

## COMPUESTOS BIOACTIVOS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CÁLCICES Y HOJAS DE HIBISCUS SABDARIFFA LINN

BIOACTIVE COMPOUNDS AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CALYXES AND LEAVES OF HIBISCUS SABDARIFFA LINN

PACHECO Coello Franklin<sup>1,2</sup>, PINTO-Catari Ibis<sup>2</sup>, RAMIREZ Azuaje Doralys<sup>2</sup>, PERAZA Marrero María<sup>2</sup>, OROSCO Vargas Corymar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Carabobo, Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos,  
<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED-UC).  
pachecofranklin74@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-2765-406>  
Bárbula, Venezuela

Recibido en 13 de abril de 2020  
Aceptado en 28 de mayo de 2020



### Resumén

**Introducción:** A nivel mundial Hibiscus sabdariffa, es reconocida por sus múltiples beneficios a la salud gracias a su contenido de compuestos bioactivos, representando una alternativa en el tratamiento de enfermedades crónicas y degenerativas. **Objetivos:** El estudio tuvo como objetivo, comparar la concentración de fenoles totales, flavonoides, presencia de antocianinas y capacidad antioxidante en extractos acuosos de cálices y hojas comercializadas en mercados populares de la ciudad de Maracay, Venezuela. **Métodos:** Por triplicados y bajo las mismas condiciones se realizaron las extracciones de los compuestos bioactivos en cada material vegetal, empleándose para la determinación de fenoles totales el método de Follin-Ciocalteu, método Marinova y método diferencial de pH para antocianinas. La actividad antioxidante se evaluó por los métodos DPPH, FRAP y ABTS. **Resultados:** Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la concentración de fenoles totales, flavonoides y presencia de antocianinas en cálices y hojas ( $p \leq 0,05$ ). La actividad antioxidante fue superior en los cálices en todos los métodos empleados y con diferencia estadística en comparación a las hojas ( $p \leq 0,05$ ). **Conclusiones:** Si bien los cálices son consumidos con frecuencia en bebidas frías y calientes, las hojas también representan una fuente de compuestos con capacidad antioxidantes, lo que podría incorporarse en la dieta diaria.

**Palabras clave:** Hibiscus Sabdariffa, Cálices, Antioxidantes, Polifenoles, Bioactivo.

## Abstract

**Introduction:** Worldwide, *Hibiscus sabdariffa* is recognized for its multiple health benefits thanks to its bioactive compound content, representing an alternative in the treatment of chronic and degenerative diseases. **Objectives:** The objective of the study was to compare the concentration of total phenols, flavonoids, presence of anthocyanins and antioxidant capacity in aqueous extracts of calyxes and leaves commercialized in popular markets in the city of Maracay, Venezuela. **Methods:** Extractions of bioactive compounds in each plant material were performed in triplicate and under the same conditions. The Follin-Ciocalteu method, Marinova method and differential pH method for anthocyanins were used to determine total phenols. The antioxidant activity was evaluated by DPPH, FRAP and ABTS methods. **Results:** A statistically significant difference was found in the concentration of total phenols, flavonoids and presence of anthocyanins in calyxes and leaves ( $p \leq 0.05$ ). The antioxidant activity was higher in calyxes in all methods used and with statistical difference compared to leaves ( $p \leq 0.05$ ). **Conclusions:** Although calyxes are frequently consumed in hot and cold beverages, leaves also represent a source of compounds with antioxidant capacity, which could be incorporated into the daily diet.

**Key words:** *Hibiscus Sabdariffa*, Calyxes, Antioxidants, Polyphenols, Bioactive.

## Introducción

*Hibiscus sabdariffa* L., es un arbusto de la familia de las Malváceas, cultivada en los climas tropicales y subtropicales del mundo; se le agrupa dentro de los cultivos no tradicionales y plantas medicinales<sup>1</sup>. Sus cálices se aprovechan para elaborar bebidas frías o calientes, mermeladas, salsas, y aderezos, además que posee acciones farmacológicas importantes, que han sido identificadas en flores, pétalos y semillas, principalmente antiarterioscleróticas y cardioprotectoras<sup>2</sup>. Es conocida su capacidad de disminuir el perfil de lípidos séricos y control de alteraciones hepáticas o fiebre<sup>3,4</sup>. Estos beneficios terapéuticos se atribuyen a la diversidad de los fitoquímicos de los cálices en los que predominan los compuestos fenólicos<sup>5,6</sup>.

Por otra parte las hojas de *H. sabdariffa*, se han utilizado como medicinas populares tradicionales para tratar la presión arterial alta y la fiebre<sup>7</sup>. Los polifenoles son estructuras complejas y son los antioxidantes de mayor consumo en la dieta de humanos, con una alta implicación en la

salud pública<sup>5</sup>. Los compuestos polifenólicos son un grupo cercano a 8.000 sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura. Entre los más importantes están los flavonoides, que poseen una estructura básica C6-C3-C6, las antocianinas, catequinas y epicatequinas. Este grupo de compuestos reportan múltiples efectos biológicos, tales como: actividad antioxidante, antiinflamatoria, inhibición de la agregación plaquetaria y de la actividad antimicrobiana<sup>8</sup>.

Considerando lo anteriormente expuesto el presente estudio tuvo como objetivo determinar la concentración compuestos bioactivos (fenólicos totales, flavonoides, presencia de antocianinas) y evaluar el potencial antioxidante de extractos de cálices y hojas de *H. sabdariffa*, para así incentivar el uso integral de esta planta.

## Método

*Material vegetal (MV).*

Los cálices y hojas de *H. sabdariffa* fueron obtenidos del mercado principal de la

ciudad Maracay estado Aragua, Venezuela, las cuales son comercializadas directamente al consumidor.

#### *Extracción.*

#### *Preparación de los extractos de hoja y cálices.*

Los extractos se prepararon con 2,5 g de MV y 100 mL de agua destilada. La mezcla hirvió 15 min, se separó el líquido del material vegetal por decantación y la extracción se repitió en las mismas condiciones. La solución se filtró con papel Whatman No. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada. Este proceso se realizó por triplicado con cada MV<sup>9</sup>.

#### *Cuantificación de compuestos fenólicos totales.*

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó por el método colorimétrico de Follin-Ciocalteu. A 50  $\mu$ L de muestra fueron adicionados a 125  $\mu$ L del reactivo de Folin, y 400  $\mu$ L de carbonato de sodio 7,1% (p/v), completándose con agua destilada hasta 1000  $\mu$ L. Este procedimiento se realizó por quintuplicado. Seguidamente se prepararon 5 patrones de concentración de 50, 100,150, 200 y 250  $\mu$ g/mL, a partir de una solución patrón madre de ácido gálico (AG) de concentración 500  $\mu$ g/mL. Por último realizó la lectura a 760 nm empleando el equipo de absorción molecular Génesis 20 (Thermo Scintific), y expresando los resultados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) /g de MV<sup>10</sup>.

#### *Determinación de flavonoides.*

La determinación de flavonoides se realizó siguiendo un método colorimétrico. 100  $\mu$ L de muestra fueron mezclados con 30  $\mu$ L de

NaNO<sub>2</sub> al 5% (p/v), 30  $\mu$ L de FeCl<sub>3</sub> 10 % (p/v), 200  $\mu$ L de NaOH a 1M y ajustados con agua destilada hasta un volumen final de 1 mL, se realizó la lectura espectrofotométrica a 510 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar (+)-catequina. Los resultados fueron expresados como mg de Catequina Equivalente (CE)/g de MV<sup>11</sup>.

#### *Presencia de antocianinas.*

La concentración de antocianinas monoméricas totales se determinó por el método diferencial de pH. Al alcalinizar la disolución a pH 4,5 se torna incolora y desaparece el máximo de absorbencia a la longitud de onda de trabajo de 520 nm, debido a que la antocianina se encuentra en forma de hemiacetal; en estas condiciones el compuesto presenta una absorción no detectable por espectrofotómetro<sup>12</sup>. Para efecto de análisis se clasificaron las muestras en 4 grupos a partir de los resultados de concentración de antocianinas monoméricas totales (0-1, 1-5, 5-10 y 10-15 mg delfinidina- 3-glucósido/g MV<sup>13</sup>.

#### *Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).*

Para evaluar la actividad antioxidante se usó el método del radical libre DPPH (Sigma Aldrich) con una solución 100  $\mu$ M de DPPH en metanol al 80 %. En una cubeta de cuarzo se colocaron 100  $\mu$ L de extracto y 2,9 mL de DPPH. La absorbancia se monitoreó cada 5 min por 30 min a una longitud de onda de 515 nm. La absorbancia de referencia (A<sub>0</sub>) fue obtenida al sustituir el volumen de extracto por metanol al 80 %. El porcentaje de reducción de DPPH se obtuvo de la expresión: DPPH (%)= (A<sub>0</sub>-A<sub>n</sub>) 100/A<sub>0</sub>, donde A<sub>0</sub> y A<sub>n</sub> fueron las

absorbancias de referencia y de la muestra, respectivamente<sup>14</sup>.

*Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo del poder reductor férrico (FRAP).*

El ensayo FRAP se utilizó para determinar la capacidad reductora de los extractos<sup>15</sup>. 100 µL se mezcló con 3 mL de reactivo FRAP constituido por una mezcla de 300 mM de tampón de acetato de sodio y ácido acético, solución de TPTZ (2, 4,6-tri (2-piridil) -s-triazina) de 10 mM y solución FeCl<sub>3</sub> 20 mM, en una relación de volumen de 10: 1: 1. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 minutos, para luego leer las absorbancias se a 593 nm empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific.). Se empleó FeSO<sub>4</sub> como estándar, y los resultados se expresaron en µmol Fe<sup>+2</sup> / g de MV.

*Análisis estadístico.*

Todas las determinaciones se realizaron por triplicados y se expresaron los valores como los promedios ± desviación estándar (DS). Para la comparación de la concentración tanto de fenoles totales como de flavonoides en cálices y hojas se aplicó

**Tabla 1.** Fenólicos totales (mg de GAE/ g de MV) y flavonoides (mg de CE/ g de MV)

Material Vegetal	Fenolicos Totales	Flavonoides	p
Cálices	12,58±0,57	7,9±0,23	0,011*
Hojas	5,10±0,48	1,51±0,21	0,001*

**Tabla 2.** Evaluación de la actividad antioxidante por método FRAP, DPPH y ABTS

Material vegetal	FRAP Fe <sup>+2</sup> / g MP	DPPH(IC <sub>50</sub> ) µg.mL <sup>-1</sup>	ABTS µmol eq. Tx. mL <sup>-1</sup>
Cálices	4110,80 ± 4,11	180,30 ± 2,04	3,90 ± 0,11
Hojas	172,80 ± 5,12	90,30 ± 2,14	1,90 ± 0,19

resultados (p<0,05). La presencia de antocianinas estuvo en un rango de 5-10 y

0-1 mg delfinidina- 3-glucósido/g MV para cálices y hojas respectivamente.

En relación a la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de hojas y cálices la Tabla 2 muestra los resultados obtenidos (Media ±Desviación Estándar) por los métodos FRAP, DPPH y ABTS. (Tabla 2). Para todos los métodos se evidenció diferencia estadística (p<0,05).

## Discusión

Se conoce que dependiendo de la planta que se emplee, la concentración de compuestos fenólicos es variable<sup>14</sup>. Así mismo factores como, la diversidad genética (variedad y origen de la muestra), etapa de madurez, intensidad de la luz, clima, temperatura, uso de fertilizantes, que condicionan el contenido de estos compuestos bioactivos<sup>16,17</sup>. En Egipto, un análisis comparativo de los compuestos fenólicos en tallo, hoja y cálices presentes en *H. sabdariffa*, y su comparación con la procedente de Sudan, arrojó que no solo existe diferencia entre las partes de la planta, sino también con las de Sudán lo que demuestra que los factores anteriormente señalados son determinante en la concentración de estos compuestos bioactivos tanto en hojas como en los calices<sup>18</sup>.

Estudios indican que los flavonoides son agentes antioxidantes con gran aplicación en la medicina alternativa, lo que sugiere un uso potencial de estos extractos para el tratamiento de diferentes patologías como arterosclerosis, procesos antiinflamatorios, anticancerígenos y para reducir los niveles de colesterol y poder antimicrobiano ante cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulace* y *Klebsiella pneumoniae*<sup>8,9,19,20</sup>. Por lo tanto, es importante la identificación de fuentes con alto contenido de flavonoides que sean aceptadas por la población en general. A este respecto, el consumo de bebidas y aderezo de las comidas con las hojas de *H. sabdariffa*, es una opción accesible para proveer de este tipo de compuestos<sup>21</sup>. El color de los extractos es debido a la presencia de antocianinas, quedando en evidencia que

los cálices son ricos en estas sustancias. Sin embargo la presencia de antocianinas en las hojas está relacionada con el contenido de clorofila de las plantas<sup>22,23</sup>.

Por otra parte diversos estudios indican que es difícil evaluar completamente las actividades antioxidantes de los compuestos naturales de los extractos simplemente usando un único método de determinación<sup>24,25</sup>. A pesar de no ser determinado en la investigación, se encuentra reportado que la concentración de antocianinas en jamaica contribuye con el 51% de su capacidad antioxidante, el resto de la cual está dada principalmente por otros compuestos fenólicos como los flavonoides<sup>26,9</sup>.

Los extractos de los cálices presentaron la mayor actividad antioxidantes, la cual está principalmente correlacionada con la concentración de antocianinas monoméricas y en menor medida con los compuestos fenólicos totales. Por lo tanto mientras aumenta el contenido de antocianinas en los ex-tractos de los cálices aumenta la actividad antioxidante<sup>27,28,29</sup>. Si bien el nivel antioxidante mostrado por las hojas fue bajo en comparación a los cálices, se ha reportado que estas poseen un mayor poder antioxidante en comparación a otras partes de esta planta, como por ejemplo los pétalos<sup>30,31</sup>.

## Conclusión

Si bien la biodisponibilidad en el organismo de estos compuestos en baja, el consumo de adecuado y de manera regulada de *H. sabdariffa* puede traer beneficios a la salud. Los cálices son la principal vía de compuestos con actividad biológica, sin embargo las otras partes de la planta como en este caso las hojas también puede ser

usadas e incorporadas a la dieta diaria siendo entonces una son una alternativa que aporta compuestos fenólicos.

## Bibliografía

1. Ali B, Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A review. *Phytother Res.* 2005; 19: 369-375.
2. Chen C, Hsu J, Wang S. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(18):5472-5477.
3. Tzu-Li L, Hui-Hsuan L, Chang-Che C, Ming-Cheng L, Ming-Chih C, Chau-Jong W. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutr Res* 2007; 27: 140-145.
4. Carvajal-Zarrabal O, Waliszewski S, Barradas-Dermitz D, Orta-Flores Z, Hayward-Jones P, Nolasco-Hipólito C, Angulo-Guerrero O, et al. The consumption of Hibiscus sabdariffa dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Food Hum Nutr.* 2005; 60(4): 153-9.
5. Ramírez-Rodríguez M, M., M. L. Plaza, A. Azeredo, M. O. Balaban, and M. R. Marshall. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from Hibiscus sabdariffa. *J Food Sci.* 2011; 76(3): 428-435.
6. Rodríguez-Medina I, Beltrán-Debón R, Micol Molina V, Alonso-Villaverde C, Joven A, Menéndez A, et al. Direct characterization of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *J Separ Sci.* 2009; 32: 3441-3448.
7. Wang J, Cao X, Ferchaud V, Qi Y, Jiang H, Tang F. Variations in chemical fingerprints and major flavonoid contents from the leaves of thirty-one accessions of Hibiscus sabdariffa L. *Biomed. Chromatogr.* 2016; 30: 880-887
8. Gradinaru G, Biliaderis CG, Kallithraka S, Kefalas P, Garcia-Viguera C. Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* 2003; 83(3): 423-436.
9. Reyes-Luengas A, Salinas-Moreno Y, Ovando-Cruz M, Arteaga-Garibay R, Martínez-Peña M. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia.* 2015; 49 (1): 277-290.
10. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16 (3): 144-158.
11. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *J Chem Technol Metall.* 2005; 40(3): 255-260.
12. Wrolstad, R. E., Durst, R. W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology.* 16(9): 423-428.
13. Medina-Carrillo, R., Sumaya-Martínez, M., Machuca-Sánchez, M., Sánchez-Herrera, L. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (hibiscus sabdariffa l.) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias.* 22(1): 41-44).
14. Soler-Rivas C, Espín J, Wichers H. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytoche Anales.* 2000; 11(1): 330-338.



15. Benzie I.F.F and Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996; 239 ;( 1):70–76.
16. Wong SK, Lim Y, Chan E. Antioxidant properties of Hibiscus: species variation altitudinal change, coastal influence and floral colour change. *J Trop For Sci.* 2009; 21(4): 307-315.
7. Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi M. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (Marrubium vulgare Linné) from three geographical. *Ann Pharm Fr.* 2019; 3(2): 23-34
18. Rasheed D, Porzel A, Frolov A, El Seedi H, Wessjohann L, Farag M. Comparative analysis of Hibiscus sabdariffa (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Food Chem.* 2018; 250:236– 244.
19. Verma P, Verma A. "Evaluation of antibacterial activity of different parts of Tagetes erecta". *Int J of Pharm and Life Sci.* 2012; 3 (6):1766-1768.
20. Ramya R, Mahna S, Bhanumathi S, Bhat, S. "Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic activity of Tagetes spp". *Inter Res J Pharm.* 2012; 3 (11): 114-116.
21. Høstmark A. T. The oslo health study: a dietary index estimating high intake of soft drinks and low intake of fruits and vegetables was positively associated with components of the metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2010; 35:816-825.
22. Haussein R.M, Shaheun Y.E, El Hakim A.E, Awad H.M. biochemical and molecular characterization of three colored types of roseel( Hibiscus sabdariffa L.). *Am. J. Sci.* 2010; 6(11):726-733
23. Abdallah M.A, Suliman A.Oa, Eldeen S, Idriss A.A, Abdualrahman H. a comparative study on red and white karkade (Hibiscus sabdariffa L.) calyces extracts, and their products. *Pak. J. Nutri.* 2011; 10(7):680-683.
24. Fu L, Xu B.T, Xu X.R, Gan R.Y, Zhang Y, Xia E.Q, Li H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem.* 2011; 129(1):345–350.
25. Gan R.Y, Li H.B, Gunaratne A, Sui Z.Q, Corke H. Effects of fermented edible seeds and their products on human health: Bioactive components and bioactivities. *Food Sci.* 2017; 16:489–531.
26. Tsai P. J, Mcintosh J, Pearce P, Camden B, Jordan B.R. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract. *Food Research International.* 2002; 35(4):351–356
27. Medina-Carrillo, R., Sumaya-Martínez, M., Machuca-Sánchez, M., Sánchez-Herrera, L. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (hibiscus sabdariffa l.) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias.* 22(1): 41-44).
28. Páez, I., Rodríguez, J., Cruz, L. (2018). Optimización de la extracción de antocianinas de hibiscus sabdariffa L. y su caracterización cromática. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimento.* 28(2):17-21.
29. Pérez, D. y Ortiz, Y. (2011). Determinación de la capacidad antioxidante de bebidas de flor de jamaica y tamarindo. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimento.* 21(1):31-33.
30. Chen JH, Wang CJ, Wang CP, Sheu JY, Lin CL, Lin HH. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR $\alpha$ /ABCA1 pathway. *Food Chem.* 2013; 141: 397–406.
31. Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yee CL. Antioxidant activity in different parts of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chem.* 2010; 122: 1055–1060.