006. The determination of red grape quality parameters using the LOCAL algorithm. Journal Near Infrared Spectroscopy 14: 71–79.

Dao, L., Friedman, M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2152 - 2150.

Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L. 1991. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 12: 1193-1196.

Dixon, R.A., Steele, C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* 4: 394-400.

Dixon, R.A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* 55: 225–261.

Dixon, R.A., Xie, D.Y., Sharma, S.B. 2005. Proanthocyanidins a final frontier in flavonoid research. *New Phytologist* 165: 9–28.

Domínguez López, G., Remondetto, E., Navarro Galindo, S. 2008. Thermal kinetics degradation of anthocyanins in a Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. ‘Criollo’) infusion. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 322-325.

Downham, A., Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology* 35: 5–22.

Duke, J.A. 1983. *Hibiscus sabdariffa*.

[http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/hibiscus\\_sabdariffa.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/hibiscus_sabdariffa.html).

Duke, J.A., Bogenschutz-godwin, M., Ducey, J.K., Duke, P.A. 2003. Handbook of medicinal spices 348.

Durst, R., Wroslstad, R. 2001. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In: R.E. Wroslstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith, and P. Sporns (eds.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.3.1.

Eggensperger, H., Wilker, M. 1996. Hibiscus-Extrakt Ein hautverträglicher Wirkstoffkomplex aus AHA's und polysacchariden. *Parfumerie und Kosmetik* 9:540–543.

El Adawy, T.A., Khalil, A.H. 1994. Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1896-1900.

El Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M., El Massry, R.A. 1991. Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Nahrung* 35(6): 567-576.

Ersus, S., Yurdagel, U. 2006. Microencapsulation of anthocyanins pigments of black carrot (*Daucus carota*) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80: 805-812.

Espin, J.C., Soler Rivas, C., Wichers, H., Garcia Viguera, C. 2000. Anthocyanin based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1588–1592.

Fasoyiro, S.B., Ashaye, O.A., Adeola, A., Samuel, F.O. 2005. Chemical and storability of fruit flavoured (*Hibiscus sabdariffa*) drinks. *World Journal of Agricultural Sciences* 1(2): 165-168.

Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina, C. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1912-1920.

Fernandez, M.A., Garcia, M.D., Saenz, M.T. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal Ethnopharmacology* 26:11-14.

Fernández Arroyo, S., Herranz López, M., Beltrán Debón, R., Borrás Linares, I., Barrajión Catalán, E., Joven, J., *et al.* 2012. Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status. *Molecular Nutrition and Food Research* 56 (10): 1590–1595.

Fernández Arroyo, S., Rodríguez Medina, I.C., Beltrán Debón, R., Pasini, F., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., *et al.* 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 (5): 1490–1495.

Ferraro, G.E. 1983. Flavonoides: Actualización de su uso en terapéutica. IQUIMEFA (Instituto de la Química y Metabolismo del Farmaco) CONICET-UBA. *Acta Farmacéutica Bonararensis* 2 (2): 97-103

Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., Brouillard, R. 1999. New features of intramolecular copigmentation by acetylated anthocyanins. *Phytochemistry* 1: 125–132.

Francis, F.J. 1982. Analysis of anthocyanins. In: P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press 181–207.

Francis, F.J. 1989. Food colourants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28: 273–314.

Franz, M., Franz, G. 1988. *Phytotherapy* 9: 63.

Frank, T., Netzel, G., Carle, R., Kler, A., Kriesl, E., Bitsch, I., *et al.* 2012. Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in healthy subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (10): 2207–2218.

Galicia Flores, L.A., Salinas Moreno, Y., Espinoza García, B.M., Sánchez Feria, C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 121-129.

García Alonso, J., Ros, G., Vidal Guevara, L., Periago, J. 2006. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research* 26:330-339.

Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana* 13(3): 27-36.

Gaya, I.B., Mohammad, O.M.A., Suleiman, A.M., Maje, M.I., Adekunle, A.B. 2009. Toxicological and lactogenic studies on the seeds of *Hibiscus Sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract on serum prolactin levels of albino wistar rats. *The Internet Journal of Endocrinology* 5(2).

Gibson, S. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93–102.

Giusti, M., Rodríguez Saona, L., Wrolstad, R. 1999. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4631–4637.

Giusti, M., Wrolstad, R. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith, and P. Sporns (eds.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.2.1.

Glew, R.H., Vanderjagt, D.J., Lockett, C., Grivetti, L.E., Smith, G.C., Pastuszyn, A., Millson, M. 1997. Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *Journal of Food Composition and Analysis* 10 (3): 205 – 217.

Goto, T., Kondo, T. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins Flower color variation. *Angewandte Chemie Internattional Edition in English* 30: 17-33.

Goto, T., Takase, S., Kondo, T. 1978. PMR spectra of natural acylated antocyanins. Determination of stereostructure of awobanin, shisonin and violanin. *Tetrahedron Letters* 27:2413–2416.

Gould, K.S. 2003. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. In: Thomas, B., Murphy, D.J. and Murray, B.G. (Eds), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 9–16.

Gould, K.S., Lister, C. 2006. Flavonoid functions in plants. In: O.M. Andersen and K.R. Markham (Eds.) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* 397–442.

Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalas, P., Garcia-Viguera, C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: Effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry* 83(3): 423–436.

Greenwald, P. 2004. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. *Journal of Nutrition* 134 (12 Suppl.): 3507S–3512S.

Gurrola Diaz, C.M., Garcia Lopez, P.M., Sanchez Enriquez, S., Troyo Sanroman, R., Andrade Gonzalez, I., Gomez Leyva, J.F. 2010. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine* 17:500–5.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.

Hand, S., Chawla Maninder, A. 1989. Hypoglycaemic plants. A review *fitoterapia* 60 (3): 195-221.

Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 2nd Ed. Chapman & Hall, London.

Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481–504.

Haslam, E. 1998. *Practical Polyphenols From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University, Cambridge, UK 18-22.

Haslam, E. 1980. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* 19: 2577–2582.

Herrera Arellano, A., Flores Romero, S., Chávez Soto, M.A., Tortoriello, J. 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., Miranda Sanchez, J., Avila Castro, P., Herrera Alvarez, S., Jimenez Ferrer, J.E., Zamilpa, A., *et al.* 2007. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Médica* 73:6–12.

Hidalgo Villatoro, S.G., Cifuentes Reyes, W.A., Ruano Solís, H.H., Cano Castillo, L.E. 2009. Caracterización de trece genotipos de rosa de Jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 101-109.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunya praphatsaea, N., Sato, H., Herunsalee, A., Suthin sisang, C. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low density lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28(3): 481-484.



Hirunpanich, V., Utaipat, A., Noppawan, P.M., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthisisang, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal Ethnopharmacology* 103(2): 252-260.

Hochmuth, G., Maynard, D., Vavrina, C., Hanlon, E., Simonne, E. 2004. Plant tissue analysis and interpretation for vegetable crops in Florida: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences 1 –79.

Holzbeierlein, J.M., McIntosh Thrasher, J.B. 2005. The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. *Current Opinion in Urology* 15: 17–22.

Hou, D.X. 2003. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Current Molecular Medicine* 3: 149.

Howard, L., Clark, J., Brownmiller, C. 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1238-1247.

Jonadet, M., Bastide, J., Bastide, P. 1990. Activités inhibitrices enzymatiques in vitro détraits de karkadé (*Hibiscus sabdariffa* L). *Journal de Pharmacie de Belgique* 45: 120-124.

Juliani, H.R., Welch, C.R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., Simon, J.E. 2009. Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural product industry in senegal. *Journal of Food Science* 74 (2): 113–S121.

Jung, E., Kim, Y., Joo, N. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Kahkonen, M.P., Heinonen, M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3): 628–633.

Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., Terabe, K. 1995. Suppression of tumor-cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation* 13(6): 590–594.

Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D.S., Drzewiecki, G., Middleton, E. 1991. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Letters* 56: 147-152.

Kang, S.Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., Bourquin, L.D. 2003. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters* 194(1): 13–19.

Kanner, J., German, J. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 25: 317-364.

Kao, E.S., Hsu, J.D., Wang, C.J., Yang, S.H., Cheng, S.Y., Lee, H.J. 2009. Polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating cyclooxygenase 2 expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 385–390.

Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(1): 68–75.

Kelm, M.A., Hammerstone, J. F., Schmitz, H.H. 2005. Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: how good are the datas. *Clinical and Developmental Immunology* 12: 35-41.

Kerharo, J. 1971. *Plant Medicine. Phytotherapy* 5: 277.

Kimula, V.L., Crapo, J.D. 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Biology and Medicine* 36: 718- 744.

Koes, R.E., Quattrocchio, R., Mol, J.N.M. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132.

Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10: 236–242.

Koostra, A. 1994. Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Molecular Biology* 26: 771–774.

Kuskoski, M., Asuero, A., García Parrilla, M., Troncoso, A., Fett, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciencia e Tecnología de Alimentos, Campiñas* 24: 691-693.

Lala, G., Malik, M., Zhao, C., He, J., Kwon, Y., Giusti, M.M., Magnuson, B.A. 2006. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutrition and Cancer* 54(1): 84–93.

Lee, M., Chou, F., Tseng, T., Hsieh, M., Lin, M., Wang, C. 2002. Hibiscus protocatechic ácido or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (7): 2130-6.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of the AOAC International* 88: 1269–1278.

Leyva Daniel, D., Barragán Huerta, E., Anaya Sosaa, M., Vizcarra Mendoza, G. 2012. Effect of fixed bed drying on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Industrial Crops and Products* 40: 268–276

Li thomas, S.C. 2002. Chinese and related north American herbs. *Phytopharmacology and therapeutic values* 598.

Lietti, A., Cristoni, A., Picci, M. 1976. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides .I. vasoprotective and antiinflammatory activity. *Drug Research* 26(5): 829–832.

Lila, M.A. 2004. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 306–313.

Lin, T.L., Lin, H.H., Chen, C.C., Lin, M.C., Chou, M.C., Wang, C.J. 2007. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* 27(3).

Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., Tseng, T.H. 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tertbutyl hydroperoxide induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1415-1422.

López Munguía, A., García, M., Quintero, R. 2002. *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa 635.

Mabry, T.J., Markham, K.R. Thomas, M.B. 1970. “The Systematic identification of the Flavonoids”. Springer-Verlag Ed., Berlin-New York: 1-175.

Magee, P.J., Rowland, I.R. 2004. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British Journal of Nutrition* 91: 513–531.

Mahadevan, N., Shivali., Pradeep, K. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn. An overview. *Natural Product Radiance* 8 (1): 77-83.

Makita, H., Tanaka, T., Fujitsuka, H., Tatematsu, N., Satoh, K., Hara, A., Mori, H. 1996. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Research* 56: 4904-4909.

Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of Science of Food and Agriculture* 61: 161 - 165.

Marjorie, C. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564-582.

Markakis, P. 1982. *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press, London.

Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press.

Marles, M.A.S., Ray, H., Ad Gruber, M.Y. 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* 64: 367–383.

Martínez, A. *et al.* 2000. *Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas*. Publicación y convenio Andrés Bello y el Programa iberoamericano de ciencia y Tecnología para el desarrollo 524.

Mati, E., Boer, H. 2011. Ethnobotany and trade of medicinal plants in the Qaysari Market, Kurdish Autonomous Region, Iraq. *Journal Ethnopharmacology* 133:490–510.

Mazza, G., Miniati, E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. BocaRaton, FL, CRC Press.

McKay, D.L., Chen, C.Y., Saltzman, E., Blumberg, J.B. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *Journal of Nutrition* 140: 298–303.

Menben, H.G., Staesche, K. 1974. *Deutsche Apotheker Zeitung* 114: 1211.

Mendez, M., Jones, D.G., Manetas, Y. 1999. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist* 144: 275–282.

Meza Jiménez, J., Ramírez Ruiz, J., Luna Solano, G., Andrade González, I. 2009. Low-cost solar thermodynamics drying system for the dehydration of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Drying Technology* 27: 621-624.

Mitchell, J.H., Gardner, P.T., Mcphail, D.B., *et al.* 1998. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360: 142–148.

Miyagi, Y., Om, A.S., Chee, K.M., Bennink, M.R. 2000. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutrition and Cancer* 36: 224-229.

Mohamed, R., Fernandez, J., Pineda, M., Aguilar M. 2007. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of  $\gamma$ -tocopherol. *Journal of Food Science* 72: 207–211.

Mojiminiyi, F.B., Adegunloye, B.J., Egbeniyi, Y.A., Okolo, R.U. 2000. An investigation of the diuretic effect of an aqueous extract of the petal of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medical Sciences* 2: 77-80.

Mojiminiyi, F.B.O., Dikko, M., Muhammad, B.Y., Ojobor, P.D., Ajagbonna, O.P., Okolo, R.U., *et al.* 2007. Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. *Fitoterapia* 78: 292–297.

Mol, J., Grotewold, E., Koes, R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3(6): 212–217.

Morton, J.F. 1987. Roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. En: Morton, J.F. Edition *Fruits of Warm Climates* 281–286.

Morton, J.F. 1987. Roselle. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/roselle.html>.

Mozaffari Khosravi, H., Jalali Khanabadi, B.A., Afkhami Ardekani, M., Fatehi, F., Noori-Shadkam, M. 2009. The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. *Journal of Human Hypertension* 23: 48–54.

Müller, B., Kraus, J., Franz, G. 1989. Polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* structural investigation and biological activity. *Planta Médica* 7.

Muller, B.M., Franz, G. 1992. *Plant medicine* 58: 60.

Ngamjarus Wahabi, H.A., Alansary, L.A., Al Sabban, A.H., Glasziuo, P. 2010. The effectiveness of *Hibiscus sabdariffa* in the treatment of hypertension: a systematic review. *Phytomedicine* 17:83–6.

Ngamjarus, C., Pattanittum, P., Somboonporn, C. 2010. Roselle for hypertension in adults. *Cochrane Database Systematic Reviews* 1–17.

Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369–389.

Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., Packer, L. 2000. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology* 148(2–3): 119–123.

Oboh, G., Rocha, J.B.T. 2008. Antioxidant and neuroprotective properties of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*, calyx) and green tea (*Camellia sinensis*) on some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain in vitro. *Food Biophysics* 3: 382–389.

Odigie, I.P., Ettarh, R., Adigun, S. 2003. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 86: 181–185.

Onyenekwe, P., Ajani, E., Ameh, D., Gamaniel, K. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calix infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function* 17 (3): 199-206.

Ortiz Marquez, S. 2008. Composición en micronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de Jamaica cultivada en el estado Monagas. *Tecnología y pensamiento* 3 (1-2): 61-75.

Owolabi, A., Adegunloye, B., Ajagbona, O., Sofola, O., Obiefuna, P. 1995. Mechanism of relaxant effect mediated by an aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* petals in isolated rat aorta. *International Journal of Pharmacognosy* 33: 210-4.

Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V., Reddy, A.R. 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry* 46: 499–502.

Poo, S.M. 2005. Concentración de antocianinas en jugo de cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante nanofiltración. Tesis de Maestría. Universidad Austral de Chile, Chile 62.

Peris, J., Stubing, G., Vanaclocha, B. 1995. *Fitoterapia Aplicada*. Edit. Micof S.A. Col. Farmacia. Valencia.



Perry, L.M. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses, MIT Press 632.

Prasongwatana, V., Woottisin, S., Sriboonlue, P., Kukongviriyapan, V. 2008. Uricosuric effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal stone former subject. Journal of Ethnopharmacology 117(3): 491–495.

Prenești, E., Berto, S., Daniele, P.G., Toso, S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. Food Chemistry 100(2): 433–438.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4290–4302.

Ramirez Rodrigues, M.M., Plaza, M.L., Azeredo, A., Balaban, M.O., Marshall, M.R. 2011. Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from *Hibiscus sabdariffa*. Journal of Food Science 76 (3): C428–C435.

Rao, P. 1996. Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. Plant Foods for Human Nutrition 49 (1): 27-34.

Rao, S.R.S., Ramayya, N. 1977. Structure distribution and taxonomic importance of trichomes in the Indian species of Malvastrum. Phytomorphology 27: 40–44.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Annala, A., Yang, M., Rice Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology Medicine 26: 1231-1237.

Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Master Degree Thesis 87.

Renaud, S., Delorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease. *Lancet* 339(8808): 1523–1526.

Rice Evans, M.C., Miller, N.J. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Science* 2: 152-159.

Rivas Gonzalo, J.C. 2003. Analysis of anthocyanins. In: C. Santos-Buelga and G. Williamson (Eds.). *Methods in Polyphenol analysis*. The Royal Society of Chemistry 338–353.

Rogger, Y.S., John, L.I., Mark, L.W. 1990. *General Microbiology*. 5th ed. Macmillan education Ltd London 626-642.

Ross, J.A., Kasum, C.M. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22: 19-34.

Saito, N., Tatsuzawa, F., Yoda, K., Yokoi, M., Kasahara, K., Lida, S., Shigihara, A., Honda, T. 1995. Acylated cyanidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. *Phytochemistry* 40: 1283–1289.

Salazar González, C., Vergara Balderas, F.T., Ortega Regules, A.E., Guerrero Beltrán, J.Á. 2012. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Ciencia e Investigación Agraria* 39(1): 79-90.

Satue Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(9): 3362–3367.

Saura Calixto, F., Goñi, I. 2005. Fibra dietética y antioxidante en la dieta española y en alimentos funcionales. En: *Alimentos funcionales*. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología 167-200.

Sáyago Ayerdi, S.G., Arranz, S., Serrano, J., Goñi, I. 2007. Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L) Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7886-7890.

Sáyago Ayerdi, S.G., Goñi, I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 60: 79- 84.

Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1324-1329.

Scalbert, A., Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073–2085.

Schilcher, H. 1976. *Deutsche Apotheker Zeitung* 116, 1155 In: Franz, M. and Regensburg, G.Franz. 1988. *Hibiscus sabdariffa* – Hibiscusblüten. *Zeitschrift fur Phytotherapie* 1159: 1163–1166.

Schreier, P. 2005. Chemopreventive compounds in the diet. *Developments in Ophthalmology* 38: 1-58.

Seeram, N.P., Schutzki, R., Chandra, A., Nair, M.G. 2002. Characterization, quantification, and bioactivities in anthocyanins in *Cornus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2519–2523.

Segura Carretero, A., Puertas Mejía, M.A., Cortacero Ramírez, S., Beltrán, R., Alonso Villaverde, C., Joven, J., *et al.* 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.

Serra Colmar, A., Zapata Lobsang, R., Zimmerman, T. 2013. Viabilidad de variedades de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae) bajo condiciones de días largos como cultivo en la República Dominicana.

Shaheen, N., Ajab, M., Yasmin, G., Qasim Hayat, M. 2009. Diversity of Foliar Trichomes and Their Systematic Relevance in the Genus *Hibiscus* (Malvaceae). *International Journal of Agriculture and Biology* 11: 279-284.

Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., Jiang, Y. 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Reviews International* 21:139-166.

Shirley, B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Science* 1: 377-382.

Singh, A., Selvi, M., Sharma, R. 1999. Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of Experimental Botany* 50: 1619–1625.

Singh, U., Jialal, I. 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13: 129-142.

Sini, J.M., Umar, I.A., Inuwa, H.M. 2001. The beneficial effect of extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces in alloxan- diabetic rats: hypoglycaemic and hypolipidaemic activities. *Journal of medicinal plants Research* 5(11): 2182-2186.

Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., Perry, G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer`s disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502: 139- 144.

Strack, D., Wray, V. 1989. Anthocyanins. In: P. M. Dey and J. B. Harborne (Eds.) *Methods in Plant Biochemistry* 1: 325–356.

Stringheta, P.C. 1991. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil

Takahashi, A., Takeda, K., Ohnishi, T. 1991. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant and Cell Physiology* 32: 541–547.

Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Ushida, J., Honjo, S., Hara, A., Tsuda, H., Mori, H. 1999. Modifying effects of a flavonoid morin on azoxymethane-induced large bowel tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 20: 1477-1484.

Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M., Saito, K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* 42:218–235.

Torres, M.C., Cativiela, M., Gattuso, S. 1998. Parametros de identificación morfoanatómicos del fruto de *Rosa rubiginosa* L. (rosa mosqueta) (Rosaceae). *Universidad nacional de Rosario* 37-40.

Tsai, P.J., Ou, A.S.M. 1996. Colour degradation of dried roselle during storage. *Food Science* 23: 629–640.

Tsai, P.J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., Jordan, B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35(4): 351–356.

Tsai, P.J., Huang, H.P. 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International* 37: 313-318.

Upston, J.M., Kritharides, L., Stocker, R. 2003. The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progress in Lipid Research* 42: 405- 422.

Vankar, P.S., Srivastava, J. 2008. Comparative study of total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity in *Canna indica* and *Hibiscus rosa sinensis*: Prospective natural food dyes. *International Journal of Food Engineering* 4.

Venereo, G.J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar* 31: 126-133.

Wagner y Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis*. Ed. Sprinder 281-287.

Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 304–309.

Wang, H.X., Ng, T.B. 1999. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences* 65: 2663–2677.

Wang, J., Mazza, G. 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(15): 4183–4189.

Watanabel, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y., *et al.* 2006. The blood pressure lowering effect and safety of chlorogenic acid from Green coffe bean extract in essential hypertension. *Clinical and experimental hypertension* 28 (5): 439- 449.

Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Kulling, S., Rufer, C., Johannes, C., Janzowski, C. 2006. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Journal of Biotechnology* 1(4): 388–397.

Wen Chin, L., Chau Jong, W., Yu Hsin, C., Jen Dong, H., Su Ya, C., Hong Chen, C., Huei Jane, L. 2009. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(6): 2206-2210.

Werlein, H.D., Kutemeyer, C., Schatton, G., Hubbermann, E.M., Schwarz, K. 2005. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. *Food Control* 16: 729–733.

Winkel Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485–493.

Wiseman, B.R., Snook, M., Widstrom, N.W. 1996. Feeding responses of the corn ear worm larvae (Lepidoptera: Noctuidae) on corn silks of varying flavone content. *Journal of Economic Entomology* 89: 1040-1044.

Wiseman, H., O'Reilly, J.D., Adlercreutz, H., *et al.* 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72: 395–400.

Woisky, R.G., Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105.

Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M., Che Man, Y.B. 2002. Physicochemical characteristics of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science* 32 (2): 68-73.

Wulf, L.W., Nagel, C.W. 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology Viticulture* 29: 42-49.

Yanishlieva Maslarova, N.V. 2001. Inhibiting oxidation. In: J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds.). *Antioxidants in Foods: Practical Applications* 22-70.

Yi-Sun, Y., Chien-Ning, H., Chau-Jong, W., Yi-Ju, L., Mu-Lin, C., Chiung-Huei, P. 2013. Polyphenols of *Hibiscus sabdariffa* improved diabetic nephropathy via regulating the pathogenic markers and kidney functions of type 2 diabetic rats. *Journal of Functional Foods* 5 (2): 810-819.

Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(5): 282-288.

Zhang, Y.J., Vareed, S.K., Nair, M.G. 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Science* 76(13):1465-1472.