

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR
DE FLORES DE *Hibiscus rosa sinensis* (FAMILIA MALVACEAE)

JOSÉ GIOVANNY CEBALLOS JAIMES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2018

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR
DE FLORES DE *Hibiscus rosa sinensis* (FAMILIA MALVACEAE)

JOSÉ GIOVANNY CEBALLOS JAIMES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero
Químico

Director

JAIRO R. MARTINEZ

Químico, Ph.D. en Química.

Co-directoras:

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph.D. en Química.

JESICA J. MEJÍA MEDINA, Química,

Candidata a Doctora en Química.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2018

DEDICATORIA

A Dios, por todas sus bondades.

A mi amada esposa Andrea Castillo por estar siempre cuando más la necesité.

A mi madre Luisa Jaimes, porque siempre ha sido un ejemplo para mí, a mi padre Henry Ceballos, por su esfuerzo durante todos estos años.

A mis hermanos Henry y Wislton, Diana y mis sobrinos por el apoyo que representan en mi vida.

Y a todos mis queridos amigos.

José Giovanni Ceballos Jaimes.

"Encomienda a Jehová tus obras, Y tus pensamientos serán afirmados." Proverbios 16:3.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo Martínez, por todas sus enseñanzas para mi formación profesional y personal.

A todos los compañeros y amigos del CENIVAM y CROM-MASS por permitirme ser parte de esta gran familia.

A Jesica Mejía por toda su ayuda y paciencia.

A la Universidad Industrial de Santander.

Soli Deo gloria.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	17
1.1.1 Compuestos polifenólicos	17
1.1.1.1 Flavonoides	18
1.2 <i>HIBISCUS ROSA SINENSIS</i>	19
1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES.....	19
1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	20
1.6 ANTOCIANINAS TOTALES	21
1.7 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN	22
2. METODOLOGÍA	23
2.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO. La siguiente es la metodología (esquema general) usada en el trabajo.....	23
2.1.1 Materiales y equipos.	24
2.1.1.1 Reactivos, solventes	24
2.1.1.2 Equipos de laboratorio	24
2.2 ETAPA I.....	25
2.2.1 Recolección del material vegetal.	25
2.2.2 Elección de las variables	25
2.2.3 Diseño experimental.	26
2.2.4 Validación del modelo de extracción	27
2.3 ETAPA II.....	27
2.3.1 Análisis cromatográfico por UHPLC-ESI- Orbitrap-MS	27
2.4 ETAPA III.....	28
2.4.1 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)	28
2.5 ETAPA IV	29
2.5.1 Cinética de extracción	29
2.5.2 Ajuste de parámetros cinéticos a partir de datos experimentales	29
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30

3.1.1 Efecto de la relación etanol:agua	32
3.1.2 Efecto de la concentración de HCl	33
3.1.3 Efecto de la temperatura.	34
3.1.4 Efecto de la relación material vegetal:solvente.....	34
3.1.5 Efecto del tiempo.	35
3.2 VALIDACIÓN DE LOS MODELOS.....	35
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO.....	36
3.4 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN	38
4. CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

Abreviaturas y acrónimos

AAPH	<i>2,2'-Azobisisobutyramidinium chloride</i> [Cloruro de 2,2'- azobis (2-amidinopropano)].
ABC	Área bajo la curva.
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza)
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> (Hidroxitolueno butilado).
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i> (Hidroxianisol butilado).
CA	Capacidad antioxidante.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
EE.UU.	Estados Unidos de América.
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros).
FL	<i>Fluorescein</i> (Fluoresceína).
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Capacidad para reducir el hierro III).
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida).
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
NO	<i>Nitric oxide radical scavenging assay</i> (Ensayo de barrido de óxido nítrico).
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).
R.comb	Respuesta combinada.
RE	Rendimiento de extracción.
RL	Radicales libres.
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Especies reactivas de nitrógeno).
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno).
RP	<i>Estimation of reducing power</i> (Estimación de capacidad de reducción).
t _R	Tiempo de retención (min).
UV	Ultravioleta.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de los flavonoides	18
Figura 2. Flor de <i>Hibiscus rosa sinensis</i>	19
Figura 3. Efectos individuales para la capacidad antioxidante.	31
Figura 4. Efectos individuales para el rendimiento de extracción.....	32
Figura 5. Efectos individuales para la respuesta combinada.....	32
Figura 6. Relación entre la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles aislados	37

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Modelos cinéticos empleados para explicar la extracción de polifenoles.	22
Tabla 2. Factores independientes y sus niveles para la extracción de polifenoles en flores de <i>H. rosa sinensis</i>	26
Tabla 3. Mejores condiciones de extracción de polifenoles.	35
Tabla 4. Identificación y cuantificación de polifenoles en flores de <i>H. rosa sinensis</i>	36
Tabla 5. Parámetros cinéticos de los modelos ajustados.	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} . Réplicas en el punto central y en los puntos adicionales fuera del diseño.	48
ANEXO B. Resultados del análisis estadístico, análisis de varianza (<i>ANOVA</i>) y modelos asociados a la CA, el RE y la R.comb.	49
ANEXO C. Gráficos de superficie de contorno para los efectos binarios.....	52
ANEXO D. Diagramas de Pareto para los efectos estandarizados.....	55
ANEXO E. Valores y gráficos de la validación de los modelos asociados a la Ca y el RE.....	57
ANEXO F. Perfil cromatográfico UHPLC-ESI(+)Orbitrap-MS del extracto hidroalcohólico de flores de <i>Hibiscus rosa sinensis</i>	59
ANEXO G. Identificación y cuantificación de polifenoles en los 25 tratamientos del diseño experimental factorial fraccionado 2^{5-1} para flores de <i>H. rosa sinensis</i>	60
ANEXO H. Gráficos de los modelos cinéticos ajustados a los datos experimentales..	62

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE FLORES DE *HIBISCUS ROSA SINENSIS* (FAMILIA MALVACEAE)*

AUTOR: Ceballos Jaimes, José Giovanni**

PALABRAS CLAVE: Metabolitos secundarios, antocianinas, *Hibiscus rosa sinensis*, ORAC.

DESCRIPCIÓN:

Los metabolitos secundarios de flores rojas de *Hibiscus rosa sinensis* liofilizadas, fueron aislados por extracción con solventes (etanol:agua) y se caracterizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Para la extracción con solventes se realizó un diseño experimental factorial fraccionado con cinco variables y dos niveles, con el fin de determinar las mejores condiciones de extracción, para obtener la mayor respuesta combinada entre la capacidad antioxidante y el rendimiento de extracción. Por medio del ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), se evaluó la capacidad antioxidante, se tuvo como referencia el antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT). Con el extracto obtenido bajo las mejores condiciones de extracción se realizó un estudio de la cinética de extracción de antocianinas. Los resultados obtenidos fueron ajustados a cuatro modelos matemáticos utilizados en la literatura que describen el fenómeno de extracción. Las siguientes fueron las mejores condiciones de extracción: etanol:agua 45:55 (% v/v); temperatura: 50 °C; relación material vegetal:solvente 1:40 (g/mL) y tiempo de extracción: 15 min. A estas condiciones se realizó el estudio cinético, encontrando que el modelo de segundo orden fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales con un R^2 de 0,97.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Director. Jairo R. Martínez Morales Químico, Ph.D. Codirectoras: Elena E. Stahenko Química, Ph.D.; Jesica J. Mejía. Química, candidata a Doctora en Química.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE CONDITIONS OF EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM FLOWERS OF *HIBISCUS ROSA SINENSIS* (MALVACEAE FAMILY)*

AUTHOR: Ceballos Jaimes, José Giovanni**

KEYWORDS: Secondary metabolites, anthocyanins, *Hibiscus rosa sinensis*, ORAC.

DESCRIPTION:

The secondary metabolites of freeze-dried *Hibiscus rosa sinensis* red flowers were isolated by solvent extraction (ethanol: water) and characterized by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). For the extraction with solvents, a fractional factorial experimental design with five variables and two levels was carried out, in order to determine the best extraction conditions, to obtain the highest combined response between antioxidant capacity and extraction performance. The antioxidant capacity was evaluated by the oxygen radical absorption capacity test (ORAC), the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) was taken as reference. With the extract obtained under the best extraction conditions, a study of the kinetics of anthocyanin extraction was carried out. The results obtained were adjusted to four mathematical models used in the literature that describe the extraction phenomenon. The following were the best extraction conditions: ethanol: water 45:55 (% v / v); temperature: 50 ° C; plant material ratio: solvent 1:40 (g / mL) and extraction time: 15 min. To these conditions the kinetic study was carried out, finding that the second order model was the one that best adjusted to the experimental data with an R^2 of 0.97.

*WorkDegree

** Faculty of Physicochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Director. Jairo R. Martinez Morales Chemist, Ph.D. Codirector: Elena E. Stahenko Chemist, Ph.D.; Jesica J. Mejía. Química, candidate in Chemist.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes sintéticos se usan en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica, para preservar propiedades organolépticas y funcionales de los diferentes productos hasta su consumo (Yehye *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Entre los antioxidantes más comúnmente utilizados se encuentran el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA). Estudios realizados (Miller *et al.*, 1994; Zeligler 2007), han determinado la posible relación entre éstos y efectos cancerígenos; experimentos en roedores han demostrado que la exposición prolongada a dosis altas de BHT puede causar en ellos daños en el hígado, pulmón y tracto gastrointestinal.

Por esta razón, entidades gubernamentales colombianas (Colciencias) han impulsado el estudio y el desarrollo de nuevos productos que incorporen compuestos naturales menos tóxicos, y capaces de sustituir las sustancias sintéticas. Parte de este trabajo, se ha venido desarrollando por medio del proyecto titulado: “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana” (Stashenko *et al.*, 2013).

Para buscar nuevos ingredientes naturales, se ha estudiado la *Hibiscus rosa sinensis*. Es un arbusto de flores grandes de tonos rojos, amarillos, rosas o naranjas entre otros. Crece en zonas tropicales y subtropicales; cada planta puede llegar a producir entre 30 y 50 flores mensuales. Estudios previos (Ruban *et al.*, 2012; Goldberg *et al.*, 2017), han determinado interesantes propiedades biológicas de sus extractos acuosos, metanólicos y etanólicos: entre éstas, se encuentran respectivamente, la capacidad antibacteriana e inhibición del crecimiento de células cancerígenas. Hoy en día, este arbusto no tiene un uso industrial; solo se emplea para fines ornamentales.

Los extractos obtenidos a partir de las flores de *H. rosa sinensis* están compuestos por polifenoles (Rao *et al.*, 2014), entre ellos se encuentran las antocianinas, colorantes solubles en agua, responsables de la coloración de diferentes partes de las plantas incluyendo pétalos, frutas y semillas (Chaves *et al.*, 2018). Las antocianinas en las flores ayudan a atraer polinizadores (Alcalde *et al.*, 2013) y sus propiedades antioxidantes

contribuyen a proteger las frutas de las enfermedades producidas en las plantas (Taiz & Zeiger, 2006).

Las antocianinas son compuestos con actividades biológicas beneficiosas para la salud humana. Poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, entre otras (Rojo *et al.*, 2012; Afify *et al.*, 2016); además, pueden ser utilizadas industrialmente como colorantes naturales. Existen estudios que concluyeron que es posible usar extractos de antocianinas como colorantes naturales en bebidas y alimentos (Luna *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2017).

Los procesos industriales se escalan a partir de los procesos desarrollados a nivel de laboratorio. El análisis de los diferentes modelos cinéticos de extracción de antocianinas es esencial para la aplicación industrial. El objetivo del presente estudio fue encontrar las mejores condiciones (relación etanol:agua, concentración de HCl, temperatura de extracción, relación material vegetal:solvente y tiempo de extracción) para obtener de las flores *Hibiscus rosa sinensis* el extracto con las mayores capacidad antioxidante y rendimiento de extracción. Este trabajo aportó información sobre los parámetros cinéticos de la extracción de antocianinas totales a partir de material vegetal y su caracterización química.

1. MARCO TEÓRICO

Entre las sustancias bioactivas presentes en plantas se encuentra un grupo llamado polifenoles, los cuales presentan efectos positivos en la salud humana (Santhakumar *et al.*, 2013). Los polifenoles se pueden utilizar como principios activos en productos cosméticos, alimenticios y farmacéuticos, gracias a sus actividades biológicas.

Existe tanto antioxidantes sintéticos como naturales. Los primeros son aditivos alimenticios que se utilizan como antioxidantes en grasas o aceites y productos que los contienen. Entre los más comunes se encuentran el BHT y el BHA, los cuales han sido cuestionados por su posible relación con efectos adversos en la salud (Iglesias, 2009).

Los antioxidantes naturales son sustancias derivadas del metabolismo secundario de las plantas. Estos presentan ventajas sobre sus homólogos sintéticos, ya que algunos, además de poseer propiedades antioxidantes, también pueden brindar coloración, ampliando su aplicabilidad en la industria (Muhamad *et al.*, 2018). Entre los antioxidantes naturales más comunes se encuentran flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos (Iglesias, 2009).

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son los compuestos presentes en las plantas encargados de su adaptación, defensa y comunicación con las demás especies. Cumplen importantes funciones, a saber: protección contra herbívoros, y ante la infección por patógenos microbianos, atrayentes de polinizadores y para comunicación con otras plantas. Estos metabolitos se pueden dividir en tres grupos principales: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno (Taiz & Zeiger, 2006).

1.1.1 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, se caracterizan por llevar en su estructura más de un anillo de benceno con grupos hidroxilo generalmente funcionalizado (Crozier *et al.*, 2009). Existen cerca de 8000 compuestos descritos, con diversas estructuras. En general, los polifenoles se pueden dividir en al

menos diez tipos dependiendo de su estructura básica: fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas e isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides y ligninas (Wollgast & Anklam, 2000).

1.1.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles con más de 5000 estructuras químicas descritos, que se pueden clasificar en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononas, flavanonas y antocianinas; estas últimas son las responsables de la coloración de algunos frutos y flores; como la piel de la uva, la manzana, la mora, entre otras. La coloración de estas depende principalmente del pH (Nguyen *et al.*, 2018).

Diversos estudios han atribuido a los flavonoides propiedades antioxidantes, fotoprotectoras (Stevanato *et al.*, 2014), algunos son e inhibidoras de la proliferación de células cancerígenas (Goldberg *et al.*, 2017).

La estructura común de los flavonoides es la benzo- γ -pirona (C₆-C₃-C₆) y consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos, que normalmente forman un heterociclo oxigenado (**Figura 1**) (Wollgast & Anklam, 2000).

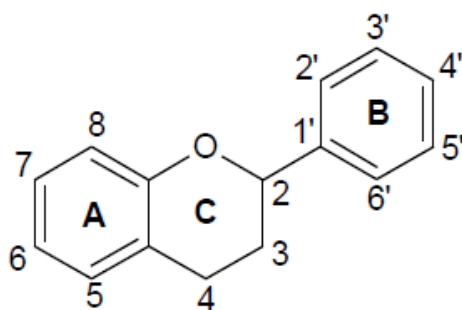


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides

Fuente: (Wollgast & Anklam, 2000).

1.2 *HIBISCUS ROSA SINENSIS*



Figura 2. Flor de *Hibiscus rosa sinensis*.

Foto tomada por el autor.

El género *Hibiscus*, originario del Sureste Asiático, pertenece a la familia Malvaceae, está abundantemente distribuido en zonas tropicales y subtropicales. Está conformado por plantas que pueden ser herbáceas, arbustos y árboles, con floración anual o perenne. Este género comprende alrededor de 250 especies como la *H. sabdariffa*, *H. coccineus*, *H. syriacus*, *H. rosa-sinensis*, entre otras (Lopez & Perez, 2006).

H. rosa-sinensis (rosa de China, cayeno, hibisco) es un arbusto de hoja perenne que puede alcanzar hasta cinco metros de altura, sus flores rojas, amarillas, anaranjadas, blancas, rosas y combinación entre ellas han sido usadas con fines ornamentales, medicinales y culinarios (Pillai & Mini, 2016).

1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

Existen amplios estudios sobre la extracción de polifenoles a partir de diversas matrices vegetales. La extracción con solvente es una de las técnicas comúnmente utilizadas, la cual implica calentamiento, ebullición o reflujo. Sin embargo, puede ocasionar la transformación de compuestos como resultado de tiempos largos de extracción, oxidación e hidrólisis (Hui *et al.*, 2005). En las últimas décadas, se han desarrollado diferentes técnicas para acelerar el proceso de extracción con solvente, entre ellas se

encuentran la extracción asistida por microondas o por ultrasonido (Toubane, *et al.*, 2017) y extracción con fluido supercrítico (Da Porto & Natolino, 2017).

La técnica de extracción con solvente asistida por ultrasonido presenta un aumento en la obtención de polifenoles en comparación con la extracción convencional (Pingret *et al.*, 2012), además del bajo costo de inversión en comparación con la técnica de extracción con fluido supercrítico (Tiwari, 2015; Pradal *et al.*, 2016).

1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico y tiene como finalidad generar conocimiento sobre un proceso, a través de pruebas planeadas adecuadamente, que permitan dilucidar situaciones complejas de relación “causa-efecto” (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Uno de los diseños más usados industrialmente es el factorial 2^k debido a su eficacia y versatilidad, este permite estudiar el efecto de k factores sobre una o más variables de respuesta, donde la base del factorial significa dos niveles para cada uno de los factores a investigar.

Cuando el número de factores en un diseño aumenta, de igual forma incrementan los tratamientos a estudiar, lo que implica mayor tiempo y recursos. Los diseños factoriales fraccionados son una parte o una fracción de los factoriales completos. La teoría de diseños fraccionados se basa en una jerarquización de los efectos, donde los principales son más importantes en comparación con interacciones dobles, triples, cuádruples, etcétera. Si el experimentador supone que ciertas interacciones de orden superior son insignificantes, es posible conseguir información valiosa de las interacciones principales y dobles; esto implica estudiar solo una fracción del diseño experimental completo (Mongomery, 2004).

1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad de atrapamiento de radicales de oxígeno (ORAC) es uno de los ensayos

que conduce a la determinación de la actividad antioxidante; este método evalúa la disminución en la intensidad de la fluorescencia de la fluoresceína en función del tiempo, la cual es producto de la oxidación inducida por radicales peroxilo; que se generan por la descomposición térmica del hidrocloreto de 2,2'-azobis (2-aminopropano) (AAPH) (Ou *et al.*, 2001).

La capacidad antioxidante del compuesto evaluado se determina comparando el área bajo la curva (ABC) y el ABC del blanco; los resultados se expresan en unidades de μmol de Trolox®/g de extracto, y se obtiene de la comparación entre el ABC de la muestra analizada y el ABC de una curva de calibración de Trolox®.

1.6 ANTOCIANINAS TOTALES

Giusti y Wrolstad (2001) propusieron un método para el cálculo de la cantidad de antocianinas presentes en una muestra, el cual denominaron método de pH diferencial. El pH es uno de los factores de mayor importancia en la estabilidad del color de las antocianinas, las cuales tienen dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y en la región visible (490-550 nm). Al variar el pH de la muestra, los espectros UV-Vis permiten dilucidar las antocianinas presentes y determinar su concentración por medio de la absorbancia. La absorbancia total (A_T) se calcula por medio de la **Ecuación 1**.

$$(A_T) = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH4,5} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

$A_{\lambda_{vis-max}}$: Absorbancia en la longitud de onda máxima (510 nm) a pH 1 como a pH 4,5.

$A_{\lambda_{700}}$: Absorbancia en la longitud de onda a 700 nm tanto a pH 1 como a pH 4,5.

La **Ecuación 2** determina la concentración total de antocianinas monoméricas en términos de mg cianidina-3-glucósido /L de extracto (mg Cy3g/L).

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{A_T * Pm * FD * 1000}{\epsilon * l} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde: A_T : Absorbancia total; P_m : Peso molecular de la cianidina 3-glucósido; ε : Absortividad molar de la cianidina 3-glucósido; FD : Factor de dilución; I : Espesor de la celda.

1.7 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Cuando se escala un proceso a nivel industrial, es de gran importancia conocer modelos matemáticos que describan su comportamiento. Por esta razón, es relevante entender la cinética de extracción de los polifenoles. La literatura ofrece diferentes modelos que describen este fenómeno (Ching *et al.*, 2012; Voltaire *et al.*, 2012), que incluyen el término de difusividad y la similitud que existe con curvas de sorción y absorción (Peleg, 1988).

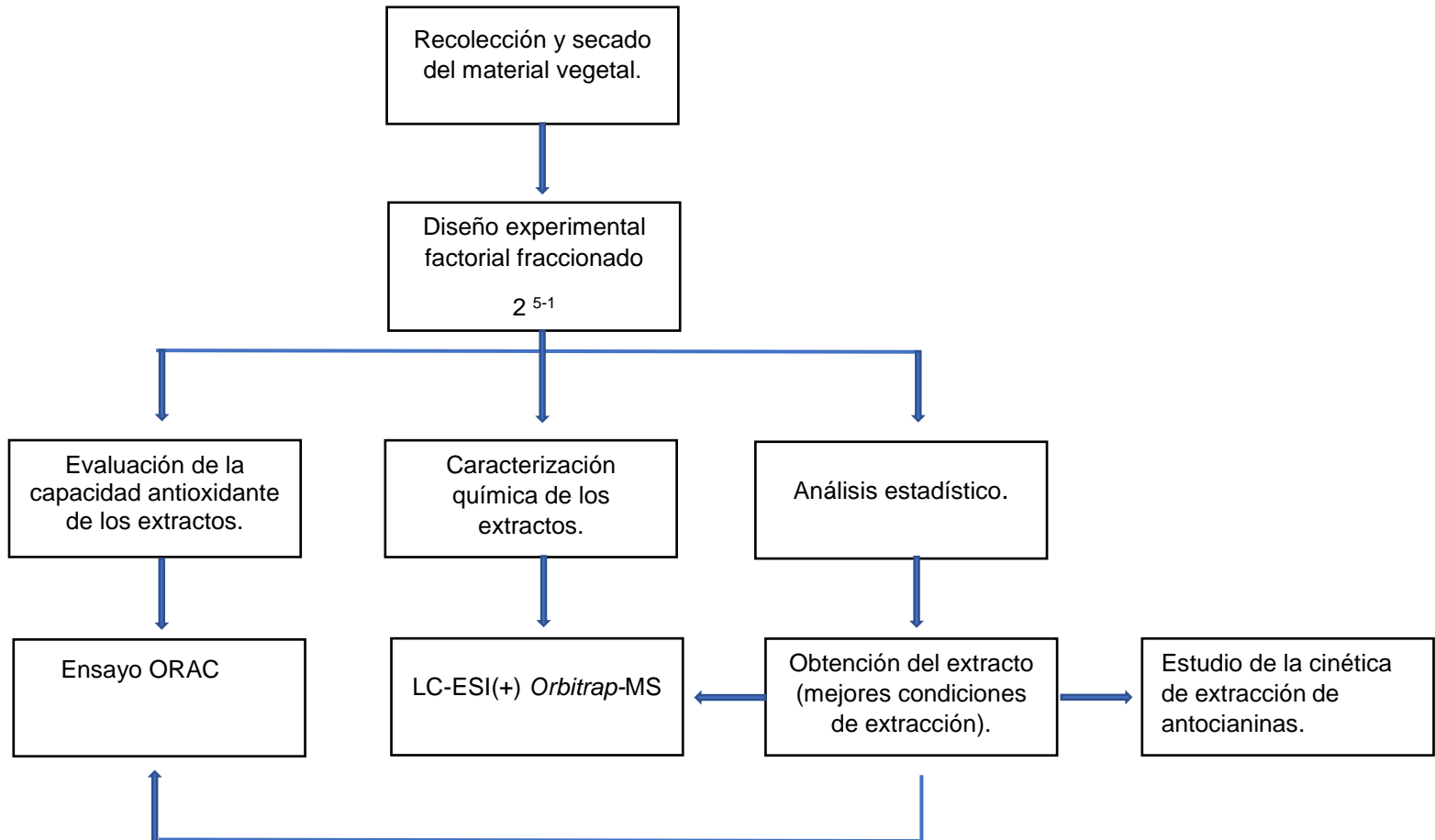
En la **Tabla 1**, se presentan varias ecuaciones matemáticas que se han utilizado en trabajos previos para explicar la extracción de polifenoles. En este trabajo, se emplearon las ecuaciones matemáticas con el propósito de definir el modelo que mejor representa la extracción de antocianinas a partir de flores de *H. rosa sinensis*, debido a que estos compuestos están relacionados con la coloración de las flores (Alcalde *et al.*, 2013).

Tabla 1. Modelos cinéticos empleados para explicar la extracción de polifenoles.

Modelo	Parámetros	Ecuación
$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 * t}$	K_1 : Relaciona la velocidad de extracción. K_2 : Relaciona la cantidad máxima de polifenoles.	Peleg, 1988
$C(t) = a * \text{Log}(t) + b$	a, b : Constantes del modelo.	Jokic <i>et al.</i> , 2010
$C(t) = \frac{t}{\left(\frac{1}{K * C_e^2}\right) + (t/C_e)}$	K : Relaciona la velocidad de extracción. C_e : Concentración máxima de polifenoles.	Lazar <i>et al.</i> , 2016
$C(t) = e^{-K*t^n}$	K, n : Constantes del modelo.	Tusek, <i>et al.</i> , 2016

2. METODOLOGÍA

2.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO. La siguiente es la metodología (esquema general) usada en el trabajo.



2.1.1 Materiales y equipos.

2.1.1.1 Reactivos, solventes

Los siguientes reactivos y solventes se usaron en el presente trabajo: Ácido clorhídrico (37 %) (Merck, Darmstadt, Alemania), etanol industrial (95 %) (Suquin, Bucaramanga, Colombia), agua Tipo I, producida por un equipo purificador *Millipore* (Molsheim, Francia).

Cloruro de pelargonidina (95 %), cloruro de cianidina (95 %), cloruro de delfinidina (95 %), naringenina (95 %), rutina (95 %), quercetina (≥ 95 %), quercitrina (78 %), quercetina-3-glucósido (98 %), catequina (98 %), ácido-*p*-hidroxibenzoico (97 %), epicatequina (97 %), galato de epicatequina (98 %), ácido ferúlico (99 %), ácido elágico (95 %), fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE.UU.). La cianidina-3-glucósido, la cianidina-3-rutinósido, la delfinidina-3-glucósido y la pelargonidina-3-glucósido se compraron a *PhytoLab GmbH & Co. KG* (Vestenbergsgreuth, Alemania), metanol y etanol absoluto (99,9 %), metanol grado HPLC (99,8 %) y ácido fórmico Suprapur (98 -100 %) se compraron a (*Merck*, Darmstadt, Alemania); el acetonitrilo y metanol grado LC-MS (≥ 99.9 %), a *Honeywell Burdick & Jackson* (Morristown, New Jersey, EE.UU.). Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97 %), fluoresceína [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)], AAPH (hidrocloruro de 2,2'-azobis (2-aminopropano))] fueron adquiridos a *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE.UU.).

2.1.1.2 Equipos de laboratorio

Los siguientes fueron los equipos y accesorios empleados en esta investigación: Balanza analítica (*Mettler-Toledo* PB1502-s, Nanicon, Suiza), baño ultrasónico (*Elmasonic* S15H, Singen, Alemania), liofilizador de bandejas (*VirTis Advantages Plus*, New York, EE.UU.), lector de micro placas (*Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, Sunnyvale, CA, EE.UU.) con microplacas de poliestireno de 96 pozos; *transferpipette* Multicanal, 10-200 μ L, *Brand* (Wertheim, Alemania); espectrofotómetro (*Flame Ocean Optics*, Dunedin, EE.UU.),

tamaño 40 x42x 24 mm, con longitudes de onda de: $\lambda=190-650$ nm (UV) y $\lambda=350-800$ nm (Vis).

2.2 ETAPA I

2.2.1 Recolección del material vegetal.

Las flores de cultivares rojos de *H. rosa sinensis* se recolectaron en la zona de cultivos experimentales del Centro de Investigación CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander. Posteriormente, las flores se secaron en un liofilizador de bandejas *VirTis Advantage Plus* (New York, EE.UU.) y se almacenaron a temperatura ambiente, en oscuridad.

2.2.2 Elección de las variables

La extracción de compuestos bioactivos de una matriz vegetal está influenciada por diferentes factores, entre ellos, figuran la naturaleza química, el solvente a utilizar, el tiempo de extracción, la relación soluto:solvente, la temperatura y la agitación, entre otros (Mokrani & Madani, 2016). El metanol, la acetona, el etanol y el agua son solventes comúnmente utilizados. Alothman y colaboradores (2009) evaluaron el efecto del solvente (metanol, acetona y etanol) y su porcentaje (50, 70 y 90 %) en agua destilada, con el fin de obtener un extracto de frutas tropicales con alta capacidad antioxidante y contenido fenólico.

Las antocianinas son compuestos fenólicos que presentan mayor estabilidad en medios ácidos (pH=2) (Ferarsa *et al.*, 2018). Caprioli y colaboradores (2018) encontraron que la extracción con solvente acidificado favoreció la obtención de antocianinas.

En la literatura (Yilmaz *et al.*, 2006; Spigno *et al.*, 2007), el tiempo de extracción de polifenoles en diferentes matrices varía de 15 min a 5 h y la temperatura, de 25 a 70 °C.

Por esta razón, en este trabajo, se decidió evaluar el efecto de la relación etanol: agua; la concentración de HCl en el solvente, la temperatura, la relación material

vegetal:solvente y el tiempo para la extracción de polifenoles. Se seleccionó el etanol por su afinidad con los compuestos de interés y, además, su inocuidad sobre la salud humana (Panja, 2017; Ferarsa *et al.*, 2018). Para el caso de la temperatura, se tomó como límite superior 50 °C con la intención de evitar la posible degradación de compuestos termolábiles (Caprioli *et al.*, 2018). De esta forma, se evaluaron cinco factores y, los niveles seleccionados para cada uno de ellos, se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Factores independientes y sus niveles para la extracción de polifenoles en flores de *H. rosa sinensis*.

	Factores independientes	Unidades	Niveles		
			-1	0	1
A	Etanol: agua, %	v/v	95:05	70:30	45:55
B	Concentración de HCl, %	v/v	0	0,5	1
C	Temperatura	°C	30	40	50
D	Relación material:solvente	g/mL	1/20	1/30	1/40
E	Tiempo de extracción	min	5	10	15

2.2.3 Diseño experimental.

El material vegetal se liofilizó para evitar procesos de degradación enzimáticos (Alberti *et al.*, 2014) y se redujo el tamaño de partícula a 1 mm.

Para cada uno de los tratamientos del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} , el material vegetal deshidratado (1 g) se mezcló con la solución hidroalcohólica correspondiente; la mezcla se introdujo en un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) durante los tiempos de extracción definidos. El residuo se separó por filtración (papel filtro *Whatman* N°1), luego a este, se le realizó una nueva extracción renovando el solvente, posteriormente los extractos fueron rotoevaporados y liofilizados hasta obtener un extracto seco. Finalmente, todos los extractos se almacenaron a 7 °C, en ausencia de luz. Se realizaron cuatro réplicas

en el punto central. Los resultados se expresaron como el valor medido \pm la desviación estándar.

2.2.4 Validación del modelo de extracción

El tratamiento estadístico de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*, por sus siglas en inglés), a través de la herramienta estadística *Statgraphics Centurion XVI.1* (versión de prueba). A partir de los resultados obtenidos, se plantearon modelos asociados a la capacidad antioxidante (CA), el rendimiento de extracción (RE) y la respuesta combinada (R.comb). Posteriormente, el experimento se realizó por triplicado, usando las mejores condiciones de extracción y se estableció la relación entre los resultados predichos con los obtenidos experimentalmente por medio de la **Ecuación 3**. Los resultados para la capacidad antioxidante y el rendimiento de extracción se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

$$\% \text{ Error relativo} = 100 * \frac{RMSE}{\text{Valor experimental promedio}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde: RMSE es la raíz del error cuadrático medio.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{Valor experimental} - \text{Valor calculado})^2}$$

2.3 ETAPA II

2.3.1 Análisis cromatográfico por UHPLC-ESI- Orbitrap-MS

La identificación y cuantificación de polifenoles presentes en el extracto de las flores de *H. rosa sinensis* se realizó por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplada a un analizador y detector de masas *Orbitrap (Exactive Plus, Thermo-Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.)*, usando ionización por electro-

nebulización operada en modo positivo, equipado con una bomba binaria (HPG3400RS), un inyector automático (WPS300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC3000). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna *Hypersil GOLD Aq* (*Thermo-Fisher Scientific*, Sunnyvale, CA, EE.UU.), de 100 mm, L, x 2.1 mm, D.I., x 1.9 μm de tamaño de partícula. La identificación de los compuestos se realizó con base en la composición elemental de las moléculas protonadas y de sus iones-fragmento, además, por comparación de los tiempos de retención t_R , y la masa exacta de los iones en el espectro de masas del patrón con los observados en los extractos. La cuantificación se llevó a cabo por medio de dos métodos, uno, con estándar interno para aquellos compuestos de los cuales no se tuvo patrón de referencia y otro, con una curva de calibración para los compuestos de los cuales se disponía de patrón de referencia. Los datos obtenidos se procesaron con el *software Thermo XcaliburTM Roadmap* (Versión 3.1.66.10).

2.4 ETAPA III

2.4.1 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)

La capacidad antioxidante en cada experimento se determinó por medio del ensayo de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), según la metodología descrita por Ou y colaboradores (2001), con algunas modificaciones. Ésta se calculó a partir de la diferencia entre el área bajo la curva ABC de cada muestra y la del blanco (Solución *buffer* fosfato; pH 7.4). Se adicionó fluoresceína (FL) (150 μL , 8,16 x 10⁻⁵ mM) a las diluciones de las muestras (25 μL) en *buffer* fosfato; posteriormente las muestras, se incubaron a 37 °C durante 18 min y, finalmente, se les adicionó AAPH (25 μL , 153 mM). Se registró la disminución de la fluorescencia de la FL a las longitudes de onda de $\lambda=490$ nm, para excitación, y a $\lambda=510$ nm, para emisión, durante 80 min.

Se empleó Trolox[®] como estándar de control y se realizó una curva de calibración. El área neta obtenida se utilizó para calcular los μmol Trolox[®]/g de extracto. Las determinaciones se hicieron por triplicado en un lector de micro-placas *Turner*

Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader (Sunnavale, EE.UU.), usando micro-placas de poliestireno de 96 pozos, y un módulo de fluorescencia. Los resultados se reportaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

2.5 ETAPA IV

2.5.1 Cinética de extracción

Se determinó la cantidad de antocianinas monoméricas en el extracto obtenido bajo las mejores condiciones de extracción, por medio de la metodología de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001).

Se utilizaron dos soluciones, una, del ácido clorhídrico /cloruro de potasio, (pH 1, 0,025 M) y, otra, un *buffer* de ácido acético/ acetato de sodio (pH 4,5, 0,4 M). Se realizó una extracción durante una hora; cada cinco minutos se tomaron dos alícuotas de 125 μ L. Cada muestra se diluyó y se aforó a 5 mL en las respectivas soluciones. Posteriormente, se midió la absorbancia a $\lambda = 510$ nm y a $\lambda = 700$ nm, en un espectrofotómetro (*Flame Ocean Optics*, Dunedin, EE.UU.), Finalmente, la concentración de antocianinas se determinó por medio de la **Ecuación 2** y los resultados finales se expresaron como mg de cianidina 3-glucósido/g de extracto (mg Cy3g /g extracto).

2.5.2 Ajuste de parámetros cinéticos a partir de datos experimentales

Para la estimación de los parámetros cinéticos de los modelos presentados en la literatura (**Tabla 1**), se utilizó el método de cuadrados mínimos no lineales, usando el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI.1* (Versión de prueba).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} de resolución V con cuatro réplicas en el punto central, donde los efectos individuales e interacciones binarias están confundidos con las interacciones triples o de mayor orden, es decir, los efectos principales e interacciones dobles son estimados limpiamente (Gutiérrez, 2008) **(ANEXO A)**.

Con el objetivo de encontrar los modelos matemáticos, que representan los efectos de los factores evaluados sobre la capacidad antioxidante (CA), el rendimiento de extracción (RE) y la respuesta combinada (R. comb) **(ANEXO B)**, se realizaron análisis de varianzas, usando los resultados obtenidos en los 20 experimentos **(ANEXO A)**.

La R. comb, representa la suma de los datos normalizados por medio de la **Ecuación 4** y multiplicados por un factor de 0,5 de la CA y el RE, con la finalidad de obtener valores en el rango de 0 a 1 **(ANEXO A)**.

Con el análisis de varianza para la R. comb, se determinaron los efectos y las condiciones de extracción que maximizaron la relación CA+RE.

$$\text{Normalización de datos. } X' = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

X' : Valor normalizado.

X : Valor a normalizar.

X_{min} : Valor más pequeño del conjunto.

X_{max} : Valor más grande del conjunto.

El ANOVA para la CA refleja la falta de ajuste que existe **(ANEXO B)**. Por esta razón, se incluyeron resultados obtenidos en cinco nuevos tratamientos **(ANEXO A)** que se encontraban por fuera del diseño experimental que se planteó inicialmente.

Con esta información adicional se analizaron los efectos por medio de las **Figuras 3-5** y el análisis de los resultados presentados en las gráficas de Pareto (**ANEXO D**). Una vez identificados los factores e interacciones binarias, que aportaran la mayor variabilidad en la CA, el RE y la R. comb, se realizó el ajuste de los datos experimentales (25 datos en total) por medio del *software Statgraphics Centurion XVI.1* (Versión de prueba) para, finalmente, obtener los tres modelos asociados (**ANEXO B**).

Con estos tres modelos fue posible representar los efectos binarios de los factores evaluados con la mayor variabilidad sobre la CA, el RE y la R. comb por medio de las gráficas de superficie de contorno (**ANEXO C**).

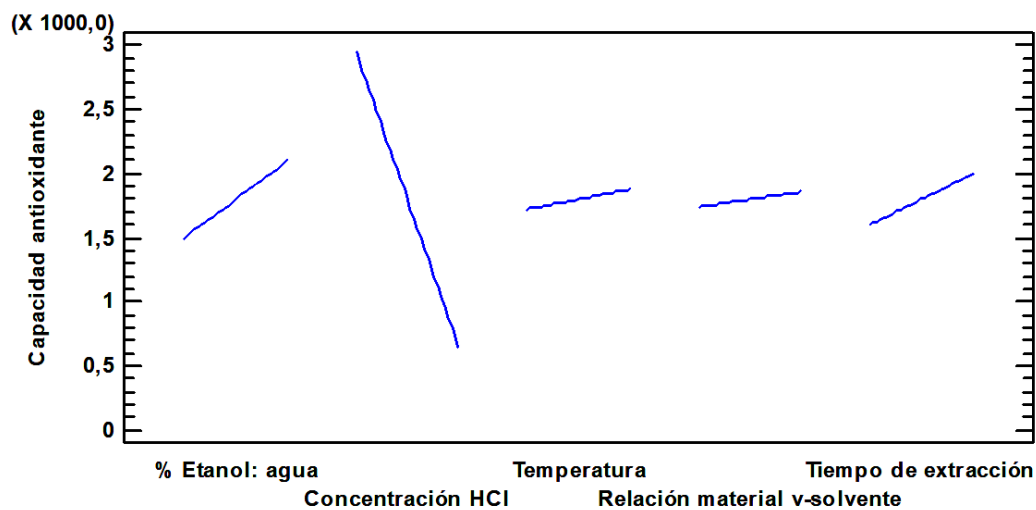


Figura 3. Efectos individuales para la capacidad antioxidante.

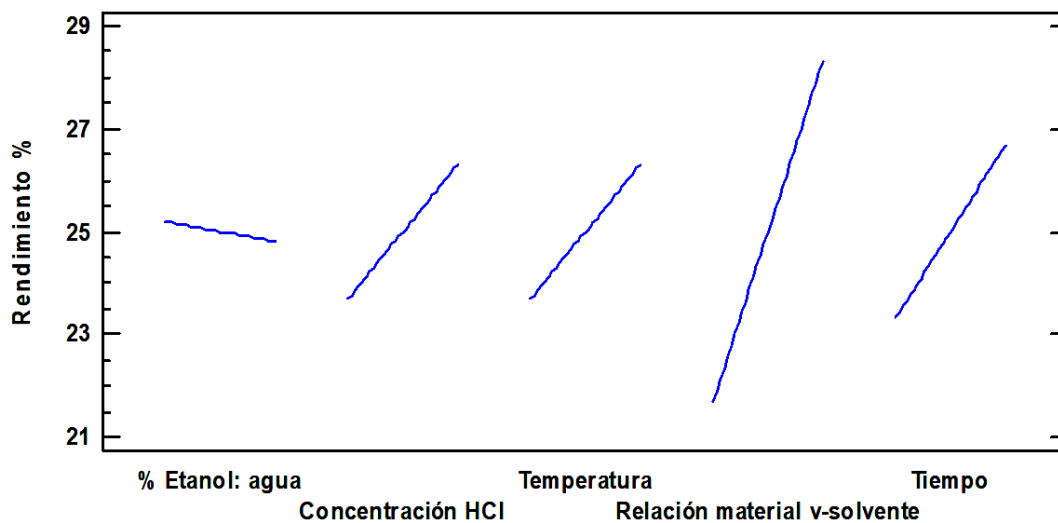


Figura 4. Efectos individuales para el rendimiento de extracción.

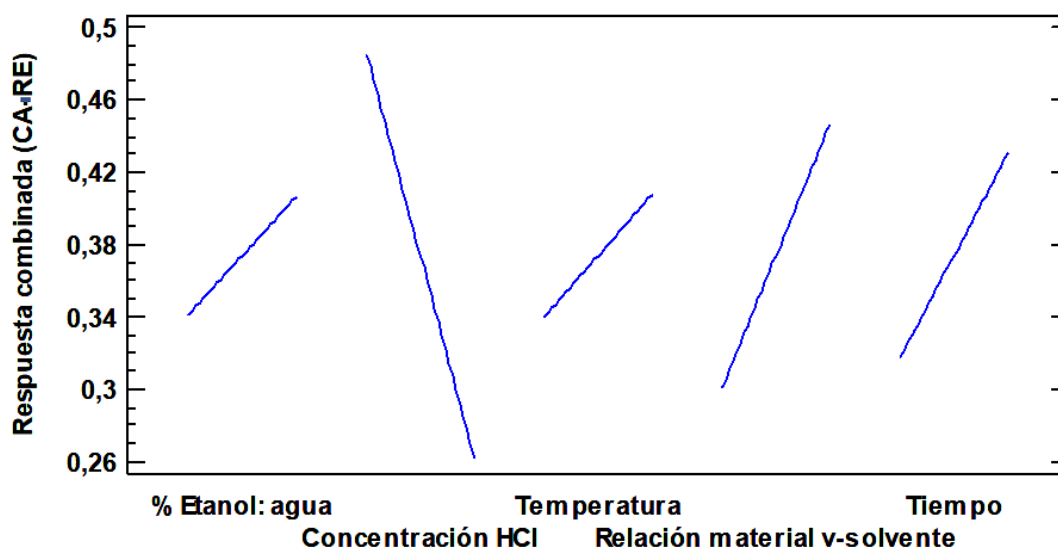


Figura 5. Efectos individuales para la respuesta combinada.

3.1.1 Efecto de la relación etanol:agua

La relación etanol:agua presentó un efecto positivo (pendiente positiva) sobre la capacidad antioxidante (Figura 3). En su nivel alto (45:55 %, v/v), se maximizó la CA, debido a que la solubilidad de los polifenoles es afectada por la polaridad del solvente. Algunos compuestos fenólicos se presentan naturalmente como

glucósidos y esto hace que sean más solubles en agua (Yang *et al.*, 2018). Spigno y colaboradores en 2007, Ghitescu y colaboradores en 2015, Ferarsa y colaboradores en 2018 realizaron estudios con diferentes matrices vegetales y concluyeron que fue más efectiva la extracción de polifenoles con la mezcla de un solvente orgánico y agua (50:50 %, v/v) y (70:30 %, v/v), que con un solvente puro. En este estudio se encontró que la mezcla adecuada para la extracción de polifenoles fue 45:55 (% v/v), cuando la polaridad de ambos solventes facilitó el proceso de extracción.

En la **Figura 5**, se refleja el aumento de la magnitud de la R. comb, (pendiente positiva), producto del efecto del factor en su nivel alto 45:55 (% v/v), lo cual indica que en esta condición se obtiene un extracto con relación CA+RE más alta.

3.1.2 Efecto de la concentración de HCl

En la **Figura 3**, se observa que el efecto de la concentración de HCl presentó pendiente negativa, lo cual no favoreció al aumento de la CA. Dentro de los cinco factores evaluados, éste es el que presentó el mayor efecto individual. La mayor magnitud de CA se obtuvo en el nivel bajo de la concentración de HCl (0 %). La interacción entre este factor en su nivel bajo (0 %) y la relación etanol:agua en su nivel alto 45:55 (% v/v) proporcionó la mayor variabilidad de la CA (**ANEXO C**).

En la **Figura 4**, se refleja el efecto positivo (pendiente) sobre la magnitud del RE. Este comportamiento se debe al aumento en la extracción de compuestos solubles en medios ácidos como las antocianinas. Estudios realizados demostraron que el uso de un solvente acidificado favorecía su extracción de estas (Dranca *et al.*, 2016; Ferarsa *et al.*, 2018). Aunque los extractos acidificados mostraron aumento en el RE y en la presencia de antocianinas, estos no superaron los valores de la CA obtenida con los extractos cuando no se utilizó HCl (0 %). Esto se puede explicar, analizando la composición química de estos extractos; ya que en los extractos no acidificados, además de las antocianinas, se identificaron y cuantificaron otros flavonoides como la catequina y la epicatequina (**Tabla 4**), compuestos con una alta

capacidad antioxidante en comparación con otros antioxidantes naturales (Grzesik, *et al.*, 2018).

En la **Figura 5**, se observa que la magnitud de la R. comb, aumentó en el nivel bajo de la concentración de HCl (0 %), esto indica, que en ese punto, se obtuvo un extracto con la CA+RE más alta (**ANEXO C**).

3.1.3 Efecto de la temperatura.

En la **Figura 3**, se observa que el efecto individual de la temperatura sobre la CA no presentó mayor variabilidad. Sin embargo, al analizar los efectos binarios entre el tiempo de extracción y la temperatura en sus niveles altos (15 min y 50 °C) se observó; que esta interacción tuvo un efecto positivo en la magnitud de la CA (**ANEXO C**). Esto se debe a que el calor genera una mayor permeabilidad en la pared celular, mejorando así la solubilidad y el coeficiente de difusión del solvente, lo cual facilita la extracción de los polifenoles con el tiempo (Alberti *et al.*, 2014), además, favorece la cantidad de extracto obtenido (Ferarsa *et al.*, 2018). Esto es coherente con lo que se evidencia en la **Figura 4**, donde la pendiente del efecto es positiva frente al RE.

El análisis de los efectos individuales de la R.comb, (**Figura 5**) y los efectos binarios (**ANEXO C**) conduce a la elección del nivel alto (50 °C) para obtener un extracto con la mayor relación CA+RE.

3.1.4 Efecto de la relación material vegetal:solvente

En la **Figura 3** se observa que este factor, es responsable de la mayor variabilidad sobre el RE, y esto se debe a que al aumentar la cantidad de solvente se obtiene mayor cantidad de extracto. Este comportamiento obedece a la ley de Fick de la difusión (Bird *et al.*, 2006), cuando el movimiento del extracto se da desde la zona más concentrada a la de menor concentración (la fuerza impulsora es el gradiente de concentración).

En la **Figura 5**, se observa que el nivel alto 1:40 (g/mL) maximiza la CA+RE.

3.1.5 Efecto del tiempo.

En las **Figuras 3 y 4**, se observa que el efecto del tiempo sobre la CA y el RE es favorable en la maximización de las respuestas en su nivel alto (15 min). Esto es congruente con estudios realizados para la obtención de compuestos polifenólicos (Spigno *et al.*, 2007; Mokrani *et al.*, 2016). La tendencia del efecto sobre la CA y el RE tiene un aumento lineal respecto al aumento en sus niveles (5, 10, 15 min) y esto mismo se observa en el **Figura 5**, cuando el tiempo de extracción en su nivel alto favorece la magnitud de la R.comb. Esta linealidad del efecto sobre la CA y el RE se debe a que no se ha alcanzado el tiempo de equilibrio necesario entre el soluto y el solvente (Ley de difusión de Fick). Otros trabajos (Dranca *et al.*, 2016; Ferarsa *et al.*, 2018), determinaron que el tiempo de extracción óptimo para la extracción de compuestos polifenólicos fue alcanzado a los 30 y 44,8 min.

Con base en los resultados obtenidos en la interpretación de las **Figuras 3-5**, se determinó que el nivel alto (15 min) del tiempo de extracción representa una de las mejores condiciones de extracción.

3.2 VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

Se realizó la extracción hidroalcohólica bajo las mejores condiciones (**Tabla 3**). Para obtener un extracto con la mayor respuesta combinada CA+RE más alta.

Tabla 3. Mejores condiciones de extracción de polifenoles.

	Factores independientes	Unds	Mejor condición
A	Etanol: agua, %	v/v	45:55
B	Concentración de HCl, %	v/v	0
C	Temperatura	°C	50
D	Relación material-solvente	g/mL	1:40
E	Tiempo de extracción	min	15

En el **ANEXO E**, se observa que el % error relativo (**Ecuación 3**), entre los valores obtenidos por medio de los modelos asociados y los valores experimentales para la CA y el Re fueron de 5 y 8 %, respectivamente, lo cual refleja que los modelos describen la mayor parte del proceso de extracción.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO

En la **Tabla 4** se muestran los compuestos que se identificaron en los extractos obtenidos bajo las mejores condiciones de extracción. El cromatograma con los tiempos de retención para cada compuesto se encuentra en el **ANEXO F**.

Tabla 4. Identificación y cuantificación de polifenoles en flores de *H. rosa sinensis*.

Compuesto	Fórmula	Masa teórica	Masa experimental	Δ ppm	mg Polifenol/ g extracto±S
Cianidina-3,5-glucósido ^{a*}	C27H31O16	611,16066	611,16119	0,872	8,2 ± 0,20
Cianidina-3-glucósido ^{b**}	C21H21O11	449,10784	449,10809	0,569	1,9 ± 0,10
Cianidina-3-rutinósido ^{b**}	C27H31O15	595,16575	595,16620	0,760	0,28 ± 0,01
Quercetina-3-glucósido ^{b**}	C21H21O12	465,10275	465,10297	0,460	1,2 ± 0,05
Quercetina-diglucósido ^{a*}	C27H31O17	627,15595	627,15582	0,394	2,6 ± 0,40
Naringenina-glucorónido ^{a*}	C21H21O11	449,10784	449,10791	0,161	3,0 ± 0,10
Catequina ^{b**}	C15H15O6	291,08631	291,08624	0,247	2,9 ± 0,20
Epicatequina ^{b**}	C15H15O6	291,08631	291,08636	0,172	2,3 ± 0,30

a: Cuantificado con estándar interno de quercetina-3-rutinosido (*Istd*)

b: Cuantificado con curva de calibración.

*: Identificación tentativa, basada en la fragmentación de la molécula protonada.

** : Identificación confirmatoria, con base en patrones y la fragmentación molécula protonada.

En la **Figura 6** se observa la relación entre la cantidad de polifenoles (expresados en μmoles de polifenoles /g extracto) y la capacidad antioxidante.

Los polifenoles cuantificados en cada uno de los 25 diferentes tratamientos del diseño experimental, se aportan en el **ANEXO G**, donde se observa que los

tratamientos que condujeron al aislamiento de catequina y epicatequina en los extractos obtenidos, presentaron la mayor capacidad antioxidante.

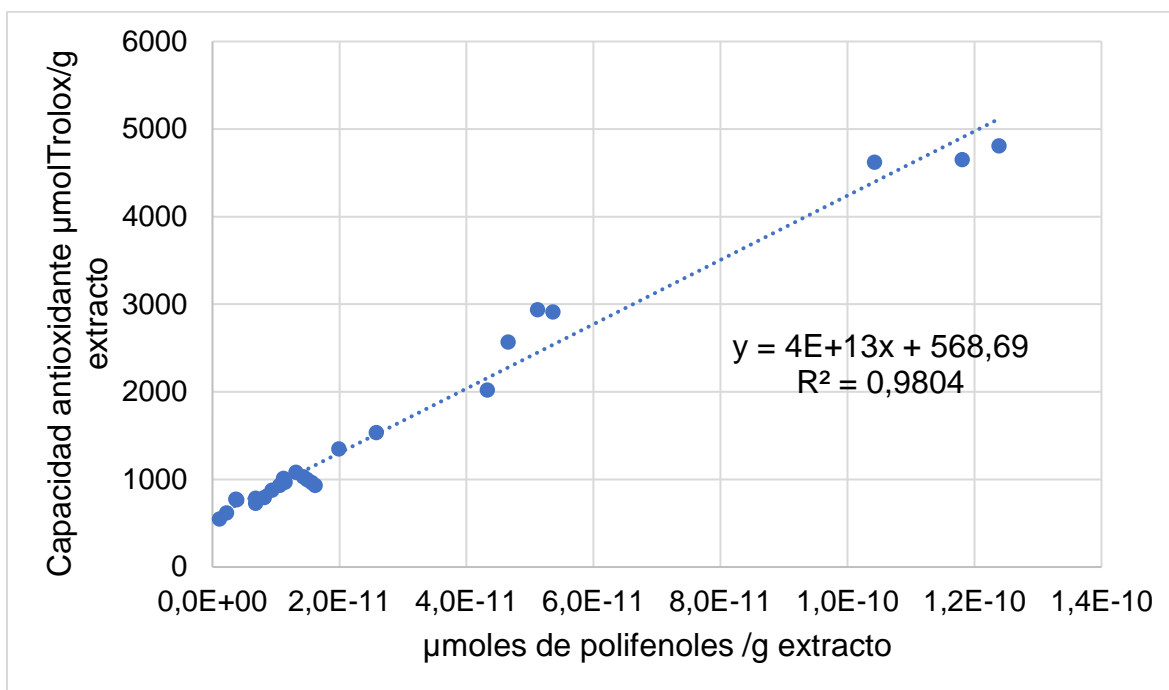


Figura 6. Relación entre la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles aislados.

Diferentes estudios fitoquímicos (Shukla & Mishra, 2001; Rao *et al.*, 2014). Se ha reportado, de manera cualitativa, la presencia de alcaloides, cumarinas, taninos, saponinas, ácidos orgánicos y flavonoides en extractos acuosos y etanólicos aislados de hojas y flores de *H. rosa sinensis*. Sin embargo, en esta investigación, se profundizó en los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos (**Tabla 4 y ANEXO G**). Y se encontraron tres antocianinas, dos flavonoles glucosilados, una flavanona y dos flavanoles, que coinciden con los reportados por Li y colaboradores en el 2014, quienes cuantificaron ciandina-3-glucósido (antocianina) y catequina (flavanol).

3.4 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Los parámetros estimados para cada uno de los modelos y el coeficiente de determinación R^2 se encuentran en la **Tabla 5**, las gráficas asociadas a cada modelo se aportan en el **ANEXO H**.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de los modelos ajustados.

Peleg	Logarítmico	Segundo orden	Tusek
$R^2 = 0,97$	$R^2 = 0,76$	$R^2 = 0,97$	$R^2 = 0,91$
$K_1 = 0,33 \frac{\text{g extracto} * \text{min}}{\text{mg Cy3g}}$	$a = 2,91$	$K = 0,030 \frac{\text{g extracto}}{\text{mg} * \text{min}}$	$K = 1,734$
$K_2 = 0,10 \frac{\text{g extracto}}{\text{mg Cy3g}}$	$b = 4,48$	$C_e = 9,96 \frac{\text{mg Cy3g}}{\text{g extracto}}$	$n = 6,55 * 10^{-2}$

Tanto el modelo empírico, propuesto por Peleg, como el modelo de segundo orden, presentaron el mejor ajuste con los datos experimentales $R^2=0,97$; esto debido a la similitud entre ambos modelos.

El inverso de los parámetros presentes en el modelo de Peleg, K_1 y K_2 , están relacionados con la constante de velocidad de Peleg, la cual representa la tasa en el inicio del proceso de extracción (Jurinjak *et al.*, 2016) $1/K_1= 3,03 \text{ mgCy3g} /(\text{g extracto} * \text{min})$ y la concentración máxima de antocianinas $1/K_2 = 10 \text{ mgCy3g/g extracto}$ (Bucic-Kojic *et al.*, 2007).

Para el caso del modelo de segundo orden, el cual ha sido utilizado en estudios previos con el fin de explicar la cinética de extracción de polifenoles en diferentes matrices (González *et al.*, 2017; Da Porto *et al.*, 2018), se encontraron: $K= 0,030 \text{ g extracto}/(\text{mg Cy3g} * \text{min})$ que representa la velocidad de extracción de segundo orden y $C_e= 9,96 \text{ mg Cy3g/g}$ de extracto, y que corresponde a la concentración de

antocianinas totales en equilibrio durante la extracción; este valor fue 1,8 veces mayor al encontrado por Da Porto y colaboradores (2018) a partir de flores de azafrán (5,27mg de Cy3g /g de extracto).

Se determinó el tiempo de extracción cuando se ha alcanzado un 80 % de la extracción de las antocianinas en el equilibrio entre el soluto y el solvente, las cuales se liberan del material vegetal al solvente durante los primeros 13,4 minutos del proceso de extracción **(ANEXO H)**.

Las antocianinas se han utilizado como colorantes en bebidas no alcohólicas (Mortensen, 2006), debido a su naturaleza polar, ellos son solubles en agua, lo que facilita su uso e implementación en diferentes productos como colorantes naturales (Castañeda *et al.*, 2006; Cheynier, 2012). El extracto de *Hibiscus rosa sinensis* obtenido bajo las mejores condiciones para la respuesta combinada (CA+RE), contiene diferentes antocianinas y otros flavonoides, a los cuales se les atribuye la capacidad antioxidante. Además de su papel como compuestos antioxidantes, la mezcla de estos polifenoles se podría emplear como colorantes naturales.

4. CONCLUSIONES

A partir del análisis estadístico se confirmó que todos los factores estudiados tienen un efecto significativo (95 % de probabilidad) sobre la respuesta combinada entre la capacidad antioxidante y el rendimiento de extracción. Las siguientes fueron las mejores condiciones de extracción: etanol: agua: 45:55 (% v/v); sin HCl; temperatura: 50 °C; relación material vegetal:solvente 1:40 (g/mL) y tiempo de extracción: 15 min.

Fue posible asociar la capacidad antioxidante, el rendimiento de extracción y su respuesta combinada, con tres modelos matemáticos que relacionan estas respuestas con los factores del proceso de extracción.

La capacidad antioxidante fue proporcional al contenido de polifenoles en el extracto. Todos los valores de la capacidad antioxidante en los tratamientos fueron superiores al valor del BHT (antioxidante sintético de referencia, $460 \pm 9 \mu\text{mol Trolox/g}$ de sustancia). Se identificaron y cuantificaron nueve diferentes polifenoles en los extractos hidroalcohólicos de flores de *H. rosa sinensis*, entre los cuales dos, cianidina-3-glucósido y catequina han sido reportados en trabajos previos.

El modelo de segundo orden fue el que mejor representó la cinética de extracción. Este trabajo contribuyó con información sobre parámetros cinéticos del proceso. El extracto hidroalcohólico de flores de *H. rosa sinensis* puede ser una alternativa para ser utilizado como fuente de colorantes naturales en aplicaciones industriales.

Es trabajo demostró que es viable técnicamente obtener extractos de *H. rosa sinensis* con altas capacidades antioxidantes en comparación con el BHT (antioxidante sintético de referencia), esta información es útil para posibles aplicaciones industriales.

BIBLIOGRÁFIA

Afify, A., and Hassan, H. Free radical scavenging activity of three different flowers- *Hibiscus rosa-sinensis*, *Quisqualis indica* and *senna surattensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016, 6, 771-77.

Alberti, A, Ferreira, A, Danianni, M, Mottin D, Nogueira, A, Igarashi, L, Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*. 2014, 149, 151-158.

Alcalde, C., Rivas, J., Muñoz, O., Escribano, M. *Schiozanthus grahamii* and *Schizanthus hookeri*. Is there any relationship between their anthocyanins compositions and their different pollination syndromes?. *Phytochemistry*. 2013, 85, 62-71.

Alothman, M., Bhat, R., Karim, A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 2009, 115, 785-788.

Bird, R., Stewart, W., Lightfoot, E. Fenómenos de transporte. Segunda edición, Limusa Wiley. México, 2006, 600.

Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S and Velic, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*. 2007,81, 236-242.

Caprioli, G., Kamgang, F., Giusti, F., Vittori, S., Sagratini, G. Optimization of an extraction method for the simultaneous quantification of sixteen polyphenols in thirty-one pulse samples by using HPLC-MS/MS dynamic-MRM triple quadrupole. *Food Chemistry*. 2018, 266, 490-497.

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

Chaves, S., Santos, A., Chlfun, A., Zhao, J., Peres, L., Benedito, V. Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants-Tools for breeding

purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*. 2018, 153, 11-27. Cheyner, V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Review*. 2012, 11, 153-177.

Ching, Y., Chai, K., Young, J. Kinetic Models for Ultrasound- Assited Extraction of Watert- Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, 6, 2659–2665.

Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., McClements, D. Stability improvement of natural food colors: Impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages. *Food Chemistry*. 2017, 218, 277-284.

Crozier, A., Jaganath, I.B and Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*. 2009, 26, 1001-1043.

Da Porto, C and Natonilo, A. Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, 130, 239-245.

Da Porto, C and Natolio, A. Extraction Kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from *safrfrom* floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chemistry*. 2018, 258, 137-143.

Dranca, F., Oroian, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena L.*) peel. *Ultrasonic Sonochemistry*. 2016, 31, 637-646.

Ferarsa, S., Zhang, W., Moulai, N., Ding, L., Jaffrin, M., Grimi, N. Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplante peles and pulps using ultrasonic-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*. 2018, 109, 19-28.

Ghitescu, R., Volf, I., Carausu, C., Buhlmann, A., Gilca, L., Popa, V. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonic Sonochemistry*. 2015, 22, 535-541.

Goldberg, K., Yin, A., Mupparapu, A., Retzbach, E., and Goldberg, G. Components in aqueous *Hibiscus rosa-sinensis* flowers extract inhibit *in vitro* melanoma cell growth. *Journal Traditional and Complementary Medicine*. 2017, 7, 45-49.

González, N., Elissetche, J., Pereira, M., Fernández, K. Extraction of polyphenols from *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*: Experimental kinetics, modeling and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*. 2017, 109, 737-745.

Giusti, M., Wrolstad, R. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001.

Gutierrez, H and De la Vara, R. Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill, segunda edición, México, 2008, 6-8.

Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska, I. Antioxidant properties of catechins: comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*. 2018, 241, 480-492.

Hui, L., Bo, C., Shouzhui, Y. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonic Sonochemistry*. 2005, 12, 295-300.

Iglesias, J. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca (Tesis Doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, España, 2009, 60-62.

Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Kojic, B., Planinic, M., Tomas, S. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Journal of Food Science*. 2010, 28, 206-212.

Jurinjak, A., Benkovic, T., Cvitanovic, A., Valinger, D., Jurina, T., Gajdos, J. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols,

antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants. *Industrial Crops and Products*. 2016, 91, 205-214.

Lazar, L., Talmaciu, A., Volf, I., and Popa V. Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 32, 191-197.

Li, A.-N., Li, S., Li, H.-B., Xu, D.-P., Xu, X.-R., & Chen, F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods*, 2014. 6, 319–330.

López, D and Pérez, A. Mejora genética y producción de *Hibiscus rosa sinensis*. *Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles*. 2006, 196, 30-33.

Luna, D., Li, Q., West, L., West, M., Gonzales, E. Anthocyanin condensed forms do not affect color or chemical stability of purple corn pericarp extracts stored under different pHs. *Food Chemistry*. 2017, 232, 639-647.

Miller, A., Dwyer, L., Auerach, C., Milety, F., Dinsdale, D. Strain-related differences in the pneumotoxic effects of chronically administered butylated hydroxytoluene on protein kinase C and calpain. *Toxicology*. 1994, 90, 141-159.

Montgomery, D. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley, segunda edición. 2004, 303-304.

Mortensen, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*. 2006, 78, 1477-1491.

Mokrani, A, Madani, K, Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica L.*) fruit, *Separation and Purification Technology*. 2016, 162, 68-76

Muhamad, I., Jusoh, Y., Nawi, N., Aziz, A., Padzil, A and Lian, H. Advanced Natural Food Colorant Encapsulation Methods: Anthocyanin Plant Pigment. *Natural and Artificial Flavoring Agent and Food Dyes*. En: Handbook of Food Bioengineering. Academic press is an imprint of Elsevier. 2018, 495-526.

Nguyen, T., Phan-Thi, H., Pham-Hoang, B., Thao Ho, P., Tran, T., and Waché, Y. Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. antocyanins as natural colours in yeast. *Food Research International*. 2018, 107, 275-280.

Ou, B., Hampsh, M., and Prio, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49, 4619-4626

Panja, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*. 2017, 17, 1-10.

Peleg, M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*. 1988, 53, 1216-1217.

Pillai, S and Mini, S. Polyphenols rich *Hibiscus rosa sinensis* Linn. Petals modulate diabetic stress signaling pathways in streptozotocin-induced experimental diabetic rats. *Journal of Functional Foods*. 2016, 20, 31-42.

Pingret, D., Tixier, F., Bourvellec, C., Renard, C., Chemat, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted wáter extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 2012, 111, 73-81.

Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., Dimitrov, K. Kinetics of ultrasound assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 32, 137-146.

Rao, K., Geetha, K., Raja, A., Banji, D. Quality control study and standardization of *Hibiscus rosa sinensis*. flowers and leaves as per WHO guidelines. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014, 3, 29-37.

Rojo, L., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M., Lila, M., Raskin, I. *In vitro* and *in vivo* anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*. 2012, 131, 387-396.

Ruban, P., and Gajalakshmi, K. *In vitro* antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012, 2, 399-403.

Santhakumar, A., Bulmer, A & Singh. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2013, 27, 1-21.

Spigno, G, Tramelli, L, Dnate M. Effects of extraction time, temperatura and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. 2007, 81, 200-208.

Stashenko, E., Martínez, J., Cala, M., Durán, D., and Caballero, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extractes from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. 2013, 36, 192-202.

Stevanato, R., Bertelle, M and Fabris, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, 69, 71-77.

Taiz, L., and Zeiger, E. *Fisiología vegetal*. Sinauer Associates, inc. Publeshers Sunderland, Massachusetts, EE.UU. 2006, 543.

Tiwari, B. Ultrasound: A clean, Green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 71, 100-109.

Toubane, A., Rezzoug, S., Besombes, C., Daoud, K. Optimization of Accelerated Solvet Extraction of *Carthamus Caeruleus L.* Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*. 2017, 97, 620-631.

Tusek, A., Benkovic, M., Belscak, A., Valinger, D., Jurina, T., Gajdos, J. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols,

antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants. *Industrial Crops and Products*. 2016, 91, 205-214.

Voltaire, A., Damasceno, L., Tessaro, I. Kinetic modeling of anthocyanin extraction from grape marc. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, 6, 3473–3480.

Wollgast, J and Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 2000, 33, 423-447.

Wang, W., Kannan, P., Xue, J and Kannan, K. Synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene (BHT), in resin- based dental sealants. *Environmental Research*. 2016, 151, 339-343.

Yang, B. liu, H, Yang J, Kumar, V, Jiang Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoids glycosides. *Trends in Food Science y Technology*. 2018, 79, 116-124.

Yehey, W., Abdul N., Ariffin, A., Been,S., Alhadi, A., Kadir, F and aYaeghoobi, M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activitiesof butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 101, 295-312

Yilmaz, Y., Toledo, R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19, 41-48.

Zeliger, H. Cosmetics: Toxicity and regulatory requirements in the US. *Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry*. 2007, 63-70.

ANEXO A. Resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} . Réplicas en el punto central y en los puntos adicionales fuera del diseño.

A	B	C	D	E	ORAC $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto	REND %	ORAC normalizado	Rend normalizado	R.Combinada
-1	1	-1	-1	-1	776	22	0,05	0,33	0,19
-1	-1	-1	1	-1	2913	19	0,55	0,24	0,40
1	-1	-1	-1	-1	4622	21	0,96	0,31	0,63
1	1	-1	1	-1	789	20	0,06	0,25	0,16
1	1	-1	-1	1	769	19	0,05	0,22	0,14
-1	1	-1	1	1	619	32	0,02	0,72	0,37
1	-1	-1	1	1	2941	29	0,56	0,61	0,58
-1	-1	-1	-1	1	2022	13	0,35	0,00	0,17
-1	1	1	1	-1	1085	30	0,13	0,64	0,38
-1	-1	1	-1	-1	729	15	0,04	0,06	0,05
1	1	1	-1	-1	1013	17	0,11	0,13	0,12
1	-1	1	1	-1	2570	28	0,47	0,59	0,53
1	-1	1	-1	1	4811	23	1,00	0,39	0,69
1	1	1	1	1	966	27	0,10	0,54	0,32
-1	1	1	-1	1	878	29	0,08	0,60	0,34
-1	-1	1	1	1	4654	27	0,96	0,54	0,75
0	0	0	0	0	971	31	0,10	0,69	0,39
0	0	0	0	0	998	31	0,11	0,70	0,40
0	0	0	0	0	935	35	0,09	0,83	0,46
0	0	0	0	0	935	32	0,09	0,73	0,41
-0,5	0,5	2,0	0,5	2,0	794	39	0,06	1,00	0,53
-0,5	-0,5	2,0	-0,5	2,0	1536	31	0,23	0,70	0,47
0,5	-0,5	-0,5	0,5	2,0	1031	35	0,11	0,83	0,47
-0,5	2,0	2,0	0,5	-0,5	550	25	0,00	0,46	0,23
0,0	-0,5	2,0	0,5	2,0	1349	32	0,19	0,73	0,46

ANEXO B. Resultados del análisis estadístico, análisis de varianza (ANOVA) y modelos asociados a la CA, el RE y la R.comb.

Capacidad antioxidante

FV	SC	GL	CM	F	Valor p
A	7058731,09	1	7058731,09	32207,65	1,88E-23
B	11311301,75	1	11311301,74	51611,32	8,78E-25
D	1102507,09	1	1102507,09	5030,53	3,23E-18
AB	6618844,62	1	6618844,62	30200,53	2,85E-23
CE	821053,72	1	821053,72	3746,31	2,18E-17
Falta de ajuste	4976943,03	1	4976943,03	22708,84	1,82E-22
Error	2849,12	13	219,16		
Total	31892230,45	19			

Fuente: Autor

R²=0,92; R² Ajustado =0,89; FV: factor de variación; SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; F y valor p: coeficientes de Fisher, A: relación etanol:agua, B: concentración HCl, C: temperatura de extracción, D: relación material vegetal:solvente, E: tiempo de extracción.

Modelo asociado al ANOVA:

ORAC=758,15+713,83A-881,49*B-221,27*D+1005,78*A²-703,503*AB+130,316*CE

ANEXO B. Continuación.

Rendimiento de extracción.

FV	SC	GL	CM	F	Valor p
B	19,59	1	19,59	42,895	9,20E-06
D	175,72	1	175,72	384,743	4,18E-12
E	47,07	1	47,07	103,071	4,09E-08
AB	194,21	1	194,21	425,228	2,02E-12
Error	6,85	15	0,45		
Total	642,63	19			

Fuente: Autor

R²=0,94; R² Ajustado =0,92; FV: factor de variación; SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; F y valor p: coeficientes de Fisher, A: relación etanol:agua, B: concentración HCl, C: temperatura de extracción, D: relación material vegetal:solvente, E: tiempo de extracción.

Modelo asociado al ANOVA:

$$\text{Rendimiento} = 32,16 + 1,37 * \mathbf{B} + 3,12 * \mathbf{D} + 1,84 * \mathbf{E} - 9,04 * \mathbf{D}^2 - 3,36 * \mathbf{AB}$$

ANEXO B. Continuación.

Respuesta combinada

FV	SC	GL	CM	F	Valor p
B	0,20	1	0,20	1082,5	2,1-15
D	0,08	1	0,08	440,5	1,5E-14
AB	0,16	1	0,16	870,6	1,0E-12
CE	0,08	1	0,08	429,5	1,8E-12
Error	0,003	15	0,0002		
Total	0,622	19			

Fuente: Autor

R²=0,90; R² Ajustado =0,86; FV: factor de variación; SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; F y valor p: coeficientes de Fisher, A: relación etanol:agua, B: concentración HCl, C: temperatura de extracción, D: relación material vegetal:solvente, E: tiempo de extracción.

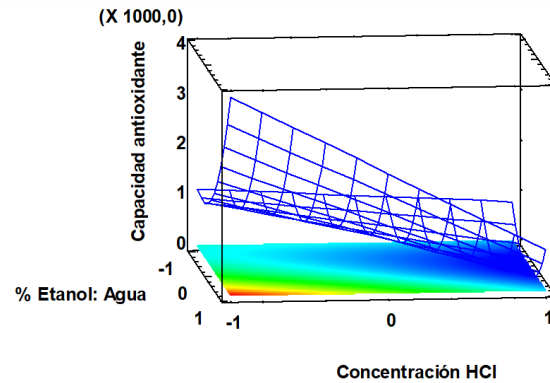
Modelo asociado al ANOVA:

Respuesta Combinada = 0,362 + 0,07*A - 0,07*B + 0,04*D + 0,03*E - 0,15*AB + 0,02*CE

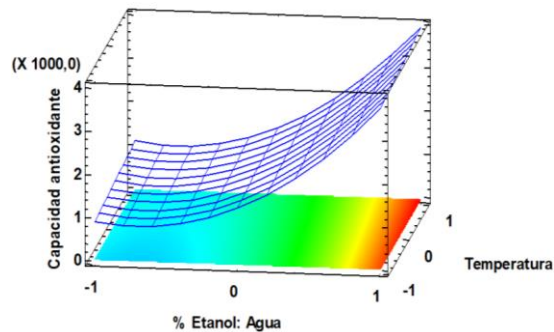
ANEXO C. Gráficos de superficie de contorno para los efectos binarios.

Superficies de contorno para la capacidad antioxidante, $\mu\text{mol trolox/g}$ extracto

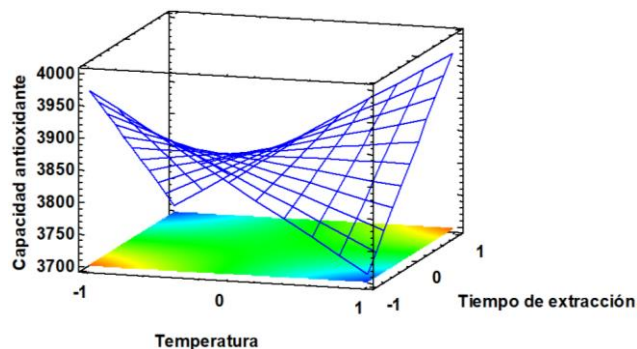
%etanol:agua vs concentración HCl a: temperatura= 50 °C; relación material vegetal-solvente= 1:40; tiempo de extracción= 15 min



%etanol: agua vs temperatura a: concentración HCl= 0 % (v/v); relación material vegetal:solvente= 1:40; tiempo de extracción= 15 min

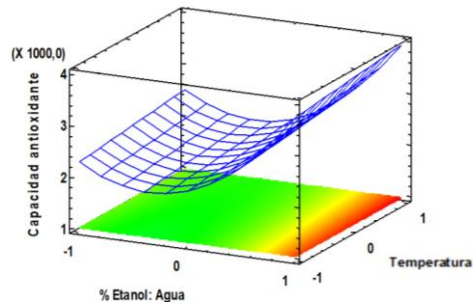


Temperatura vs tiempo de extracción a: % etanol:agua= 45:55, (v/v); concentración HCl= 0 % (v/v); relación material vegetal:solvente= 1:40.



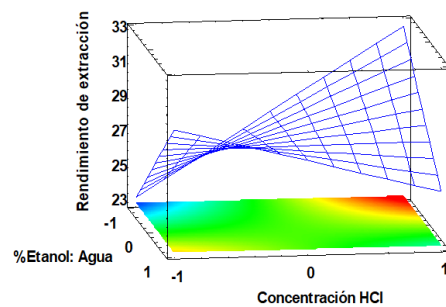
ANEXO C. Continuación.

%etanol:agua vs tiempo de extracción a: temperatura= 50 °C; concentración HCl= 0 % (v/v); relación material vegetal:solvente= 1:40.

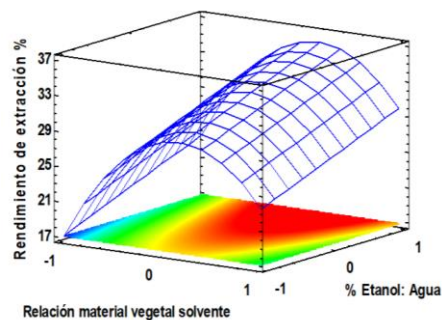


Superficies de contorno para el rendimiento de extracción, %

%etanol:agua vs concentración HCl a: temperatura= 50 °C; relación material vegetal:solvente= 1:40; tiempo de extracción=15 min.



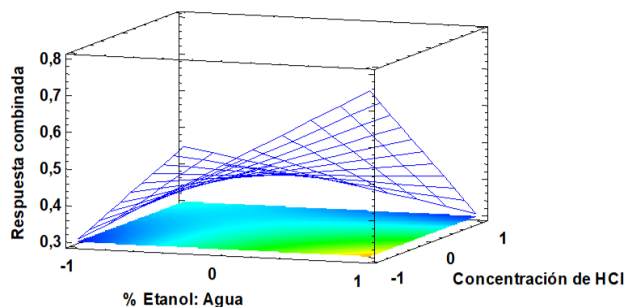
Relación material vegetal:solvente vs % etanol:agua= 45: 55 (v/v) a: concentración HCl 0 %temperatura= 50 °C; tiempo de extracción 15 min.



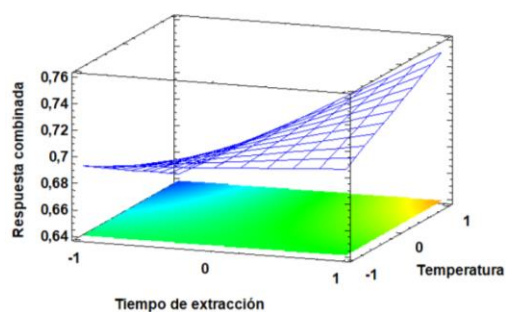
ANEXO C. Continuación.

Superficies de contorno para la respuesta combinada.

%etanol:agua vs concentración HCl a: temperatura= 50 °C; relación material vegetal:solvente= 1:40; tiempo de extracción= 15 min.

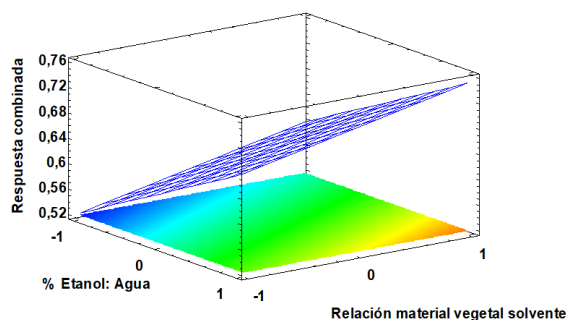


Tiempo de extracción vs temperatura a: % etanol:agua 45.55 (v/v); concentración HCl= 0%; relación material vegetal:solvente= 1:40.



%etanol:agua vs relación material vegetal:solvente a:

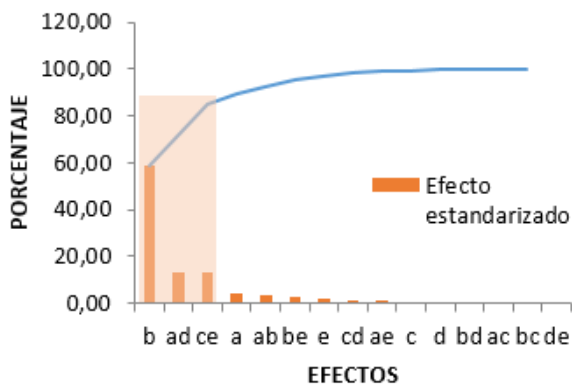
concentración HCl=0%; temperatura= 50 °C; tiempo de extracción= 15 min



ANEXO D. Diagramas de Pareto para los efectos estandarizados.

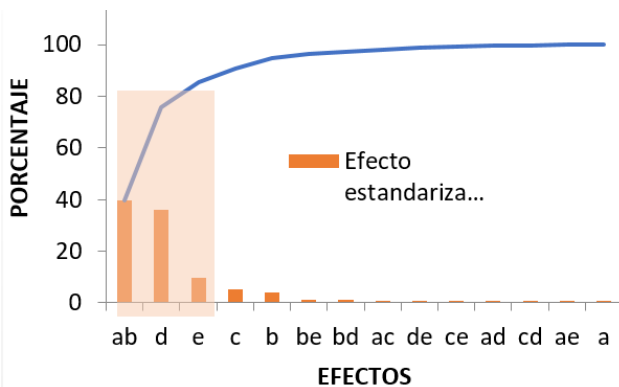
El efecto de las variables individuales y las binarias que están sombreadas representan más del 80 % de la variación de las respuestas evaluadas.

Capacidad antioxidante



Efectos	Efecto estandarizado	Porcentaje
<i>b</i>	58,5	58,5
<i>ad</i>	13,4	72,0
<i>ce</i>	13,0	85,0
<i>a</i>	4,0	89,0
<i>ab</i>	3,4	92,5
<i>be</i>	2,8	95,3
<i>e</i>	1,7	97,0
<i>cd</i>	1,3	98,3
<i>ae</i>	0,8	99,2
<i>c</i>	0,2	99,4
<i>d</i>	0,1	99,6
<i>bd</i>	0,1	99,7
<i>ac</i>	0,1	99,8
<i>bc</i>	0,0	99,9
<i>de</i>	0,0	100

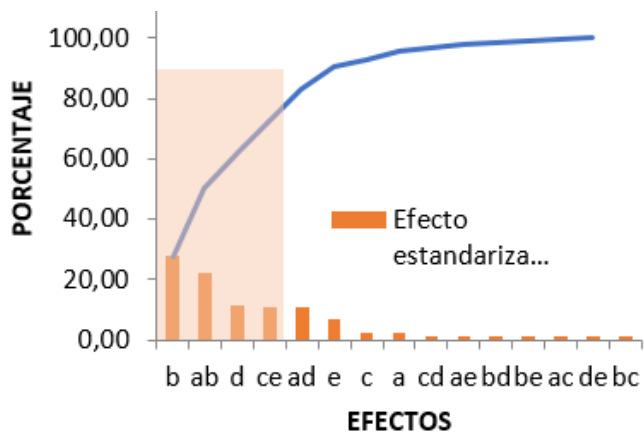
Rendimiento de extracción



Efectos	Efecto estandarizado	Porcentaje
<i>ab</i>	39,9	39,9
<i>d</i>	36,1	75,9
<i>e</i>	9,7	85,6
<i>c</i>	5,4	90,9
<i>b</i>	4,0	94,9
<i>be</i>	1,3	96,2
<i>bd</i>	1,0	97,3
<i>ac</i>	0,7	98,0
<i>de</i>	0,7	98,7
<i>ce</i>	0,5	99,2
<i>ad</i>	0,3	99,5
<i>cd</i>	0,3	99,8
<i>ae</i>	0,1	100,0
<i>a</i>	0,0	100,0
<i>bc</i>	0,0	100,0

ANEXO D. Continuación.

Respuesta combinada



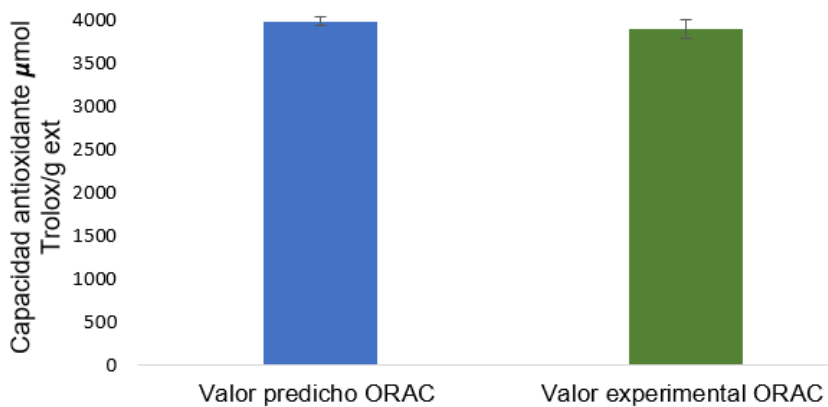
Efectos	Efecto estandarizado	Porcentaje
<i>b</i>	27,80	27,8
<i>ab</i>	22,35	50,1
<i>d</i>	11,31	61,5
<i>ce</i>	11,03	72,5
<i>ad</i>	10,92	83,4
<i>e</i>	7,08	90,5
<i>c</i>	2,57	93,1
<i>a</i>	2,40	95,5
<i>cd</i>	1,49	97,0
<i>ae</i>	0,85	97,8
<i>bd</i>	0,66	98,5
<i>be</i>	0,64	99,1
<i>ac</i>	0,49	99,6
<i>de</i>	0,36	100,0
<i>bc</i>	0,04	100,0

ANEXO E. Valores y gráficos de la validación de los modelos asociados a la Ca y el RE.

$$\text{ORAC} = 758,15 + 713,83A - 881,49B - 221,27D + 1005,78A^2 - 703,503AB + 130,316CE$$

Valores experimentales y predichos para CA

Capacidad antioxidante Experimental $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$	Capacidad antioxidante predicho $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$	RMSE	% Error
3822	3972	184,2	5
3701	3972		
3894	3972		
Promedio = 3805			



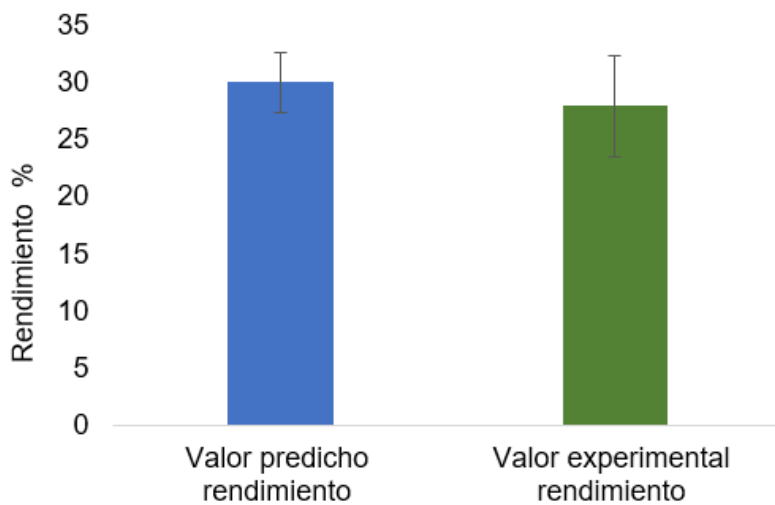
Comparación entre el valor promedio de la capacidad antioxidante y valor experimental.

ANEXO E. Continuación.

$$\text{Rendimiento} = 32,165 + 1,37536 \cdot \mathbf{B} + 3,12722 \cdot \mathbf{D} + 1,84112 \cdot \mathbf{E} - 9,04611 \cdot \mathbf{D}^2 - 3,36221 \cdot \mathbf{AB}$$

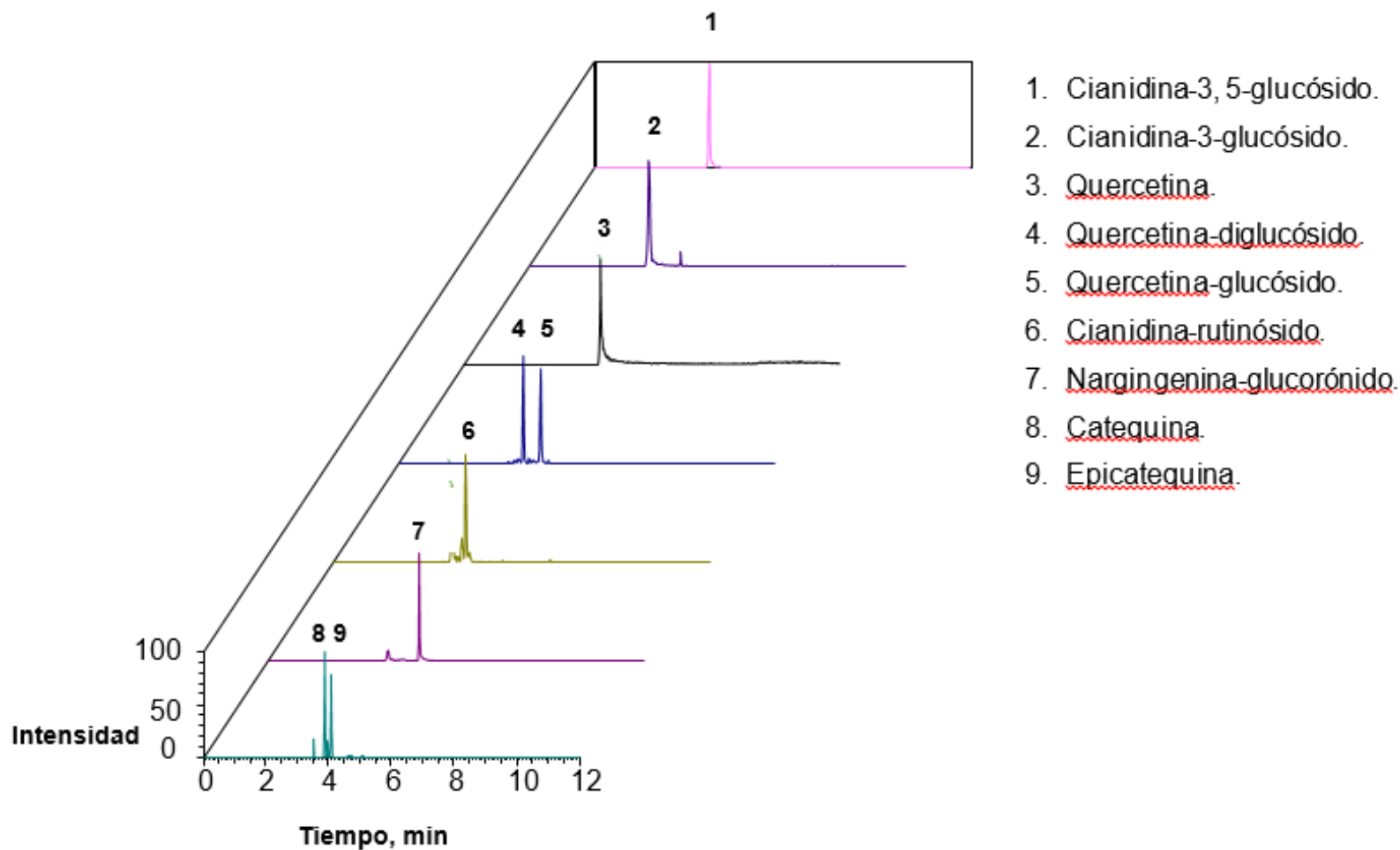
Valores experimentales y predichos para RE

Rendimiento experimental %	Rendimiento predicho %	RMSE	% Error
28	30	2,2	8
27	30		
29	30		
Promedio = 28			



Comparación entre el valor promedio del rendimiento de extracción y valor experimental.

ANEXO F. Perfil cromatográfico UHPLC-ESI(+)Orbitrap-MS del extracto hidroalcohólico de flores de *Hibiscus rosa sinensis*.



ANEXO G. Identificación y cuantificación de polifenoles en los 25 tratamientos del diseño experimental factorial fraccionado 2^{5-1} para flores de *H. rosa sinensis*.

Tratamiento	mg Polifenoles/ g extracto								
	C3, 5g	C3g	C3r	Q3g	Qdg	Q	Ng	Cq	Eq
1	0,39 ± 0,03	1,0 ± 0,1				0,0186 ± 0,0003	0,31 ± 0,02		
2	7,0 ± 0,1	0,17 ± 0,01	0,029 ± 0,003	0,56 ± 0,01	0,59 ± 0,03	0,0153 ± 0,0005	3,9 ± 0,1	6,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1
3	15,1 ± 0,8	0,50 ± 0,01		2,74 ± 0,04	1,4 ± 0,1	0,0301 ± 0,0005	9,6 ± 0,5	9,5 ± 0,4	4,8 ± 0,1
4	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1				0,0065 ± 0,0000	0,070 ± 0,003		
5	0,52 ± 0,03	1,3 ± 0,1				0,0171 ± 0,0005			
6	0,40 ± 0,02	0,7 ± 0,1							
7	3,2 ± 2,8	0,54 ± 0,01	0,115 ± 0,002	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,0	0,021 ± 0,001	7,8 ± 0,1	3,1 ± 1,8	3,2 ± 1,8
8	5,8 ± 0,1	0,13 ± 0,01	0,027 ± 0,002	0,67 ± 0,01	0,7 ± 0,0	0,0231 ± 0,0003	3,0 ± 0,2	4,8 ± 0,2	2,2 ± 0,1
9	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0,002 ± 0,007	0,029 ± 0,000		0,057 ± 0,002	0,6 ± 0,1		
10	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1				0,024 ± 0,001	0,255 ± 0,003		
11	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1		0,016 ± 0,001		0,0134 ± 0,0005	0,1 ± 0,1		

ANEXO G. Continuación.

12	6,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,020 ± 0,004	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,033 ± 0,001	5,2 ± 0,4	4,0 ± 0,2	2,2 ± 0,1
13	20,1 ± 0,7	0,55 ± 0,01	0,147 ± 0,005	2,9 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,033 ± 0,001	11,3 ± 0,2	10,7 ± 0,3	5,5 ± 0,1
14	3,9 ± 0,2	3,1 ± 0,2	0,013 ± 0,000	0,055 ± 0,001		0,046 ± 0,003	0,95 ± 0,03		
15	1,93 ± 0,04	2,25 ± 0,04		0,027 ± 0,001		0,0133 ± 0,0005	0,513 ± 0,004		
16	19,1 ± 0,4	0,50 ± 0,01	0,079 ± 0,004	1,92 ± 0,03	1,9 ± 0,1	0,028 ± 0,001	8,0 ± 0,2	11,0 ± 0,2	6,6 ± 0,2
17	2,4 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0,065 ± 0,002	0,003 ± 0,002		0,015 ± 0,001	0,31 ± 0,02		
18	3,0 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,012 ± 0,001	0,021 ± 0,001		0,020 ± 0,000	0,16 ± 0,01		
19	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	0,025 ± 0,002	0,024 ± 0,003		0,0149 ± 0,0004	0,079 ± 0,005		
20	4,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2	0,010 ± 0,002	0,020 ± 0,002		0,018 ± 0,001	0,17 ± 0,01		
21	1,25 ± 0,04	2,6 ± 0,2				0,026 ± 0,001	0,072 ± 0,003		
22	10,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1	0,028 ± 0,003	0,041 ± 0,002		0,016 ± 0,001	0,88 ± 0,03		
23	4,0 ± 0,4	0,95 ± 0,03	0,008 ± 0,001	0,16 ± 0,01	0,0068 ± 0,0004	0,081 ± 0,004	2,3 ± 0,2		
24	0,3 ± 0,2	0,29 ± 0,02				0,007 ± 0,001			
25	6,4 ± 0,4	3,5 ± 0,2	0,018 ± 0,003	0,028 ± 0,004		0,020 ± 0,001	0,60 ± 0,05		

C3,5g: Cianidina-3,5-glucósido; **C3g:** Cianidina-3-glucósido; **C3r:** Cianidina-3-rutinósido; **Q3g:** Quercetina-3-glucósido; **Qdg:** Quercetina diglucósido; **Q:** Quercetina; **Ng:** Naringenina glucorónido; **Cq:** Catequina; **Eq:** Epicatequina.

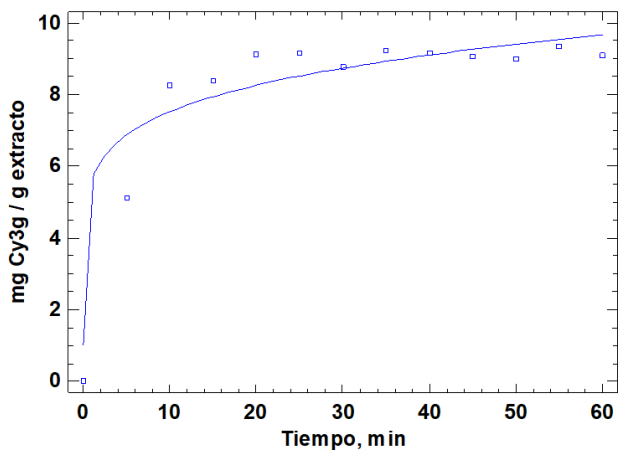
ANEXO H. Gráficos de los modelos cinéticos ajustados a los datos experimentales.

Datos experimentales de la cinética.

Tiempo, min	mg Cy3g/g extracto ± S
5	5,9 ± 1
10	8,3 ± 0,03
15	8,4 ± 0,1
20	9,0 ± 0,1
25	9,2 ± 0,05
30	8,8 ± 0,1
35	9,2 ± 0,1
40	9,2 ± 0,1
45	9,1 ± 0,03
50	9,0 ± 0,01
55	9,5 ± 0,2
60	9,2 ± 0,1

Modelo de Tusek

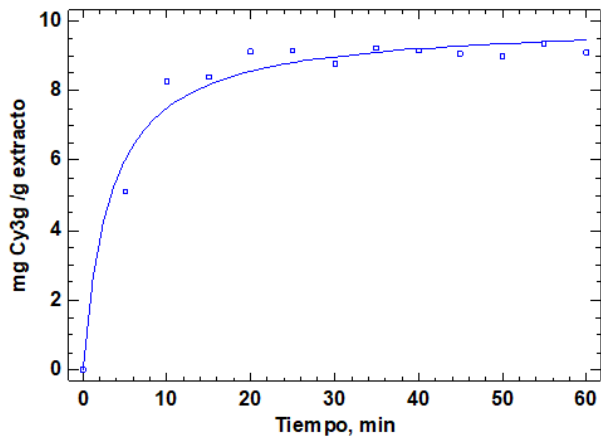
$$C(t) = e^{-K*t^n}$$



ANEXO H. Continuación.

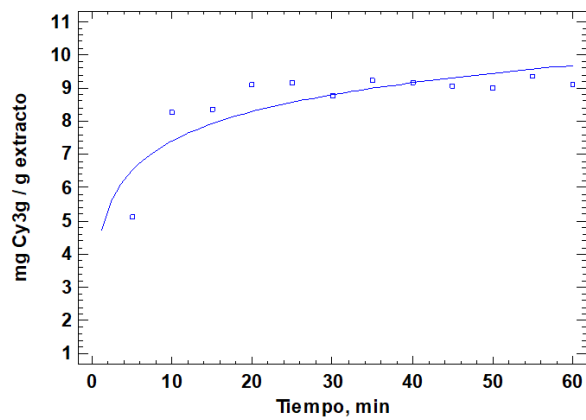
Modelo de segundo orden

$$C(t) = \frac{t}{\left(\frac{1}{K * C_e^2}\right) + (t/C_e)}$$



Modelo logaritmico

$$C(t) = a * \text{Log}(t) + b$$



ANEXO H. Continuación

Modelo Peleg

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 * t}$$

