

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE AISLAMIENTO**

JÉSICA JULIETH MEJIA MEDINA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus
sabdarriffa* L.) OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE AISLAMIENTO**

JÉSICA JULIETH MEJIA MEDINA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

Dedicatoria

Al motor de mi vida, mi hermosa hija Marianita, pues es ella, quien con sus palabras de cariño y su abrazos llenan mi vida de felicidad, de esperanza y de ganas de luchar.

A mis padres Ivan y Luz Marina, quienes siempre se esforzaron por hacer de mí una gran mujer, con sus enseñanzas y su amor incondicional.

A mis hermanas Pao y Mayer, por su apoyo incondicional.

A Wicho, quien siempre me apoyó durante este proceso, para salir adelante, y por eso, hoy alcanzamos junto esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Elana Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por darme la oportunidad de trabajar en el CENIVAM, trasmitirme su conocimiento, y formarme profesionalmente.

A la profesora Dora, quien siempre tuvo la disposición para enseñarme, para aconsejarme para darme ánimo y sobre todo ofrecerme su linda amistad

Al centro de investigación CENIVAM, por el apoyo económico brindado para la ejecución de este proyecto.

A mis compañeras y amigas Nana y Taylor, con quienes compartí gratos momentos.

A mis compañeros del laboratorio, Yuri, Cori, Silvita, Dianita, Los mercury, Roger, Gustavo, Laura, Andres, Freys, Julian, Nestor, Jose, Delver, Oscar, Alexander, Wendy, Karol, Leydé, Jesus, Jennifer y quienes en este instante se me van sus nombre, muchas gracias por todo su apoyo, ya que de alguna forma siempre tuvieron una palabra de fortaleza para mí.

A mis compañeros de carrera, con quienes estude largas jornadas, reí y compartí gratos momentos, Jose, Keyla, Carlos, Marisol, Anderson, Lina, Javier, Oscar, Sergio, Henry.

A Wicho, por ser siempre mi bastón de apoyo, quien nunca me desamparó bajo ninguna circunstancia.

A Marianita, mis padres, mis suegros, mis hermanas, mis cuñadas, mis amigas, mis abuelas, mi tía Blanca, por confiar en mí, y tener siempre palabras de apoyo para mí.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 18 |
| 1. MARCO REFERENCIAL..... | 20 |
| 1.1 MARCO DE ANTECEDENTES..... | 20 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 23 |
| 2.1 <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> L..... | 23 |
| 2.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL | 25 |
| 2.2.1 Secado a la sombra | 25 |
| 2.2.2 Liofilización | 25 |
| 2.3 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL | 26 |
| 2.4 POLIFENOLES | 27 |
| 2.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS..... | 30 |
| 2.5.1 Extracción con solventes | 31 |
| 2.5.2 Extracción con fluido supercrítico | 32 |
| 2.5.3 Destilación-extracción con solvente simultánea..... | 33 |
| 2.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS..... | 34 |
| 2.7 ANÁLISIS INSTRUMENTAL | 34 |
| 2.7.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas..... | 35 |
| 2.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia | 36 |
| 2.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 36 |
| 2.8.1 Capacidad de absorción de radicales oxígeno | 37 |
| 2.8.2 Método de Folin-Ciocalteu | 38 |
| 3. METODOLOGÍA | 39 |
| 3.1 SIEMBRA DEL MATERIAL VEGETAL | 40 |
| 3.2 RECOLECCIÓN Y SECADO DEL MATERIAL VEGETAL..... | 40 |
| 3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.3.1 Extracción con fluido supercrítico. | 41 |
| 3.3.2 Extracción por destilación-extracción con solvente simultánea | 43 |
| 3.3.3 Extracción con solvente. | 44 |
| 3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO | 45 |
| 3.4.1 Análisis por GC-MS en columna apolar | 45 |
| 3.4.2 Sistema de adquisición de datos | 46 |
| 3.4.3 Identificación | 47 |
| 3.4.4 Cuantificación. | 47 |
| 3.4.5 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia | 49 |
| 3.5 AISLAMIENTO DE ANTOCIANINAS | 50 |
| 3.5.1 Purificación del extracto metanólico empleando extracción en fase sólida... | 51 |
| 3.5.2 Selección de las condiciones de elución y separación por capa fina..... | 51 |
| 3.5.3 Caracterización y cuantificación química de antocianinas. | 53 |
| 3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 53 |
| 3.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES..... | 55 |
| 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 56 |
| 4.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>H. sabdariffa</i> L..... | 56 |
| 4.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL | 56 |
| 4.3 ANÁLISIS POR GC-MS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., OBTENIDOS POR SFE Y SDE | 58 |
| 4.4 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTE | 67 |
| 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES..... | 74 |
| 5. CONCLUSIONES | 79 |
| 6. RECOMENDACIONES..... | 81 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 82 |
| ANEXOS | 93 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Relación del número de publicaciones sobre <i>H. sabdariffa</i> , por año. | 20 |
| Figura 2. Relación de número de publicaciones sobre <i>H. sabdariffa</i> , según el área de estudio. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Periodo de observación: 2003 a 10 de agosto de 2013. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: (" <i>Hibiscus sabdariffa</i> " OR " <i>Rosell</i> " OR " <i>flor de Jamaica</i> "). | 21 |
| Figura 3. Flor de Jamaica: Foto tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 14 de julio de 2012. | 24 |
| Figura 4. Estructura básica de los flavonoides..... | 28 |
| Figura 5. Ruta metabólica del ácido shiquímico (Havsteen, J., 2002). | 28 |
| Figura 6. Estructuras químicas de las antocianinas (Latti y col., 2009). | 30 |
| Figura 7. Diagrama de fases para el dióxido de carbono puro, PT: punto triple, PC: punto crítico (Walton e Irown., 1999). | 33 |
| Figura 8. Metodología desarrollada en el proyecto | 39 |
| Figura 9. A). Equipo de liofilización; B). Secado del material vegetal a la sombra. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 14 de agosto de 2012. | 41 |
| Figura 10. Equipo de extracción con fluido supercrítico <i>Thar SFE-2000</i> . Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 10 de febrero de 2012..... | 42 |
| Figura 11. Equipo de destilación-extracción con solvente simultánea a micro-escala. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013..... | 44 |
| Figura 12. Extracción con solventes: A). Primera extracción con metanol y agua. B) Extracción No. 24, donde se observa el extracto incoloro. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 5 de febrero de 2013. | 45 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N Network GC System</i> . Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013..... | 46 |
| Figura 14. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890A Network GC System</i> . Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013..... | 49 |
| Figura 15. Cromatógrafo líquido <i>Agilent Technologies 1200 Series</i> . Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013. | 50 |
| Figura 16. Elución de una placa cromatográfica en caja Coplin. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 30 de agosto de 2013. | 52 |
| Figura 17. Compuestos separados por cromatografía en capa fina. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 3 de septiembre de 2013. | 52 |
| Figura 18. Equipo lector de microplacas <i>Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader</i> . Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 23 de agosto de 2013..... | 54 |
| Figura 19. Curva de secado a la sombra de la especie <i>H. sabdariffa</i> | 57 |
| Figura 20. Curva de secado por liofilización de la especie <i>H. sabdariffa</i> | 57 |
| Figura 21. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de <i>H. sabdariffa</i> . A). Extracto obtenido por SDE de flores secadas a la sombra. B). Extracto obtenido por SDE de flores liofilizadas. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV)..... | 59 |
| Figura 22. Clasificación por familias de compuestos químicos presentes en el extracto de <i>H. sabdariffa</i> liofilizada o secada a la sombra. D.A.G: Derivados de ácidos grasos; D.A: Derivados de azúcares; F: Derivados fenólicos; T: Terpenos.... | 62 |
| Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de <i>H. sabdariffa</i> . A). Extracto obtenido por SFE de flores | |

| | |
|---|----|
| secadas a la sombra. B). Extracto obtenido por SFE de flores liofilizadas. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV)..... | 65 |
| Figura 24. Perfil de antocianinas obtenido por HPLC-DAD de la flor de Jamaica a 520 nm en un extracto metanólico, columna ZORBAX Extend C ₁₈ | 68 |
| Figura 25. Perfil de antocianinas de la flor de Jamaica a 520 nm reportado por Wong y col. (2002) y Sukwattanasinh T. y col. (2007). | 68 |
| Figura 26. Estructura química de delfinidina-3-sambubiosido. | 69 |
| Figura 27. Estructura química de cianidina-3-sambubiosido. | 69 |
| Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis a 520 nm, A). Mezcla de antocianinas; B) Compuesto 1 (delfinidina-3-sambubiosido); C). Compuesto 2 (cianidina-3-sambubiosido)..... | 70 |
| Figura 29. Perfil cromatográfico de extractos de cálices de <i>H. sabdariffa</i> , obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis, a 520 nm. A). Extracto metanólico de flores secadas a la sombra; B). Extracto acuoso de flores secadas a la sombra; C). Extracto metanólico de flores liofilizadas; D). Extracto acuoso de flores liofilizadas..... | 71 |
| Figura 30. Curva de calibración para el compuesto 1 (Delfinidina-3-sambubiosido... | 72 |
| Figura 31. Curva de calibración para el compuesto 2 (Cianidina-3-sambubiosido) | 72 |
| Figura 32. Curva de calibración del Trolox [®] para el ensayo ORAC. | 74 |
| Figura 33. Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación del contenido total de fenoles, para el ensayo Folin-Ciocalteu..... | 75 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L..... | 24 |
| Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción SFE..... | 42 |
| Tabla 3. Condiciones cromatográficas..... | 50 |
| Tabla 4. Identificación taxonómica de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L..... | 56 |
| Tabla 5. Identificación, concentración (ppm) de los componentes presentes en los extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | 60 |
| Tabla 6. Rendimientos de extracto de flor de Jamaica, obtenidos con fluido supercrítico (SFE). | 64 |
| Tabla 7. Identificación y concentración (ppm) de los componentes principales del extracto de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. obtenido por SFE | 66 |
| Tabla 8. Cantidad relativa del compuesto 1 y del compuesto 2, presentes en los extractos de flor de Jamaica, en función del método de secado y del agente extractante. | 73 |
| Tabla 9. Valores de ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) y de (mg ácido gálico / L) para los extractos de <i>H. sabdariffa</i> , obtenidos por los métodos ORAC, Folin-Ciocalteu.... | 75 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|-----------------------------------|-------------|
| ANEXO A. Espectros de masa | 93 |
| ANEXO B. Espectros UV-Vis | 95 |
| ANEXO C. Espectro infrarojo | 97 |

RESUMEN

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

AUTORA: JESICA JULIETH MEJIA MEDINA **

PALABRAS CLAVES: *Hibiscus sabdariffa*, destilación extracción simultánea, fluido supercrítico, antocianinas, ORAC, Folin-Ciocalteu

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se distingue por su aroma y sabor ácido característico, posee componentes activos que pueden ser utilizados como materia prima en diversos campos de la medicina natural y homeopática, así como en la industria farmacéutica. En Colombia, el cultivo de flor de Jamaica es considerado no tradicional y forma parte del sector de especias y plantas medicinales. Se sabe que cuando existen condiciones de crecimiento de las plantas como: condiciones de suelo, época de cultivo, de cosecha y todo lo referente a la parte agrotecnológica, puede presentarse una gran variabilidad de metabolitos secundarios. Teniendo en cuenta que la composición química de la *H. sabdariffa* L. puede variar por las condiciones de cultivo, fue necesario realizar un estudio de los metabolitos secundarios de la *Hibiscus sabdariffa* cultivada y deshidratada en Colombia por dos métodos diferente, a saber: liofilización y secado a la sombra. En este trabajo, se caracterizaron los metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles de los extractos del cáliz de flor de Jamaica aislados por destilación extracción con solvente simultánea (SDE) y extracción con CO₂ supercrítico (SFE), respectivamente; se evaluó por medio del ensayo capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) la actividad antioxidante, y por el ensayo de Folin-Ciocalteu el contenido total de fenoles para los extractos obtenidos por SFE y extractos obtenidos con solventes así como de las dos antocianinas principales de la Jamaica (delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido) aisladas por cromatografía en capa fina. Se encontró: que el extracto SDE es rico en derivados de azúcares y terpenos, el extracto obtenido por SFE, es rico en ácidos grasos, fitosteroles y triterpenos, y los extractos obtenidos con solventes son ricos en flavonoides.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores Dra. Elena Stashenko, Jairo René Martínez.

ABSTRACT

TITLE: CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF EXTRACTS OF JAMAICA FLOWER (*Hibiscus sabdariffa* L.) OBTAINED BY DIFFERENT TECHNIQUES OF ISOLATION

AUTHOR: JESICA JULIETH MEJÍA MEDINA **

KEYS WORDS: *Hibiscus sabdariffa*, simultaneous distillation extraction, supercritical fluid, anthocyanins, ORAC, Folin-Ciocalteu

The Jamaica flowers (*Hibiscus sabdariffa* L.) has an aroma and sour taste, has active components that can be used as raw material in various fields of natural and homeopathic medicine and in the pharmaceutical industry. In Colombia, the cultivation of Jamaica flower is considered non-traditional and it is part of sector spices and medicinal plants. We know that when conditions of plant growth such as soil conditions, growing season, harvest and everything related to agrotechnological hand, may present a great variability of secondary metabolites. Given that the chemical composition of *H. sabdariffa* L. may vary depending on growing conditions, it was necessary to conduct a study of the secondary metabolites of *Hibiscus sabdariffa* cultivated and dehydrated in Colombia by two different methods, namely: lyophilization and dried in the shade. In this work, the volatile and semi-volatile secondary metabolites from extracts of calyx Jamaica flower was isolated by distillation solvent extraction simultaneously (SDE) and supercritical CO₂ extraction (SFE), respectively were characterized; was evaluated by testing absorption capacity of oxygen radicals (ORAC) antioxidant activity, and by the Folin-Ciocalteu assay total phenol content to the extracts obtained by SFE and extracts obtained with solvents as well as the two major anthocyanins Jamaica (delphinidin-3-sambubioside and cyanidin-3-sambubioside) isolated by thin layer chromatography. It was found, that the SDE extract is rich in sugar derivatives and terpenes, the extract obtained by SFE, is rich in fatty acids, phytosterols and triterpenes, and solvent extracts obtained are rich in flavonoids.

* Proyect to degree

** Science Faculty, Chemistry School, Director: Dr. Elena Stashenko, Jairo René Martínez

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---------|---|
| ABC | Área bajo la curva. |
| AO | Antioxidantes. |
| AAPH | <i>2,2'-Azobisisobutyramidinium chloride</i> (Cloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)). |
| BHT | <i>Butylated hydroxytoluene</i> (Hidroxitolueno butilado). |
| ca. | Circa (Aproximadamente). |
| CC | <i>Column Chromatography</i> (Cromatografía en columna). |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales. |
| DAD | <i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos). |
| D.A | Derivado(s) de azúcar(es). |
| D.A.G. | Derivado(s) de ácido(s) graso(s). |
| d_f | Espesor de la fase estacionaria |
| D.I. | Diámetro interno. |
| DPPH | Difenil-1-picrilhidracilo. |
| ET | <i>Electron Transfer</i> (Transferencia de un electrón). |
| e.g. | <i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo). |
| Ev | Electrón-Voltio. |
| F. | Derivado(s) fenólico(s). |
| F-C | Folin-Ciocalteu. |
| FID | <i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama). |
| FL | <i>Fluoresceín</i> (Fluorescina). |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases). |
| HAT | <i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferencia de un átomo de hidrógeno). |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía de alta eficiencia). |

| | |
|---------------------|---|
| i.e., | <i>Id est</i> (Es decir) |
| IOU | Inhibición de la absorción de oxígeno. |
| LRI | Índice de retención lineal. |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas). |
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas). |
| <i>m/z</i> | Relación masa/carga. |
| ORAC | <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno). |
| SIM | <i>Select Ion Monitoring</i> (Monitoreo de ion seleccionado) |
| SDE | <i>Simultaneous distillation solvent extraction</i> (Destilación-Extracción simultánea con solvente). |
| SE | <i>Solvent Extraction</i> (Extracción con solvente). |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico). |
| SPE | <i>Solid Phase extraction</i> (Extracción en fase sólida). |
| T. | Terpeno(s). |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox. |
| TIC | <i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total). |
| TLC | <i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa delgada). |
| t_R | Tiempo de retención, min. |
| TRAP | Parametro antioxidante total de la captura de radicales. |
| Trolox [®] | <i>6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i> (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). |
| UV-Vis | Ultravioleta –Visible. |

INTRODUCCIÓN

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) se distingue por su aroma y sabor ácido característico, posee componentes activos que pueden ser utilizados como materia prima en diversos campos de la medicina natural y homeopática, así como en la industria farmacéutica (Chen, 2003). Los cálices (fruto del arbusto de *H. sabdariffa*) se usan para la preparación de jaleas, helados, vinos, y como colorante en alimentos (Ali y col., 2005).

En Colombia, el cultivo de flor de Jamaica es considerado no tradicional y forma parte del sector de especias y plantas medicinales. La proliferación de esta especie está limitada por las condiciones climáticas, el mayor porcentaje de germinación ocurre a los 25°C en suelos áridos (Vallecillo y Gómez 2004). Se sabe, que cuando existen condiciones de crecimiento de las plantas como: condiciones de suelo, época de cultivo, de cosecha y todo lo referente a la parte agrotecnológica, puede presentarse una gran variabilidad de metabolitos secundarios (Acosta, L., 2010). Teniendo en cuenta que la composición química de la *H. sabdariffa* L. puede variar por las condiciones de cultivo, fue necesario realizar un estudio de los metabolitos secundarios de *la Hibiscus sabdariffa* cultivada en Colombia.

El cáliz de Jamaica es secado por métodos tradicionales (sol o sombra), para su posterior distribución y comercialización. Sin embargo, debido al alto contenido de humedad (>80%), durante dicho proceso es difícil controlar la actividad enzimática, fenómeno que puede alterar sustancialmente la calidad del material vegetal por descomposición de sus constituyentes, los cuales ya no serían aptos para consumo humano (Vallecillo y Gómez 2004). Por lo tanto, en esta investigación se buscó aportar conocimientos científicos sobre el tratamiento *post-*

cosecha de flores de Jamaica, teniendo en cuenta la composición química y la actividad antioxidante de los metabolitos presentes en extractos de *H. sabdariffa*. En este trabajo, se caracterizaron los metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles presentes en el extracto de cáliz de *H. sabdariffa* L., aislados por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y por extracción con CO₂ (dióxido de carbono) supercrítico (SFE), respectivamente; se evaluó, por medio del ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), la actividad antioxidante, y, por ensayo de Folin-Ciocalteu, el contenido total de fenoles para los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y extractos obtenidos con solventes; así como de las dos antocianinas principales de la Jamaica (delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido), aisladas por cromatografía en capa delgada (TLC).

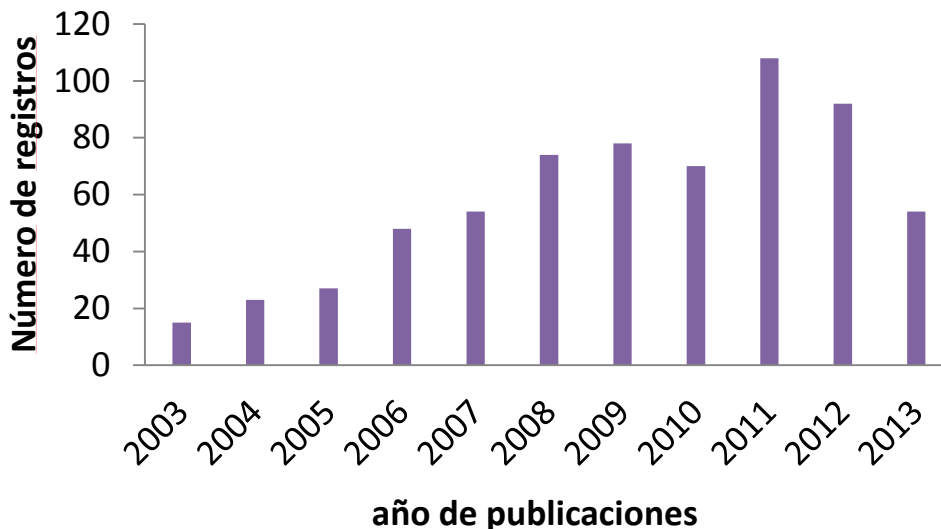
Es importante resaltar que, en este trabajo de investigación se determinó que los extractos de flor de Jamaica, presentaron una alta actividad antirradicalaria, superior a los antioxidantes sintéticos de referencia evaluados (BHT y α -tocoferol), medida por el ensayo ORAC, que es un método de evaluación de la capacidad antioxidante de gran relevancia en sistemas biológicos y en alimentos.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES

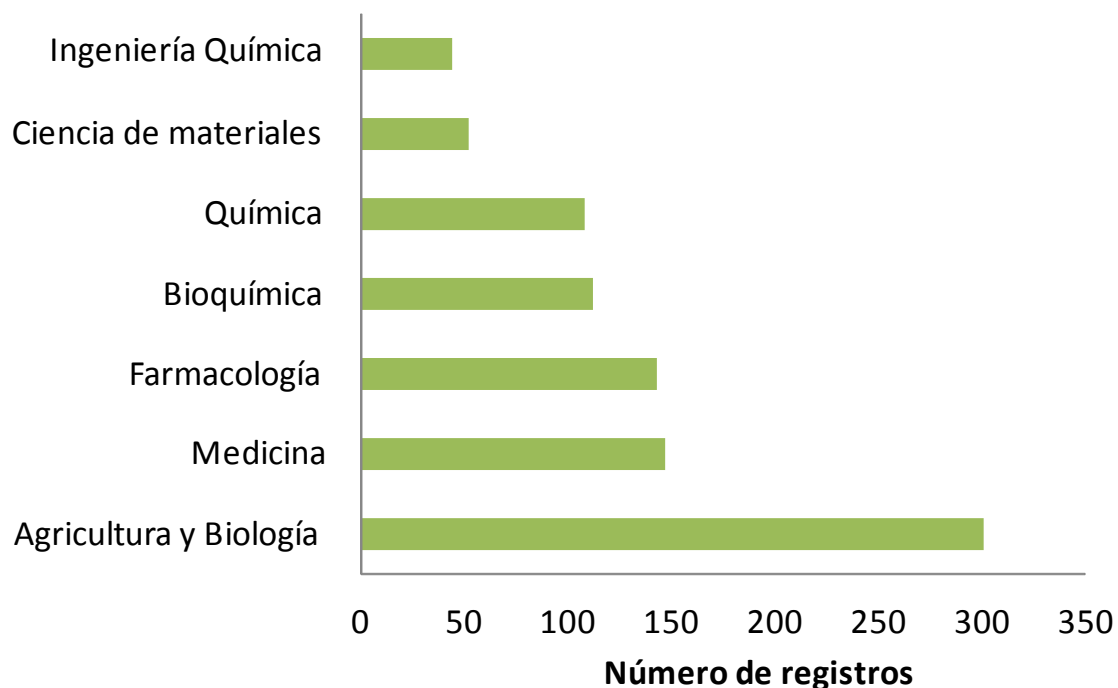
Con el objetivo de analizar el número de investigaciones que se han llevado a cabo sobre *Hibiscus sabdariffa* L., se realizó una exploración de la producción científica existente, utilizando una base de datos *Scopus* (*Elservier*).

Figura 1. Relación del número de publicaciones sobre *H. sabdariffa*, por año.



En la **Figura 1**, se observa la tendencia de aumento del número de publicaciones, que se han llevado a cabo, en los últimos diez años, sobre *Hibiscus sabdariffa*. Como ecuación de búsqueda se utilizó TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus sabdariffa*" OR "*Rosell*" OR "*flor de Jamaica*")), entre el periodo de 2003 a 10 de agosto de 2013, se han publicado 369 artículos, entre los cuales se reportan varias aplicaciones del uso de *H. sabdariffa* L. para las industrias de alimentos y farmacéutica.

Figura 2. Relación de número de publicaciones sobre *H. sabdariffa*, según el área de estudio. Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2003 a 10 de agosto de 2013. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: ("*Hibiscus sabdariffa* " OR "*Rosell* " OR "*flor de Jamaica*")).



En la **Figura 2**, se observa la relación entre el número de publicaciones y el área de estudio, donde se logra evidenciar que el área de mayor estudio es la agricultura y ciencias biológicas. Algunos de los artículos, que se encuentran en estas áreas, estudian los efectos de las variables que pueden causar la degradación de compuestos de interés presentes en la flor de Jamaica, con el fin de obtener productos derivados de esta planta, que puedan ser comercializados; también evalúan la actividad biológica de los extractos de la flor.

En el mundo se han realizado diversos estudios acerca de las plantas medicinales, e *Hibiscus sabdariffa* no ha sido la excepción. Entre algunas de las publicaciones más importantes se encuentran las siguientes:

Chen y col. (1998) extrajeron los volátiles de flores frescas de flores de Jamaica cultivadas en Taiwán, mediante destilación-extracción con solvente simultánea, utilizando éter etílico como disolvente: los compuestos mayoritarios fueron el furfural y el 5-metilfurfural.

Ortiz (2008) determinó la composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices frescos de flor de Jamaica, que se usan en tratamientos medicinales y en la preparación de bebidas, infusiones, vinos y otros productos alimenticios. En este estudio, se encontró, que los cálices contienen agua (87,92%), proteínas (1,04%), grasa (0,14%), cenizas (0,80%) y carbohidratos totales (10,10%). En cuanto al contenido de minerales, por cada 100 g de cáliz se encontraron 60,39 mg de calcio, 37,97 mg de magnesio, 0,09 mg de cobre, 0,80 mg de hierro, 0,04 mg de níquel y 0,41 mg de zinc.

Gómes y col. (2010), hicieron una revisión sobre la evidencia farmacológica de los extractos de plantas de género *Hibiscus*, encontrando que la actividad anticancerígena y antioxidante de estas plantas se atribuye a la presencia de ácido protocatecúico y de antocianinas tales como la cianidina-3-rutinósido, delphinidina y delphinidina-3-glucósido, siendo esta última la antocianina mayoritaria en *Hibiscus sabdariffa*.

Hirunpanich y col. (2005) han reportado la presencia de ácidos orgánicos como los ácidos tartárico, cítrico, málico, entre otros, en flores de *H. sabdariffa*.

Norhaizan y col. (2010), obtuvieron los metabolitos secundarios de flores liofilizadas de Jamaica cultivadas en Malasia, mediante extracción con agua y una mezcla de agua-metanol. A los extractos les evaluaron el contenido total de fenoles.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Hibiscus sabdariffa* L.

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L., familia Malvacea) (**Figura 3**), originaria de África tropical, es una planta arbustiva semileñosa anual, crece hasta 180 cm o más, sus hojas son esparcidas y ovaladas y su tallo es de color verde rojizo. Las flores son bisexuales solitarias con pétalos de color blanco y un centro de color rojizo, duran de uno a dos días y al caerse desarrollan una fructificación en forma de copa. El fruto es un cáliz de color rojo carnosos y brillante, el cual está conformado por siete sépalos separados y envuelve una bellota de forma ovoide que contiene alrededor de 20 semillas de color marrón.

La flor de Jamaica es una planta sensible a temperaturas bajas (climas fríos), crece en regiones tropicales y se cultiva en Filipinas, Sudán, Malasia, Senegal, México y Nicaragua (Solórzano y Macario, 2002). Se conoce con diferentes nombres comunes como: Jamaica, flor de Jamaica, rosa de Jamaica, roselle, red sorrell, karkadé o carcadé (Bahaeldeen y col., 2012).

Figura 3. Flor de Jamaica: Foto tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 14 de julio de 2012.



La flor de Jamaica se describe taxonómicamente según se muestra en la **Tabla 1** (Solórzano y Macario, 2002).

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Hibiscus sabdariffa* L.

| | |
|------------------|----------------------|
| REINO | PLANTAE |
| Clase | Magnoliopsida |
| Sub-Clase | Dilleniidae |
| Orden | Malvales |
| Familia | Malvaceae |
| Género | <i>Hibiscus</i> |
| Especie | <i>sabdariffa</i> L. |

2.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas medicinales pueden ser comercializadas frescas, enteras o cortadas; en la mayoría de los casos es necesario someterlas a un proceso de secado, en el cual se retira la mayor cantidad de humedad presente en la planta, con el objetivo de conservar el material vegetal por más tiempo y reducir la proliferación de hongos. Para conservar las plantas es indispensable disminuir la actividad enzimática, y para esto, se minimiza el contenido acuoso hasta valores de humedad entre 5 y 14%, según cada caso. Normalmente, las plantas en la cosecha presentan humedades superiores al 70%, por lo que es necesario encontrar medios eficientes de secado, que no perjudiquen la calidad del material vegetal, ni reduzcan el contenido de componentes volátiles presentes en el mismo (Bandoni, 2002).

2.2.1 Secado a la sombra. El secado a la sombra se realiza a temperatura ambiente en lugares cubiertos; siendo un sistema que actúa por convección del aire, aprovechando las corrientes naturales del viento (Bandoni, 2002). Sin embargo, el principal inconveniente del secado a la sombra es la imposibilidad de controlar las condiciones climáticas, e.g., días lluviosos, alta humedad o bajas temperaturas, entre otras. (Bandoni y col., 1976). Pero, este método de secado presenta una ventaja para aquellas plantas que contengan compuestos termosensibles, porque no hay cambios bruscos de temperatura, lo que favorece la conservación de dichos compuestos (Asekun y col., 2006).

2.2.2 Liofilización. La liofilización es un proceso de conservación mediante el cual se elimina el agua por sublimación y se reducen las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles (Ramírez, 2006). Es considerado el mejor proceso para conservar productos biológicos, porque uno de los dos métodos más confiables de conservación, la congelación y la deshidratación (Alvarado, 1979).

Este proceso no altera la estructura físico-química del material y permite la conservación del mismo sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y con alta estabilidad microbiológica. Otra ventaja, que ofrece la liofilización sobre otras técnicas de secado tradicionales, es que logra conservar e intensificar las características organolépticas del producto, como el sabor y el olor. El encogimiento que se da es mínimo, por tanto, conservan su aspecto y textura, al igual que sus características nutricionales (Constantino y Pikal, 2004).

La liofilización involucra varias etapas, a saber (Ramírez, 2006):

1. Congelación a bajas temperaturas.
2. Secado por sublimación del hielo del producto congelado, generalmente, a presión baja.
3. Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

2.3 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL

El metabolismo primario es un conjunto de reacciones químicas y entre sus productos se puede encontrar aminoácidos, lípidos, proteínas, azúcares, entre otros, que desempeñan un papel importante para el desarrollo fisiológico de las plantas (Stashenko, E. 2009). También, existen una gran cantidad de compuestos orgánicos, que no están implicados directamente en su crecimiento y desarrollo, a los cuales se les conoce como “metabolitos secundarios”. En general, la ruta de síntesis de estas sustancias parte del metabolismo primario y se deriva en tres rutas, principalmente, la ruta de los ácidos malónico, mevalónico y shiquímico (Wink. M, 2010).

Los metabolitos secundarios están relacionados con el sistema de defensa de las plantas y la comunicación con otras especies. Además, son los responsables de las características organolépticas de las plantas y de su actividad biológica. Los

metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse en tres grupos: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (TAIZ y ZEIGER, 2002).

2.4 POLIFENOLES

Los compuestos polifenólicos son sustancias producidas a partir del metabolismo secundario de las plantas. En las plantas superiores, la ruta biosintética empleada para su producción es la del ácido shiquímico, mediante ésta, se sintetiza la mayoría de fenoles y flavonoides. La ruta inicia con la síntesis de fenilalanina, a partir del ácido shiquímico, seguidamente, se da la desaminación de ésta para producir el ácido *trans*-cinámico, a partir del cual se sintetiza el *p*-cumaroil-CoA, precursor de todos los compuestos fenólicos conocidos como flavonoides (Ávalos y col., 2009).

Los polifenoles están presentes en las plantas como una mezcla y no como componentes aislados; éstos, se pueden clasificar de diversas formas, por ejemplo, respecto a su unidad base o a la naturaleza de los grupos funcionales ligados a esta base; también, se pueden clasificar según el número y la disposición de sus átomos de carbono. La clasificación más utilizada, los divide en ácidos fenólicos, flavonoides y, los menos abundantes, estilbencenos y lignanos, aunque existen muchos más tipos de estructuras (Bhat y col., 2005).

Los flavonoides son polifenoles con esqueletos carbonados de hasta 15 carbonos, ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de 3 carbonos (**Figura 4**). Su precursor directo son las chalconas (**Figura 5**), las cuales se forman tras la condensación de malonil-CoA y *p*-cumaril-CoA, en una reacción catalizada por la enzima chalcona sintasa (Havsteen, J., 2002).

Figura 4. Estructura básica de los flavonoides.

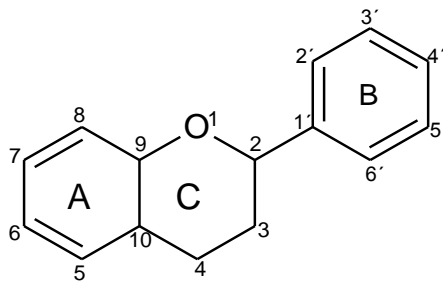
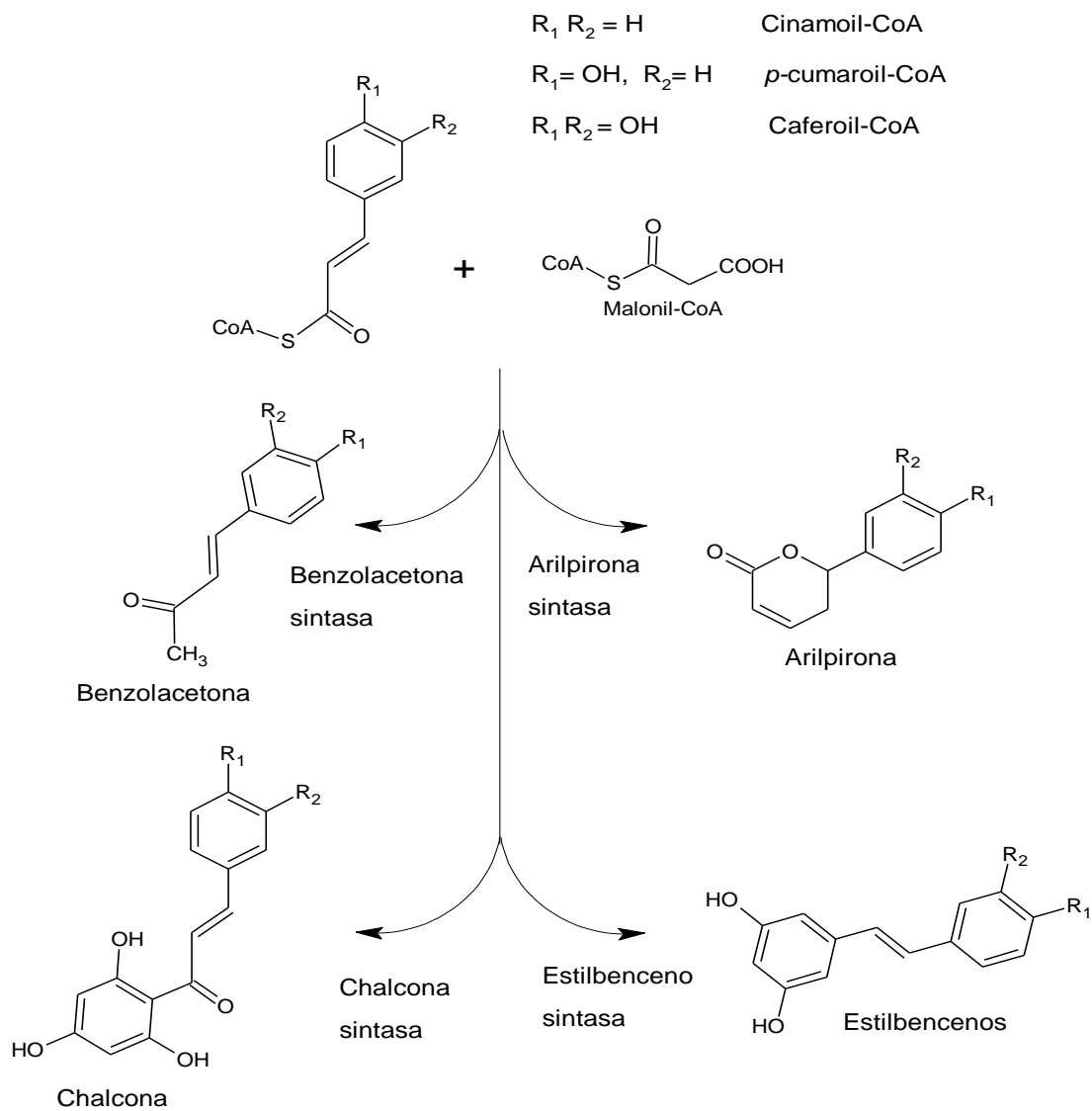


Figura 5. Ruta metabólica del ácido shiquímico (Havsteen, J., 2002).



Los flavonoides se pueden clasificar como: flavonoles, favonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y flavonoles (catequina y proantocianidinas). Estos compuestos están caracterizados por una estructura benzo- γ -pirona $C_6-C_3-C_6$. Esta estructura permite la sustitución de diversas posiciones de diferentes grupos funcionales como hidroxilo, metoxilo u O-glucósido, lo que explica la existencia de más de 8000 estructuras caracterizadas hasta la fecha (Havsteen, B., 2002).

Las antocianinas son flavonoides que forman parte de la piel de la uva, mora, manzana, ciruela, pera, rosas, col morada y flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), entre otras. Además, son las responsables de dar la coloración características de dichas especies. La diferencia entre las coloraciones depende de la naturaleza y concentración de las antocianinas presentes. Entre los factores, que pueden afectar la coloración de las antocianinas, figuran el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, la temperatura, la luz, entre otros (Gross. J., 1987).

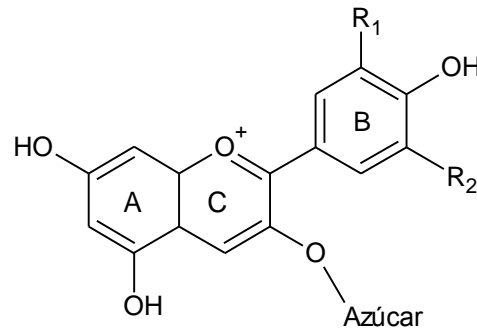
La forma natural, en la que se encuentran las antocianinas, es como glicósidos, que poseen la unión de una antocianidina y un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico (**Figura 6**) (Cavalcanti y col., 2011).

Los azúcares comúnmente encontrados son la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa, y la presencia de estas unidades otorga mayor estabilidad y solubilidad (Gross., J. 1987).

Las antocianinas presentan una alta coloración en medio ácido, debido a que contienen un sistema π de ocho enlaces conjugados. En el espectro de absorción, es posible identificar dos bandas características: una, en la región visible entre los 465 y 550 nm determinada por la conjugación del anillo B (**Figura 6**), y la segunda (menos intensa), en la región ultravioleta entre los 270 y 280 nm, determinada por la conjugación del anillo A; la absorbancia máxima de las

antocianinas se desplaza hacia el extremo del rojo en la medida en que haya mayor sustitución (Cavalcanti y col., 2011).

Figura 6. Estructuras químicas de las antocianinas (Latti y col., 2009).



| R ₁ | R ₂ | Antocianina |
|------------------|------------------|-------------|
| OH | OH | Delfinidina |
| OH | H | Cianidina |
| OCH ₃ | OH | Petunidina |
| OCH ₃ | H | Peonidina |
| OCH ₃ | OCH ₃ | Malvidina |

2.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Un extracto vegetal es una mezcla compleja de sustancias presentes en una determinada planta, en la cual, se encuentran los metabolitos secundarios de la planta. En la industria farmacológica, los extractos vegetales tienen una gran aplicación, gracias a la variedad de principios activos (sustancias con propiedades farmacológicas). Según la OMS, el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Queipo y col., 2000).

Las sustancias químicas sintetizadas en el laboratorio, en su mayoría, resultan siendo tóxicas o presentan efectos secundarios poco deseables, por lo tanto, no pueden ser empleadas para el desarrollo de nuevos fármacos. Debido a estas consecuencias, muchas investigaciones, actualmente, se centran en la búsqueda de nuevas estructuras con actividad terapéutica, que puedan ser aisladas de extractos vegetales (Queipo y col., 2000).

2.5.1 Extracción con solventes. La extracción con solventes es una operación básica, cuya finalidad es la separación de uno o más componentes de una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. La extracción con disolventes o extracción sólido-líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso; así, se le conoce también como lixiviación, lavado, percolación, etc. (Walton e Irown., 1999). Entre las aplicaciones de esta técnica en la industria alimentaria se encuentran: extracción de aceites, grasas animales y vegetales, lavado de precipitados, obtención de extractos de materias vegetales, fabricación de té y bebidas orgánicas (Ibarz y Barbosa, 2005).

Se considera que el mecanismo de la extracción de un soluto contenido en una partícula sólida mediante un líquido, ocurre en tres etapas sucesivas hasta que se alcanza el equilibrio, a saber (Walton e Irown., 1999):

1. Cambio de fase del soluto: es el paso de soluto desde la fase sólida al líquido;
2. Difusión del soluto en el disolvente contenido en los poros del sólido: la transferencia del soluto desde el interior de la partícula sólida hasta su superficie, se realiza debido al gradiente de concentración existente entre la interfase sólido-líquido y la superficie exterior del sólido;
3. Transferencia del soluto desde la superficie de las partículas hasta el seno de la disolución: una vez que el soluto ha alcanzado la superficie de la partícula, se transfiere desde este punto hasta el seno de la disolución por un gradiente de

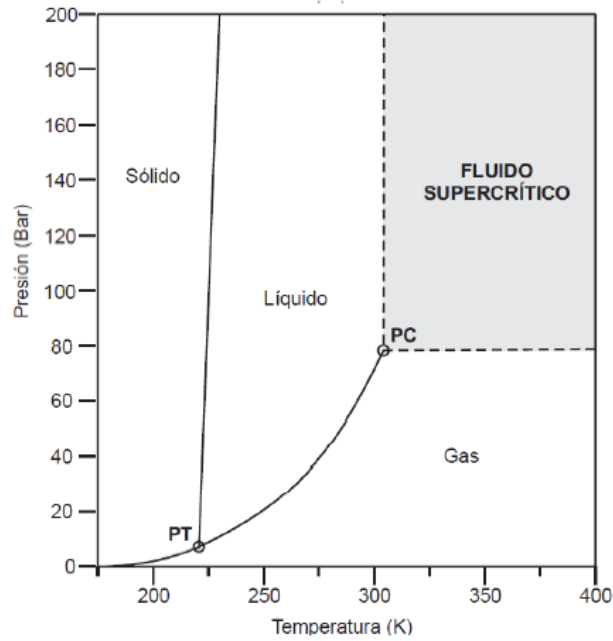
concentración, esta transferencia de materia se realiza por transporte molecular.

2.5.2 Extracción con fluido supercrítico. Un fluido supercrítico SF (*Supercritical Fluid*, por sus siglas en inglés) posee propiedades de disolvente, que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las de un gas (Walton e Irown., 1999). De esta manera, un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar más eficientemente en los poros de los sólidos. El solvente supercrítico más utilizado es el dióxido de carbono (CO₂), porque no es tóxico, no es inflamable y sus condiciones críticas se pueden alcanzar fácilmente con las tecnologías disponibles. Con esta técnica, se extraen tanto metabolitos secundarios volátiles como los semi-volátiles, también, de alto peso molecular (Diaz y col., 2006).

Utilizar un SF para la extracción de un analito determinado a partir de una materia prima, implica el reparto del fluido supercrítico en el material, seguido de un cambio de temperatura y presión que tienen como resultado el aislamiento del soluto puro por vaporización del CO₂ (Lang y Wai., 2001). Una de las ventajas de esta técnica, es que se lleva a cabo a bajas temperaturas, con lo cual, se evita la degradación térmica de los metabolitos y, por ende, los productos obtenidos presentan características físicas y organolépticas mejores (Reyes y Patiño, 2007).

El área sombreada en la **Figura 7** demarca la zona denominada de SF. Por lo tanto, éste se define como una sustancia sometida a condiciones de presión y temperatura por encima de sus valores críticos y cuya densidad es aproximada o mayor que su densidad crítica.

Figura 7. Diagrama de fases para el dióxido de carbono puro, PT: punto triple, PC: punto crítico (Walton e Irown., 1999).



2.5.3 Destilación-extracción con solvente simultánea. La técnica de destilación-extracción con solvente simultánea (SDE, por sus siglas en inglés) fue introducida en 1966 por Likens y Nickerson, en ella, se usan diferentes solventes orgánicos, con los cuales se pueden extraer o disolver sustancias sin reaccionar químicamente entre sí. La técnica combina la destilación por arrastre con vapor y la extracción líquido-líquido (Chacón y col., 2004), y requiere un extractor de destilación continua modificado a micro-escala para solventes de alta densidad (Godefroot y col., 1981), que consiste en un cuerpo Soxhlet, un dedo frio, un condensador, un balón y una lágrima que se encuentran conectados al cuerpo Soxhlet por vías diferentes. Con esta técnica, se obtienen los metabolitos volátiles y semi-volátiles [(Bartak y col., 2000), (Stashenko y col., 1996)].

2.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

Muchas de las técnicas disponibles para la separación y purificación de metabolitos secundarios de las plantas están relacionadas con la cromatografía. De hecho, los métodos de separación se pueden clasificar en dos grupos: cromatográficos y no cromatográficos. El primer grupo comprende, entre otros, métodos preliminares como la cromatografía en columna, CC (*Column chromatography*, por sus siglas en inglés) y la cromatografía en capa fina, TLC (*Thin Layer Chromatography*, por sus siglas en inglés), las cuales, complementadas, constituyen los métodos más empleados para aislar y purificar compuestos químicos en matrices sólidas o líquidas, durante experimentos a pequeña-mediana escala (≤ 20 g). Es importante resaltar, que la elección de la técnica de aislamiento dependerá exclusivamente de las características fisicoquímicas de los analitos que se van a separar (Dickson y col., 2004).

2.7 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Con el fin de realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *H. sabdariffa*, las muestras se sometieron a un proceso de separación cromatográfico, empleando una columna de carácter apolar. Se usó un detector de masas, MSD (*Mass Selective Detector*, por sus siglas en inglés). La cuantificación la fracción volátil y semi-volátil presente en los extractos obtenidos por SDE y SFE de la planta, se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama, FID (*Flame Ionization Detector*, por sus siglas en inglés), y para los extractos obtenidos con solventes, se cuantificó por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés).

2.7.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La introducción de la espectrometría de masas (MS) es un gran avance en el desarrollo de las técnicas analíticas, por su gran sensibilidad y su alto grado de fiabilidad. Su principal ventaja sobre otras técnicas de detección es, por un lado, su capacidad para suministrar información sobre la identidad del compuesto, por otro lado, la MS se presenta como uno de los métodos de detección más sensibles y específicos para el análisis molecular.

El acoplamiento de la cromatografía gaseosa (GC) con la MS es uno de los métodos más usados en química analítica instrumental. Esta metodología se considera una técnica robusta, utilizada de forma rutinaria en los laboratorios de análisis. El principio de operación de la MS, se basa en la generación de iones moleculares cargados positivamente y sus fragmentos a partir de moléculas provenientes de la columna GC, mediante el bombardeo con electrones. Los iones fragmento producidos, entran al filtro de masas, *i.e.*, cuadrupolo, donde son separados de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Después de la detección de los iones con un electro multiplicador, se obtiene la corriente iónica total, cromatograma, dando información sobre los tiempos de retención (t_R) de cada compuesto y sus espectros de masas, consistentes con sus patrones de fragmentación únicos. MS es un método de detección de alta sensibilidad con una cantidad pequeña en el rango de 0.1 a 1 ng por compuesto, que puede incrementarse en el modo de monitoreo del ion seleccionado (*SIM*), en el cual, se escogen los iones diagnóstico de un compuesto en particular (Stashenko y col., 2010).

De esta manera, la identificación de un compuesto, por GC-MS, se realiza por: (1) comparación de sus LRI (índices de retención lineales) con los de una sustancia de referencia o la reportada en las bases de datos y (2) con base en espectros de masas experimentales, comparándolos con los espectros de masas de bibliotecas de espectros, a saber: Adams, NIST, Wiley (Stashenko y col., 2009).

2.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia. El principal inconveniente de la cromatografía gaseosa es la dificultad en el análisis de determinados compuestos, por ejemplo sustancias poco volátiles, polares o termolábiles, para los cuales es necesaria la derivatización (Ardey, R., 2003).

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica de separación de analitos basada en la transferencia de masa entre la fase estacionaria y la fase móvil. Tras disolver la muestra, los analitos son arrastrados a lo largo de la columna por medio de la fase móvil a alta presión. Dado que los analitos tienen distintas interacciones con la fase móvil y la fase estacionaria, la mezcla aparece separada en sus componentes a la salida de la columna.

HPLC es la técnica más usada para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. En general, para el análisis de flavonoides, se ha empleado casi que exclusivamente la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), con columnas de sílice modificada con octilsilano (C₈) u octadecilsilano (C₁₈), largas, entre 100-300 mm, y con diámetro interno usualmente de 4.6 mm (Merken y Beecher, 2000).

En cuanto a los sistemas de detección, los más empleados son UV-Vis, arreglo de diodos (DAD) y MS. Todos los compuestos fenólicos contienen, por lo menos, un anillo aromático, en consecuencia, absorben luz ultravioleta (Merken y Beecher, 2000).

2.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Un antioxidante (AO) se define como cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones, en comparación con la del sustrato oxidable, inhibe o previene su oxidación. Los AO se clasifican de acuerdo con su origen, como naturales o sintéticos (Haliwell, 1990). Según Krinsky (1992) un antioxidante

biológico o natural es un “compuesto que protege sistemas biológicos en contra de los efectos dañinos potenciales de los procesos o reacciones que causen oxidación extensiva”, y es extraído a partir de plantas, tejidos animales, o producto del procesamiento de los alimentos; comúnmente son compuestos fenólicos, tales como tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos. Los compuestos sintéticos son igualmente compuestos fenólicos, pero a éstos, les han sido introducidos grupos alquílicos, para aumentar su solubilidad en grasas (Krinsky, 1992), (Exarchou y col., 2006).

Debido a la complejidad de los extractos de las plantas y alimentos, se han desarrollado varios métodos para cuantificar la actividad antioxidante, sin embargo, no existe un método estándar, único para esta determinación. Entre algunos ensayos, que se realizan para la determinación de la actividad antioxidante, se destacan aquellos cuyo mecanismo se da a través de reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), por ejemplo: el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) (Huang y col., 2005), el ensayo TRAP (parámetro antioxidante total de la captura de radicales), el ensayo IOU (inhibición de la absorción de oxígeno) (Re, y col., 1999). Otra clase de ensayos se dan a través del mecanismo de reacción de transferencia de un electrón (ET), por ejemplo: el ensayo TEAC (capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox), el ensayo DPPH (difenil-1-picrilhidracilo), entre otros (Sánchez y col., 2002), (Niki, y Noguchi., 2000).

2.8.1 Capacidad de absorción de radicales oxígeno. El ensayo ORAC es un método validado para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos y suplementos nutricionales. Se utiliza la fluoresceína (FL) como indicador, porque es un compuesto sintético con alto poder fluorescente a pH mayor que 7.0; con este método se evalúa la disminución de la fluorescencia de la FL con el tiempo, a medida que reacciona con los radicales peroxilo, en presencia de una molécula antioxidante (Huang y col., 2005). La velocidad de disminución de la

fluorescencia puede reducirse, debido a una competencia entre la FL y el compuesto antioxidante, por estabilizar los radicales peroxilo (Ou y col., 2001).

2.8.2 Método de Folin-Ciocalteu. Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, que contiene más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxilo. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y, por lo tanto, limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Martínez y col., 2002).

El método usado comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos es el de Folin-Ciocalteu, que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La intensidad de la absorbancia de este color es proporcional al número de grupos hidroxilo presentes en las moléculas (Julkunen, 1985) (Magalhães y col., 2010).

3. METODOLOGÍA

La parte experimental del trabajo se desarrolló según el esquema que aparece a continuación:

Figura 8. Metodología desarrollada en el proyecto



3.1 SIEMBRA DEL MATERIAL VEGETAL

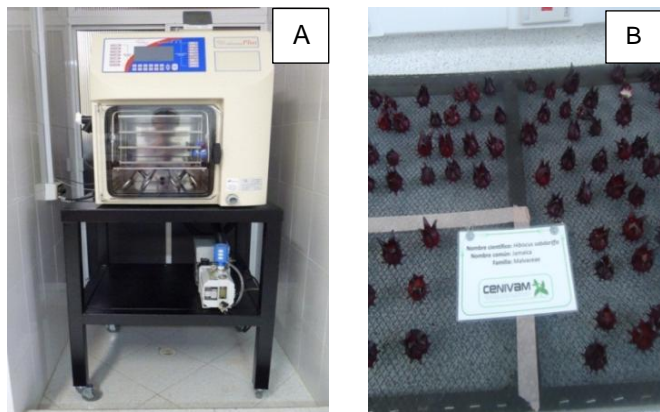
Para la siembra del material vegetal se dispuso de semillas de *Hibiscus sabdariffa* suministradas por el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, las cuales fueron sembradas en el vivero N° 2 durante 2 meses y, posteriormente, fueron trasplantadas a la zona de cultivos, donde crecieron hasta ser cosechadas después de los 9 meses.

3.2 RECOLECCIÓN Y SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Después de que los arbustos de *H. sabdariffa* dieron frutos, estos se recolectaron de la zona de cultivos experimentales ubicados en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander. Parte del material vegetal fue secado a la sombra, a temperatura ambiente, y otra parte, en un liofilizador de bandejas *Virtirs Advance Plus* (New York, EE.UU.) (Figura 9).

Se realizó una curva de secado, para las flores deshidratadas a la sombra, y otra, para las liofilizadas, con el fin de determinar el tiempo necesario para el secado del material vegetal. De igual forma, se determinó el porcentaje (%) de humedad relativa del material vegetal, después de someterlo al proceso de secado.

Figura 9. A). Equipo de liofilización; B). Secado del material vegetal a la sombra. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 14 de agosto de 2012.



Para determinar la humedad relativa remanente del material vegetal deshidratado se utilizó el Método de Secado al Horno, que consiste en poner 2 g de material vegetal en un crisol, previamente secado y pesado, e introducirlo en una estufa a 103°C durante 24 h; posteriormente, el crisol con la muestra es introducido en un desecador para que se enfríe lentamente, dejándolo 30 min, después de este proceso, se pesa rápidamente en una balanza analítica.

3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

El material vegetal recolectado se picó hasta llegar a un tamaño de partícula ca. 5 mm de diámetro. Posteriormente, se realizaron extracciones con fluido supercrítico, destilación-extracción con solvente simultánea y extracción con solventes.

3.3.1 Extracción con fluido supercrítico. Para la extracción con CO₂ supercrítico, se empleó un equipo de extracción a escala piloto *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc, Pittsburgh, PA, EE.UU.*) (Figura 10), equipado con un porta-muestra en acero inoxidable con capacidad para 2x10⁻³ m³; un sistema de

separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad para $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$; un regulador automático e independiente de temperatura y presión; bombas de alta presión *P-200A*, para el CO_2 ; y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo* tipo *MASS6000* (*Siemens AG*, Berlín, Alemania).

Figura 10. Equipo de extracción con fluido supercrítico *Thar SFE-2000*. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 10 de febrero de 2012.



Las condiciones de operación empleadas durante el proceso de extracción con fluido supercrítico, se encuentran reportadas en la **Tabla 2**. El experimento se realizó por triplicado.

Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción SFE.

| Parámetro | Valor |
|------------------------|----------|
| Material vegetal | 0,11 kg |
| Presión | 15 MPa |
| Temperatura | 323 K |
| Flujo de CO_2 | 20 g/min |
| Tiempo de extracción | 2 h |
| Co-solventen | Etanol |

El rendimiento de la extracción, se determinó con base en el peso inicial del material vegetal empleado y el peso del extracto obtenido, según la **Ecuación 1**.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde:

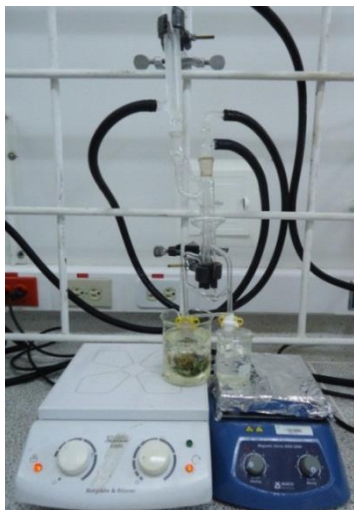
W_{AE} = Peso del extracto obtenido;

W_{MV} = Peso inicial del material vegetal deshidratado.

Finalmente, se tomaron 10 mg del extracto, se depositaron en un vial, se adicionaron 0.6 μ L de *Istd* (patrón interno, *n*-tetradecano). La mezcla anterior se aforó a 1 mL con metanol y se inyectó al GC-MS, para su análisis.

3.3.2 Extracción por destilación-extracción con solvente simultánea. En el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, se han realizado estudios con la técnica de destilación-extracción con solvente simultánea, utilizando un montaje similar al descrito por Godefroot, siguiendo una metodología descrita por Stashenko y col. (1996); en el cual, se conecta en la parte inferior del equipo de destilación continua a micro-escala, un balón con el material vegetal (6,5 g), en el que se adiciona agua como solvente (30 mL), por la otra salida inferior, se conecta un reservorio, que contiene diclorometano (Figura 11).

Figura 11. Equipo de destilación-extracción con solvente simultánea a micro-escala. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013.



3.3.3 Extracción con solvente. Se pesaron ca. 2 g de material vegetal liofilizado en dos vasos de precipitado y se adicionaron 20 mL de metanol y 20 mL de agua, respectivamente, en cada uno de los vasos. Se sometieron a sonicación con ultrasonidos por 15 min, seguidamente, se filtró el extracto en un embudo, por gravedad, con papel filtro; se repitió el procedimiento 24 veces (Figura 12), hasta que el extracto fuera incoloro. Los extractos obtenidos se concentraron por rotoevaporación a 35 °C y 800 mbar, se guardaron refrigerados a 7 °C. Este procedimiento se repitió utilizando material vegetal secado a la sombra.

Figura 12. Extracción con solventes: A). Primera extracción con metanol y agua. B) Extracción No. 24, donde se observa el extracto incoloro. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 5 de febrero de 2013.



3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Con el fin de realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por SFE y SDE de *H. sabdariffa*, las muestras se sometieron a un proceso de separación cromatográfica, empleando una columna apolar. Se usó un detector de masas, MSD. La cuantificación de los compuestos presentes en los extractos de la planta, se realizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama, FID.

3.4.1 Análisis por GC-MS en columna apolar. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890N Network GC System* (Figura 13) (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973*, con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7683B*. La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar con fase estacionaria apolar DB5-MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μm , d_f , con fase

estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio (He, 99.995%, Grupo Linde, Colombia) con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. La programación de temperatura en el horno fue de 45 °C (5 min), 120 °C (5 min) @ 4 °C/min, 150 °C (7 min) @ 5 °C/min, 275 °C (40 min) @ 10 °C/min.

Figura 13. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network GC System*. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013.



3.4.2 Sistema de adquisición de datos. Los espectros de masas se obtuvieron empleando el método de ionización con electrones, EI, con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 280°C. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas, TIC (*Total Ion Current*, por sus siglas en inglés) se obtuvieron mediante un analizador cuadrupolar, operado en modo de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*) a $4,75 \text{ scan s}^{-1}$, en el rango de masas de m/z 40-350 Da. Los datos cromatográficos y espectrométricos se obtuvieron y se procesaron con el sistema de datos *Chemstation* (G1701DA MSD).

3.4.3 Identificación. La identificación cualitativa de los compuestos en los extractos, se realizó por comparación de sus índices de retención lineales (LRI) y los espectros de masas experimentales, con los reportados en las librerías de compuestos Adams, NIST o Wiley (Stashenko y col., 2009).

Los LRI se calcularon con base en los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos lineales desde C₆ hasta C₂₅. Su determinación se realizó empleando la **Ecuación 2**.

$$\text{LRI} = 100n + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

LRI= Índice de retención lineal del compuesto de interés;

n = Número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

N= Número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés.

t_{RX}= Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{Rn} y t_{RN}= Tiempos de retención de *n*-alcanos que eluyen antes y después del compuesto de interés, respectivamente.

3.4.4 Cuantificación. La cuantificación de los compuestos presentes en las matrices se realizó por medio de la cromatografía de gases con el FID.

El análisis cuantitativo de los extractos se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890A Network GC System (Figura 14)* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un FID (250°C), con un puerto de inyección

split/splitless (250° C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7683B*. La separación de los analitos de las mezclas se realizó en una columna capilar de naturaleza apolar DB5-MS (J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) con dimensiones de 60 m x 0,25 mm, 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio (He, 99,995%, Grupo Linde, Colombia.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad de flujo constante de 1 mL min⁻¹. Las velocidades de flujos de gases de combustión en el detector de ionización en llama, FID, aire e hidrógeno, se mantuvieron a 300 y 30 mL min⁻¹, respectivamente; el gas auxiliar fue nitrógeno (N₂, 99,995%, Grupo Linde, Colombia), a 30 mL·min⁻¹. Los datos obtenidos fueron procesados por medio del *software GC ChemStation Rev. B.01.03 (204)*. La programación del horno fue de 45 °C (5 min), 120 °C (5 min) @ 4 °C/min, 150 °C (7 min) @ 5 °C/min, 275 °C (40 min) @ 10 °C/min.

La cuantificación de los metabolitos se realizó mediante el método de estandarización interna, empleando como patrón interno, *n*-tetradecano, según la **Ecuación 3**.

$$C_x = \frac{C_{Istd} \times A_x}{A_{Istd}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde:

C_x= Concentración (g/L) del analito en la muestra.

C_{Istd}= Concentración (g/L) del *Istd*.

A_x= Área (cuentas) del pico cromatográfico del analito.

A_{Istd}= Área (cuentas) del pico cromatográfico del *Istd*.

Figura 14. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890A Network GC System*. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013.



3.4.5 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia. Para el análisis de antocianinas se siguió la metodología descrita por De Ancos y col. (2000), con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies 1200*, (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), (Figura15), equipado con una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, y detectores UV-Vis y de arreglo de diodos, DAD, ATG1315B. La separación se realizó en una columna apolar *Agilent Technologies ZORBAX Extend C₁₈* de 250 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Fase móvil A fue acetonitrilo, fase móvil B fue ácido fosfórico al 1%; flujo de 1 mL/min, detección se realizó a 520 nm, temperatura 30°C.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas

| Tiempo (min) | Acetonitrilo, % | Ácido fosfórico al 1%, % |
|--------------|-----------------|--------------------------|
| 0-10 | 6 | 94 |
| 10-55 | 20 | 80 |
| 55-60 | 20 | 80 |

Figura 15. Cromatógrafo líquido *Agilent Technologies 1200 Series*. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 20 de enero de 2013.



3.5 AISLAMIENTO DE ANTOCIANINAS

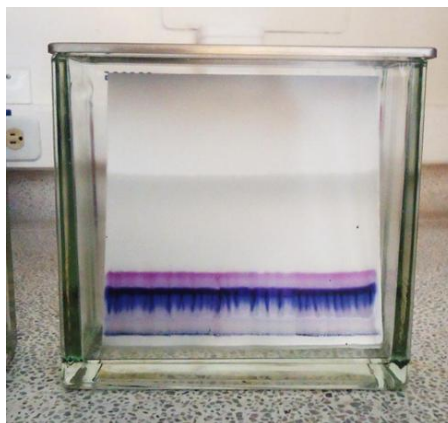
El aislamiento de las antocianinas principales (delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido) presentes en *H. sabdariffa*, se realizó a partir del extracto metanólico. Para ello, el desarrollo del proceso se dividió en tres etapas: (1) Purificación del extracto metanólico empleando extracción en fase sólida (SPE); (2) Selección de las condiciones de elución y separación por capa fina y (3) Caracterización química de las antocianinas por HPLC.

3.5.1 Purificación del extracto metanólico empleando extracción en fase sólida. La purificación de antocianinas se realizó por extracción en fase sólida, siguiendo la metodología descrita por De Ancos y col, 2000, con algunas modificaciones. A través de un cartucho apolar C₁₈ (matriz C₁₈ unida a sílice; de 300 mg, marca *Agilent*).

El acondicionamiento del cartucho se realizó pasando por él dos volúmenes de metanol, y tres volúmenes de agua ácida (0.01% de HCl en agua tipo HPLC v/v). Después se adicionaron 250 µL de extracto concentrado de flor de Jamaica, disuelto en agua tipo HPLC. El lavado se realizó con dos volúmenes de agua ácida (0.01% de HCl en agua tipo HPLC v/v) y para la elución de las antocianinas, se emplearon dos volúmenes de metanol ácido (0.01% de HCl en metanol v/v). Las antocianinas purificadas se concentraron con corriente de nitrógeno y se almacenaron a -20 °C.

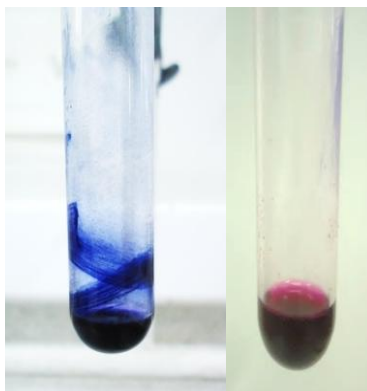
3.5.2 Selección de las condiciones de elución y separación por capa fina. El segundo paso fue la selección del sistema de elución para separar las antocianinas por TLC (*Thin Layer Chromatography*, por sus siglas en inglés). Las antocianinas obtenidas en la Sección 3.5.1, se disolvieron en 0.5 mL de metanol. La separación de antocianinas del extracto metanólico de flor de Jamaica, se realizó usando como fase estacionaria placas de silica gel 60 F₂₅₄ TLC de aluminio de 20 x 20 cm (marca Merck), y la fase móvil fue una solución de butanol: agua: ácido acético, en relación 4:2:1 (v/v). Las placas se eluyeron en una caja Coplin (Figura 16) hasta observar que el frente del solvente recorriera la placa y se tuviera una buena separación.

Figura 16. Elución de una placa cromatográfica en caja Coplin. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 30 de agosto de 2013.



Posteriormente, se raspó la franja azul-violeta y la franja roja por separado; cada fracción se depositó en un Erlenmeyer, se le adicionó metanol, se taparon con papel aluminio y se pusieron en agitación durante 30 min. Después, cada fracción se filtró en un embudo por gravedad, se recolectó en un tubo de ensayo cada una de las fracciones y se concentraron con corriente de nitrógeno a sequedad (**Figura 17**).

Figura 17. Compuestos separados por cromatografía en capa fina. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 3 de septiembre de 2013.



3.5.3 Caracterización y cuantificación química de antocianinas. La caracterización y cuantificación de las antocianinas, se realizó por HPLC-DAD. Las condiciones del proceso de separación se reportan en la Sección 3.4.5.

La elucidación de los compuestos aislados se determinó por comparación del perfil antociánico de la flor de Jamaica obtenido por HPLC, con el reportado en la literatura por Wong y col. (2002); Sukwattanasinh y col. (2007). Los datos obtenidos fueron procesados por medio del *software Agilent Chem Station LC version B.04.03-SP1*.

La cuantificación se realizó empleando el método de estándar externo. Las curvas de calibración se realizaron con concentraciones diferentes (500-4000 ppm) de los compuestos aislados y purificados, que fueron empleados como patrones de referencia.

3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para el desarrollo del ensayo ORAC, se empleó el equipo lector de microplacas de 96 pozos (**Figura 18**), en el módulo de fluorescencia, con filtros que manejan longitudes de onda de $\lambda = 490$ nm, de excitación, y $\lambda = 510-570$ nm, de emisión. La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por SFE, con solventes y de las antocianinas aisladas, se midió por la inhibición en la disminución de la fluorescencia según la metodología reportada por Ou y col., (2001), para este propósito, se utilizó la fluoresceína como indicador molecular y el blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por el AAPH. La protección antioxidante se midió a partir de la diferencia entre el área de fluorescencia bajo la curva (ABC) de cada muestra y el ABC del blanco. El área neta obtenida se utilizó para calcular los $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto, previa realización de una curva de calibración. El cálculo se realizó con base en la **Ecuación 4**. Cada medición se hizo por triplicado

y los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar. (Arias, G., 2012).

$$ABC = 1 + F_i/F_0 \quad \text{Ecuación 4.}$$

En donde:

F_i = Fluorescencia en el tiempo i ;

F_0 = Fluorescencia en el tiempo inicial (0 min).

El valor neto de ABC se obtuvo restando el ABC blanco de la reacción al ABC de cada una de las mediciones, según la **Ecuación 5**.

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{muestra}} - ABC_{\text{blanco}} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Figura 18. Equipo lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. Fotografía tomada por la autora en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, 23 de agosto de 2013.



3.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Para el desarrollo del ensayo Folin-Ciocalteu, se empleó el equipo lector de microplacas de 96 pozos (**Figura 18**), en el módulo de absorbancia; este método es usado comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla, color amarilla, que contiene ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico, los cuales en medio básico se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos cromógenos de color azul intenso de molibdeno (Mo_8O_{23}), y de wolframio (W_8O_{23}); la absorbancia se midió a 750 nm y la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos (Kuskoski y col., 2005).

Se usó ácido gálico como patrón de referencia, para realizar la curva de calibración. La concentración de fenoles totales se expresó en mg de ácido gálico/g de extracto. Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar (Arias, G., 2012).

Las determinaciones se hicieron en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader*, con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, que se encuentra equipado con módulos de absorbancia (UV-Vis) y fluorescencia (*Turner Biosystems, CA, EE.UU*) (**Figura 18**).

Los resultados obtenidos de los ensayos de ORAC y Folin-Ciocalteu se compararon con los obtenidos de patrones certificados de antioxidantes sintéticos: el BHT y el α -tocoferol.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este trabajo, se desarrolló en 4 etapas experimentales: 1). Siembra, recolección y secado del material vegetal. 2). Aislamiento y caracterización de los extractos de *H. sabdariffa* obtenidos por diferentes técnicas. 3). Aislamiento de delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido (antocianinas principales de la flor de Jamaica). 4). Evaluación de la actividad antirradicalaria y contenido total de fenoles en los extractos obtenidos con solventes y CO₂ supercrítico. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en esta investigación, con su respectivo análisis.

4.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE *H. sabdariffa* L.

En el presente trabajo, se realizó la identificación botánica de la especie en estudio, que fue cultivada en parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. Para esto, una exsiccata de planta completa se envió al Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de Colombia. Los resultados de la identificación botánicas se muestran en la **Tabla 4**.

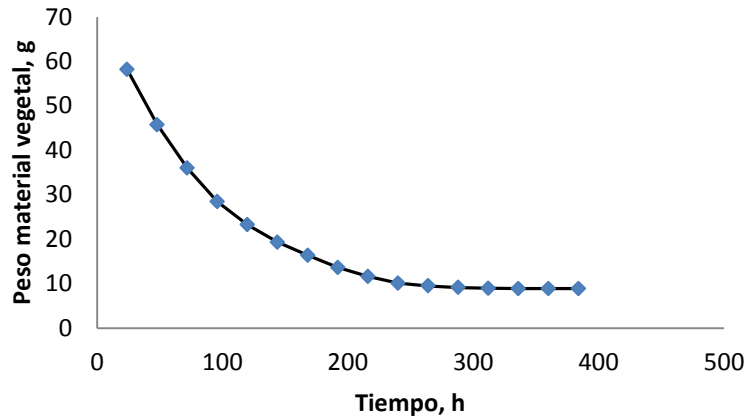
Tabla 4. Identificación taxonómica de *Hibiscus sabdariffa* L.

| Nombre común | Especie | Familia | No. COL |
|-----------------|-------------------------------|----------|---------|
| Flor de Jamaica | <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Malvacea | 568236 |

4.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

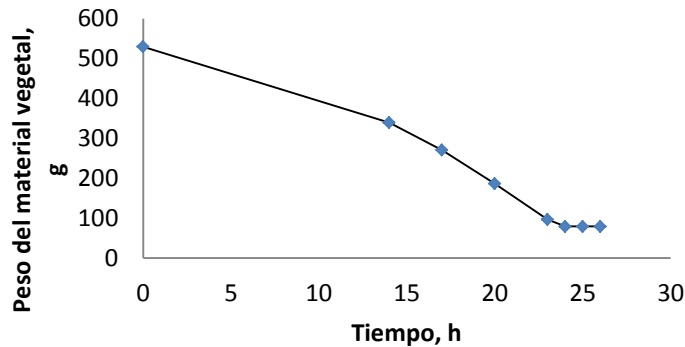
A continuación, se muestra la curva de secado, construida con los datos experimentales obtenidos después de someter el material vegetal de *H. sabdariffa* a un proceso de secado a la sombra (**Figura 19**).

Figura 19. Curva de secado a la sombra de la especie *H. sabdariffa*.



En la **Figura 20**, se muestra la curva de secado, construida con los datos experimentales obtenidos después de someter el material vegetal de *H. sabdariffa* a un proceso de liofilización.

Figura 20. Curva de secado por liofilización de la especie *H. sabdariffa*.



En las **Figuras 19** y **20**, se muestra el cambio del peso durante el proceso de secado de la planta, con respecto al tiempo. Como se puede observar, para secar la planta a la sombra, fueron necesarias 336 h (ca. 14 días), mientras que para secar por liofilización solo se requirieron 24 horas (ca. 1 día), es cuando se alcanza la humedad de equilibrio, la cual se define como la humedad más baja que puede conservar un material, en función de la humedad relativa del aire que rodea la muestra.

Para determinar el % de humedad relativa en las muestras, se empleó la **Ecuación 6**

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{P_w - P_d}{P_d} * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

P_w = Peso del material vegetal humedo (g)

P_d = Peso del material vegetal seco.(g)

Teniendo en cuenta la **Ecuación 6**, el material vegetal secado a la sombra presentó un 15% de humedad, lo que significa que desde el momento en que se inició el secado a la sombra, la planta perdió un 85% en peso. Por otra parte, el material vegetal liofilizado perdió un 90% en peso, mientras que el 10% correspondía a la masa del material vegetal.

Es importante tener en cuenta, que el material vegetal secado a la sombra presentó un porcentaje de humedad mayor, comparado con el liofilizado, debido a que la planta secada a la sombra se encontraba en un espacio abierto, razón por la cual, el contenido de humedad final de la misma, está sujeto a las variaciones de la humedad relativa del ambiente.

4.3 ANÁLISIS POR GC-MS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE *Hibiscus sabdariffa* L., OBTENIDOS POR SFE Y SDE

Los extractos fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa GC-MS, usando los parámetros experimentales descritos en la Sección 3.4.1. En los extractos de flores liofilizadas y secadas a la sombra obtenidos por SDE, se detectaron 32 compuestos, respectivamente, de los cuales se pudieron cuantificar 22 compuestos, en concentración mayor de 1 ppm. Entre

los compuestos, se lograron identificar derivados de ácidos grasos, derivados de azúcares, derivados fenólicos, terpenos, entre otros. En la **Figura 21**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS, de cálices de *H. sabdariffa* liofilizadas y secadas a la sombra. La identificación de los picos cromatográficos, se reporta en la Tabla 5.

Figura 21. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de *H. sabdariffa*. A). Extracto obtenido por SDE de flores secadas a la sombra. B). Extracto obtenido por SDE de flores liofilizadas. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

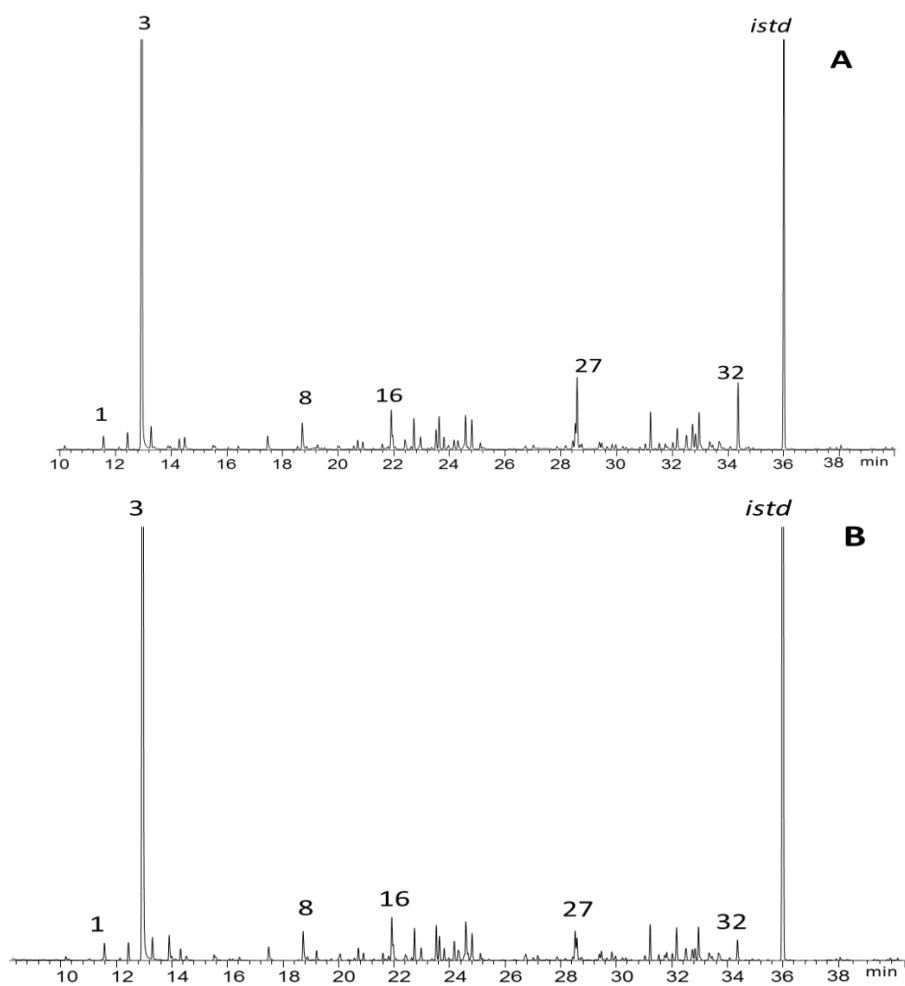


Tabla 5. Identificación, concentración (ppm) de los componentes presentes en los extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

| No. Pico | Compuesto | LRI | | | Concentración, ppm | |
|-------------|--|--------|-------|--------------------------------|--------------------|-------------|
| | | DB-5MS | | | Sombra | Liofilizada |
| | | Exp. | Lit.* | Ref. | | |
| Valor | Valor | Ref. | | | | |
| 1 | Hexanal | 801 | 800 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 2 | 2,4-Dimetilheptano | 822 | 822 | Xu. y col. (2003) | 4,1±0,4 | 5,6±0,9 |
| 3 | Furfural | 834 | 830 | Adams, P.(2004) | 164±8,2 | 127±8,9 |
| 4 | 2,4-Dimetilhepteno | 842 | 842 | Alissandrakis y col. (2005) | 23±2,6 | 38±2,4 |
| 5 | 2-Hexenal | 853 | 854 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 6 | 4-Metiloctano | 863 | 862 | Wang. y col. (1994) | 2,3±0,2 | 3,9±0,7 |
| 7 | Heptanal | 902 | 899 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 8 | 5-Metilfurfural | 962 | 962 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 9 | Benzaldehído | 965 | 961 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 10 | 2,2,6-Trimetil-6-(vinil-2H)tetrahidropirano | 973 | 960 | Chen, y col. (1998) | trazas | 3,1±0,1 |
| 11 | Sulcatona | 985 | 985 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 12 | 2-Pentil furano | 992 | 992 | Pino. y col. (2005) | trazas | trazas |
| 13 | Octanal | 1003 | 1001 | Adams, P.,(2004) | trazas | trazas |
| 14 | <i>p</i> -Cimeno | 1028 | 1026 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 15 | Limoneno | 1030 | 1031 | Adams, P.(2004) | 12,4±0,4 | 15,1±0,1 |
| 16 | Eucaliptol | 1037 | 1033 | Adams, P.(2004) | 4,1±0,2 | 4,9±0,4 |
| 17 | N.I. | 1059 | | | 6,3±0,2 | 9,8±0,8 |
| 18 | 2,2-Dimetil-5-(1-metilpropil) tetrahidrofurano | 1065 | 1065 | Chen, y col. (1998) | 2,5±0,1 | 4,3±0,4 |
| 19 | <i>cis</i> -Óxido de linalol | 1074 | 1074 | Adams, P.(2004) | 12,9±0,4 | 16,8±0,3 |
| 20 | N.I. | 1081 | - | | 3,9±0,2 | 5,6±0,3 |
| 21 | <i>trans</i> -Óxido de linalol | 1090 | 1088 | Adams, P.(2004) | 3,3±0,3 | 4,7±0,2 |
| 22 | <i>p</i> -Cimeno | 1093 | 1089 | Adams, P.(2004) | 2,9±0,1 | 7,4±0,1 |
| 23 | N. I. | 1096 | - | | 2,2±0,1 | 4,2±0,2 |

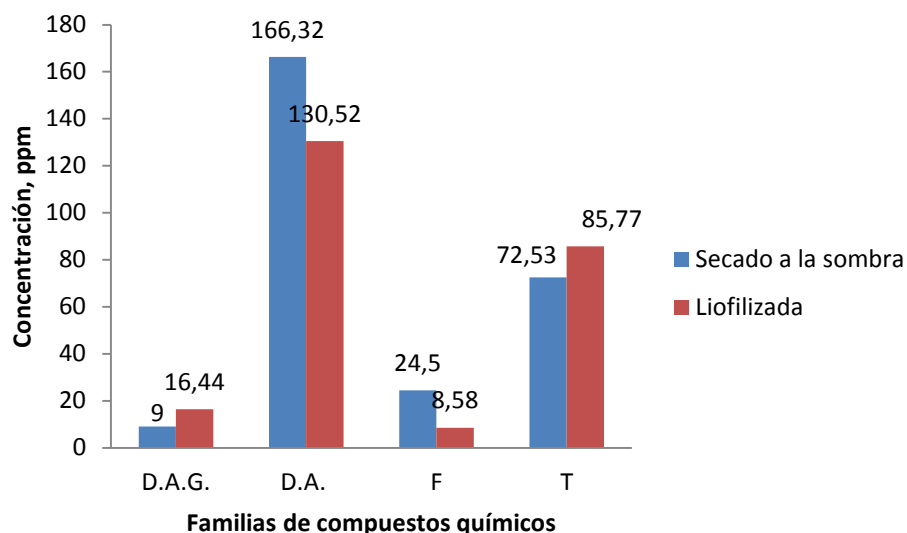
| No. Pico | Compuesto | LRI DB-5MS | | | Concentración, ppm | |
|-------------|----------------------|---------------|-------|------------------------------|--------------------|-------------|
| | | Exp. | | Lit.* | Sombra | Liofilizada |
| | | Valor | Valor | Ref. | | |
| 24 | Linalol | 1099 | 1098 | Adams, P.,(2004) | 11±1,3 | 17,2±3,1 |
| 25 | Nonanal | 1108 | 1108 | Zehentbauer. y col., 2002 | 7±1,2 | 9±1,9 |
| 26 | Salicilato de metilo | 1198 | 1190 | Adams, P.(2004) | 8,5±0,3 | 12,8±0,2 |
| 27 | α-Terpineol | 1200 | 1207 | Hognadottir y col. (2003) | 12±2,5 | trazas |
| 28 | Metil chavicol | 1202 | 1195 | Adams, P.(2004) | trazas | trazas |
| 29 | N.I. | 1280 | - | | 9,3±0,3 | 13,5±0,1 |
| 30 | Timol | 1290 | 1290 | Adams, P.(2004) | 1,6±0,1 | trazas |
| 31 | Carvacrol | 1300 | 1298 | Adams, P.(2004) | 6,2±0,2 | 9,8±0,9 |
| 32 | Eugenol | 1366 | 1356 | Adams, P.(2004) | 25±4,1 | 8,6±1,1 |

Exp: Índice de retención lineal calculado con la **Ecuación 3**.

*Lit: Índice de retención lineal tomado de la literatura

La composición del extracto de *H. sabdariffa* L. se caracterizó principalmente, por la presencia de derivados de azúcares, compuestos terpénicos, derivados de ácidos grasos y derivados fenólicos. Las distintas familias de compuestos químicos se representan en la **Figura 22**.

Figura 22. Clasificación por familias de compuestos químicos presentes en el extracto de *H. sabdariffa* liofilizada o secada a la sombra. D.A.G: Derivados de ácidos grasos; D.A: Derivados de azúcares; F: Derivados fenólicos; T: Terpenos.



En la **Figura 22**, se puede observar que los derivados de los azúcares, constituyen la familia de componentes mayoritarios en el extracto obtenido por SDE, tanto para las flores liofilizadas, como para secadas a la sombra. El furfural, para ambos casos, fue el compuesto mayoritario (164 y 127 ppm). Este compuesto no hace parte del metabolismo secundario de la planta, por el contrario, su presencia, se puede explicar a través de la degradación de los carbohidratos (Antal y col., 1990, 1991). La formación del furfural puede resultar por dos vías, a saber: 1). Por medio de la reacción de Maillard (Kroh, 1994) o 2) Por deshidratación de pentosa y hexosa (Antal y col., 1990, 1991).

Una posible hipótesis, para explicar que la cantidad de furfural es más alta, en el extracto de flores deshidratadas a la sombra, puede ser que el proceso de su formación es lento y demanda mucho más tiempo en comparación con el proceso de liofilización, por lo tanto, el agua presente en la matriz vegetal, se va eliminando lentamente, hasta que el contenido de humedad de la planta se equilibra con la humedad del ambiente, dando lugar a procesos enzimáticos y de degradación de carbohidratos. Eichner y col. (1972), en su investigación, afirman que el contenido de agua puede acelerar el proceso de degradación de azúcares, tal como se aprecia para los resultados obtenidos por medio del secado a la sombra.

El proceso de liofilización, por el contrario, es un método, que opera en condiciones controladas y a bajas temperaturas, eliminando el agua presente en la matriz vegetal y reduciendo las pérdidas de los componentes termo-sensibles (Abascal y col., 2005); es posible, que por este método de secado, haya menor actividad enzimática en la planta deshidratada, ya que el contenido de humedad se reduce drásticamente. Otros autores aseguran que la liofilización, a menudo, altera el perfil de volátiles de las plantas y, a veces, puede aumentar significativamente su cantidad o, al contrario, degradarlos (Bos y col., 2002; Díaz y col., 2003).

Es necesario tener en cuenta que, como los extractos se obtuvieron a través de destilación-extracción con solvente simultánea, en la cual se empleó un baño de aceite con temperatura superior a los 100°C, es posible, que también la formación de furfural se hubiese dado, a través de la reacción de Maillard, porque Kroh. L. (1994), afirma que la reacción de Maillard procede eficazmente a temperaturas >50°C y es favorecida a pH 4-7, es decir, en el intervalo de pH de la planta.

Una segunda familia de compuestos presentes en los extractos obtenidos por SDE, son los terpenos. Es posible apreciar, según la **Figura 22**, que estos compuestos se encontraron en mayor proporción en el extracto obtenido de

material liofilizado, debido a que se logró preservar mejor la fracción volátil por este método de deshidratación, con respecto al secado realizado a la sombra, donde su cantidad se ve disminuida, porque el material vegetal estuvo expuesto al ambiente, durante un periodo de 15 días, cuando algunos compuestos se pudieron haber perdido por volatilidad. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, con respecto a los publicados por Chen y col. (1998) son congruentes, a pesar de que estos autores emplearon otros métodos de secado (secado en estufa a diferentes temperaturas) para el análisis de volátiles en té de *H. sabdariffa*. Yousif y col. (2000) reportaron que el contenido de timol, en orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) había incrementado después de someter el material vegetal a liofilización, con respecto a otros métodos de secado, como el secado en estufa a diferentes temperaturas, lo cual está de acuerdo con lo que afirman Bos y col. (2002); Díaz y col. (2003), pues constatan, que la liofilización a menudo altera el perfil de volátiles de las plantas.

Los extractos de *H. sabdariffa* obtenidos por SFE presentan un olor característico a “vino”; son de consistencia viscosa y de color amarillo-verdoso. Los rendimientos de los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico, se encuentran tabulados en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos de extracto de flor de Jamaica, obtenidos con fluido supercrítico (SFE).

| Muestra | Cantidad de material utilizado, g | Humedad, % | Extracto obtenido, g | Rendimiento, %* |
|-------------------------|-----------------------------------|------------|----------------------|-----------------|
| Flor liofilizada | 110.89 | 10 | 0.30 | 0.30 |
| Flor secada a la sombra | 110.89 | 15 | 0.36 | 0.38 |

*El rendimiento fue calculado en base seca.

En los extractos obtenidos por SFE de flores liofilizadas y secadas a la sombra se identificaron 15 compuestos, de los cuales fue posible cuantificar 10 compuestos, en concentraciones mayores de 3 ppm. Entre los componentes mayoritarios identificados se destacan dos familias, una, de triterpenos (α -amirin) y la otra, de ácidos grasos (palmitato de etilo, linoleato de etilo, entre otros). En la **Figura 23**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS, del extracto obtenido con CO₂ supercrítico de cálices de *H. sabdariffa* liofilizadas y secadas a la sombra. La identificación de los picos cromatográficos, se reporta en la **Tabla 7**.

Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de los metabolitos secundarios aislados de *H. sabdariffa*. A). Extracto obtenido por SFE de flores secadas a la sombra. B). Extracto obtenido por SFE de flores liofilizadas. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

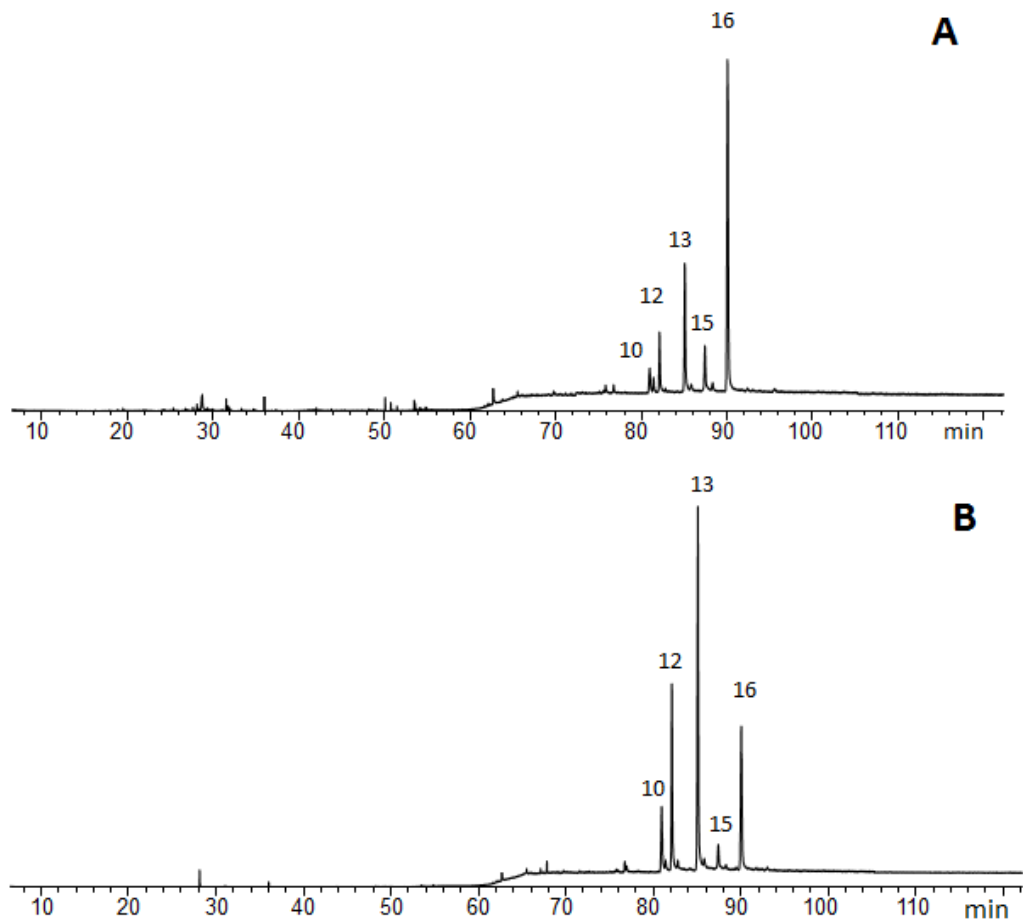


Tabla 7. Identificación y concentración (ppm) de los componentes principales del extracto de *Hibiscus sabdariffa* L. obtenido por SFE

| No. Pico | Compuesto | LRI DB-5MS | | Concentración, ppm | |
|----------|--|------------|------|--------------------|-------------|
| | | Exp. | Lit* | Secado a la sombra | Liofilizada |
| 2 | 5-(Hidroximetil)-2-(dimetoximetil)furano | 1283 | | trazas | trazas |
| 3 | Carvacrol | 1300 | 1299 | trazas | 17,7±0,2 |
| 4 | Palmitato de metilo | 1924 | 1927 | 5,5±0,7 | 8,4±0,7 |
| 5 | Palmitato de etilo | 1992 | 1993 | 6,4±2,2 | 63±9,2 |
| 6 | Linoleato de metilo | 2094 | 2092 | 9±1,2 | 10,6±1,3 |
| 7 | Oleato de metilo | 2100 | 2103 | 15,5±2,9 | 3,7±0,4 |
| 8 | Linoleato de etilo | 2159 | 2159 | 19,3±3,4 | 76±8,1 |
| 9 | α-Tocoferol | 3129 | 3131 | trazas | 3,6±0,6 |
| 10 | Δ ⁵ -campesterol- | 3231 | | trazas | trazas |
| 11 | EPIENDESMIN | 3240 | | trazas | trazas |
| 12 | Estigmasterol | 3255 | | trazas | trazas |
| 13 | γ- Sitosterol | 3314 | | 6,6±0,2 | 6,9±0,1 |
| 14 | Fucosterol | 3326 | | 18±3,0 | 7,7±0,1 |
| 16 | α-Amirin | 3399 | | 104,±1,0 | 10,9±0,5 |

Exp: Índice de retención lineal calculado con la **Ecuación 3**.

*Lit: Índice de retención lineal tomado de la literatura (Adams, 2004).

Según Reverchon y col. (2006), en el proceso de extracción con fluido supercrítico, el aumento de la presión y una temperatura constante, conduce a un mayor rendimiento, debido al aumento de la densidad del solvente. Sin embargo, las extracciones realizadas a 15 MPa y 323 K, presentaron rendimientos bajos comparados con los reportados por Lukmanto y col. (2013), quienes hicieron un diseño experimental, para la extracción de compuestos fenólicos a partir de flor de Jamaica: esto se debe principalmente al tamaño del equipo usado en esta investigación. Meireles y col. (2005) estudiaron el escalamiento del proceso SFE, determinaron que el principal inconveniente en los equipos a escala piloto, es la pérdida de extracto en las paredes de las tuberías. Debido al empleo de altas presiones (15MPa), se esperaba extraer compuestos de alto peso molecular,

especialmente, flavonoides, pero con las condiciones empleadas no se logró su aislamiento, sin embargo, se extrajeron ácidos grasos, fitosteroles y triterpenos, que también son compuestos apolares de alto peso molecular. La identificación de los fitosteroles y de los triterpenos se realizó únicamente por comparación de los espectros de masas con los reportados en las base de datos *Adams, Nist y Wiley*, debido a que no se encuentran bases de datos donde se reportan los LRI de estos compuestos. Los espectros de masa de los compuestos identificados a través de bases de datos, se encuentran en el **Anexo 1**.

4.4 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTE

Los extractos obtenidos con solvente (metanol y agua) no se pueden analizar por GC-MS, ya que se extraen analitos de alto peso molecular, termolábiles y no volátiles, por lo tanto, fue necesario analizar estos extractos por cromatografía líquida. Para realizar dicho análisis, hay que contar con patrones de referencia, con los cuales se pueda identificar por comparación de los tiempos de retención y del espectro UV-Vis los analitos presentes en la matriz vegetal. Por tal motivo, se optó por aislar las antocianinas mayoritarias presentes en *H. sabdariffa*, para compararlas con el perfil antociánico de *H. sabdariffa*. El perfil antociánico es un término que se refiere al patrón de las antocianinas presentes en un material biológico. Las condiciones experimentales que se siguieron para su aislamiento se encuentran en la Sección 3.5.

Comparando el perfil antociánico obtenido (**Véase Figura 24**) con el reportado en la literatura por Wong y col. (2002) y Sukwattanasinh T. y col. (2007), en la **Figura 25** se identifican las dos antocianinas más representativas de *H. sabdariffa*.

Figura 24. Perfil de antocianinas obtenido por HPLC-DAD de la flor de Jamaica a 520 nm en un extracto metanólico, columna ZORBAX Extend C₁₈.

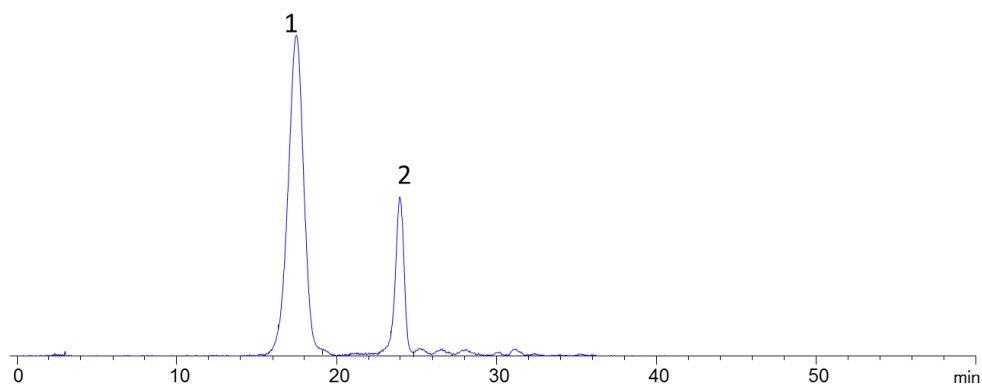
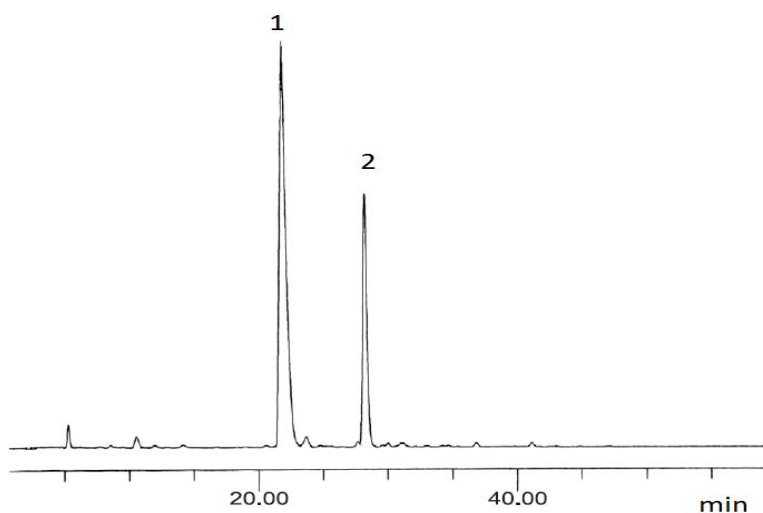


Figura 25. Perfil de antocianinas de la flor de Jamaica a 520 nm reportado por Wong y col. (2002) y Sukwattanasinh T. y col. (2007).



De acuerdo con lo reportado por Francis y col. (1973), Wong y col. (2002), Sukwattanasinh T. y col. (2007) los picos son identificados como: 1). Delfinidina-3-sambubiosido (**Figura 26**) y 2). Cianidina-3-sambubiósido (**Figura 27**); de igual forma, reportan el compuesto 1, como el mayoritario seguido del 2. Sin embargo, para realizar la cuantificación de estas antocianinas, fue necesario aislarlas.

Figura 26. Estructura química de delphinidina-3-sambubiosido.

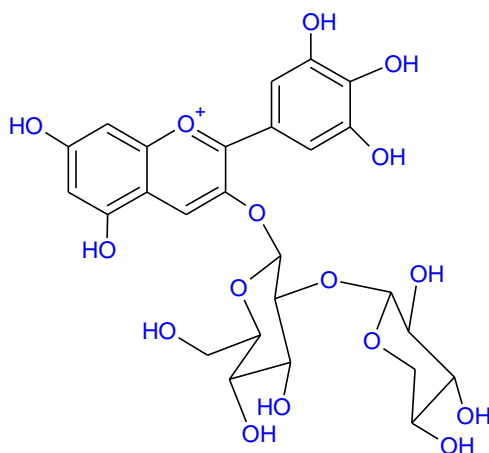
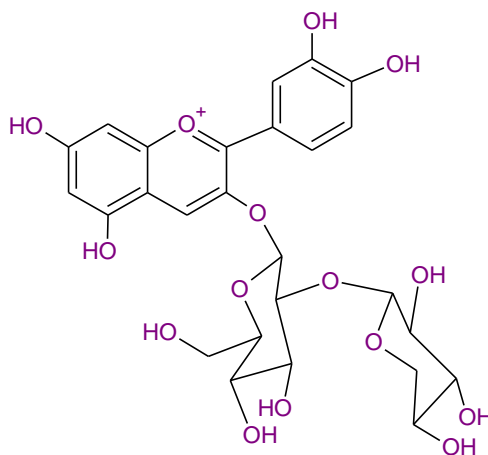
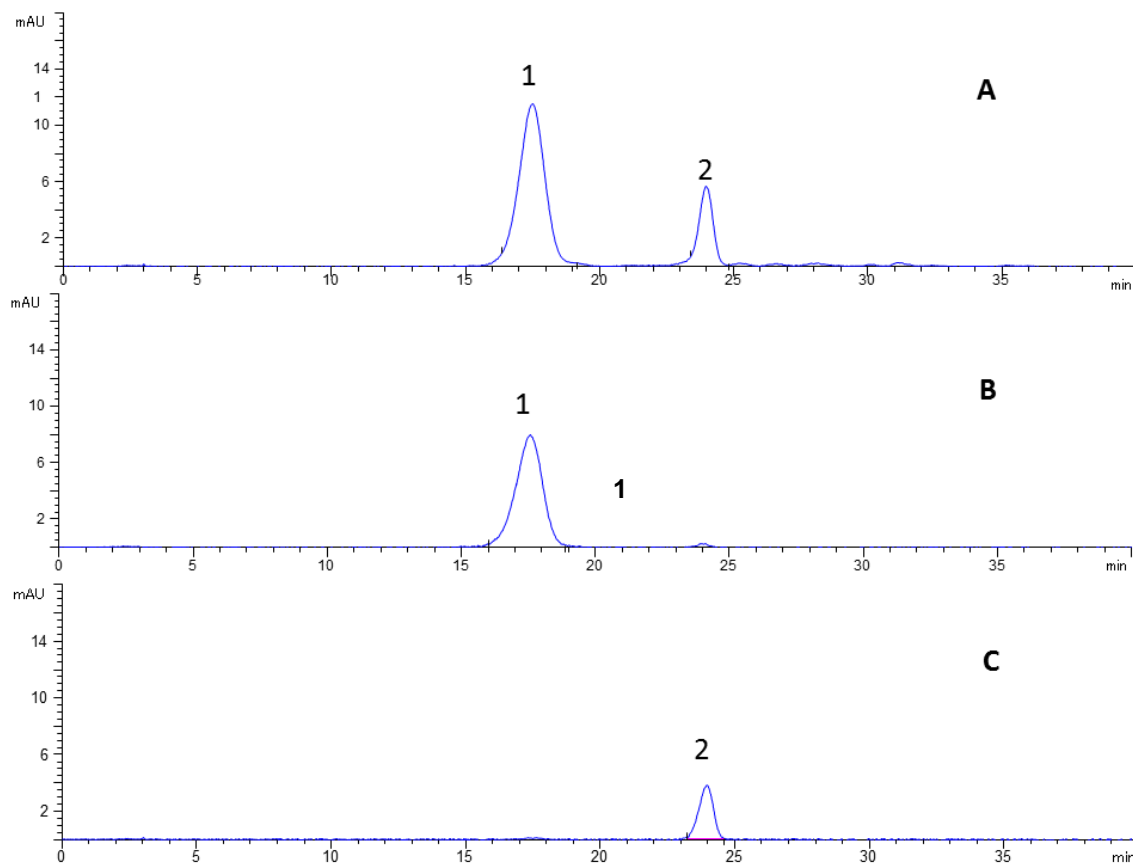


Figura 27. Estructura química de cianidina-3-sambubiosido.



En la **Figura 28**, se presenta el perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD de: A). Mezcla de antocianinas; B). Compuesto 1 (delphinidina-3-sambubiosido); C). Compuesto 2 (cianidina-3-sambubiosido), aisladas por TLC del extracto metanólico de *H. sabdariffa*

Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis a 520 nm, A). Mezcla de antocianinas; B) Compuesto 1 (delfinidina-3-sambubiosido); C). Compuesto 2 (cianidina-3-sambubiosido).

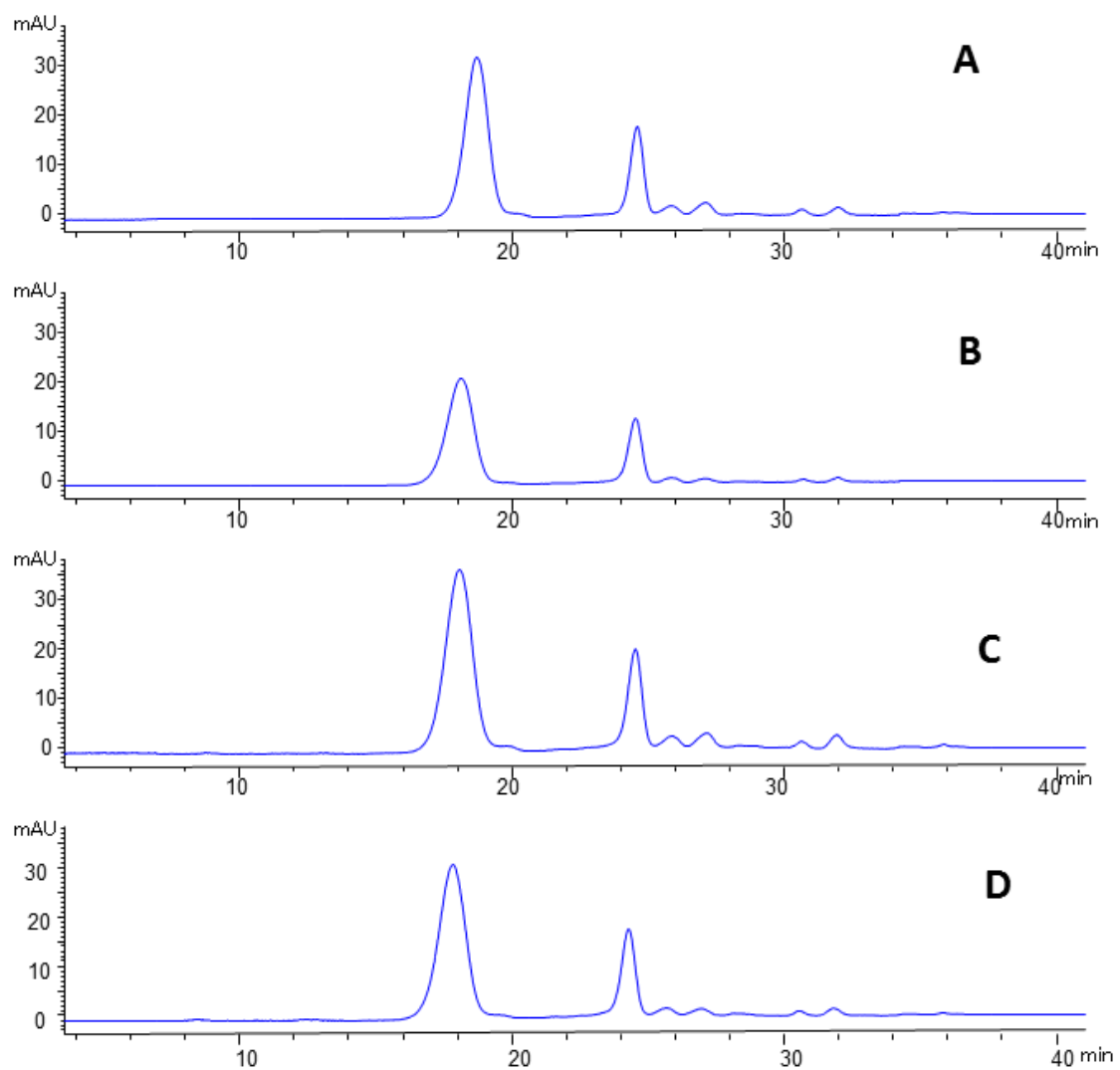


En la **Figura 28-B** se observa un pico cromatográfico intenso (98% de pureza), junto con una pequeña impureza correspondiente a la cianidina-3-sambubiosido. En la **Figura 28-C** se registra un pico cromatográfico intenso (98% de pureza), junto con una pequeña impureza correspondiente a la delfinidina-3-sambubiosido.

De igual forma, en la **Figura 29**, se muestran los cromatogramas obtenidos para los dos sistemas de extracción, ya mencionados en la Sección 3.3.3. Se observa, que el perfil antociánico, obtenido a 520 nm, presenta el mismo comportamiento

para dos disolventes, lo que permite identificar los mismos componentes en todos los extractos, observándose que lo único que cambia, es su concentración.

Figura 29. Perfil cromatográfico de extractos de cálices de *H. sabdariffa*, obtenido por HPLC-DAD-UV-Vis, a 520 nm. A). Extracto metanólico de flores secadas a la sombra; B). Extracto acuoso de flores secadas a la sombra; C). Extracto metanólico de flores liofilizadas; D). Extracto acuoso de flores liofilizadas.



Usando diferentes concentraciones de los compuestos aislados, se construyeron las curvas de calibración del método de cuantificación externa y se realizó la validación de la misma (Figuras 30 y 31).

Figura 30. Curva de calibración para el compuesto 1 (Delfinidina-3-sambubiosido)

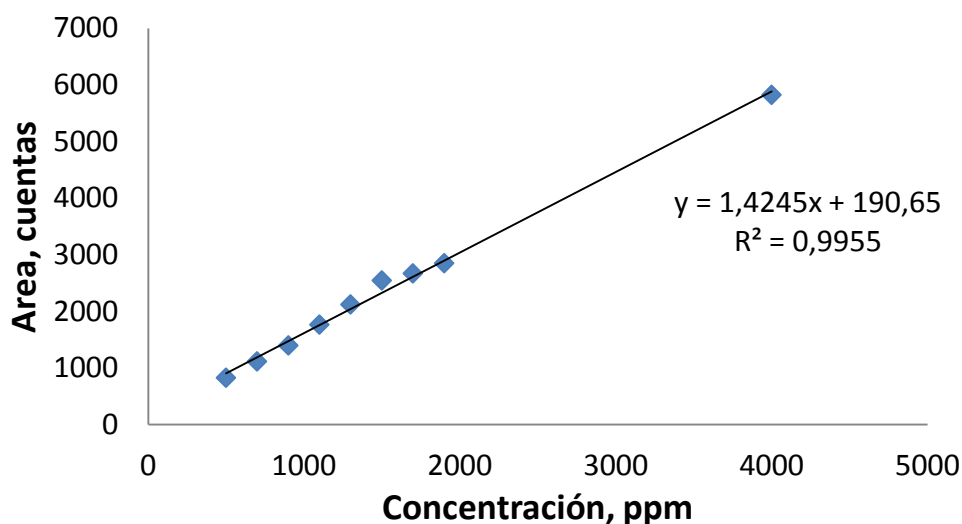
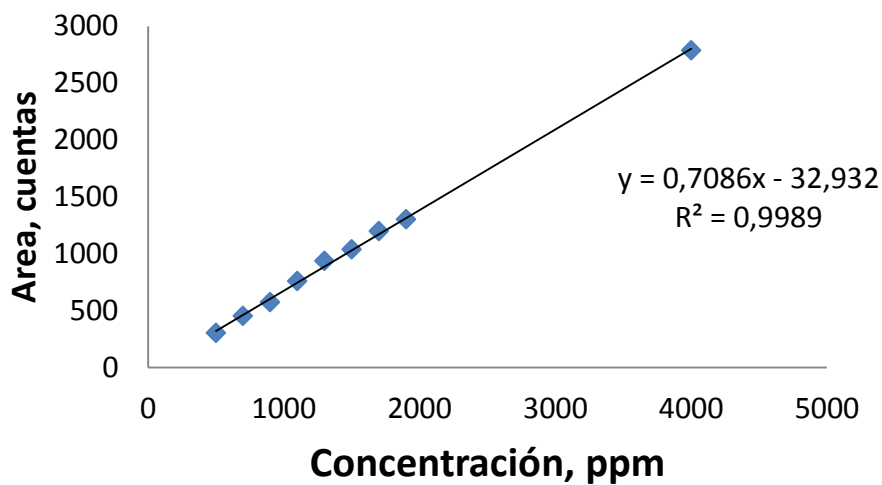


Figura 31. Curva de calibración para el compuesto 2 (Cianidina-3-sambubiosido)



En la **Tabla 8**, se muestra la cuantificación de cada uno de los pigmentos antocianicos en cada uno de los sistemas extractantes.

Tabla 8. Cantidad relativa del compuesto 1 y del compuesto 2, presentes en los extractos de flor de Jamaica, en función del método de secado y del agente extractante.

| Método de secado | Agente extractante | Delfinidina-3-sambubiosido (ppm) | Cianidina-3-sambubiosido (ppm) |
|----------------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Flores liofilizadas | Metanol | 1606±2 | 1150±1 |
| | Agua | 1359±1 | 1001±5 |
| Flores secadas a la sombra | Metanol | 1184±2 | 965±3 |
| | Agua | 899±3 | 741±1 |

En la Tabla 8, se observa que el metanol, como agente extractante, fue más eficiente en comparación con el agua, pero, a su vez, estos resultados también varían dependiendo del método de secado empleado. En la liofilización, se detectó mayor concentración de antocianinas, esto se debe, a que, posiblemente, por este método de secado, se disminuye la actividad enzimática, al tener un menor contenido de humedad lo que favorece a la preservación de estos compuestos. Sin embargo, Debicki-Pospisil y col. (1983) reportan, que el furfural y sus derivados, influyen en la degradación de antocianinas, ya que estos compuestos pueden reaccionar con los pigmentos antocianicos, generando especies poco estables, cuya cinética de degradación aumenta con la temperatura y es más rápida, en comparación con las antocianinas.

En los **Anexos 2 y 3**, se encuentran los espectros UV e IR de cada una de las antocianinas aisladas.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES

La capacidad antioxidante, expresada en equivalentes de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia se determinó por el método ORAC, y el contenido total de fenoles, expresado en mg de ácido gálico/g de extracto, se halló en los extractos obtenidos con solvente y extractos obtenidos con CO_2 supercrítico de flores de Jamaica secadas a la sombra y liofilizadas. Como compuestos antioxidantes de referencia se emplearon el BHT, α -tocoferol, y los dos compuestos aislados, delphinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido.

En las **Figuras 32** y **33** se muestran las curvas de calibración del Trolox[®] y del ácido gálico, con base en ellas, se realizó la cuantificación.

Figura 32. Curva de calibración del Trolox[®] para el ensayo ORAC.

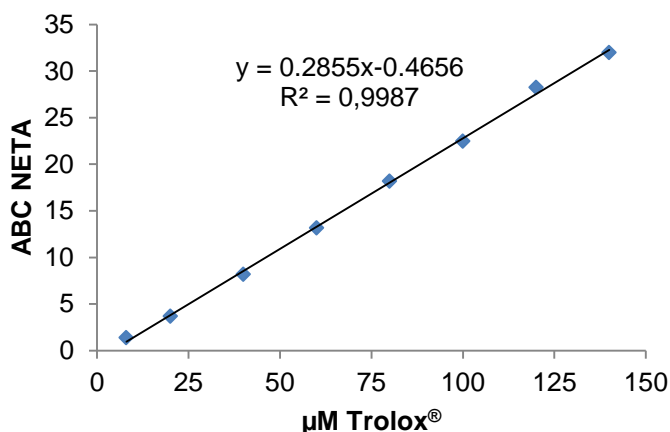
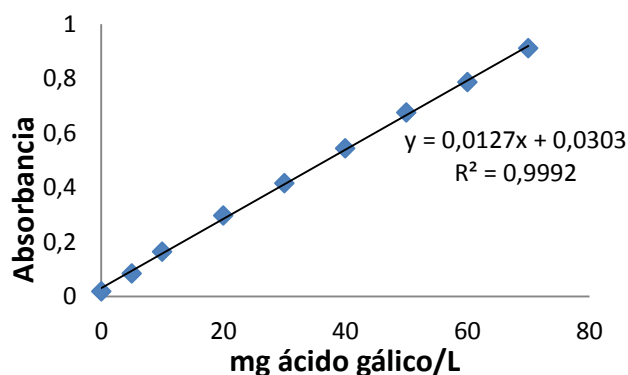


Figura 33. Curva de calibración del ácido gálico para la cuantificación del contenido total de fenoles, para el ensayo Folin-Ciocalteu.



En la Tabla 9, se presentan los resultados de la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles, medidos por los ensayos ORAC y Folin-Ciocalteu, de los extractos obtenidos con solvente y por SFE de flores de Jamaica liofilizadas y secadas a la sombra, junto con los antioxidantes de referencia.

Tabla 9. Valores de ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g sustancia) y de (mg ácido gálico / L) para los extractos de *H. sabdariffa*, obtenidos por los métodos ORAC, Folin-Ciocalteu.

| Sustancia evaluada | Método de medición (\pm s, n=3) | |
|----------------------------|--|-------------------------|
| | ORAC | Folin-Ciocalteu |
| | ($\mu\text{Trolox}^{\text{®}}$ /g de sustancia) | (mg de ácido gálico/ L) |
| BHT | 500 \pm 9 | 272 \pm 4 |
| α -Tocoferol | 480 \pm 5 | 166 \pm 2 |
| Delfinidina-3-sambubiosido | 820 \pm 17 | 550 \pm 42 |
| Cianidina-3-sambubiosido | 710 \pm 24 | 309 \pm 7 |
| Extracto A ¹ | 1010 \pm 18 | 801 \pm 1 |
| Extracto B ² | 827 \pm 5 | 752 \pm 1 |
| Extracto C ³ | 1040 \pm 23 | 923 \pm 1 |
| Extracto D ⁴ | 837 \pm 1 | 917 \pm 2 |

| | | |
|-----------------|--------|------|
| SFE Liofilizada | 460±16 | 94±1 |
| SFE sombra | 450±16 | 85±2 |

¹ Extracto metanólico de flores secadas a la sombra

² Extracto acuoso de flores secadas a la sombra.

³ Extracto metanólico de flores liofilizadas.

⁴ Extracto acuoso de flores liofilizadas.

Los valores obtenidos para el ensayo de ORAC, de los extractos de flores de Jamaica liofilizadas obtenidos con metanol, fueron mayores (1040±23 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) en comparación con los de las sustancias de referencia, BHT (500± 9 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia) y del α -tocoferol (480±5 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia). Al cambiar el agente extractante por agua, se observa una disminución en el valor ORAC (837±1 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia), este mismo efecto se apreció cuando se emplearon flores de Jamaica secadas a la sombra, con lo que es posible afirmar que el metanol, como agente extractante, es más eficiente que el agua para extraer analitos que presentan actividad antioxidante, lo cual también se puede evidenciar en la cuantificación de las antocianinas por HPLC (Tabla 8).

Estos resultados son consistentes con respecto a los reportados por Sáyago y col. (2007), quienes evaluaron la capacidad antioxidante de la flor de Jamaica empleando agua como solvente de extracción, y obtuvieron un valor de 335 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de sustancia; también, Salazar y col. (2012) en su investigación hacen una comparación entre agentes extractantes, y demuestran que con una mezcla etanol:agua se obtiene un valor de 745 $\mu\text{mol Trolox/g}$; que es un valor más cercano al obtenido en esta investigación. Sin embargo, los valores de la actividad antioxidante medida por el método ORAC, en este trabajo son más altos con respecto a los nombrados anteriormente: la diferencia se atribuye, tal vez, a la variedad del material vegetal empleado y a la metodología de extracción (cantidad de material vegetal y el tipo de solventes empleados).

Mediante el método ORAC, se evalúa la capacidad que puede tener una sustancia para retardar los procesos de oxidación causados por los radicales presentes en el medio. El mecanismo, por el que el agente antioxidante retarda o previene este proceso de oxidación, se debe a la presencia de hidrógenos lábiles que se transfieren a dichos radicales. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible explicar, la razón del porqué los extractos obtenidos con los diferentes sistemas extractantes, y los compuestos aislados (delfinidina-3-sambubiosido, y cianidina-3-sambubiosido) presentan capacidad antioxidante mayor, en comparación con la de los patrones de referencia (BHT y α -tocoferol). Ello debido a que las antocianinas poseen varios grupos hidroxilo, que pueden ceder fácilmente el hidrógeno a los radicales libres. La delfinidina-3-sambubiosido (**Figura 26**), es una antocianina con 3 grupos hidroxilo en el anillo B, que la hace un antioxidante mejor, con respecto a la cianidina-3-sambubiosido (**Figura 27**), que tiene 2 hidroxilos en el anillo B.

Se observó, que los extractos metanólicos y acuosos presentaron mayor capacidad antirradicalaria, medida por el ensayo ORAC (mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno, HAT) e incluso superior a la de los compuestos aislados (delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido), lo cual se puede explicar a través de un posible efecto aditivo, de los compuestos y otros posibles compuestos presentes en la matriz vegetal.

En los extractos obtenidos por SFE, los componentes mayoritarios son ácidos grasos, fitosteroles y triterpenos, sustancias apolares de alto peso molecular; es de esperar que los valores ORAC medidos sean menores a los de las sustancias de referencia, BHT y α -tocoferol, como se evidencia en la Tabla 9. Es importante destacar, que la actividad antioxidante de algunas moléculas, que no poseen enlaces X-H lo suficientemente débiles, no puede ser descrita a través de la donación del átomo de H. Algunos compuestos antioxidantes (no fenólicos), tienen la capacidad de formar radicales centrados en átomos de carbono

(preferiblemente terciarios), que pueden ser estabilizados por resonancia, hecho que aumenta de manera considerable su tiempo de vida media.

Al analizar los resultados obtenidos para el contenido total de fenoles de los extractos metanólicos y acuosos, de flores liofilizadas y secadas a la sombra, se observa que en este caso, el agente extractante no marca una diferencia significativa entre los valores obtenidos, para el ensayo Folin-Ciocalteu: los valores más altos, se obtuvieron con flores liofilizadas, lo que evidencia, nuevamente, que en el proceso de liofilización se pueden preservar mejor los analitos, en comparación con el secado a la sombra. Norhaizan y col. (2010), hicieron un estudio comparativo del contenido total de fenoles, para flores de Jamaica, empleando como sistemas extractantes, agua, y metanol (80% v/v), y también resaltan que, se obtiene un valor más alto, cuando el sistema extractante es metanol.

Para los extractos obtenidos por SFE de flores liofilizadas, se obtuvo un valor de 94 ± 1 mg de ácido gálico/L, y para flores secadas a la sombra, 85 ± 2 mg de ácido gálico/L; estos valores fueron superiores a los reportados por Lukmanto y col. (2013). Sin embargo, al comparar los valores obtenidos de los extractos de SFE, con respecto a los de referencia (BHT y α -tocoferol), resultaron ser más bajos, debido a que los componentes mayoritarios presentes en estos extractos no son de naturaleza fenólica, por tanto, el valor obtenido fue menor en comparación con los valores de los extractos obtenidos con solventes, ya que en éstos, los componentes principales son polifenoles.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se obtuvieron los extractos de flor de Jamaica (*H. sabdariffa* Linn, Número de voucher 568236) a través de diferentes técnicas de aislamiento, a saber: destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), extracción con CO₂ supercrítico (SFE) y extracción con disolventes (metanol y agua)

Se encontró, que el extracto obtenido por SDE, fue rico en derivados de azúcares y compuestos terpénicos, el extracto SFE, en ácidos grasos, triterpenos y fitosteroles, mientras que en el extracto obtenido con disolventes, prevalecieron flavonoides; se observó claramente el cambio de la composición dependiendo de la técnica de aislamiento empleada.

El método de secado usado para la deshidratación del material influye significativamente sobre la composición química de los extractos de la flor de Jamaica: se encontró, que por medio del proceso de liofilización se conservan los compuestos mejor, gracias a la disminución de su degradación.

Delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido se aislaron del extracto obtenido con solventes, por medio de cromatografía en capa fina.

Usando la técnica HPLC-DAD, se determinó la concentración de la delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido en los extractos obtenidos con diferentes sistemas extractantes; el mayor contenido de antocianinas se encontró en los extractos, obtenidos con metanol, de flores liofilizadas.

Los valores obtenidos en los ensayos ORAC y Folin-Ciocalteu, para los extractos obtenidos con solventes y de las antocianinas aisladas, fueron más altos e incluso superiores a la de los antioxidantes de referencia, BHT y α -tocoferol, lo que confirma que las antocianinas resultan ser compuestos naturales con alta capacidad antioxidante, lo que se podría aprovechar, utilizándolas en la industria de alimentos.

Los extractos obtenidos con solventes presentaron la actividad antioxidante más alta, en comparación con la de los extractos obtenidos con fluido supercrítico, ya que en los primeros se logran extraer pigmentos antocianínicos (antocianinas), a los que se les atribuye la actividad antioxidante.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar diferentes estudios de actividad biológica sobre los extractos metanólicos y acuosos de flor de Jamaica con el fin de evaluar su potencial biológico y la viabilidad de su uso en la industria de alimentos e industria farmacológica.

Para medir la capacidad antioxidante, en el presente estudio, solo se empleó el método ORAC, cuyo mecanismo se basa en la transferencia de hidrógeno al radical libre, para determinar la capacidad antioxidante total; se recomienda realizar ensayos, e.g., TEAC, en los que el mecanismo se basa en la transferencia de un electrón, o ensayos *in vitro*, por ejemplo, el estudio del avance de la peroxidación lipídica.

Realizar el análisis de los extractos obtenidos por SFE y con solventes, empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, para identificar los compuestos de alto peso molecular, que no se lograron identificar por cromatografía de gases.

BIBLIOGRAFÍA

ABASCAL, K.; GANORA, L. y YARNELL., E. The Effect of Freeze-drying and its Implications for Botanical Medicine: A Review. *Phytother. Res.*, 2005;19, p.p. 655–660.

ACOSTA L Growing, harvest and postharvest processing of *Artemisia annua* L. *Rev Cubana Plant Med.* 2010; 15, p.p.75-95

ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004, p. 456.

ALI, B., H.; AI WABEL, N.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytother. Res.*, 2005; 19, p.p. 275–289.

ALISSANDRAKIS, E.; KIBARIS, A.; TARANTILIS, P.; HARIZANIS, P. y POLISSIOU, M. Compuestos del sabor de la miel del algodón griego, *J. Ciencia. Agric Food.* , 2005; 85, p.p. 1444-1452.

ALVARADO, J. Ensayos de almacenamiento y estudio de un mecanismo de secado a temperaturas bajas en papa (*Solanum tuberosum*). Tesis para optar por el título de Magíster Scientifcae. CESNA-INCAP. Universidad de San Carlos de Guatemala, 1979; p.p. 68-70.

ANTAL, J. y MOK. W. Mechanism of formation of 5 (hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydr. Res.*, 1990; 199, p.p. 91-109.

ANTAL, J.; LEESOMBOON, T. y MOK, W. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydr. Res.*, 1991;217, p.p. 71-85.

ARDREY, R. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction., John Wiley & Sons., Chichester, England 2003; p.p. 2-21.

ARIAS, G. J. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citrodora*, cultivadas en el municipio de Sucre (Santander). Tesis para optar por el título de Magister. Universidad Industrial de Santander, 2012; p.p. 77-97.

ASEKUN, O.; GRIERON. D. y AFOLAYAN. A. Influence of drying methods on the chemical composition and yield of the essential oil of *Leonotis leonurus*. *J. Sci Res. Dev.*, 2006;10, p.p. 61-64.

ÁVALOS, A.; PÉREZ. E. Metabolismo secundario de plantas, REDUCA (Biología), Fisiología Vegetal., 2009; 2, p.p. 119-145.

BAHAELDEEN M.; ABDELATIF. S. y ABDELHAFIZ. D. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, cultivation and their uses *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, 2012; 1, p.p. 48-54.

BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1^a Red de Editoriales Universitarias, La Plata- Argentina., 2002; p.p. 29-39.

BANDONI, A.; MENDIONDO, M.; RONDINA, R.; COUSSIO, J. Survey of Argentine medicinal plants. Folklore and phytochemical screening. *J. Nat. Prod.*, 1976; 30, p.p. 169-181.

BARTAK, P.; FRNKOVA, P. y CÁP. L. Determination of phenols using simultaneous steam distillation–extraction. *J. Chromatogr. A.*, 2000; 867, p.p. 281–287.

BHAT, S.; NAGASAMPAGI, B. y SIVAKUMAR, M. Chemistry of natural products, Springer, New York, EE. UU. 2005; p.p. 1-21.

BOS. R.; KOULMAN. A.; WOERDENBAG. H.; QUAX, W. y PRAS, N. Volatile components from *Antriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *J Chromatogr. A.*,2002; 966, p.p. 233–238.

CAVALCANTI. R.; SANTOS. D. Y MEIRELES. M. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview *Food Res. Int.*, 2011; 44, p.p. 499–509.

CHACÓN, A.; GONZÁLEZ, N.; STASHENKO, E. Aceite esencial de hojas de *Hyptis umbrosa* Salzm extraído por diferentes técnicas. Universidad Nacional Experimental de Táchira & Universidad Industrial de Santander., *Acta Cient. Venez.*, 2004; 55, p.p. 181-187.

CHEN, S.; HUANG, T.; HO, C.; y TSAI, P. Extraction, analysis, and study on the volatiles in roselle tea. *J. Agric. Food Chem.*, 1998; 46, p.p.1101-1105.

CHEN, C.;HSU, J.; WANG, J.; CHIANG, H.; YANG, M.; KAO, E.; HO, Y. y WANG. C. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51, p.p. 5472–5477.

CONSTANTINO. H. y PIKAL. M. Lyophilization of biofarmaceuticals. Custom Editorial Productions Inc., United States of America., 2004; p.p. 3-21.

DE ANCOS, B.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, T. y CANO., M. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48, p.p. 873-879.

DEBICKI-POSPISIL, J.; LOVRIC, T.; TRINAJSTIC, N. y SABLJIC, A. Anthocyanin Degradation in the Presence of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural *J. Food Sci.*, 1983, 48, p.p. 411-416.

DÍAZ, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54, p.p. 2441-2469.

DIAZ, M.; GONZALES, M.; CABEZUDO, M. Evaluation of the effect of drying on aroma of parsley by free choice profiling. *Eur Food Res Technol.*, 2003; 216, p.p.227–232.

DICKSON H.; KITTREDGE, K. y SARQUIS, A. Thin-Layer Chromatography: The “Eyes” of the Organic Chemist. *J. Chem. Educ.*, 2004; 81, p.p. 1023-1025.

EICHNER, K. y KAREL, M. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions *J. Agr. Food Chem.*, 1972;20, p.p. 218-223.

EXARCHOU, V.; FIAMEGOS, Y.; VAN BEEK, T.; NANOS, C. y VERVOORT, J. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J. Chromatogr. A.*, 2006; 112, p.p. 293–302.

FRANCIS, J. y DU, C. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*, L.) *J. Food Sci.*, 1973; 38, p.p. 810-812.

GODEFROOT, M.; SANDRA, P. y VERZELE. M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1981; 203, p.p. 325-335.

GÓMES, E.; HALMENSCHLAGER, R.; MOREIRA, R.; PEGAS. J.; RAMOS. A, y SAFFI. J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *J. Agric. Food. Chem.*, 2010; 118, p.p.1–10.

GROSS, J. Pigments in fruits, *Ed. Academic press.*, London 1987; p.p. 59-85.

HALIWELL, B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth. Enzymol.*, 1990, 186, p.p. 1-85.

HIRUNPANICH, V.; UTAIPAT, A.; MORALES, N.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALEE, A. y SUTHISISANG, C. Antioxidant effects of aqueous sextracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa L.* (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol Pharm Bull.*, 2005; 28, p.p. 481-484.

HAVSTEEN. B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 2002; 96, p.p. 67–202.

HOGNADOTTIR, A., y ROUSEFF, R. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2003; 998, p.p.201-211.

HUANG, D.; OU, B. y PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, p.p.1841-1856.

IBARZ, A. y BARBOSA, G. Operaciones unitarias en ingeniería de alimentos. Ed. Mundi-Prensa., Madrid., 2005; p.p.767-770.

JULKUENEN, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *J. Agric. Food. Chem.*, 1985; 33, p.p.213-217.

KRINSKY, N. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 200, p.p. 248-254.

KROH, L. Caramelisation in food and beverages. *J. Agric. Food. Chem.*, 1994; 51, p.p.373-379.

KUSKOSKI, E.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO, J. y FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campiñas., 2005; 25, p.p.726-732.

LANG, Q. y WAI. C. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta.*, 2001; 53, p.p. 771–782.

LATTI. A.; KAINULAINEN. P.; AYAZ. S.; AYAZ. F. y RIIHINEN. F. Characterization of Anthocyanins in Caucasian Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Native to Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57, p.p. 5244–5249.

LUKMANTO, S.; ROESDIYONO, N.;JU, Y.; INDRASWATI, N.; EDI, F. y ISMADJI, S. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *Chem. Eng. Comm.*, 2013; 200, p.p.1187–1196.

MAGALHÃES, L.; SANTOS, F.; SEGUNDO, M.; REIS. S. y LIMA. J. Rapid micro plate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta.*, 2010; 83, p.p. 441–447.

MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J.; CULEBRAS, J. y TUÑÓN. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutr. Hosp.*, 2002; 17, p.p. 271-278.

MEIRELES, A.;CARVALHO J.; MOURA, L. y ROSA, P. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids*. 2005; 35, p.p. 197-204.

MERKEN, H. y BEECHER, G. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48, p.p. 577-579.

NIKI, E. y NOGUCHI, N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method?. *Life*, 2000; 50, p.p.323–329.

NORHAIZAN, M.; FONG. S.; AMIN, I. y CHEW, L., Antioxidant activity in different parts of *roselle* (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *J. Agric. Food. Chem.*, 2010; 122, p.p.1055–1060.

ORTIZ, S. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de Jamaica cultivada en el estado de Monagas. *Revista Voces: Tecnología y pensamiento.*, 2008; 3, p.p. 61-75.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M. y PRIOR, R. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.*, 2001; 49, p.p. 4619-4626.

PINO, J.; MESA, J.; MUÑOZ, Y.; MARTÍ, M. y MARBOT, R. Los componentes volátiles del mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53, p.p. 2213-2223.

PRICE, J.; SANNY, C. y SHEVLIN, D. Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant activity of drugs and natural products. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 2006; 54, p.p. 56 – 61.

QUEIPO, J.; BUDIA, A.; MASCAROS, E.; GÓMEZ, A.; GOBERNADO, M. y JIMÉNEZ, J. Evolución de la resistencia microbiana a fluorquinolonas en un hospital terciario. *Acta Urolog Española.*, 2000; 24, p.p. 381-387.

QUIROGA, A. Biodiversidad, una joya a conservar y un potencial económico para el desarrollo que el estado boliviano quiere estimular; *Instituto Boliviano de Comercio Exterior.*; 2008; p.p. 234-240.

RAMÍREZ, J., Liofilización de alimentos, Seminario II, Universidad del Valle, Cali, Colombia. 2006; p.p.1-30.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. y RICE, C. Antioxidant activity applying as improved ABST radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999; 26, p.p. 1231-1237.

REVERCHON, E.y DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Supercrit. Fluids*, 2006; 38 p.p. 146-166.

REYES, J. y PATIÑO, J. Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum sp.* (Labiatae), en función del método de extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica; Trabajo de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 2007; p.p.54 -56.

SALAZAR. C.; VERGARA. F.; ORTEGA. A. y BELTRÁN. J. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Cienc. Inv. Agr.*, 2012; 39 p.p. 79-90.

SÁNCHEZ, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 2002; 8, p.p.121-137.

SAYAGO. S.; ARRANZ. S.; SERRANO. J.y GOÑI. I. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55, p.p. 7886–7890.

SOLÓRZANO, R. y MACARIO. T. Estudio de factibilidad del cultivo, procesamiento y comercialización de la Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). Documento en línea. Disponible en: <http://volensamerica.org/spip/IMG/doc/estudiomercadorosajamaicaaltertec.doc>. Consultado: Octubre, 2012.

STASHENKO, E.; PUERTAS, M. y COMBARIZA, M. Volatile by secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A.*, 1996; 752 p.p. 223-232.

STASHENKO, E. y MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica.*, 2010, 2, p.p. 29-47.

STASHENKO, E., and MARTÍNEZ, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica.*, 2009;1, p.p. 29-45.

STASHENKO, E. Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia., 2009; p.p. 13-180.

SUKWATTANASINIT, T.; BURANA, O. y JANKANA; S. Spectrophotometric method for quantitative determination of total anthocyanins and quality characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Planta Med.*, 2007; 73, p.p. 1517-1522.

TAIZ, L. y ZEIGER, E. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, EE.UU, 2002; p.p.283-307

VALLECILLO, M. y GÓMEZ. E. Cultivo de rosa de Jamaica. Ed. *Editarte*, 2004; (1ra Edición), Managua, Nicaragua, p.p. 7-24.

WALTON, N. e IROWN, D. Chemicals from plants: Perspectives on plants secondary products. Imperial Collegue, Londres, Inglaterra, 1999; p.p. 95-113.

WANG, Z. ; FINGAS, M. y LI, K. El fraccionamiento de un aceite ligero crudo y la identificación y cuantificación de alifáticos, aromáticos y comopunds biomarcadores por GC-FID y GC-MS, Parte II , *J. Chromatogr. Sci.* , 1994; 32, p.p. 367-382.

WINK, M. Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annu Rev. Plant.*, Germany. 2010; 40, p.p.1–19.

WONG, P.; YUSOF, S.; GHAZALI, H. y MAN, Y. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J Nutr Food Sci.*, 2002; 32, p.p.68-73.

XU, X.; VAN STEE, L.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; ADAHCHOUR, M.; VREULS, J.; BRINKMAN, U. y LELIEVELD, J. Comprehensive two-dimensional gas

chromatography (GC × GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere *Atmos. Chem. Phys.* 2003; 3, p.p.1139-1181.

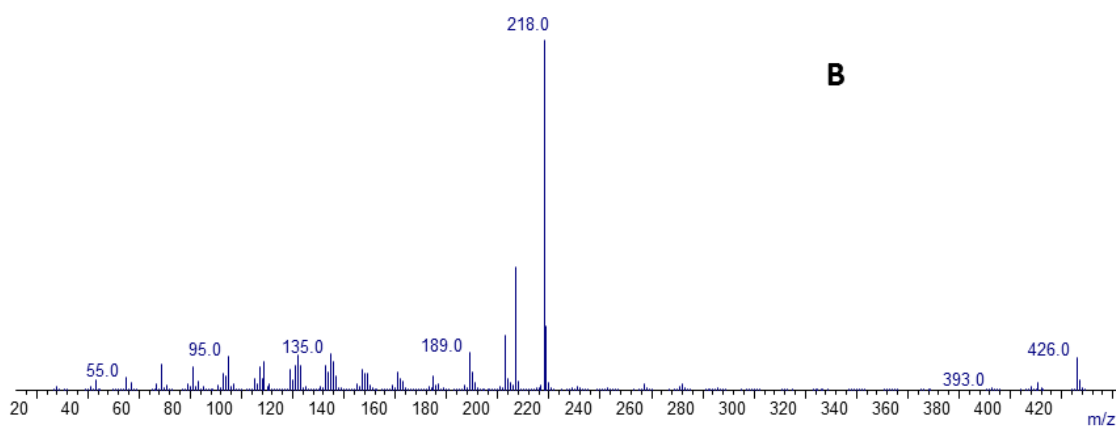
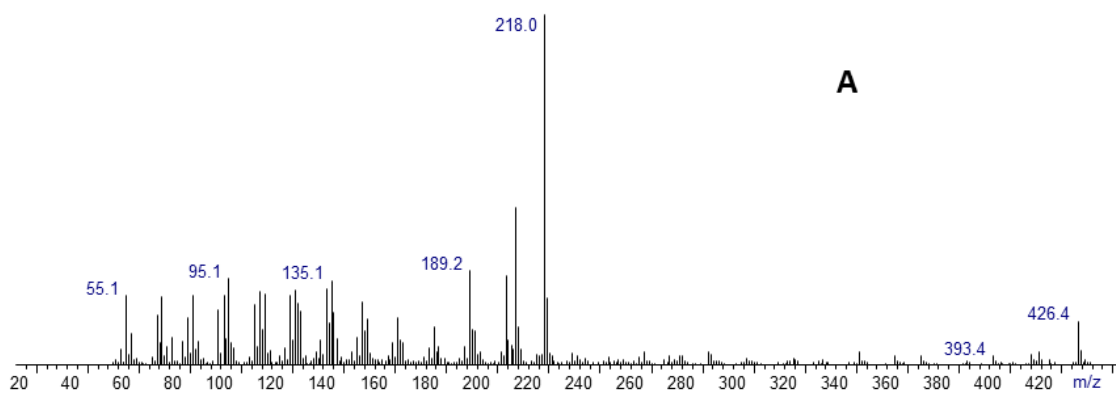
YOUSIF. A.; DURANCE. T.; SCAMAN. C.; GIRARD. B. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri Schauer*). *J Food Sci.*, 2000; 65, p.p. 926–930.

ZEHENTBAUER, G. y REINECCIUS, G. Determination of key aroma components of Cheddar cheese using dynamic headspace dilution assay. *Flavour Fragr. J.* 2002; 17, p.p.300-305.

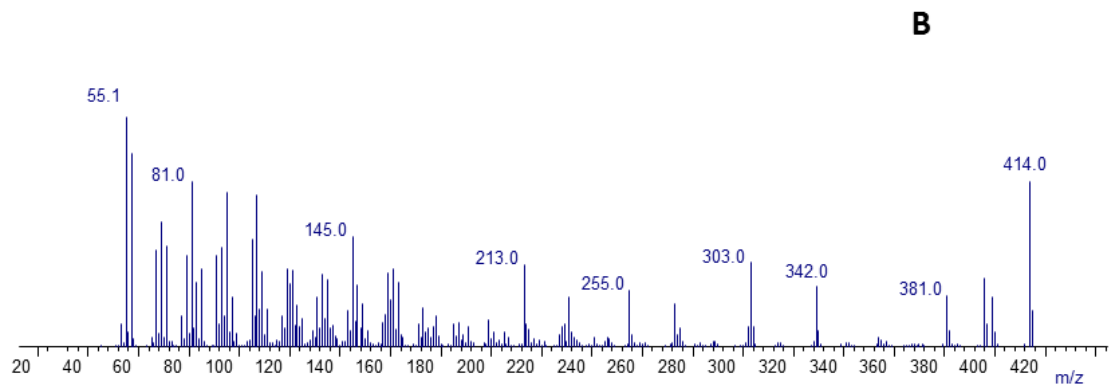
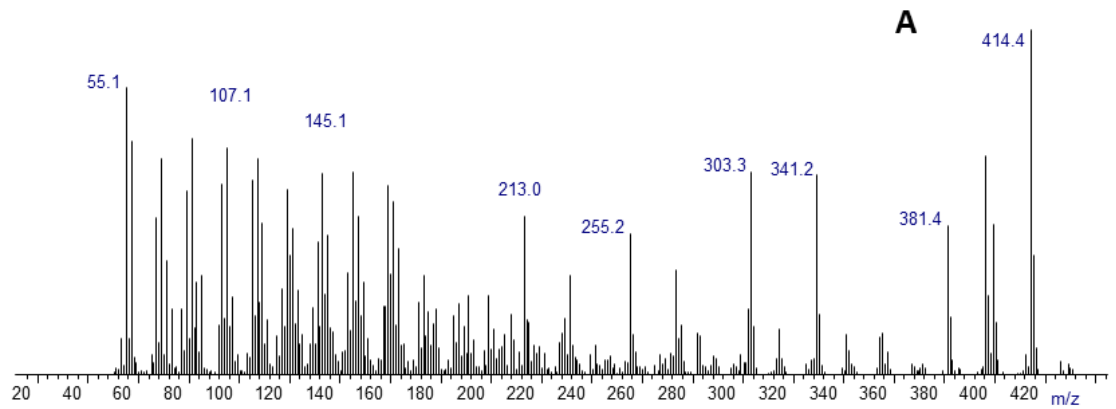
ANEXOS

ANEXO A. Espectros de masa

Anexo A.1 .Espectro de masas para el compuesto α - amirin obtenido por GC-MS del extracto SFE de *H. sabdariffa*. A). Espectro de masas experimental; B). Espectro de masas obtenido en las bases de datos. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

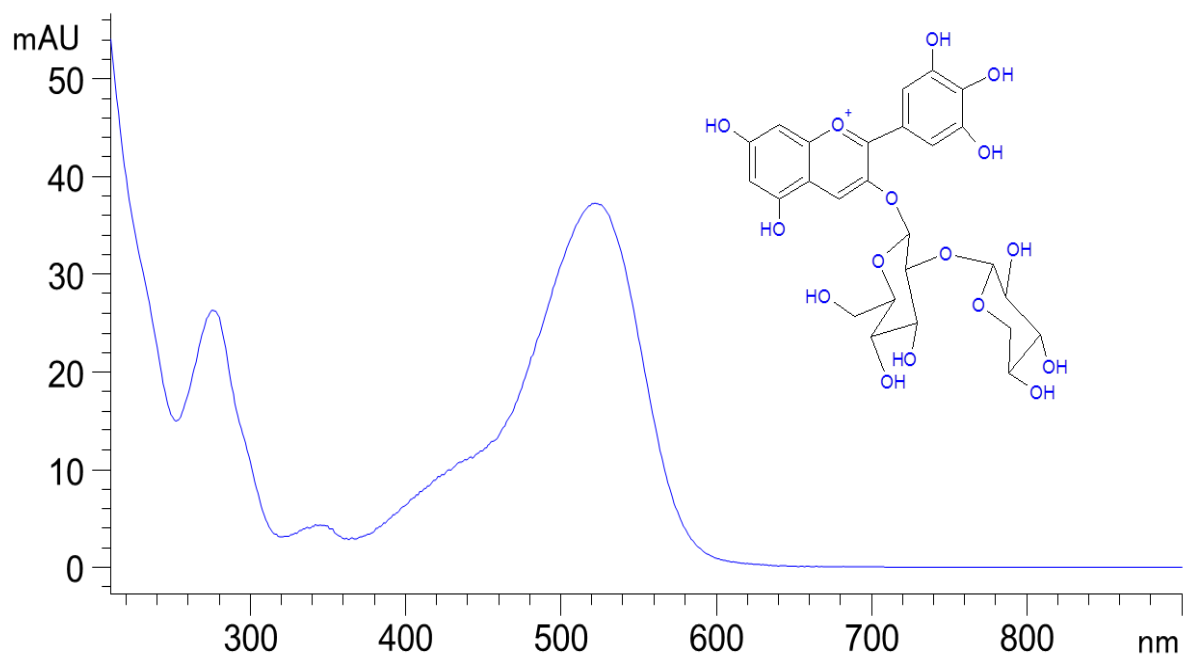


Anexo A.2. Espectro de masas para el compuesto γ -Sitosterol obtenido por GC-MS del extracto SFE de *H. sabdariffa*. A). Espectro de masas experimental; B). Espectro de masas obtenido en las bases de datos. Columna DB-5 (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV)

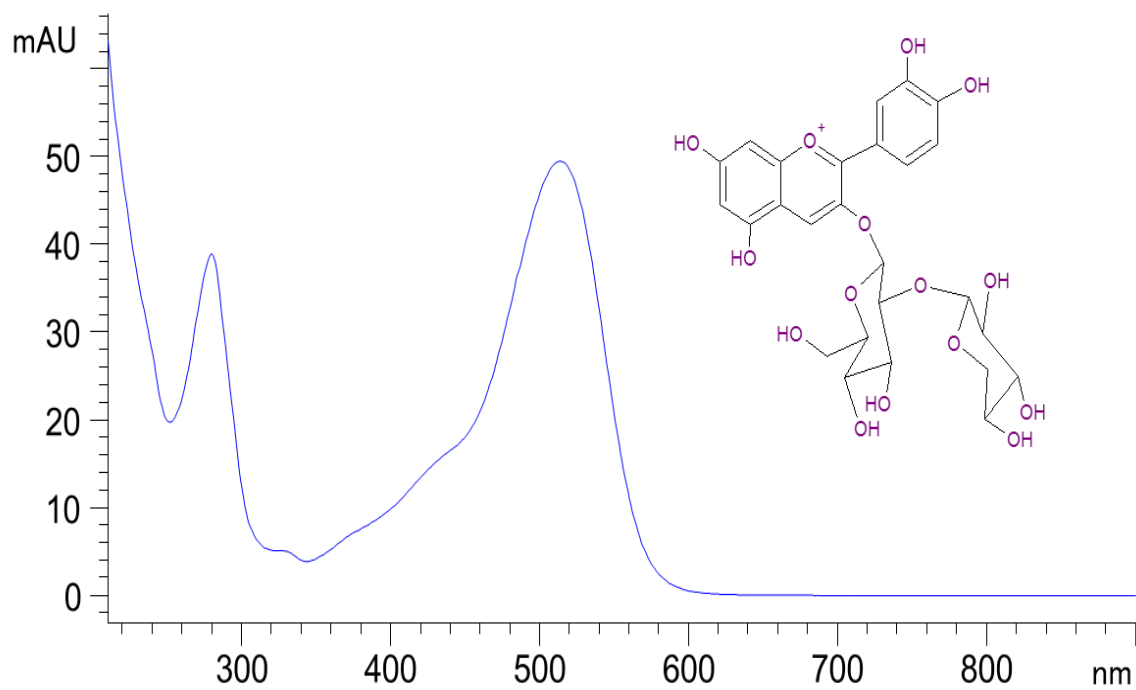


ANEXO B. Espectros UV-Vis

Anexo B.1 Espectro UV-Vis del compuesto 1 (Delfinidina-3-sambubiosido)

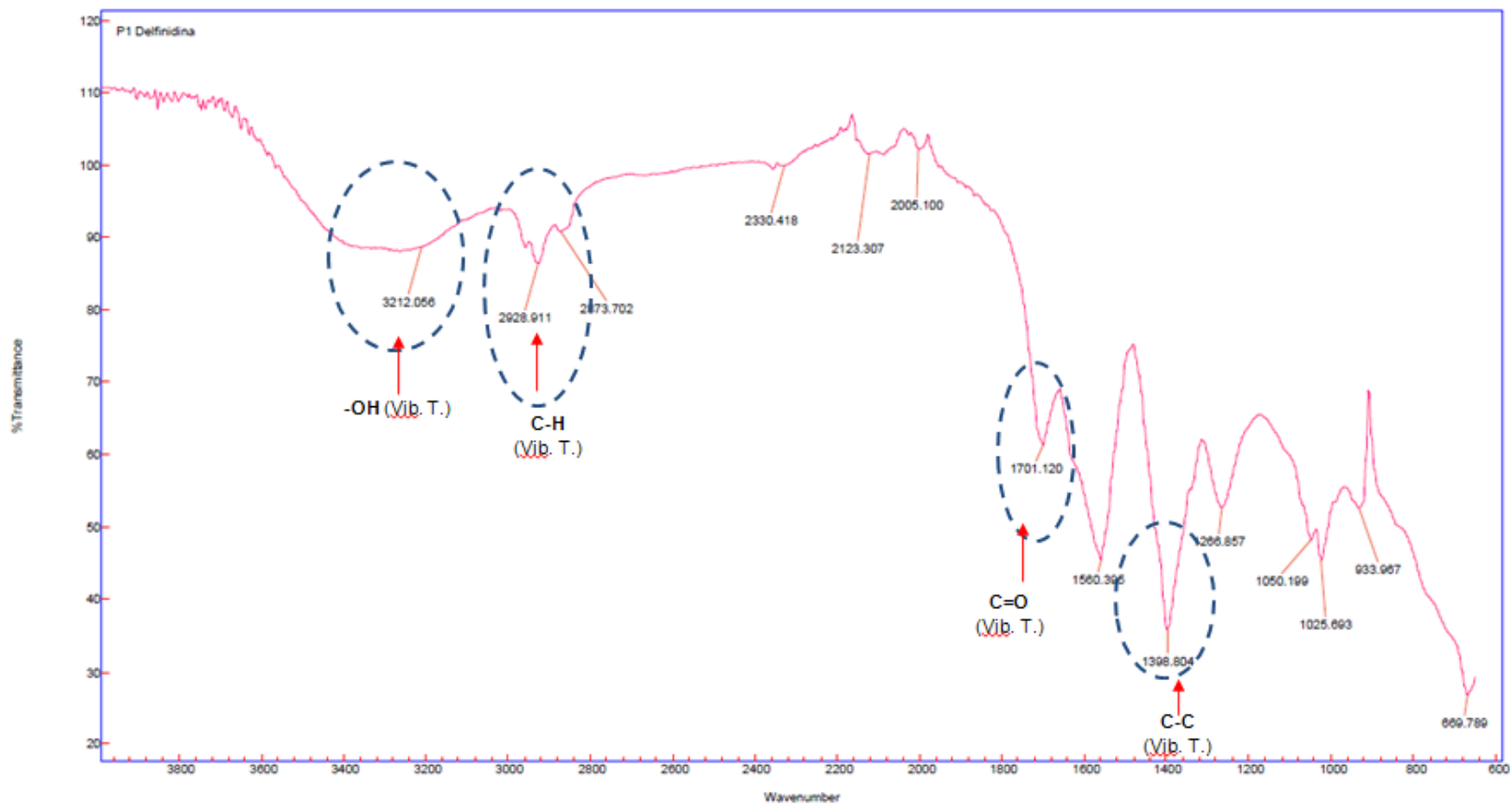


Anexo B.2 Espectro UV-Vis del compuesto 2 (Cianidina-3-sambubiosido)

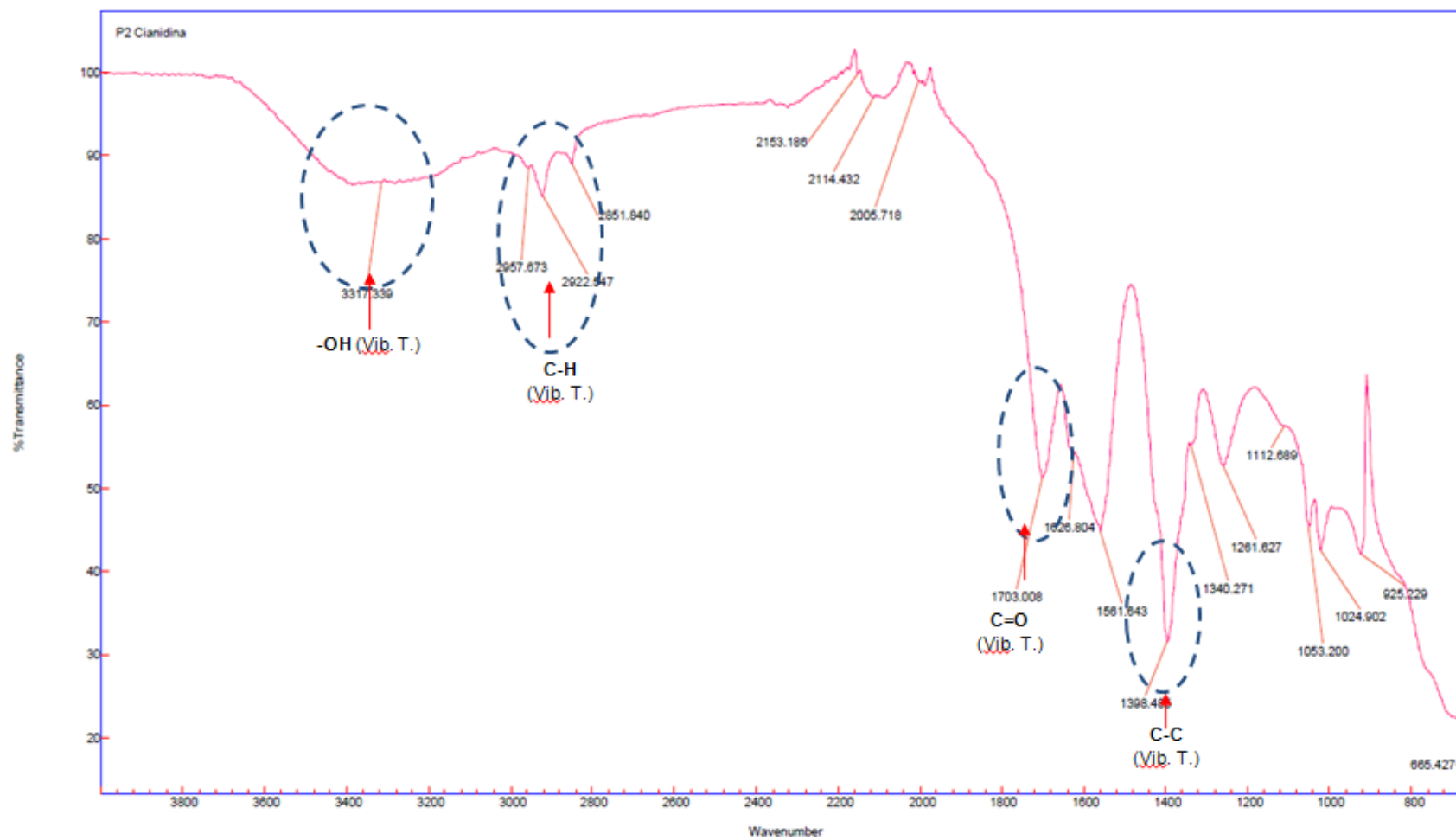


ANEXO C. Espectro infrarojo

Anexo C.1. Espectro Infrarrojo del compuestos 1 (Delfinidina-3-sambubiosido)



Anexo C.2. Espectro Infrarrojo del compuestos 2 (Cianidina-3-sambubiosido)



En el espectro infrarrojo (**Véanse Anexos 3.1 y 3.2**), se muestran las bandas características de las antocianinas aisladas, donde se observa una banda de absorción propia del grupo hidroxilo (-OH) entre $3200-3400\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a la vibración de tensión (Vib. T) del enlace O-H. En la región de 2971 a 2859 cm^{-1} , se aprecia una serie de bandas correspondientes a los enlaces C-H (Vib. T.). También, en la región de 1700 cm^{-1} , aparece una banda correspondiente a los enlaces C=O (Vib. T.), y en la región de 1400 cm^{-1} , se evidencia una banda intensa y definida que corresponde a la vibración de tensión del enlace C-C (Vib. T.).