

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Evaluación de la incorporación de la fibra antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. en extractos acuosos secados por aspersion, para el diseño de un fitofármaco antihipertensivo”

Rodrigo Castañeda Molina

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, noviembre 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Evaluación de la incorporación de la fibra antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. en extractos acuosos secados por aspersión, para el diseño de un fitofármaco antihipertensivo”

**Informe final presentado por**

Rodrigo Castañeda Molina

**Para optar al grado de Maestría en Ciencias**

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, noviembre 2013

**MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Sergio Alejandro Melgar Valladares, Ph.D	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audon	Vocal V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D

MSc. Vivian Matta de García

Roberto Flores Arzú, Ph.D.

Jorge Erwin López Gutiérrez, Ph.D.

MSc. Félix Ricardo Véliz Fuentes

## **DEDICATORIA**

**“Hasta que el pueblo las canta, las coplas, coplas no son, y cuando las canta el pueblo, ya nadie sabe el autor. Procura tú que tus coplas vayan al pueblo a parar, aunque dejen de ser tuyas para ser de los demás, que, al volcar el corazón en el alma popular, lo que se pierde de gloria se gana de eternidad”.** Dedicado a mí pueblo de Guatemala.

**“Si no hay justicia para el pueblo, que no haya paz para el gobierno”** Dedicado a todas los sistemas de poder y autoridades, estatales, municipales y universitarias que entorpecen el desarrollo de Guatemala, el pueblo les demostrará de lo que es capaz...

**“No voy a nombrar todas las razones por la que los quiero y los admiro pues de ser así nunca terminaría de hacerlo, solo voy a decir que me siento feliz de ser su hijo, porque ambos son seres maravilloso con un gran corazón, queridos padres, los amo a los dos”**  
Dedicado a César e Ingrid, mis queridos viejos.

**“Esta vez, te lo dedico a vos hermano amigo que desde ayer, andas conmigo este camino, es mía la suerte de poder cantar esto que mando; agradecido”** Dedicado a Juan Carlos y al Cana.

**“¿Por qué las aves de repente aparecen cada vez que estás cerca? Como yo, ellas quieren estar Junto a ti”.** A mi queridísima, Isa.

**“Ha pasado tanto tiempo, desde que comencé a andar, por los caminos del sonido poderoso del metal”.** A mis amigos del alma, Cana, Poroj, Edy, Gerson, Cuco, Rudy, Misha.

**“Los cambios imprevistos pueden ser oportunidades para encontrar nuestro camino”.**  
A todas las personas, amigos y familiares, que me acompañan hoy y llegan siempre en el momento justo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A quienes apoyaron en la realización de ésta tesis:**

**PHARMALAT:** *Licda. Gaby Paredes, Licda. Elizabeth Beltran, Lic. Hector René Paredes, Jeremias Gálvez, Shadya Pensamiento, Arturo Lima.*

**FARMAYA:** *Ing. Sebastián Cáceres, Danilo Alonso y Victor Barillas*

**PHENIEL:** *Lic. Boris Márquez*

**LIPRONAT:** *Dra. Sully Cruz y Licda. Nereida Marroquín.*

**A mi familia:** *A mis papas, a mis hermanos, a mis sobrinos, a mis tías y tíos, a mis primas y primos. Por todo su apoyo.*

**A mi asesor de tesis:** *Armando Cáceres. Por apoyarme en trazar la ruta.*

**A mis profesores de la maestría:** *Benito Soler, Armando Cáceres, Ericka Márquez, Óscar Medinilla, Vicente Martínez, Sully Cruz, Rosa María Oliva, Manuel Arias, María Eugenia Paredes, Rodolfo Orozco. Por todos los conocimientos compartidos.*

**A mis amigos de la maestría:** *Jorge Mario, Max, Ana, Carmen, Karen, Deborah, Alma, y Juan Carlos. Por la buena compañía en estos dos años.*

**A mis amigos de licenciatura:** *Male, Elisa, Gaby, Diego, Melón, Morsa. Por aquella pasada y futura ilusión.*

**A mis amigos de siempre:** *Cana, Poroj, Edy, Gerson, Cuco, Rudy, Misha (los de la promo 56, Don Bosco). Porque siempre hay algo que compartir.*

**A mi novia:** *Isa. Por toda la inspiración, por todo el apoyo en los momentos difíciles y por la alegría y motivación en cada día.*

# INDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
1. RESUMEN EJECUTIVO.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1. Secado por aspersión.....	5
3.1.1. Etapas del secado por aspersión.....	7
3.1.1.1. Atomización.....	7
3.1.1.2. Contacto aire-gota.....	7
3.1.1.3. Evaporación.....	9
3.1.1.4. Recuperación del producto.....	10
3.1.2. Microencapsulación.....	10
3.1.2.1. Composición y parámetros de secado empleados.....	11
3.1.2.2. Indicadores para la evaluación de la calidad de las microcápsulas.....	12
2.3. <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	14
2.3.1. Clasificación taxonómica.....	14
2.3.2. Sinonimias.....	14
2.3.3. Nombres comunes.....	14
2.3.4. Distribución geográfica.....	15
2.3.5. Variedades.....	15
2.3.6. Descripción botánica.....	17
2.3.7. Aspectos agrotecnológicos.....	17
2.3.8. Usos populares.....	20
2.3.9. Especificaciones de calidad.....	24
2.3.10. Composición química.....	25
2.3.10.1. Estabilidad Química y Estructural de las Antocianinas.....	25
2.3.10.2. Estabilidad Química y Estructural de la fibra antioxidante.....	31
2.3.10.3. Propiedades fisicoquímicas, farmacéuticas y formulación.....	37
2.3.11. Farmacocinética.....	38
2.3.11.1. Farmacocinética de antocianinas.....	38

2.3.11.2. Farmacocinética de antocianinas con fibra antioxidante.....	43
2.3.12. Farmacología.....	47
2.3.13. Interacciones.....	55
2.3.14. Toxicidad.....	56
4. JUSTIFICACIÓN.....	59
5. OBJETIVOS.....	60
6. HIPOTESIS.....	61
7. MATERIALES Y METODOS.....	62
8. RESULTADOS.....	72
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	80
10. CONCLUSIONES.....	87
11. RECOMENDACIONES.....	89
12. REFERENCIAS.....	90
13. ANEXOS.....	100

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de un secador por aspersión.....	35
<b>Figura 2.</b> Etapas del secado por aspersión.....	35
<b>Figura 3.</b> Contenido químico principal de los cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	52
<b>Figura 4.</b> Núcleo de antocianinas (Ión Flavilio) y las diversas antocianinas.....	53
<b>Figura 5.</b> Cambios estructurales de Antocianinas según el pH.....	54
<b>Figura 6.</b> Degradación de antocianinas-monoglucósidos a pH 3.7 acelerado por calor.....	55
<b>Figura 7.</b> Tipos de interacciones entre compuestos fenólicos y fibra dietaria.....	59
<b>Figura. 8.</b> Farmacocinética de antocianinas.....	59



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Intervalo de tamaño de partículas obtenidas en secadores por aspersión.....	10
<b>Tabla 2.</b> Encapsulantes y parámetros de secado para diferentes productos .....	11
<b>Tabla 3.</b> Representación cromatográfica en capa fina de <i>H. sabdariffa</i> .....	23
<b>Tabla 4.</b> Límites de residuos de plaguicidas (Farmacopea Española, 2005).....	25
<b>Tabla 5.</b> Composición proximal de cálices de <i>H. sabdariffa</i> .....	33

## 1. RESUMEN EJECUTIVO

El uso de portadores para mejorar la estabilidad de las moléculas funcionales de *H. sabdariffa* con el fin de aumentar su concentración y bioaccesibilidad se ha considerado en múltiples estudios. En éste estudio se evaluó el uso de su cáliz extraído, secado y pulverizado, como portador en el proceso de secado por aspersión, y como excipiente de relleno en el proceso de encapsulado, con el fin de proteger a los compuestos bioactivos de la degradación y aumentar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos, proponiendo un mejor aprovechamiento de los recursos naturales y un mejor rendimiento industrial, al utilizar a una especie vegetal como fuente de principios activos y como fuente de su propio excipiente.

El objetivo del estudio fue evaluar la incorporación de la fibra antioxidante, como portador y como excipiente, en extractos secados por aspersión de *H. sabdariffa*, a partir de la determinación de la concentración de antocianinas expresadas en delfinidina-3-sambubiósido por el método de pH diferencial, flavonoides expresados en quercetina, y polifenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu, de extractos secos de *H. sabdariffa*, y a su vez comparar ésta cuantificación con la actividad antioxidante a partir de la determinación de la concentración inhibitoria de radicales libres a través de espectrometría con DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil), y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2`-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). También se comparó la carga microbiana en los extractos secos al incorporarles la fibra antioxidante como portador y como excipiente.

Los resultados evidencian ventajas fundamentales en el uso de la fibra antioxidante, ya que mostró un aumento estadísticamente significativo en el rendimiento del extracto seco obtenido al usarla como portador en el proceso de secado por aspersión, al proteger a los compuestos bioactivos y al evitar que el extracto se adhiriera a las paredes del secador, y aportó una mayor cantidad estadísticamente significativa de flavonoides, al utilizarla como relleno en su uso de excipiente. Por lo que la fibra antioxidante mejora los indicadores de calidad de los extractos secos, como portador y como excipiente.

## 2. INTRODUCCIÓN

El potencial farmacológico de los extractos acuosos del cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. en alteraciones metabólicas como hipertensión, dislipidemia e hiperuricemia, ha sido demostrado *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos, observándose una estrecha relación con la estabilidad química, en la extracción y almacenaje de los compuestos bioactivos, así como en su comportamiento en los compartimientos biológicos. Para lograr un efecto antioxidante en un tejido u órgano particular, los compuestos fenólicos ingeridos deben mostrar una biodisponibilidad que les permita expresar sus actividades biológicas (Mertens-Talcott *et al.*, 2008). Los principales compuestos bioactivos de los cálices de *H. sabdariffa* son antocianinas, ácido clorogénico y flavonoides, los cuales poseen una limitada biodisponibilidad, y por lo tanto un limitado potencial terapéutico. El uso de portadores para mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos de *H. sabdariffa* se ha considerado debido a una pobre eficacia en la absorción de los polifenoles administrados por vía oral (Frank *et al.*, 2005), con una biodisponibilidad menor al 1%, proponiendo que la protección de polifenoles con portadores, en lugar de administrarlos como compuestos libres, puede superar las desventajas de su inestabilidad en el procesamiento y en la digestión, mejorar la biodisponibilidad y mejorar su vida-media (Villanueva-Carvajal *et al.*, 2013), así como contrarrestar la necesidad de administrar una alta concentración de moléculas de interés para obtener la actividad esperada.

En este estudio, se propone el uso de los cálices extraídos, secados y pulverizados (fuente de fibra antioxidante), como portadores en el proceso de secado por aspersion y como excipiente de relleno en el proceso de encapsulado, permitiendo el diseño de un fitofármaco con principios activos y excipientes de origen natural, considerando la estabilidad de los compuestos fenólicos, con el fin de proteger y aumentar la concentración de flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante, y de ésta forma superar la limitada biodisponibilidad que tiene un extracto seco. El alcance de ésta investigación es considerar como alternativa de aporte dietario, el uso de los cálices extraídos después de su extracción como una fuente de fibra y como un aporte de polifenoles retenidos, para proponer a la especie *H. sabdariffa* como fuente de principios activos y como excipiente.

Una de las propuestas para mejorar la biodisponibilidad de las antocianinas, es que la digestión extrae más compuestos fenólicos que el proceso de infusión sencillo, lo que puede realizarse a partir de la administración de los cálices enteros, sin embargo la biodisponibilidad en este caso es limitado por la bioaccesibilidad de las antocianinas a liberarse de su matriz (cálices). La importancia del estudio radica en demostrar que la concentración de principios activos y de actividad antioxidante de un extracto seco de *H. sabdariffa* aumenta al incluir en la formulación a la fibra de sus cálices extraídos, proponiendo un tratamiento alternativo con dosis de principios activos definida que supere la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de las antocianinas.

A la fecha, no existe el fármaco antihipertensivo ideal, razón por la que se requiere investigar alternativas farmacológicas, por lo que las plantas medicinales son un campo importante para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Una de las especies vegetales cultivadas en el país con mayor evidencia antihipertensiva es *H. sabdariffa*, a la cual se les atribuye acción diurética, bloqueadora de la enzima convertidora de angiotensina y vasodilatadora por su actividad calcioantagonista, así como liberación del óxido nítrico, los que al actuar en forma sinérgica logran disminuir la presión arterial.

No han sido publicados estudios que incluyan, los cambios fisicoquímicos y actividad antioxidante que se producen en la elaboración de extractos acuosos de *H. sabdariffa* secados por aspersión al utilizar su fibra antioxidante incorporada a la formulación, por lo que en éste estudio se evaluó la concentración de antocianinas totales, quercetina y polifenoles totales junto a su actividad antioxidante para justificar el uso medicinal del extracto seco. El propósito del estudio es proponer un fitofármaco diseñado a partir de un uso racional de la materia prima de *H. sabdariffa*, al proponer que una especie vegetal no solo aporta una cantidad estandarizada de principios activos, sino también aporta sus propios excipientes, para obtener una mejor actividad antioxidante y por lo tanto un mejor potencial farmacológico. Esto será alcanzado a partir de la evaluación del efecto que tiene en la concentración de principios activos y actividad antioxidante la incorporación de la fibra antioxidante de los cálices extraídos pulverizados de *H. sabdariffa*, tanto en el proceso de secado por aspersión, como en el uso como excipiente en el encapsulado del producto.

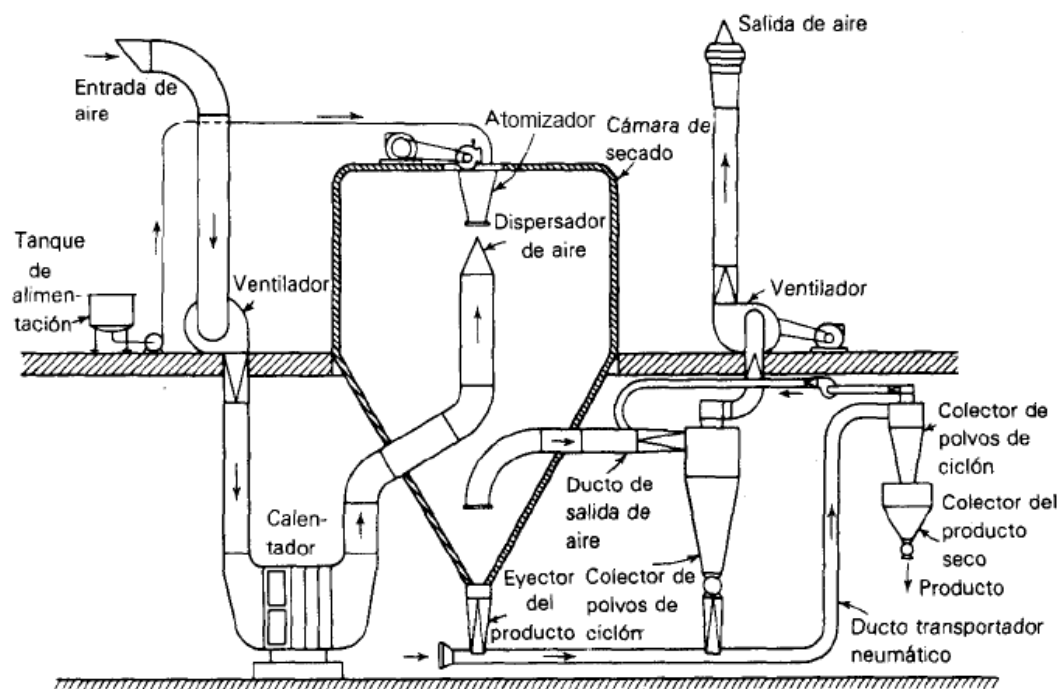
### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Secado por aspersión

La operación de secado por aspersión consiste en la transformación de una alimentación en estado líquido a un producto sólido y seco, al poner en contacto dicha alimentación en forma de gotas finas con una corriente de aire caliente. El tiempo de contacto es muy corto y en consecuencia el daño debido al calor también es mínimo (Masters, 1985). Se forman partículas de geometría esférica, con aspecto de esferillas huecas con un diámetro que puede estar entre los 20  $\mu\text{m}$  y los 200  $\mu\text{m}$ . Tienen aspecto de espuma desecada y presentan gran solubilidad. El aire caliente introducido alcanza una temperatura que oscila entre 100 y 200  $^{\circ}\text{C}$ . A pesar de la temperatura relativamente alta del aire, las gotas del líquido atomizado se calientan solo hasta 40  $^{\circ}\text{C}$  debido a la corta duración del secado (fracciones de segundo), lo que evita la degradación del producto, ya que a pesar del aporte de aire caliente, este sustrae calor por la vaporización del disolvente. Este método se puede utilizar en operaciones de recubrimiento de sólidos y líquidos porque a medida que se evapora el disolvente, el material de recubrimiento envuelve las partículas, lo que puede ser útil para enmascarar olores y sabores, mejorar la estabilidad y modificar la entrega del fármaco, como por ejemplo, los que requieren ser liberados en el colon y necesitan un recubrimiento entérico. Los secadores por aspersión son usados para el secado de productos agro-químicos, biotecnológicos (enzimas, hormonas, obtención de microencapsulados, etc.), químicos (cerámicas, detergentes, pinturas, etc.), fármacos (antibióticos y vitaminas) y alimentos (leche, suero, maltodextrinas, etc.) (Alamilla, 2001).

En los últimos años, ha habido una creciente inclinación hacia el desarrollo de productos preformulados empleando el secado por aspersión, conocido también como secado por atomización, pulverización, spray, rocío o "spray drying". Las soluciones, suspensiones y pastas pueden secarse mediante su aspersión en pequeñas gotas dentro de una corriente de gas caliente en un secador por aspersión. En la Figura 1 se muestra uno de estos aparatos. El líquido que se va a secar se atomiza y se introduce en una cámara grande de secado, en donde las gotas se dispersan en una corriente de aire caliente. Las partículas de líquido se evaporan rápidamente y se secan antes que puedan llegar a las paredes del secador; el polvo

seco que se obtiene cae al fondo cónico de la cámara y luego es extraído mediante una corriente de aire hasta un colector de polvos. La parte principal del gas saliente también se lleva al colector de polvos, como se muestra, antes de ser descargado. Son posibles muchos otros arreglos en que interviene tanto el flujo en paralelo como a contracorriente del gas y del atomizado. Las instalaciones pueden ser, incluso, de 12 m de diámetro y 30 m de altura. Los arreglos y diseños detallados varían considerablemente, según el fabricante. Los secadores por aspersion se utilizan para gran variedad de productos, que incluyen materiales tan diversos como sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, productos farmacéuticos, alimenticios como leche, huevos y café soluble, lo mismo que jabón y productos detergentes (Masters, 1985).



**Figura 1.** Esquema de un secador por aspersion (Nichols Engineering and Research Corp.)

*Fuente:* Masters, 1985.

Con el fin de obtener un secado rápido, la atomización de la alimentación debe proporcionar pequeñas partículas de elevada relación superficie/peso. Con esta finalidad, se pueden utilizar boquillas de aspersion o discos que giren rápidamente. Las boquillas de aspersion son principalmente de dos tipos: las boquillas a presión, en las cuales el líquido se bombea a

una presión elevada, con un movimiento circular rápido a través de un pequeño orificio y las boquillas de doble fluido en las cuales se utiliza un gas como aire o vapor a presiones relativamente bajas para separar al líquido en pequeñas gotas. Las boquillas poseen características relativamente invariables de operación; no permiten siquiera una variación moderada en los flujos del líquido: una variación semejante produce cambios muy grandes en el tamaño de las gotas. Las boquillas se erosionan y deterioran con rapidez. Por lo tanto, en la industria química se prefieren los discos giratorios. Éstos pueden ser planos, en forma de aspas o en forma de copas, hasta de 0.3 m (12 pulg) de longitud aproximadamente y pueden girar a velocidades de 50 a 200 rps. El líquido o suspensión se alimenta sobre el disco, cerca del centro y se acelera centrífugamente hacia la periferia, de donde se arroja en una atomización en forma de paraguas (Masters, 1985).

Puede manejarse satisfactoriamente una variación apreciable en las propiedades del líquido y los flujos de alimentación; aún las suspensiones o pastas espesas se pueden atomizar sin tapar el aparato, siempre y cuando se bombeen en el disco. El gas de secado, ya sea gas de combustible o aire, puede entrar a la temperatura práctica más elevada, 80 a 760 °C (175 a 1400 °C), limitada únicamente por la sensibilidad del producto a la temperatura. Puesto que el tiempo de contacto entre el producto y el gas es muy corto, es posible utilizar temperaturas relativamente elevadas (Masters, 1985).

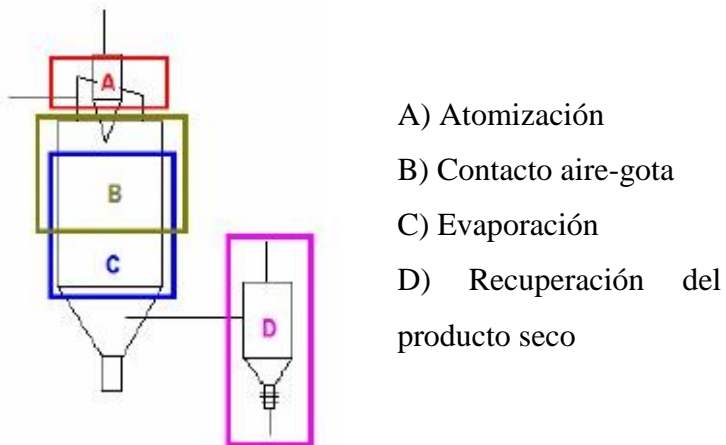
El corto tiempo de secado requiere un mezclado efectivo del gas y el atomizado; debido a la gran cantidad de intentos por conseguirlo, existe una gran cantidad de diseños de las cámaras de aspersión. Algunas veces, se admite aire frío en las paredes de la cámara de secado, con el fin de evitar que el producto se pegue a los lados. El gas efluente puede arrastrar todo el producto seco fuera del secador; es posible también que únicamente arrastre el más fino; en cualquier caso, el gas debe pasar a través de algún tipo de colector de polvos, como ciclones o filtros de bolsa; algunas veces, después de pasar por éstos, pasa por lavadores de humedad que eliminan las últimas trazas de polvo. La recirculación del aire caliente al secador con el fin de economizar calor no es práctico, porque la operación de recuperación de polvos generalmente no puede lograrse sin pérdida apreciable de calor (Masters, 1985).

Las gotas de líquido alcanzan rápidamente su velocidad terminal en la corriente gaseosa, a pocos centímetros del aparato de atomización. La evaporación ocurre desde la superficie de las gotas; en el caso de muchos productos, se puede acumular materia sólida como una cubierta impenetrable. Como de todas maneras el calor se transmite rápidamente a las partículas desde el gas caliente, la porción atrapada de líquido en la gota se evapora y hace que la pared de la gota, plástica todavía, aumente hasta 3 a 10 veces su tamaño original; finalmente, al explotar se abre un pequeño agujero en la pared escapando y dejando una cubierta hueca y seca de sólido como producto (Masters, 1985).

El secado por aspersión ofrece la ventaja de un secado extremadamente rápido para los productos sensibles al calor, un tamaño y densidad de la partícula de producto que son controlables dentro de ciertos límites y costos relativamente bajos de operación, en especial en el caso de secadores de capacidad grande (Masters, 1985).

### 3.1.1. Etapas del secado por aspersión

El secado por aspersión consiste en cuatro etapas (Figura 2) (Masters, 1985):



**Figura 2.** Etapas del secado por aspersión

*Fuente:* Masters, 1985

#### 3.1.1.1. Atomización

La atomización se logra al aplicar energía a la masa de líquido que va a ser procesado. Esta operación debe producir una nube de líquido con alta relación superficie-masa y la



dispersión del tamaño de partícula debe mantenerse al mínimo (Masters, 1985). La atomización es la operación más importante en el proceso de secado por aspersión. El tipo de atomizador determina la energía requerida para formar la nube, el tamaño y la distribución de tamaño de las partículas atomizadas, su trayectoria y velocidad, siendo estos los factores de los que depende el tamaño final de la partícula seca (Filková *et al.*, 2006). La trayectoria de viaje de la gota asperjada, principalmente la de gotas grandes merece una atención especial, ya que el tamaño de la cámara deberá diseñarse de tal forma que las gotas más grandes de la nube asperjada deben secarse antes de alcanzar la pared de la cámara de secado (Alamilla, 2001).

Los aspersores/atomizadores utilizados son (Masters, 1985): Atomizadores rotatorios, que originan una descarga de líquido a alta velocidad desde el eje de un disco rotatorio; Boquillas a presión, que descargan líquido bajo presión a través de un orificio pequeño; Boquillas neumáticas, que logran la aspersión por medio del uso de aire u otro gas a alta velocidad en contacto con la alimentación. Los intervalos típicos de tamaño de partículas obtenidos en secadores por aspersión se muestran en el Tabla 1.

Tabla 1. Intervalo de tamaño de partículas obtenidas en secadores por aspersión

<b>Atomizador</b>	<b>Tamaño de partícula (µm)</b>
Discos rotatorios	1-600
Boquillas de presión	10-800
Boquillas neumáticas	5-300

*Fuente:* Masters, 1985

### 3.1.1.2. Contacto aire-gota

Existen tres formas básicas de contacto aire-gota (Masters, 1985):

Flujo paralelo. El asperjado y el aire caliente se introducen en la zona superior de la cámara y viajan en la misma dirección a través del secador. El aire caliente contacta inicialmente a las gotas atomizadas. Esto favorece a los materiales termolábiles, ya que éstos son protegidos de las altas temperaturas por enfriamiento evaporativo. El gas de secado se va

enfriando al pasar a través de la cámara y las partículas secas se encuentran con aire más frío a la salida del equipo. Cuando se utiliza un atomizador rotatorio se presenta un perfil homogéneo de temperaturas dentro de la cámara de secado.

Flujo a contracorriente. El aire de secado y el asperjado se mueven en direcciones opuestas en la cámara de secado. Debido a que las partículas secas se ponen en contacto con el gas más caliente y el tiempo de exposición es mayor, el diseño se propone para productos no termolábiles. En estos casos, el producto seco sale a una temperatura tan alta como la del gas de secado. Este arreglo se utiliza cuando se quiere impartir ciertas cualidades al producto, como por ejemplo, una alta densidad a granel para el caso de detergentes.

Flujo mixto. Una boquilla se coloca en el fondo de la cámara, dirigida hacia arriba, dentro de la corriente descendente del gas, cuya entrada se encuentra en el techo de la cámara. Este arreglo no se recomienda para productos termolábiles ya que las partículas secas están en contacto con el aire más caliente, sin embargo se recomienda para partículas gruesas en cámaras pequeñas, ya que la longitud del patrón de viaje de las partículas es grande. Se ha observado que estas partículas pueden presentar movimiento dentro de la cámara tanto del tipo paralelo como en contracorriente.

### 3.1.1.3. Evaporación

La velocidad de evaporación se lleva a cabo en dos periodos (Masters, 1985; Treybal, 1996):  
Período de velocidad constante. La difusión de humedad desde dentro de las gotas permite tener la superficie saturada de líquido, el tamaño de la gota va disminuyendo y en la superficie la temperatura permanece constante. El aire de secado disminuye su temperatura a medida que gana humedad.

Período de velocidad decreciente. La velocidad de migración de la humedad a la superficie no es suficiente para mantenerla saturada, en este momento aparecen áreas secas sobre la superficie, alcanzándose el punto crítico de humedad en donde la gota ya no puede contraerse más en volumen y su temperatura empieza a ascender. En este punto el aire de secado llega a la temperatura y humedad críticas, su temperatura sigue disminuyendo hasta la fijada por el final del proceso aumentando su humedad.

#### 3.1.1.4. Recuperación del producto

La separación del producto se puede realizar primero en la base de la cámara de secado (denominada separación primaria), seguida de la recuperación de finos (denominada separación secundaria), que puede estar constituida por ciclones, filtros bolsa, precipitadores electrostáticos o filtros húmedos (Masters, 1985).

Los separadores ciclónicos son los más empleados para la separación y recolección de polvo. En estos el aire cargado de polvo entra en forma tangencial a una cámara cilíndrico-cónica girando rápidamente y sale por la parte central superior. El producto seco, debido a su inercia, tiende a moverse hacia la pared exterior del separador donde continúa hasta caer en un receptor (Masters, 1985).

#### 3.1.2. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica que se ha aplicado para preservar y/o proteger numerosos ingredientes. Puede considerarse una forma especial de empaquetar materiales sólidos, líquidos y gaseosos en miniatura. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la solución, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. El material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente, de la reacción con otros compuestos o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Permite proteger del ambiente a sustancias sólidas o líquidas, divididas en pequeñas partículas o gotas (fase interna), recubriéndolas con una película de carbohidratos u otro material polimérico (Yoshi, 2001; Ré, 2000)

Una de las grandes ventajas de este proceso, en comparación con otros métodos de microencapsulación, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales muy volátiles y sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s). Los principales encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas

(arábica, mezquite, guar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación. (Yoshi, 2001; Ré, 2000; Goud, 2005; Yáñez, 2002)

#### 3.1.2.1. Composición y parámetros de secado empleados

Cuando se usan polisacáridos como agentes encapsulantes, como en el secado por aspersión, también deben revisarse detalladamente sus propiedades funcionales. Por ejemplo, las maltodextrinas se usan en combinación con goma arábica para contribuir en la continuidad estructural durante la formación de la película encapsulante, al combinar dos compuestos de muy diferente masa molecular (aproximadamente 1.8 y 1 700 kDa respectivamente) mejorando con ello la eficiencia de encapsulación de aceites, aún de bajo peso molecular. Sin embargo, el grado de hidrólisis de las maltodextrinas también es un factor a considerar, ya que equivalentes de dextrosa muy bajos no tienen el efecto positivo mencionado. Recientemente se ha demostrado, que por la interacción existente entre la goma arábica y los lípidos previene la oxidación. Se ha reconocido el efecto benéfico de protección de los ácidos grasos poliinsaturados contra la oxidación usando polisacáridos.

Para evaluar la sustitución de la goma arábica por otros agentes encapsulantes, se prepararon emulsiones con concentraciones entre 14.3 y 44.7 %. Se secaron a temperaturas de entrada y salida de 180 y 100-120 °C, respectivamente. Se concluyó que el uso de almidón de maíz como reemplazante total de la goma arábica produce un polvo con una eficiencia de encapsulación pobre (30%). Sin embargo, cuando se combinan los materiales de la pared (50% de glucosa y 50% de goma arábica) se alcanza una eficiencia de encapsulación elevada (92%). Además, se demostró que la goma arábica puede ser reemplazada parcialmente por maltodextrina o almidones para encapsular materiales lipídicos, y que la elevación de la concentración de sólidos en la emulsión incrementa significativamente la eficiencia de encapsulación. Otras condiciones de secado para emulsiones de maltodextrina y goma

arábiga han sido empleando temperaturas de entrada y salida de 180 y 95 °C respectivamente, usando caseinato de sodio como encapsulante y también de 200 y 110 ± 10 °C respectivamente con maltodextrina y goma arábica (Hogan, 2001; Soottitantawat, 2003).

**Tabla 2.** Encapsulantes y parámetros de secado para diferentes productos

Productos	Encapsulantes	Te/Ts (°C)	Observaciones
Ácido linoléico	Concentrado de proteínas de suero lácteo al 30 %	–	Eficiencia de encapsulación 89.60 % Ácido libre de 1.77 %
Carotenoides	–	170 ± 5/ 80 ± 3	–
Aceite de hígado de bacalao	Goma arábica, goma de mezquite y maltodextrina, solas y en mezclas	170 ± 5/ –	La goma arábica fue la que más retuvo el aceite
Ácido linoléico con linoleato	Goma arábica	–	–
Aceite de hígado de tiburón	Maltodextrina, goma arábica, gelatina	180/75	Eficiencia de encapsulación de 82 %
Vitamina A	Maltodextrina, goma arábica	–	–
Ácido linoléico	Goma arábica y maltodextrina	–	–
Aceite de soya	Maltodextrina gelatina	150/90	30 % sólidos
Aceite de aguacate	Aislado de proteínas de suero lácteo, maltodextrina DE 5	180/80	Eficiencia de encapsulación 45–66 %
Aroma de café	Goma cashew 30 %	180/90	–
Aceite de pescado	Celulosa modificada, leche descremada, gelatina y almidón de maíz	–	–
Aceite de palma	–	180/113	–
β-caroteno	Almidón de tapioca nativo, modificado y maltodextrina	170/95	–
Ácido linoléico	Goma arábica y maltodextrina	200/100	–
Aceite de pescado	n-octenilsuccinato de almidón, y sirope de glucosa o trehalosa	170/70	–
Aceite de semillas de <i>Cucurbita pepo</i> L	Goma arábica y maltodextrina	180/90	37 % sólidos y 33 % aceite

Fuente: Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003).

### 3.1.2.2. Indicadores para la evaluación de la calidad de las microcápsulas

Eficiencia de encapsulación: Indica la cantidad de sustancia encapsulada, dando una medida de la eficiencia del procedimiento de microencapsulación utilizado. La eficiencia de

encapsulación, también llamada de microencapsulación (ME) puede ser calculada empleando la expresión siguiente:  $ME = \frac{(\text{Compuesto total} - \text{compuesto extraíble})}{\text{compuesto total}} \cdot 100$  (Hogan, 2001; Rodríguez, 2004). Otros autores han utilizado el término aceite incorporado, calculándose por la relación de la diferencia entre el total teórico o real con el libre y el total teórico o real, empleando la siguiente expresión:  $\% \text{ Incorporación} = \frac{(\% \text{ Total} - \% \text{ Libre})}{\% \text{ Total}} \cdot 100$  (Hermida L, *et al.*, 2002).

Distribución de tamaño de partículas: Muestra la composición porcentual correspondiente a los diferentes tamaños, lo que permite la caracterización de la muestra en cuanto a tamaño.

Morfología: Indica la forma geométrica de las partículas, lo cual es un aspecto de importancia que define aspectos tecnológicos en las etapas siguientes de elaboración de la forma terminada.

Aspecto de la superficie: Permite conocer la continuidad de la capa polimérica por la ausencia de poros, lo cual atenta contra la estabilidad de las microcápsulas.

Carga de principio activo: Indica el contenido de la sustancia activa encapsulada, lo cual sirve para formular el producto final con la dosis requerida. Se expresa como la cantidad de principio activo por cada 100 mg de masa de micropartículas según:  $\text{Carga} = \frac{\text{Cantidad de principio activo}}{100 \text{ mg micropartículas}}$ . También puede ser expresada en porcentaje.

Disolventes orgánicos residuales: Denota la presencia de disolventes orgánicos en caso de ser empleados en la formación de las microcápsulas y deben encontrarse en concentraciones casi inapreciables si se detecta.

Perfil de liberación del principio activo: Indica el tiempo en que se va liberando el principio activo en el caso de un sistema de liberación controlada.

Ensayos de esterilidad y apirogenicidad: Se realizan solamente para medicamentos estériles como colirios y parenterales.

Factibilidad en la elaboración de formas sólidas: Se realiza como parte de la caracterización tecnológica del producto, si va a ser utilizado para formular una forma sólida, valorando parámetros como la velocidad de flujo, la resistencia mecánica, densidad, etcétera.

### **3.2. *Hibiscus sabdariffa* L.**

#### 3.2.1. Clasificación taxonómica

Según la clasificación de Cronquist (1981), *H. sabdariffa* pertenece al Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase magnoliopsida, Subclase Dilleniidae, Orden Malvales, Familia Malvaceae, género *Hibiscus*.

Según la clasificación filogenética de Angiospermas (2009), *H. sabdariffa* pertenece al Reino Plantae, división Angiospermae (Magnoliophyta), Clase Eudicotyledoneae, grupo Malvidae (Eurrósidas II), orden Malvales, Familia Malvaceae, Género *Hibiscus*.

#### 3.2.2. Sinonimias

*Abelmoschus cruentus* Bertol; *Hibiscus cordofanus* Turcz; *Hibiscus cruentus* Bertol; *Hibiscus digitatus* Cav; *Hibiscus fraternus* L; *Hibiscus palmatilobus* Baill; *Sabdariffa rubra* Kostel (Royal Musseum for Central Africa).

#### 3.2.3. Nombres comunes

Es conocida en Guatemala como rosa de Jamaica. En otros países de Latinoamérica es conocida como hibisco, hibiscus, té de Jamaica, rosa de Jamaica (México), viñuela, quimbombó (Panamá, Cuba), chiriguata (Venezuela), abutilón (Colombia), sorrel, agra (Costa Rica). En portugués es conocida como hibiscus, hibisco, pampola, pampulha, papoula, vinagreira, azadinha. En inglés es conocida como sorrel (Caribe) o Roselle (Inglaterra). En francés es conocida como *karkadé* (Francia, Egipto, Arabia, Sudán, norte de África). En Senegal es conocida como Bissap, en Namibia como mutette. En italiano es

conocida como carcadé ó ibisco. En alemán es conocida como Malven tee. En India es conocida como mesta (Banquer, 2009).

#### 3.2.4. Distribución geográfica

Es originaria del Asia tropical y Sudán, siendo posteriormente introducido en Egipto, Sri Lanka, Tailandia, Jamaica, México y Guatemala, lugares donde suele crecer silvestre o se cultiva. China ocupa el primer lugar en la producción de jamaica, seguido por India, Sudán, Uganda, Indonesia, Malasia, México, Filipinas, Taiwán, Guinea, Angola y Estados Unidos; tomando en cuenta la producción de cada continente, México ocupa el primer lugar en América seguido por Estados Unidos (Rojas, 1999).

A nivel nacional el departamento de Baja Verapaz ocupa el primer lugar de producción de rosa Jamaica con 60.36% de la producción total del país; seguido por los departamentos de Huehuetenango con 28.37%, Guatemala con 4.01%, Jutiapa con 2.51%, Escuintla con 1.42%, El progreso con 1.38%, Quiché con 0.44% e Izabal con 0.34% (Hidalgo-Villatoro *et al.*, 2009).

#### 3.2.5. Variedades

Hidalgo-Villatoro *et al.* (2009) realizaron una colecta de genotipos de *H. sabdariffa* en las zonas productoras de Guatemala con la que se inició una pequeña colección de trece accesiones que fue utilizada para establecer un programa de mejoramiento genético La caracterización agromorfológica de la colección constituida se hizo a partir de 24 caracteres cuantitativos y siete cualitativos. Las accesiones se agruparon de acuerdo a su ciclo de crecimiento y cosecha en tardíos, intermedios y precoces. Tres accesiones, identificadas como 0205, 1205 y 1305, se catalogaron como promisorias debido a su precocidad y rendimiento sobresaliente. Entre las variedades de rosa de Jamaica identificadas en Guatemala se encuentran:

3.2.5.1. ICTA 0205: Selección realizada en Guatemala por ICTA. Ciclo de 165 días a cosecha. Altura de 1.75 metros. Hojas trilobuladas con nervaduras prominentes de color rojizo, bellotas y cálices grandes de color morado, gruesos y crujientes. Alto rendimiento.



Tolerancia a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y susceptible a *Fusarium* sp. Susceptible al acance de sus ramas. (Hidalgo-Villatoro *et al.*, 2006).

3.2.5.2.ICTA 1205: Cultivar de Guatemala identificado por ICTA en la región productora de Huehuetenango. Ciclo de 180 días a cosecha. Altura de 1.65 metros. Hojas de cinco lóbulos, bellotas con cálices medianos, color rojo claro, suaves a cosecha y mediano rendimiento. Con susceptibilidad a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y *Fusarium* sp. (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006)

3.2.5.3.ICTA 1305: Cultivar de Guatemala identificado por ICTA en las regiones productoras de Baja Verapaz. Ciclo de 155 días a cosecha. Altura de 1.65 metros. Hojas de cinco lóbulos, bellotas con cálices medianos de color rojo claro. Con susceptibilidad a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y *Fusarium* sp. (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006)

3.2.5.4.Indonesia: Variedad de Nicaragua, introducida por ICTA, Ciclo tardío 200 días a cosecha, siendo una de las variedades más tardías. Altura de 1.65 metros. Hojas de cinco lóbulos, bellotas de color rojo, cálices suaves con color rojo intenso. Con susceptibilidad a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y *Fusarium* sp. (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006)

3.2.5.5.Criolla Nayarit: Variedad de Nayarit, México, introducida por ICTA. Ciclo de 180 días a cosecha. Altura de 1.75 metros. Hojas de cinco lóbulos, bellotas de color rojo claro, cálices delgados y suaves a cosecha. Con susceptibilidad a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y *Fusarium* sp. (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006).

3.2.5.6.Reina: Variedad de Nayarit, México, introducida por ICTA. Ciclo de 165 días a cosecha. Altura de 1.60 metros. Hojas con cinco lóbulos, bellotas grandes, con cálices largos y carnosos de color rojo intenso. Alto rendimiento. Con susceptibilidad leve de enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y susceptible a *Fusarium* sp. Es susceptible al acame de sus ramas. (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006)

3.2.5.7.Criolla x Reina (F2): Cruce realizado en la Universidad Autónoma de Nayarit, México e introducida por ICTA. Ciclo de 175 días a cosecha. Altura de 1.75 metros. Bellotas grandes, con cálices semi-gruesos y crujientes de color rojo intenso. Alto rendimiento. Presenta una gran variación en sus características. Con susceptibilidad a enfermedades asociadas a *Oidium* sp. y *Fusarium* sp. (Hidalgo-Villatoro, *et al.* 2006)

### 3.2.6. Descripción botánica

Es una planta anual, herbácea, leñosa en la base, erecta, de 1 a 2 m de alto, y de fotoperiodicidad marcada. El tallo es de forma cilíndrica, ramificado y alcanza diámetros de 1.5 a 2 cm, de color rojizo generalmente aunque también puede ser de color verde. Contiene abundante fibra. Hojas superiores con 3-5 lóbulos, lineales o elípticos, finamente dentados y hojas inferiores normalmente enteras y ovaladas. Los pecíolos pueden ser cortos o largos y lisos, lóbulos angostos, borde aserrado, nervadura central, glándula grande cerca de la base en el envés (Rodríguez, 2002). Posee un sistema radicular herbáceo y poco profundo, aumentando su profundidad hasta 1.5 m en suelos francos arenosos. En suelos verticales se desarrolla un promedio de 1 a 1.20 m (Nechari, 2001). Las flores son solitarias en las axilas de las hojas; el cáliz tiene adherido a la base un epicáliz carnoso, con 8 a 12 bracteolas delgadas, agudas y pubescentes, con un canal longitudinal en el lado interno del ápice. El cáliz es cónico en la base y se divide arriba en 5 o 7 sépalos ovoidales, cada uno con una pequeña glándula en el centro, es carnoso de color rojo brillante y de sabor ácido. Columna estaminal poco saliente. Cáliz de 2 cm de largo, 5 pétalos de 4-5 cm de largo, de color amarillo y verde pálido al inicio de la floración, carnoso y rojo brillante cuando inicia el desarrollo de las semillas, y sabor ácido, estambres numerosos, ovario superior con 5 carpelos cerrados y placentación axial. El fruto es una cápsula espinosa, de 5 carpelos, con semillas duras de 15 a 20 semillas de media por baya. Las semillas son pequeñas, de color café oscuro y con un peso medio de 2 g (Nechari, 2001).

### 3.2.7. Aspectos agrotecnológicos

Requiere suelos moderadamente ricos, bien drenados y con humedad permanente, aunque se adapta bien a casi todos los suelos, prefiere suelos areno-limosos, debido a que la planta desarrolla un sistema radicular grande y profundo (Godínez, 1988). El cultivo prefiere un clima cálido con un óptimo de temperatura alrededor de 25°C, tolerando temperaturas mínimas de 7-10°C, y un régimen pluvial de mínimamente 400-500 mm distribuido durante el período vegetativo de 4-5 meses. Debido al fotoperiodismo crítico de 12 horas luz el cultivo se limita a regiones inferiores a 25° de latitud. Para la reproducción se requiere un

periodo de oscuridad de minimamente 11.5 h, la inducción floral ocurre con 12.5-13.5 horas luz/día, al mismo tiempo termina el crecimiento apical (Naturland, 2000).

Para la preparación del terreno, es suficiente un paso de arado y rastra en suelos sueltos, para facilitar a las plantas un buen desarrollo radicular. La producción es por semillas, en ciertos casos para la preparación del semillero, pueden emplearse estacas. La semilla debe sembrarse a 10 cm al cuadro, en camas o tablones, enterrándolas aproximadamente 1 cm. Para el trasplante, cuando han alcanzado 10 cm se procede a realizarlo al campo definitivo. La siembra directa, se puede realizar a mano o en forma mecanizada (Godínez, 1988).

Es preferible arar el suelo previo a la siembra, debido al sistema radicular que es grande y profundo; especialmente donde la lluvia es escasa. Los deshierbes después de la siembra son suficientes para asegurar un buen cultivo. Además, una poda, con el propósito de obligar a la planta a dar más ramas con más brotes y por lo consiguiente con más flores, consiste en eliminar de 10 a 15 cm de la yema terminal de las plantas durante la primera etapa de crecimiento (Godínez, 1988).

La siembra directa es recomendable realizarla con el instrumento conocido en diferentes lugares como macana, chuzo, etc., dejando de 4 a 6 semillas por postura. El distanciamiento adecuado será de 1 a 1.50 m entre surcos y de 75 cm a 1 m entre postura, dejando una o dos plantas después del raleo. La cantidad de semilla a utilizar es de 7.8-11.7 Kg por hectárea, considerando el raleo y algunos otros factores que puedan incidir en la población (Godínez, 1988).

La producción tradicional de rosa de Jamaica se realiza generalmente en suelos menos fértiles y debería ocupar cada año otro espacio del predio. Se lo cultiva muchas veces después en un barbecho o después de cultivos como arroz, maíz, sorgo, frijol y maní. En estos casos se aplicará abonos verdes y se integrarán cultivos leguminosos dentro de la rotación de cultivos. Se evitará la siembra seguida en la misma parcela debido a la

autoincompatibilidad del cultivo y el peligro de afectaciones por nemátodos. Se deberá evitar el cultivo de algodón y rosa de Jamaica dentro de la misma rotación (Naturland, 2000).

En Guatemala no se reportan daños severos; solamente una pequeña incidencia de hongos en la pudrición del tallo, el daño de zompopos durante los primeros dos meses e incidencia de un posible virus que afecta las hojas. Choussy (1942), reporta ataque de hormigas, el cual es indispensable controlar sólo en los primeros meses, incidencia de *Oidium* sp., que se desarrolla durante la floración; el *Phoma sabdariffae* Sacc., algunas cochinillas del género *Coccus*, el teñidor de algodón, *Dysdercus suturelius*, que se desarrolla en los cálices.

La recolección de los cálices se efectúa a los veinticinco días después de la floración, que es cuando ha alcanzado su madurez (Choussy, 1942). La planta está lista cuando los cálices están hinchados y quebradizos; y su base rojiza; frágil y de un rojo intenso; antes que el tejido comience a ponerse fibroso y pueda arrancarse el fruto dándole un tirón rápido, o bien cortando con un machete las ramas que contienen los cálices y formando manojos se traslada a lugares sombreados para efectuar la cosecha. En ambas formas es necesario separar los cálices de la cápsula, lo cual puede efectuarse con navaja manualmente o utilizando un equipo sencillo especial. Cuando se deseen utilizar las hojas y los tallos tiernos se recolectan a las seis semanas de la siembra, cortando la planta a unos diez centímetros del suelo; al cabo de un mes, se da el segundo corte y el mes siguiente el tercero.

Los cálices de rosa de jamaica se comercializan tanto frescos (recién cosechados), como secos, siendo la última forma la más importante, utilizándose para ello el método de secado directamente al sol. Ordóñez (1989), considera que el secado en secadoras solares es un método alternativo más eficiente, ya que a pesar que en su investigación no encontró diferencias significativas en cuanto a tiempo de secado, si se obtiene una mejor coloración, textura y relación peso fresco-peso seco, por la que es más recomendable.

### 3.2.8. Usos populares

Localmente la planta es cultivada principalmente para la preparación de una infusión a partir de sus cálices, sin embargo en otros países se utilizan sus tallos, hojas y semillas, debido a importantes propiedades medicinales y comerciales.

Los ácidos y pigmentos que contienen los cálices son utilizados para la elaboración de bebidas, vinos, coloración de embutidos, también pueden prepararse jaleas, jarabes, dulces, mermeladas, compotas, extracto para refrescos, postres y pasteles, tortas, salsas, uso culinario y una infinidad de otros productos. La pulpa después de hacer jalea, puede utilizarse para hacer conservas dulces, concentrados para la alimentación de ganado, para lo cual la fruta a procesarse debe estar fresca.

Standley y Steyermark (1946), refiere que de sus tallos se obtiene una fibra suave de igual calidad que el kenaf (*Hibiscus cannabinus*) y puede sustituir al yute en la fabricación de cordeles y sacos; las fibras de los tallos han sido bastante utilizados por los indígenas en la elaboración de jarcias o cardaje. Choussy (1942), menciona que una vez separada la corteza que contiene la fibra, son perfectamente utilizados ya que cuentan con un alto porcentaje de celulosa sin gomas ni resinas, que pueden constituir una excelente materia prima para la obtención de pasta para la fabricación de papel, el cual si puede ser elaborado en el país y puede llegar a tener mucho valor comercial. De los tallos tiernos y hojas pueden elaborarse: jaleas, jarabes, vinos, etc., y cocidos se utilizan como verduras.

Ibrahim, *et al.* (1971), refiere que las hojas son empleadas en la elaboración de bebidas medicinales en Sudán. Navarrete (1975), dice que en México son consumidos sus brotes verdes (retoños) al parecer es una comida muy popular en algunos estados. Choussy (1942), recomienda cortar los retoños dos veces antes de la floración. Su utilidad como cubierta es indiscutible; cubre totalmente el suelo, impidiendo el crecimiento de malas hierbas, modera la erosión y deja el suelo completamente limpio después de secas las plantas, las cuales se pudren con facilidad, constituyéndose en un buen abono.

Navarrete (1975), indica que la semilla es utilizada en la alimentación de las aves. Asimismo, potencialmente puede ser utilizada en la extracción de aceite y elaboración de manteca y margarina, como comestible. Choussy (1942), indica que la torta de semilla que se obtiene después de extraer el aceite, puede ser utilizada en la alimentación de ganado, de una riqueza en contenido de proteína.

### 3.2.9. Especificaciones de calidad

3.2.9.1. Definición: Cáliz y cálculo desecados, enteros o fragmentados, de *Hibiscus sabdariffa* L., recolectados durante el periodo de fructificación. Con un contenido como mínimo 13.5% de ácidos, expresados como ácido cítrico en droga desecada (Farmacopea Europea, 2005).

#### 3.2.9.2. Identificación:

Droga cruda: El cáliz es concrescente y urceolado en su mitad inferior, la mitad superior se separa en 5 dientes acuminados o recurvados. Los dientes poseen una nervadura mediana bien marcada, ligeramente prominente, y llevan una gruesa glándula nectarífera que mide aproximadamente 1 mm de diámetro. El cálculo se compone de 8 a 12 folíolos pequeños, obovados, adheridos a la base del cáliz. El cáliz y el cálculo son carnosos, secos, friables, de color rojo brillante a violeta oscuro, algo más claro en la base de la cara interna (Farmacopea Europea, 2005).

Droga pulverizada (tamiz 355): El polvo es de color rojo a rojo-violáceo. Al examinar al microscopio utilizando disolución de hidrato de cloral R, el polvo presenta predominantemente fragmentos de parénquima de color rojo, que contienen numerosas drusas de oxalato de calcio y, esporádicamente, cavidades rellenas de mucílago, a veces asociadas a células epidérmicas poligonales y estomas anisocíticos; numerosos fragmentos de haces conductores con vasos espiralados y reticulados; fibras esclerenquimatosas con lumen ancho; escasas fibras parenquimatosas rectangulares punteadas; fragmentos de pelos tectores unicelulares lisos y flexuosos, y ocasionalmente pelos glandulosos; granos de polen redondeados con exina espinosa (Farmacopea Europea, 2005).

Composición química (cromatografía en capa fina): A 1.0 g de la droga pulverizada (tamiz 355) añadir 10 ml de etanol al 60% V/V R. Agitar durante 15 min y filtrar. De solución de referencia utilizar rojo de quinaldina R (disolver 2.5 mg de en 10 ml de etanol al 96% V/V R). Aplicar en una placa de gel de sílice para cromatografía en capa fina fase reversa. Utilizar de fase móvil ácido acético R, agua R, butanol R (15:30:60 V/V/V). Aplicar 20 µl, en bandas. Permitir el desarrollo hasta una distancia de 10 cm. Realizar el secado al aire y la detección a la luz del día. Obtener una secuencia de bandas de la siguiente forma:

**Tabla 3.** Representación de cromatografía en capa fina de *H. sabdariffa*

<b>Zona alta de la placa</b>	
Rojo de quinaldina: una banda rojo-anaranjada	Una banda violeta pálida Una banda azul-violeta Una banda azul-violeta Una banda azul-violeta
<b>Disolución de referencia</b>	<b>Disolución problema</b>

*Fuente:* Farmacopea Española, 2005.

### 3.2.9.3. Ensayos:

Elementos extraños: Como máximo 2% de fragmentos de frutos: funículos rojos y fragmentos de la cápsula pentalocular con pericarpo gris amarillento, cuyas paredes delgadas se componen de varias capas de fibras cruzadas, semillas reniformes aplastadas con superficie punteada.

Pérdida por desecación: Como máximo 11.0%, determinada en 1.000 g de la droga pulverizada (tamiz 355) mediante desecación en estufa a 100-105 °C durante 2 h.

Cenizas totales: Como máximo 10.0%.

Poder colorante: Reducir la droga a polvo grosero (tamiz 1400) y homogeneizar 100 g de droga. Reducir aproximadamente 10 g de esta mezcla a polvo más fino (tamiz 355). Introducir 1.0 g de droga pulverizada (tamiz 355) en un matraz de 100 ml, añadir 25 ml de

agua R hirviente y calentar sobre un baño de agua durante 15 min, agitando frecuentemente. Filtrar la mezcla caliente en un matraz aforado de 50 ml; enjuagar sucesivamente el matraz de 100 ml y el filtro 3 veces, con 5 ml de agua R caliente cada vez. Enfriar y a continuación completar hasta 50 ml con agua R. Diluir 5 ml de esta disolución hasta 50 ml con agua R. Medir la absorbancia a 520 nm utilizando agua R como líquido de compensación. La absorbancia es como mínimo 0.350 para la planta entera y como mínimo 0.250 para la planta troceada.

3.2.9.4. Valoración: Agitar 1.000 g de droga pulverizada (tamiz 355) con 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono R durante 15 min. Filtrar. Añadir 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono R a 50.0 ml del filtrado. Valorar con hidróxido de sodio 0.1 M hasta pH 7.0, determinando el punto final potenciométricamente. 1 ml de hidróxido de sodio 0.1 M equivale a 6.4 mg de ácido cítrico.

3.2.9.5. Criterios adicionales: Según los métodos de control de calidad para plantas medicinales de la OMS (1998 y 2007), también deben de cumplirse con los siguientes criterios de calidad:

Metales pesados: 10 mg/Kg de plomo y 0.3 mg/Kg de cadmio.

Límites de contaminación microbiana en materiales de plantas medicinales se establecen de acuerdo con el uso del material:

Los límites máximos para la contaminación de material vegetal "crudo" destinado a un procesamiento posterior (incluyendo la descontaminación adicional por un proceso físico o químico), se dan para materiales vegetales sin tratar cosechados bajo condiciones higiénicas aceptables: *Escherichia coli*:  $10^4$ /g; propágulos de mohos:  $10^5$ /g.

Los límites máximos para los materiales de plantas que se han pretratado (por ejemplo, con agua hirviendo tal como se utiliza para té de hierbas e infusiones) o que se utilizan como formas de dosificación tópica: Bacterias aerobias:  $10^7$ /g; levaduras y mohos:  $10^4$ /g; *E. coli*:  $10^2$  /g; otras enterobacterias:  $10^4$ /g; salmonelas: ninguno.

Los límites máximos para materiales vegetales de uso interno: Bacterias aerobias,  $10^5$ /g; levaduras y mohos,  $10^3$ /g; *E. coli*, 10/g; otras enterobacterias,  $10^3$ /g; salmonelas: ninguno.



Límites de aflatoxinas: Para materias primas y productos terminados destinados a la preparación de infusiones el límite es de no más de 20 µg/Kg, siempre que B<sub>1</sub> no supere los 5 µg por kg. Para productos terminados de uso tópico y para productos terminados el límite es ausencia en un gramo.

Límites de residuos de plaguicidas: Para plaguicidas se debe de cumplir con los siguientes límites:

**Tabla 4.** Límites de residuos de plaguicidas

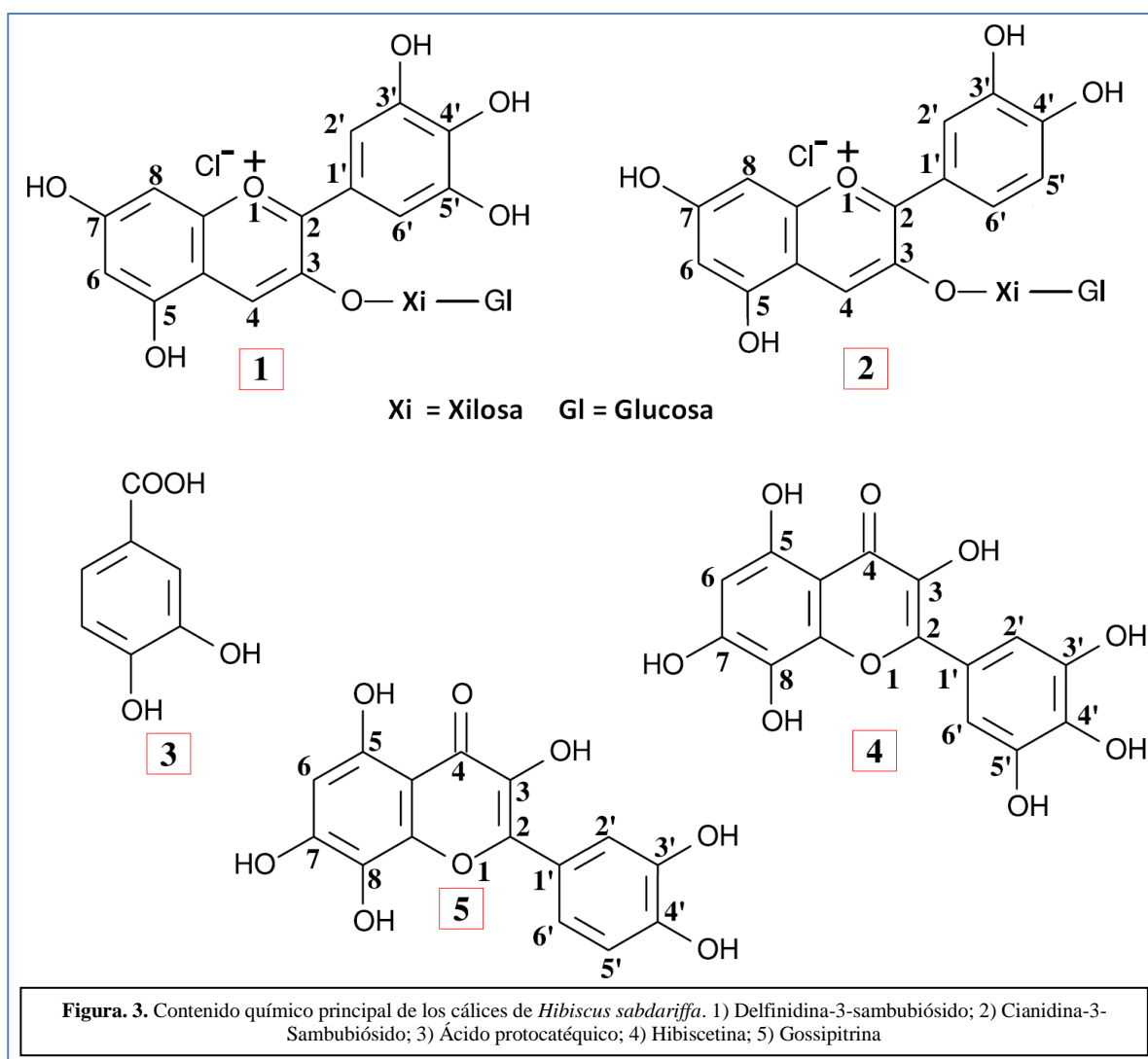
Sustancia	Límite mg/l
Alaclor	0,02
Aldrín y Dieldrín (suma de ambos)	0,05
Azinfos - metilo	1,0
Bromopropilato	3,0
Clordane (suma de los isómeros <i>cis</i> -, <i>trans</i> - y oxiclordane)	0,05
Clorfenvinfos	0,5
Clorpirifos	0,2
Clorpirifos - metilo	0,1
Cipermetrina (e isómeros)	1,0
DDT (suma de <i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE y <i>p,p'</i> -TDE)	1,0
Deltametrina	0,5
Diazinon	0,5
Diclorvos	1,0
Ditiocarbamatos (en CS <sub>2</sub> )	2,0
Endosulfán (suma de los isómeros y del sulfato de endosulfán)	3,0
Endrín	0,05
Etión	2,0
Fenitrotión	0,5
Fenvalerato	1,5
Fonofos	0,05
Heptaclor (suma de heptaclor y de heptaclor-epóxido)	0,05
Hexaclorobenceno	0,1
Hexaclorociclohexano - Isómeros (distintos del γ)	0,3
Lindano (γ-Hexaclorociclohexano)	0,6
Malatión	1,0
Metidatión	0,2
Paratión	0,5
Paratión - metilo	0,2
Permetrina	1,0
Fosalona	0,1
Butóxido de piperonilo	3,0
Pirimfos - metilo	4,0
Piretrinas (suma de las)	3,0
Quintoceno (suma de quintoceno, pentacloroanilina y pentaclorofenilsulfuro de metilo)	1,0

Fuente: Farmacopea Española, 2005

### 3.2.10. Composición química

Las flores (cálices) contienen (Figura 3): ácidos orgánicos en un 15-30% (cítrico, hibiscico, málico, ascórbico, tartárico, oxálico, protocatéquico, clorogénico), polisacáridos mucilaginosos en un 50% (ácidos urónicos en forma de sal y el resto ramnosa, arabinosa y pequeñas cantidades de glucosa, xilosa y manosa), antocianinas en un 1.5 % (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina 3-sambubiósido, hibiscina (delfinidina 3-xiloglucósido), cianidina-3-xiloglucósido, cianidina 3-monoglucósido, delfinidina 3-monoglucósido, delfinidina), otros constituyentes menores como flavonoides (hibiscitrina y su aglicona hibiscetina, gossipitrina, gossitrina, gossipetina, quercitina y sabdaritrina), polifenoles, y saponinas ( $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-galactopiranosido), fitosteroles ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, ergosterol, estigmasterol), pectina, ácido aspártico y galacturónico (Ali *et al.*, 2005; Mahadevan & Kamboj, 2009).

Las semillas contienen almidón, colesterol, celulosa, carbohidratos, campesterol,  $\beta$ -sitosterol, ergosterol, ácido propiónico, pentosanos, ácido pelargónico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, metanol, ácido málvico, ácido linoleico, ácido esterculico, ácido caprílico, ácido fórmico, ácido esteárico, alcohol isopropílico, alcohol isoamílico, etanol, 3-metil-1-butanol, alcohol bencílico, fibra y minerales (Mahadevan & Kamboj, 2009). Las hojas tienen  $\alpha$ -terpinil acetato, anisaldehído,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -D-galactósido, benzoato de  $\beta$ -sitosterol, niacina, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, metanol, 3-metil-1-butanol, alcohol bencílico, etanol, ácido málico, fibra y ceniza (Mahadevan & Kamboj, 2009). Los frutos contienen  $\alpha$ -terpinil acetato, pectina, anisaldehído, ácido ascórbico, oxalato de calcio, ácido caprílico, ácido cítrico, ácido acético, etanol, ácido fórmico, ácido pelargónico, ácido propiónico, alcohol isopropílico, metanol, alcohol bencílico, 3-metil-1-butanol, benzaldehído y minerales (Mahadevan & Kamboj, 2009). Las raíces contienen ácido tartárico y saponinas.



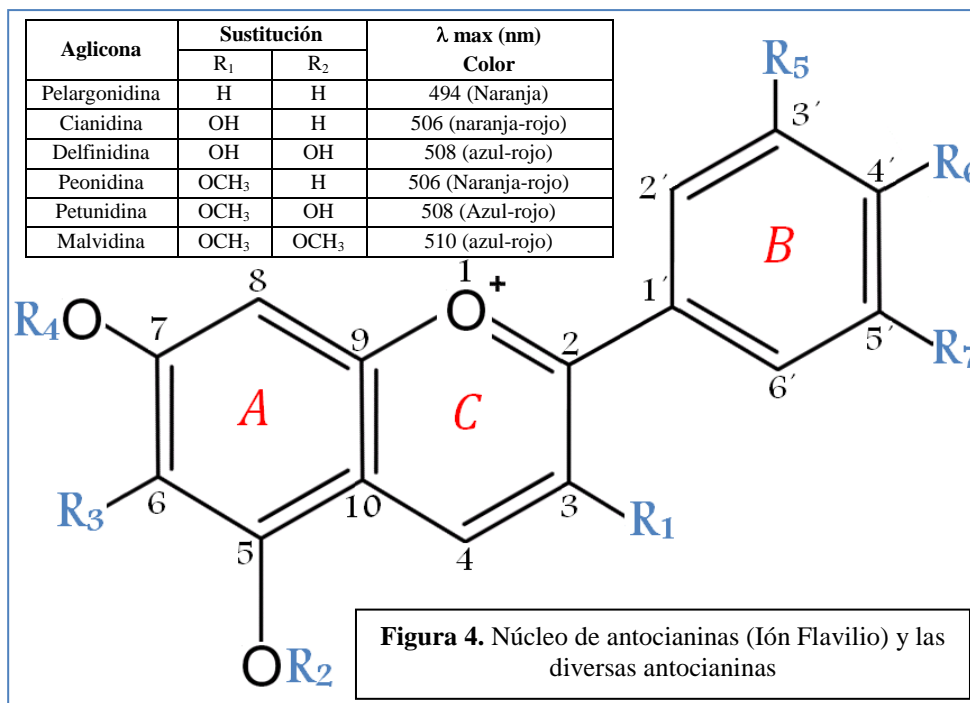
Fuente: Ali, B., Al, W. & Blunden, G. (2005).

### 3.2.10.1. Estabilidad química y estructural de las antocianinas

Las antocianinas son polifenoles con estructura similar a 2-fenil- $\gamma$ -cromona (estructura  $C_6-C_3-C_6$ ), con el oxígeno heterocíclico cargado positivamente, originando la estructura 2-fenilbenzopirilio (ión flavilio), la cual carece del carboxilo en  $C_4$  de los flavonoides. Se encuentran como agliconas libres (antocianidinas) ó como azúcares (antocianósidos), y al conjunto de antocianidinas y sus heterósidos se les llama antocianos. Existen 6 antocianidinas que difieren según el patrón de sustitución (Figura 4). El 97% de las antocianinas identificadas hasta este momento se encuentran como heterósidos,

generalmente monosacáridos, disacáridos ó trisacáridos. Son compuestos coloreados cuyo color varía según el pH. En medio ácido son rojos, en medio básico azules (Brouillard, 1982). El patrón de sustitución de los grupos hidroxilo y metoxilo en la aglicona (antocianidina) altera el comportamiento químico de la molécula. Incremento en la hidroxilación de la aglicona estabiliza la antocianidina, mientras que incremento en la metilación de grupos hidroxilo (principalmente en C4' y C7) disminuye la estabilidad. El patrón de sustitución de grupos hidroxilo y metoxilo no afecta únicamente la estabilidad, sino también el color de la antocianina. Las antocianinas simples más estables son cianidina-3-glucósido, seguido de peonidina-3-glucósido (Cabrita, *et al.*, 1999).

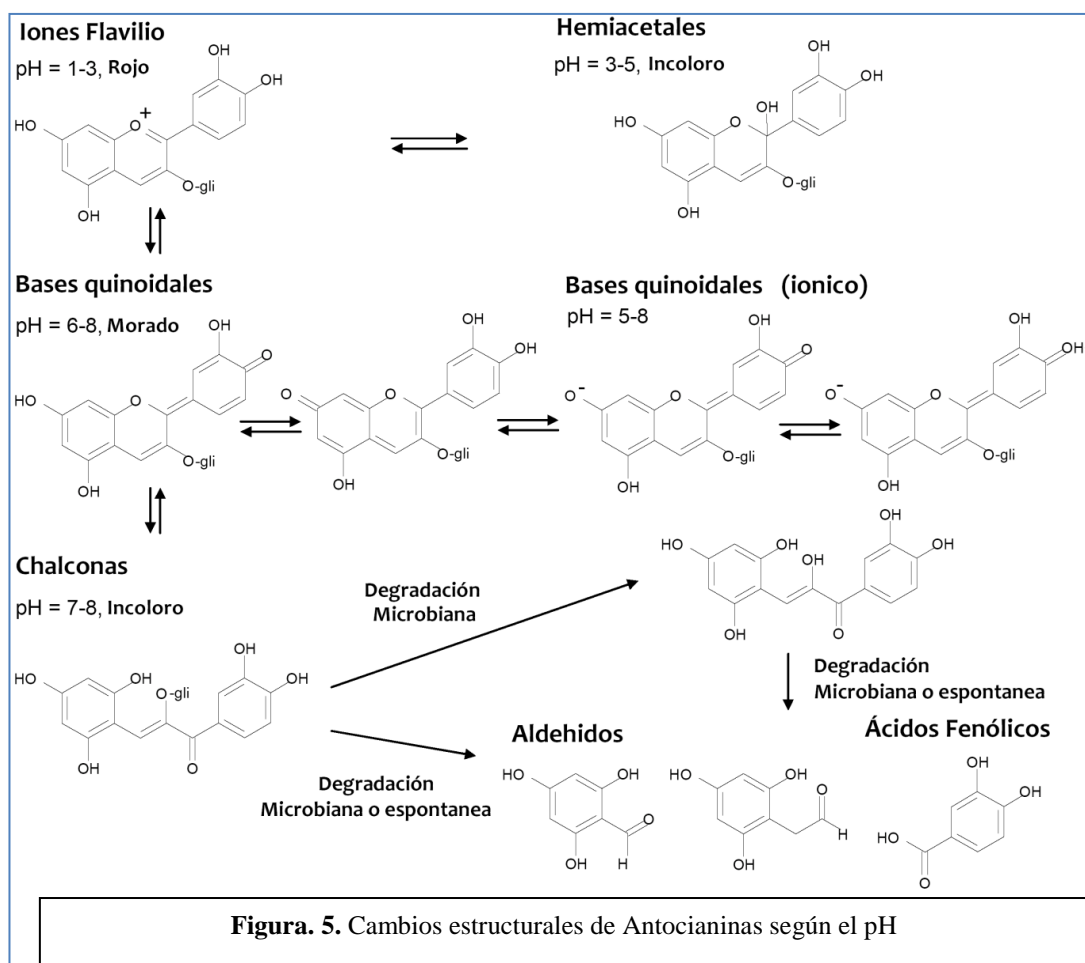
Existen muchos factores que influyen en la estabilidad de antocianinas, como el pH, la temperatura, la concentración, condiciones oxidantes, enzimas, entre otros.



Fuente: Brouillard, 1982

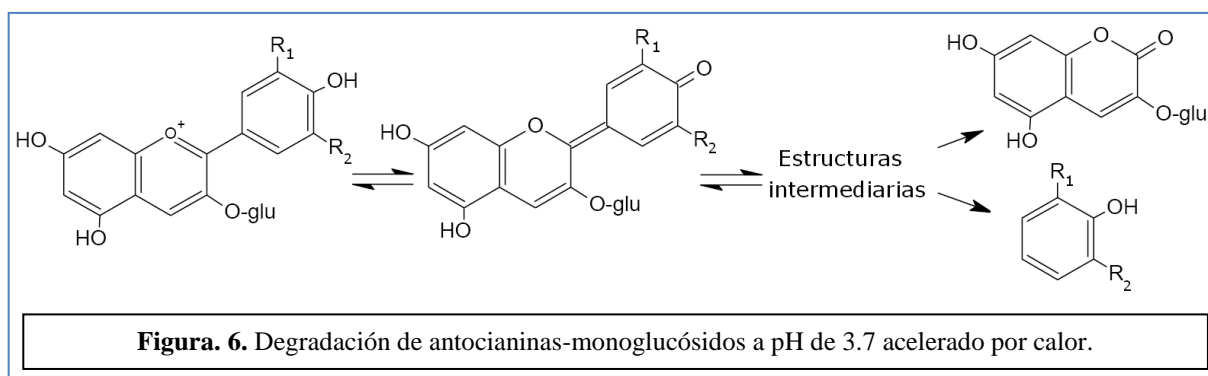
Las antocianinas existen en 4 estados pH-dependientes (Figura 5): cationes flavilio, hemicetales, bases quinoidales y chalconas a pH de 1-3, 3-5, 6-8 y 7-8, respectivamente (Brouillard, 1982; von Elbe and Schwartz, 1996; Woodward *et al.*, 2009). El pH inferior a 3 le brinda un efecto protector a la molécula, donde el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable de ión oxonio o catión flavilio (de color rojo intenso). A valores de pH

más altos a 3 ocurre una pérdida del protón y ocurre adición de agua en C2, dando lugar a un equilibrio entre el ión flavilio y el hemiacetal, y a pH mayor a 6 ocurre un equilibrio entre la base quinoidal y la chalcona (de cadena abierta). Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. Los equilibrios químicos en una solución básica de antocianinas reducen la concentración de iones flavilio de forma parcial, ya que pueden ser revertidos al acidificar el medio; sin embargo, a valores de pH muy básicos, se pierde el equilibrio al formarse chalconas inestables de forma irreversible, resultando en una reducción definitiva de la concentración de iones flavilio, demostrada a partir de reducción definitiva en la intensidad del color (Brouillard, 1982).



Fuente: Brouillard, 1982

La degradación de antocianinas incrementa a medida que la temperatura aumenta (Palamidis & Markakis, 1978; Maccarone *et al.*, 1985). La temperatura alta en pH entre 2-4 incrementa la pérdida de la unidad glucosídica en C<sub>3</sub> (Adams, 1973), lo que lleva a la pérdida del color, debido a que las Agliconas son mucho menos estables que los Antocianósidos, comenzando con la apertura del anillo y la consecuente producción de chalconas incoloras (Markakis *et al.*, 1957; Adams, 1973). Eventualmente la degradación térmica conlleva productos de color café, especialmente en la presencia de oxígeno (Markakis *et al.*, 1957). Altas temperaturas junto a alto pH causa la degradación de antocianinas (Figura 6) resultando en derivados de ácidos benzoicos y trihidrobenzaldehido (Seeram *et al.*, 2001; Furtado *et al.*, 1993).



Fuente: Palamidis, 1978

Calentamiento a 95° C a pH de 3.5, provocan vidas medias de 2-3 h. A temperatura y pH fisiológico (7.2 y 37° C) las antocianidinas se descomponen espontáneamente, generando floroglucinol aldehído y sus correspondientes ácidos fenólicos (ácido galico, siringico, vanílico y p-hidroxibenzoico). Los mismos factores estructurales que producen la estabilidad de antocianinas en pH, influyen en la temperatura (von Elbe & Schwartz, 1996). Pelargonidina 3-glucósido es más estable a 100°C que petundina 3-glucósido, la cual es más estable que malvidina 3-glucósido (Keith & Powers, 1965). Arabinosas de cianidina y peonidina son más estables al calor que las correspondientes galactosas.

La concentración de las antocianinas y la actividad del agua de la matriz afectan la estabilidad. Incrementos en las concentraciones de antocianinas aumentan la estabilidad, producto de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases

quinoidales e inclusive entre una base quinoidal y un catión flavilio (Brouillard, 1982; Dao *et al.*, 1998). Sin embargo incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de antocianinas debido a una interacción entre agua y el catión flavilio, para formar la pseudobase inestable. Por lo tanto, las soluciones de antocianinas más concentradas son más estables (Giusti & Wrolstad, 2003).

El oxígeno amplifica el impacto de la degradación de antocianinas. Remover el oxígeno protege a las antocianinas de degradación térmica. Otro factor, son las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico, produciendo grandes pérdidas de antocianinas por reacciones de condensación (Starr & Francis, 1968). La inestabilidad producida por el oxígeno es aumentada por aumento en el pH (Markakis, 1982). La degradación de antocianinas producida por la luz, es dependiente de oxígeno molecular (Attoe & von Elbe, 1981). Oxidantes (incluyendo el oxígeno) producen compuestos incoloros o de color café (Jackman *et al.*, 1987).

La forma anhidrobase de las antocianinas es la más susceptible a degradación enzimática (Yokotsuka & Singleton, 1997). La adición de sacarosa incrementa la estabilidad y las características del color por la inhibición enzimática de peroxidasa y fenoloxidasa (Wrolstad *et al.*, 1990). La inactivación de enzimas vegetales incrementa la estabilidad de antocianinas (García-Palazon *et al.*, 2004). Las enzimas más comunes que degradan antocianinas son las glucosidasas, que rompen el enlace covalente entre la aglicona de la antocianina y el residuo glucosídico, resultando en la degradación de antocianinas inestables (Huang, 1955). Peroxidasas y fenolasas, como fenol oxidasas y polifenol oxidasas, son encontradas naturalmente en frutas. Las fenolasas actúan directamente con antocianinas, pero la destrucción de antocianinas son eficientes junto con otros compuestos fenólicos, como catecol y ácido caftárico (Yokotsuka & Singleton, 1997); mientras que la polifenol oxidasa no degrada sin ácido caftarico (Sarni-Manchado *et al.*, 1997). Las enzimas primero oxidan otros compuestos fenólicos en el medio a sus correspondientes quinonas, las cuales degradan a las antocianinas para formar productos de condensación de color café (Sakamura *et al.*,

1966). Los glucósidos de malvidina son más estables que los de delphinidina hacia la polifenol oxidasa, mientras que aquellos con pelargonidina no reaccionan.

Las antocianidinas son más inestables que sus respectivos antocianósidos en soluciones acuosas. Antocianinas-3-glucósidos son más estables que 3.5 ó 5-glucósidos. Antocianósidos junto con el disacárido sambubiosa, son más estables que aquellos conteniendo monosacaridos. Antocianinas conteniendo galactosa son más estables que aquellas con arabinosa. Antocianinas acetiladas en el anillo pirilio (C2) son más estables, debido a la reducción del ataque nucleofílico del agua (Brouillard *et al.*, 1982). Antocianinas aciladas con un grupo malonil en C6 o con un grupo acil en C3 de la glucosa unida en R1 estabilizan la molécula de antocianina (Figueiredo *et al.*, 1999). Cuando se encuentran aciladas en R4 y R5 presentan estabilidad hasta pH neutro.

Los antocianósidos contenidos en *H. sabdariffa* contienen como glúcosido al disacárido samburiosa (compuesto por xilosa y glucosa), el cual resulta en una antocianina más estable en pH, temperatura y condiciones oxidantes que aquellos conteniendo glucosa. Así mismo, la estabilidad de las antocianinas de rosa de Jamaica se ve favorecida por sus características estructurales, debido a la mayor proporción del cianidina-3-glucósido, el cual es la más estable de las antocianinas, y la unión a disacáridos, que aumenta la estabilidad a pH neutro.

#### 3.2.10.2. Estabilidad química y estructural de las fibra antioxidante

La fibra dietaria consiste en una variedad de polisacáridos que incluyen la celulosa, hemicelulosa, pectina,  $\beta$ -glucanos, gomas y lignina (Michaelides y Cooper, 2005; Sudha *et al.*, 2007). Estos compuestos son resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas y se encuentran principalmente en tejidos parenquimatosos (Figuerola *et al.*, 2005; Saura-Calixto *et al.*, 2010). Las paredes celulares constituyen la mayor parte de fibra dietaria, la cual en función a su solubilidad se clasifica en fibra dietaria soluble (FDS) y fibra dietaria insoluble (FDI) (Díaz-Rubio *et al.*, 2008). La FDS incluye pectinas,  $\beta$ -glucanos, arabinoxilanos, galactomananos, así como otros polisacáridos y oligosacáridos indigeribles. Por otra parte, la



FDI está compuesta por polisacáridos como la celulosa y otros compuestos como lignina y cutina (Figuerola *et al.*, 2005).

El contenido de fibra dietaria puede verse afectado por diversos factores como la variedad, condiciones de cultivo, estado de maduración, procesamiento poscosecha así como por los tratamientos térmicos (De La Rosa *et al.*, 2010). Sin embargo, las propiedades de la fibra dietaria no sólo depende de su contenido, sino también de su composición (azúcares neutros y ácidos urónicos en fibra dietaria soluble; azúcares neutros, ácidos urónicos y lignina Klason en fibra dietaria insoluble), la cual varía de una especie a otra (Jimenez-Escrig *et al.*, 2001). La composición monomérica de la fibra dietaria corresponde a los polímeros más comunes presentes: pectinas, arabinosilanos, arabinogalactanos, entre otros.

La composición proximal de *H. sabdariffa* puede cambiar dependiendo de la variedad genética y tipo de suelo de cultivo. Como puede observarse, se trata de una muestra con un contenido apreciable de proteína, cenizas y principalmente fibra dietética (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición proximal de cálices de *H. sabdariffa*

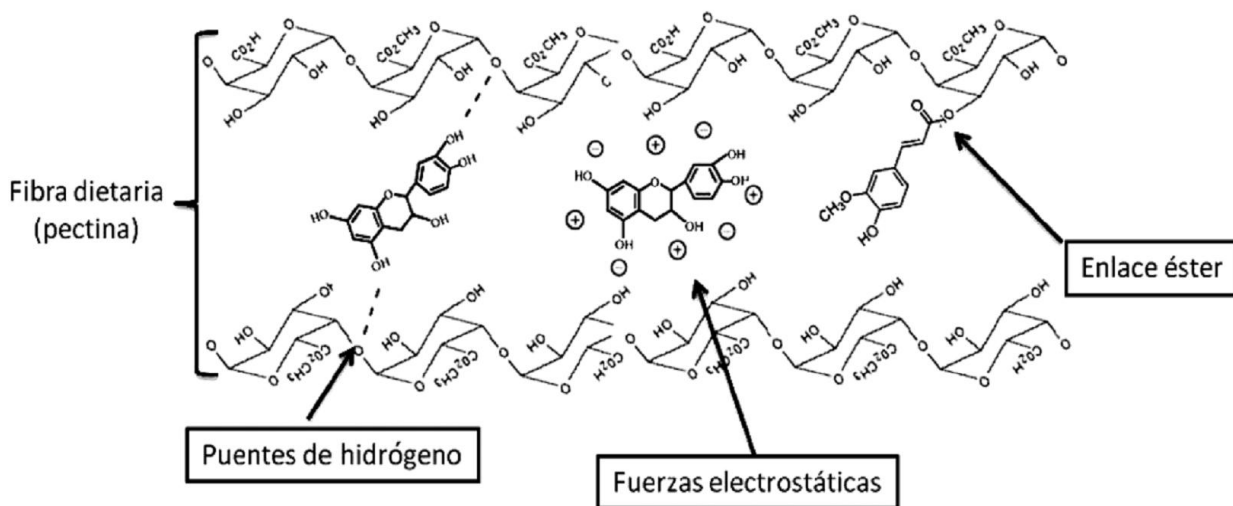
Composición proximal g/100g de materia seca			
Proteína	8.6	17.4	9.87
Lípidos	2.0	2.61	0.59
Cenizas	6.8	6.9	9.75
Fibra cruda	8.5	12.0	---
Fibra dietética total	---	---	33.90
Fibra insoluble	---	---	29.04
Fibra soluble	---	---	4.87
Minerales y vitaminas (mg/100g)			
Calcio	1263	1602	---
Potasio	2320	2732	---
Hierro	34.6	8.98	---
Magnesio	340	---	---
Zinc	6.3	---	---
Ácido ascórbico	54.8	67	---
Niacina	---	3.76	---
Tiamina	---	0.117	---
Riboflavina	---	0.277	---

Fuente: Saura Calixto *et al.*, 2010

El componente mayoritario de los cálices es la fibra dietética, siendo porcentualmente importante el contenido de fracción de fibra soluble. Los valores indicados en la Tabla 5, se han determinado analíticamente siguiendo el método propuesto por la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC). Por ello, estos valores corresponden a polisacáridos y lignina. Actualmente se tiende a ampliar el concepto de fibra, teniendo en cuenta que en los alimentos vegetales hay otros componentes diferentes a polisacáridos y lignina, que no son digeridos en el intestino delgado, por lo que pasan al intestino grueso constituyendo la mayor parte de los substratos para las bacterias fermentativas intestinales. Entre dichos componentes se encuentran proteína resistente, almidón resistente, grasa y compuestos bioactivos tales como polifenoles, carotenoides y fitoesteroles. El conjunto de todos los constituyentes del alimento o de la materia prima, constituye la denominada fracción indigestible de los alimentos. Este concepto es más amplio que el de fibra dietética y se ajusta más a un criterio fisiológico.

La presencia de compuestos fenólicos asociados a la fibra dietaria es una característica común en los alimentos vegetales ricos en polifenoles (Díaz-Rubio *et al.*, 2009). El complejo grupo de polisacáridos que forman a la fibra dietaria puede actuar atrapando compuestos fenólicos o bien formando interacciones químicas con ellos (Figura 7). Los compuestos fenólicos poseen anillos aromáticos hidrofóbicos y grupos hidroxilo hidrofílicos con la capacidad de enlazar polisacáridos y proteínas en la superficie de la pared celular (Serrano *et al.*, 2009). Este tipo de interacciones puede darse por puentes de hidrógeno (entre el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos y los átomos de oxígeno de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos), interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes (enlace éster entre ácidos fenólicos y polisacáridos) (Saura-Calixto, 2010) (Figura 6). En general, los compuestos de la fibra dietaria que interaccionan con los compuestos fenólicos incluyen al grupo carboxilo del ácido urónico (hemicelulosa y pectina) y el grupo hidroxilo presente en la celulosa (Metzler y Mosenthin, 2008). Estas interacciones también pueden depender de la porosidad específica y propiedades de la superficie, lo que puede restringir el tamaño de las moléculas que penetran. El tamaño de los poros de la pared celular puede variar de 4 a 10 nm de diámetro, que pueden restringir la penetración de compuestos fenólicos con masas

moleculares más grandes a 10 kDa (equivalente a 34 unidades de catequina) (Saura-Calixto, 2010). Por tal motivo, la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos unidos a la fibra dietaria podría afectarse.



**Figura. 7.** Tipos de interacciones entre compuestos fenólicos y fibra dietaria

### 3.2.10.3. Propiedades fisicoquímicas, farmacéuticas y formulación

En el estudio publicado por Wong *et al.* (2003), se optimizó la extracción con agua caliente (HWE) de los cálices frescos de *H. sabdariffa* usando la metodología de superficies de respuesta con dos variables, tiempo (30 a 300 min) y temperatura (30-90° C), en 11 combinaciones diferentes, y se comparó con 3 métodos de extracción, mezclando agua caliente (HWB), mezclando agua fría (CWB) y prensa de tornillo (SP), utilizando al ácido ascórbico y antocianinas como referencia de los cambios, ya que éstos pueden destruirse fácilmente durante el procesamiento. Los contenidos de antocianinas y de ácido ascórbico se determinaron utilizando el método diferencial de pH y cromatografía líquida de alta resolución, respectivamente. Los resultados indican que HWE es el método de extracción más eficaz, con un contenido alto de antocianinas y de ácido ascórbico, 42.9 mg/L (de delfinidina-3-glucósido) y 2.34 g/Kg, respectivamente. Las condiciones óptimas de extracción fueron 3.5 horas a 60° C, condiciones estables para las antocianinas y el ácido ascórbico.

En el estudio publicado por Prenesti *et al.* (2007), se cuantificó y comparó el poder antioxidante (índice de Briggs-Rauscher) a 25° y 37° C (con el fin de comparar en temperatura ambiente o fisiológica), los polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico (por método Folin-Coicalteu) y la relación color-acidez por estimación fotométrica, de una decocción e infusión fría de flores secas (pétalos) de *H. sabdariffa*. Se demostró que la temperatura de extracción juega un papel importante en el contenido de polifenoles, siendo la decocción quien proporciona el más alto contenido de polifenoles y el más alto poder antioxidante, por lo que el agua caliente conduce a una extracción más eficiente (aún por sólo 3 min de contacto) y no daña la capacidad antioxidante de las moléculas fenólicas. Las infusiones frías mostraron que la eficacia de extracción está relacionada con el tiempo de infusión, existiendo poca diferencia de equivalentes de ácido gálico entre infusiones obtenidas en 30 o 180 min. La contribución de etanol en el poder de extracción fue insignificante, sin embargo, aumenta el tiempo de almacenamiento, mostrando un tiempo de vida más largo que las infusiones de agua simples. Por último, se demostró que las condiciones de extracción no afectan el contenido de acidez del extracto.

En el estudio realizado por Chumsri *et al.* (2008), se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los cálices frescos de *H. sabdariffa*, las condiciones óptimas de extracción en agua, y se compararon los métodos de evaporación (al vacío y atmosférico) para concentrar el extracto. Las condiciones óptimas de extracción en agua para los cálices frescos fueron proporción 1:2, 50° C, por 30 min, mientras que para cálices secos fueron proporción 1:10, 50° C, por 30 min. El método de evaporación en vacío de 44 cm Hg a 70°C fue un método apropiado tanto para extractos concentrados de cálices frescos como secos.

En el estudio publicado por Cisse *et al.* (2011), se evaluó la estabilidad de las antocianinas y el color de los extractos acuosos de *H. sabdariffa* almacenados a 4-45° C, y el efecto del procedimiento de extracción (extracción en frío o en caliente con o sin pasteurización) sobre el comportamiento cinético. Se observó cinética de primer orden en la evolución del contenido de antocianinas, densidad de color, color e índice de pardeamiento (degradación). Cuando se calentaron los extractos resultaron menos estables, ya que su color cambia más

rápido durante el almacenamiento, especialmente cuando se utilizó agua caliente y pasteurización. Por lo que aunque el contenido de antocianinas y el color inicial no se modificaron, las condiciones de extracción, especialmente la temperatura, afectó mucho a la estabilidad de los extractos durante el almacenamiento.

En el estudio publicado por Ramírez-Rodríguez *et al.* (2011), se compararon los cambios en las propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas (pH, sólidos totales (TS), acidez titulable (TA), L\*, a\*, b\*, densidad del color (CD), tonalidad (HT), polifenoles totales (TP), contenido de antocianinas (AC), y capacidad antioxidante), preparando varias combinaciones tiempo-temperatura para determinar las condiciones equivalentes de extracción, entre extracción fría (25° C a 30, 60, 120 y 240 min) y caliente (90° C, a 2, 4, 8 y 16 min) de los cálices de *H. sabdariffa*; a su vez se pretendía identificar y cuantificar las principales antocianinas y polifenoles de los cálices frescos y secos por condiciones equivalentes de extracción en frío y caliente. La CD, el AC, TP y la capacidad antioxidante, incrementaron al aumentar el tiempo en ambas temperaturas de extracción (25° C y 90° C), mientras que disminuyó el L\* en ambas condiciones. No se observaron diferencias significativas en tonalidad entre los primeros 2 (30 y 60 min, y 2 y 4 min), y los últimos 2 (120 y 240, y 8 y 16 min), sin embargo los últimos valores fueron más altos. Existió un efecto significativo en las condiciones de tratamiento (tiempo y temperatura) en todos los parámetros evaluados excepto en el pH. Los tratamientos de extracción en frío por 30 min y extracción en caliente por 2 min fueron equivalentes en TS y en TA, mientras que extracciones en frío por 60 min y en caliente por 4 min fueron equivalentes en TS, TA, b\*, CD y AC. Las extracciones en frío por 120 min y en caliente por 8 min resultaron equivalentes en TS, TA, y AC, mientras que en frío por 240 min y en caliente por 16 min resultaron equivalentes en TS, TA, CD y AC. Los compuestos fenólicos totales se extrajeron mejor con agua caliente, lo que también resultó en una capacidad antioxidante más alta en estos extractos. Los perfiles polifenólicos fueron similares entre los extractos de cálices frescos y secos. En general, extracciones fría y caliente, produjeron propiedades fitoquímicas similares, sin embargo, bajo extracción en frío, la degradación del color fue significativamente menor y los tiempos de extracción fueron 15 veces mayores.

En el estudio publicado por Cissé *et al.* (2012), se evaluó la influencia de los parámetros de funcionamiento en la extracción sólido-líquido de las antocianinas de cálices de *H. sabdariffa*, siendo la proporción solido-solvente y el tamaño de partícula quienes tuvieron el mayor impacto en la eficiencia de extracción de antocianinas. El rendimiento máximo de antocianinas (88%) se obtuvo a 25° C con la más alta relación de sólido-disolvente (1:25). La disminución en el tamaño de partícula de los cálices de 2 cm a 150µm redujo drásticamente el tiempo de extracción. El aumento de temperatura reduce el tiempo de extracción mediante el aumento del coeficiente de difusión ( $3.9 \cdot 10^{-11}$  a  $1.35 \cdot 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$  entre 25 y 90° C), pero no modificó el rendimiento de extracción. Se demostró que el modelo simple de extracción de antocianinas propuesto, que integra termodegradación cinética, muestra buena relación entre los resultados previstos de los modelos y los datos experimentales, obteniendo de una relación sólido-disolvente 1:5 un rendimiento de extracción de 63% y una concentración de antocianina de 0.3 g/L en menos de 10 min.

En el estudio publicado por Leyva *et al.* (2012), se evaluó el uso del residuo de cálices de rosa de Jamaica lixiviados como una fuente alternativa de compuestos bioactivos, sometidos a deshidratación en un secador de lecho fijo, seguido de la evaluación de algunos parámetros químicos tales como la retención de antocianinas monoméricas, compuestos fenólicos, color polimérico y actividad antioxidante. Las variables experimentales fueron temperatura (40, 60 y 80° C), relación (L/D) altura de lecho/diámetro de lecho (1, 2 y 3), y velocidad del aire superficial (0.75, 1.5 y 2.25 m/s). Las curvas de secado mostraron tanto un periodo de secado constante como una disminución en periodo de velocidad decreciente. Para determinar los parámetros cinéticos, los datos de secado se ajustaron a un modelo químico de primer orden, basado en la relación de contenido de humedad en comparación con el tiempo de secado. El valor de k fue de  $9.0 \times 10^{-4}$  a  $2.7 \times 10^{-3}/\text{s}$ . Las diferentes condiciones de secado mostraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas monoméricas (expresado en mg delfinidina-3-sambubiósido (D3S)/100 g de residuo), siendo las condiciones con las que se obtuvieron el mayor contenido de antocianinas monoméricas 40° C, L/D de 1 y una velocidad de aire de 0.75

m/s. El contenido de cianidina-3-sambubiósido (C3S) fue de 126 mg/100g a las condiciones mencionadas, correspondiendo a un 74% de retención del pigmento, mientras que al aumentar únicamente la temperatura a 800 C, se obtuvieron 105 mg/100 g, disminuyendo a un 59.6% de retención del pigmento. Se determinó que el aumento en temperatura de secado y velocidad del aire aumenta el porcentaje de contenido polimérico y disminuyen el contenido de fenoles totales, mientras que el aumento en la velocidad de aire y en L/D aumenta la actividad antioxidante. Los resultados confirmaron que los cálices de rosa de Jamaica lixiviados, un material de desecho barato, pueden competir con otros productos tradicionales, en cuanto a su actividad antioxidante y su bajo costo asociado con materiales de desecho.

### 3.2.11. Farmacocinética

#### 3.2.11.1. Farmacocinética de antocianinas

Las antocianidinas (Agliconas) son hidrofóbicas, por lo que pueden difundirse pasivamente a través de membranas biológicas, sin embargo su unión a azúcares determina sus propiedades biológicas, condicionando su mecanismo de absorción, ya que incrementa su solubilidad en agua y limita su difusión pasiva, por lo que se necesita de un transportador activo del antocianósido o hidrólisis del glucósido y su posterior conjugación para llevarse a cabo la absorción y distribución necesaria para ejercer una actividad biológica (Manach *et al.*, 2005).

Las concentraciones de antocianinas no cambian después de digestión gástrica, sin embargo existe una porción que es producto de hidrólisis (ácida, enzimática por el borde en cepillo intestinal, y actividad microbiana) en estómago e intestino delgado, produciendo agliconas (antocianidinas), las cuales son absorbidas por difusión pasiva (Wallace *et al.*, 2011). El problema de éste tipo de absorción es que las antocianidinas al transportarse a un pH neutro, se descomponen a ácido protocatéquico (Tsuda *et al.*, 1999), el cual resulta ocho veces mayor en sangre que las antocianinas. El estómago absorbe una porción de antocianósidos a partir de la bilitranslocasa gástrica, un transportador transcelular localizado en las células secretoras de moco y células parietales, que aumenta su afinidad por la antocianina al contener porciones glucosídicas (principalmente monosacáridos y disacáridos unidos al C3)

(Passamonti *et al.*, 2003). Esto explica la farmacocinética de antocianinas, ya que la concentración plasmática máxima se observa 0.5-2 horas después de su administración oral, que corresponde al tiempo necesario para vaciar el estómago de un contenido líquido; así mismo, se observa una curva bifásica en la concentración plasmática a 15 min después de su administración debido a una primera absorción gástrica, seguida de una porción intestinal (Prior *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2003).

A nivel intestinal, existen 2 mecanismos para el transporte de antocianinas al enterocito duodenal: 1) Transporte de antocianósidos intactos por medio de transportadores ABC (P-glicoproteína (ABCB1), Proteínas de resistencia a multifarmaco MRP1 (ABCC1) y MRP2 (ABCC2), y la proteína de resistencia de Cancer de Mama ó BCRP (ABCG2)) (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005); ó 2) Hidrólisis extracelular del glucósido por medio de la enzima lactasa-floricina-hidrolasa en el borde en cepillo intestinal para que la aglicona entre por difusión pasiva al enterocito (Manach *et al.*, 2005). En el yeyuno se absorbe una gran porción al enterocito a partir de bilitranslocasa localizada en la membrana apical (McGhie *et al.*, 2007). Una fracción de antocianinas escapa de la absorción en el duodeno y se somete a metabolismo bacteriano en el íleon, donde se liberan las agliconas que pueden metabolizarse o transportarse. En el Colon, los antocianósidos entran a las células Caco-2 por medio de bilitranslocasa localizada en la membrana apical (Passamonti *et al.*, 2002). Los transportadores ABC B1 (P-glicoproteína), C2 (MRP2) y G2 (BCRP) se encuentran en la membrana apical de las células del intestino, mientras los que se encuentran en la membrana basolateral son los transportadores ABC C1 (MRP1) y C3 (MRP3), de los cuales únicamente C1 (MRP1) transportan antocianinas (MRP3 transporta aniones orgánicos); existiendo una eficiente entrada de antocianinas a las células, pero bajo transporte a la circulación, debido a saturación de transportadores, lo que explica la poca biodisponibilidad de las antocianinas (menos del 1% de la cantidad ingerida entra al plasma) y su alta presencia en orina y heces. Existe la hipótesis que la grasa de la dieta favorece la absorción de antocianinas debido a transporte por lipoproteínas (Lesser *et al.*, 2004).

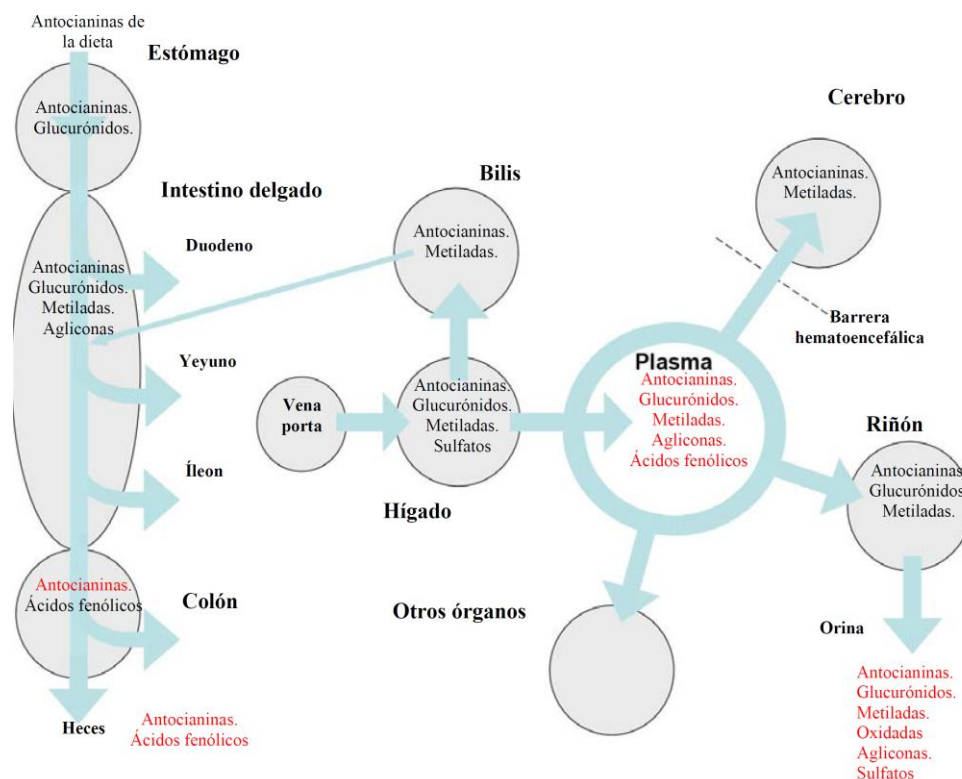
Las antocianinas se encuentran en el plasma en forma de Antocianinas, Glucurónidos, antocianinas Metiladas, antocianidinas, y ácidos fenólicos. La concentración plasmática de



antocianinas parecer ser insuficiente para alterar el potencial redox o de radicales, pero resulta adecuada para transducción de señales y/o expresión de genes. En el plasma sanguíneo y orina, debido al pH neutro las formas predominantes son la Carbinol (75-80%) y chalcona (15-20%), produciéndose una alta degradación a derivados fenólicos (Wallace, 2011). Alcanzan concentraciones plasmáticas a los 15-30 min. De las antocianinas ingeridas, el 44% se encuentran como ácido protocatéquico en el plasma (Vitaglione, 2007).

Las antocianinas encontradas en plasma se encuentran en forma de antocianósidos (transportados por bilitranslocasa), conjugadas con ácido glucurónico (por UDP-glucuronosil transferasas), metiladas (por catecol-O-metil-transferasas), sulfatadas (sulfotransferasa) y agliconas (producidas por hidrólisis ácida ó microbiana y  $\beta$ -glucosidasas del enterocito) (Wu *et al.*, 2002; Felgines, 2005). Luego de la digestión pancreática de 15-21% de antocianinas se encuentran en sangre, y de 52-67% en el colon (de las cuales se eliminan como ácidos fenólicos). Antocianinas aciladas muestran una mayor estabilidad ante digestión pancreática (Harada, 2004). El principal medio de metabolismo son los riñones e hígado. Los glucurónidos formados en el intestino entran en la circulación directamente y no son transportados a la bilis (a diferencia de los glucorónidos sintetizados en el hígado), mientras que aquellos que son sulfatados en el intestino o en el hepatocito se excretan vía renal (Wallace, 2011).

La excreción urinaria promedio es del 0.03 al 4% de la dosis ingerida, teniendo una vida media de eliminación de 1.5 a 3 horas (Kay, 2006). Su excreción se realiza a nivel renal y fecal. Las Antocianinas cruzan el epitelio intestinal con una eficacia de 1 a 4%, sin embargo el transporte es incrementado junto con etanol o exposición crónica a antocianinas. Con algunas excepciones, concentraciones plasmáticas máximas no exceden rangos nanomolares y menos del 1% son encontradas en orina como formas no metabolizadas (Faria, 2009; Yi *et al.*, 2006). La ruta farmacocinética de las antocianinas se resume en la Figura No. 8.



**Figura. 8.** Farmacocinética de antocianinas. Las denotadas en rojo evidencian estudios en humanos.

En el estudio publicado por Fernández-Arroyo *et al.* (2012), se caracterizaron y cuantificaron a través de HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-ESI-TOF-MS) los principales metabolitos presentes en el plasma de rata después de la ingestión aguda de un extracto de *H. sabdariffa* enriquecido con polifenoles con el fin de estudiar su biodisponibilidad. También se midió el estado antioxidante a través del método de la capacidad del plasma de reducir hierro férrico, el ensayo de ácido tiobarbitúrico y sustancias reactivas, y el ensayo de actividad superóxido dismutasa. Aunque se encontraron ácidos fenólicos en el plasma sin ninguna modificación en sus estructuras, la mayoría de los flavonoles se encontraron como conjugados glucurónidos de quercetina o kaempferol. Se detectaron y cuantificaron diecisiete polifenoles, de los cuales seis fueron moléculas intactas (ácido hibiscico, ácido hibiscico hidroxietilester, ácido clorogénico, metildigalato, N-feruloiltiramina y quercetina) y once metabolitos (ácido hidroxicítrico, 4 isómeros de quercetina-digluconido, 2 isómeros de quercetina glucurónido, metilquercetina, kaempferol y 2 isómeros de kaempferol glucurónido). Los glucurónidos de flavonol, que mostraron valores de vida media de eliminación más altos, se proponen contribuir a la actividad inhibidora de la peroxidación de

lípidos observada en las membranas celulares. Por el contrario, los ácidos fenólicos intactos parecen ejercer su actividad antioxidante a través de la reducción de ion férrico y de depuración de superóxidos en tiempos más cortos, proponiéndose a las formas flavonol-conjugadas (quercetina y kaempferol) como los compuestos responsables de los efectos antioxidantes observados.

En el estudio publicado por Frank *et al.* (2005), se determinaron los parámetros farmacocinéticos de varias antocianinas después del consumo de un extracto de *H. sabdariffa* en humanos sanos. Los sujetos recibieron una dosis oral única correspondiendo a 62.6 mg de cianidina-3-sambubiósido, 81.6 mg de delphinidina-3-sambubiósido, y 147.4 mg de antocianinas totales (calculado como equivalentes de cianidina), presentando dentro de 7 horas la excreción urinaria de 0.016%, 0.021%, y 0.018% de las dosis administradas, respectivamente. Las tasas máximas de excreción fueron 1.5 a 2.0 horas después de la ingesta. El área bajo la curva (ABC) en plasma de las dosis normalizadas fue de 0.076, 0.032, y 0.050 ng\*h/ml/mg, respectivamente. La dosis normalizada de Concentración máxima (Cmax) fue 0.036, 0.015, y 0.023 ng/ml/mg, respectivamente, alcanzándolas a 1.5 horas (mediana) después de la ingesta. Las medias geométricas de vida media terminal (t1/2) fueron 2.18, 3.34, y 2.63 horas, respectivamente. La excreción urinaria de antocianinas intactas fue rápida y parecía ser monoexponencial.

En el estudio publicado por McKay *et al.* (2010), se pretendían medir los niveles de las antocianinas mayoritarias *H. sabdariffa*, delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, en plasma y orina de los sujetos reclutados para un ensayo clínico con sujetos prehipertensos e hipertensos moderados. Para ello se realizó un estudio piloto farmacocinético previo donde se recolectaron muestras de sangre y orina de 3 de los investigadores como patrón de referencia, donde las antocianinas no fueron detectables en plasma u orina, ni 1 hora después de la administración ni en la mañana siguiente a 3 dosis administradas. Esto hace posible considerar que el valor de 7.04 mg de antocianinas totales del producto ensayado es una dosis muy pequeña para ser detectado en fluidos biológicos.

En el estudio publicado por Frank *et al.* (2012), se evaluó el impacto de una dosis única de un extracto de *H. sabdariffa* en el potencial antioxidante (AOP) sistémico en sujetos sanos, con lo que se obtuvo un aumento del AOP en sangre y orina, y una disminución en la excreción urinaria de malondialdehído (biomarcador de estrés oxidativo), comparados con agua como tratamiento control. La mayor concentración promedio del Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) en plasma del grupo experimental se obtuvo 1h después de la dosis y al inicio de 2h declinó, siendo su área bajo la curva (arriba de la línea base) mayor con diferencia estadísticamente significativa que el grupo control; sin embargo no existieron diferencias significativas entre ambos grupos en ácido ascórbico o ácido úrico en plasma. No se encontraron antocianinas ni metabolitos (conjugados metilados, glucuronicos o sulfatos) en plasma después del tratamiento. Se demostró un incremento significativo en la excreción urinaria de ácido hipúrico en las 24 horas posteriores a la administración del extracto, lo que indica una alta biotransformación de los polifenoles del extracto ingerido. El FRAP en orina en las 24 horas posteriores a la administración del extracto fue significativamente mayor que en el grupo control. Se observó mayor cantidad estadísticamente significativa de ácido ascórbico en orina del grupo experimental. La cianidina-3-sambubiósido fue la mayor antocianina eliminada por la orina, seguida de delfinidina-3-sambubiósido, y luego por delfinidina-3-monoglucurónido. La cantidad de antocianinas y metabolitos recuperados en orina corresponde a un  $0.022 \pm 0.010\%$  de la dosis de antocianinas administrada. Debido a que el ensayo de FRAP, utilizado para medir el potencial antioxidante, mide un gran rango de antioxidantes en plasma y orina, incluyendo el ácido úrico y el ácido ascórbico, y los niveles de éstos no cambiaron significativamente tras el consumo del extracto en plasma, se concluye que el aumento en el AOP de plasma fue causado por los compuestos fenólicos y sus metabolitos del extracto de rosa de Jamaica; a su vez en orina, se considera poco probable la contribución del ácido úrico en el AOP debido a que éste incluso se encontraba en menor proporción que el grupo control.

#### 3.2.11.2. Farmacocinética de antocianinas con fibra antioxidante

La bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, como las antocianinas, es muy variada, y no necesariamente los compuestos más abundantes en las frutas ingeridas

son los que conducen a mayores concentraciones de metabolitos activos en los tejidos (Manach *et al.*, 2004). Existen diversos factores que interfieren en la biodisponibilidad de estos compuestos, como la matriz alimentaria y las interacciones químicas con otros fitoquímicos y/o biomoléculas (Parada y Aguilera, 2007). En los tejidos vegetales, los compuestos fenólicos interactúan principalmente con los carbohidratos, encontrándose en forma libre y conjugada (Manach *et al.*, 2005). La fibra dietaria (FD), considerada un grupo de carbohidratos complejos que no puede ser digerido por el organismo humano, juega un papel importante en la dieta y salud humana (Adiotomre *et al.*, 1990; Prosky, 2000; Montagne *et al.*, 2003; DeVries, 2004). No obstante, existe evidencia que indica que estos carbohidratos complejos pueden interactuar directamente con los compuestos fenólicos presentes en los alimentos y pueden interferir con su adecuada asimilación (Faulks y Southon, 2005; Parada y Aguilera, 2007; Porrini *et al.*, 2008; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009; DeVries, 2004). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la biodisponibilidad de compuestos fenólicos se centra en alimentos y bebidas de donde estos se liberan con facilidad (Furr y Clark, 1997; Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). Los mecanismos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en matrices sólidas deben considerar que únicamente los compuestos liberados de sus matrices y/o absorbidos en el intestino delgado son potencialmente activos y capaces de ejercer efectos benéficos a la salud (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Estudios previos indican que la microestructura de los alimentos afecta los procesos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de varios nutrientes, refiriéndose sobre todo a los compuestos fenólicos (Parada y Aguilera, 2007).

Las propiedades biológicas de los antioxidantes dependen de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Saura-Calixto, 2010). La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente del alimento que está presente en el intestino humano, como consecuencia de su liberación de la matriz del alimento, y que puede ser capaz de atravesar la barrera intestinal (Shim *et al.*, 2009). En cambio, la biodisponibilidad se define como la cantidad y velocidad a la que el principio activo se absorbe y llega al lugar de acción (Holst y Williamson, 2008). Por tanto, para que un compuesto fenólico sea potencialmente

biodisponible, primeramente debe estar bioaccesible en la matriz del alimento (Tagliazucchi *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia y tipo de fibra dietaria, puede interferir en diferente magnitud con su biodisponibilidad durante el proceso de digestión (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). El tracto gastrointestinal humano puede considerarse como un extractor, en donde la masticación y la acción química durante la fase de digestión, contribuyen a la extracción de compuestos fenólicos de las matrices sólidas como las frutas (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). En particular, la acción mecánica de la masticación influye en la degradación de las células de las frutas con la liberación de los compuestos fenólicos contenidos en las vacuolas y los asociados a la pared celular. Otra parte de los compuestos fenólicos presentes en la matriz del alimento, son desprendidos en el tracto gastrointestinal humano (Saura-Calixto, 2010). Esto ocurre por solubilización directa (37° C, pH 1-7.5) o por acción de las enzimas digestivas que hidrolizan los enlaces no covalentes entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos y los grupos polares de las moléculas polisacáridas (Palafox-Carlos., 2011). No obstante, dependiendo de su tamaño y grado de conjugación sólo una parte de los compuestos fenólicos son capaces de atravesar la pared intestinal (Saura-Calixto, 2010).

Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular así como los polifenoles asociados a la fibra dietaria, no están biodisponibles en el intestino delgado humano (Saura-Calixto, 2010). Por tal motivo, estas moléculas llegan al colon en asociación con la fibra dietaria, donde se convierten en sustratos fermentables para la microflora bacteriana, junto con los hidratos de carbono digeribles y proteínas (Manach, 2005). Los compuestos fenólicos no fermentados permanecen en el lumen del colon, donde pueden contribuir a un medio ambiente antioxidante al eliminar los radicales libres y contrarrestar los efectos de los compuestos pro-oxidantes de la dieta (Selma., 2009) Por otra parte, algunos polifenoles pueden ser excretados en las heces (Saura-Calixto, 2007). Desde el punto de vista nutricional, es evidente que las enzimas digestivas no liberan completamente a los polifenoles asociados a la FD, lo que sugiere que una fracción importante de polifenoles no será biodisponible en el intestino y sólo después de la fermentación bacteriana del colon podría ser absorbida (Pérez-Jiménez, 2009). La biodisponibilidad limitada de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos a partir de matrices sólidas está determinada por su baja bioaccesibilidad en el

intestino delgado, debido a las interacciones físicas y químicas de los antioxidantes con la fibra dietaria de las paredes celulares.

La fermentación de los compuestos fenólicos en el colon humano es un evento fisiológico que puede tener efectos significativos en la salud intestinal. Los polifenoles no absorbibles asociados a la fibra dietaria no son biodisponibles en el intestino delgado humano y llegan al colon, donde son sustratos fermentables para la microflora bacteriana (Saura-Calixto, 2010). Debido a que este material insoluble permanece durante mucho tiempo en el tracto gastrointestinal, tiene la capacidad de estabilizar radicales solubles formados ahí mismo. Los ácidos fenilacético, fenilpropiónico, fenilbutírico y urolitinas A y B, son metabolitos absorbibles de los polifenoles que pueden ejercer efectos sistémicos (Saura-Calixto, 2010). Sin embargo, los metabolitos no absorbibles y compuestos fenólicos no fermentables permanecen en el lumen del colon, donde pueden contribuir a un ambiente antioxidante (eliminando radicales libres) y contrarrestar los efectos pro-oxidantes de la dieta (Selma *et al.*, 2009). Estudios realizados en animales reportan algunas propiedades biológicas de los polifenoles asociados a la fibra dietaria frente a la salud. Entre las principales propiedades derivadas de estos compuestos se encuentran: un aumento de la excreción de lípidos, proteínas, agua y heces totales; efectos positivos sobre el metabolismo lipídico; aumento de la actividad antioxidante en el intestino grueso, y una inhibición de la proliferación en el epitelio del colon, reduciendo el número total de ratas muertas (Saura-Calixto, 2010). Estos resultados sugieren efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares y también en la salud gastrointestinal, incluida la prevención del riesgo de contraer cáncer de colon. Sin embargo, existe muy poca información que sustente los beneficios de estos compuestos sobre las propiedades relacionadas a la salud.

En el estudio publicado por Villanueva-Carvajal *et al.* (2013), se evaluó el uso del cáliz entero de *H. sabdariffa* como un portador natural de polifenoles con el fin de aumentar su bioaccesibilidad en el intestino, basado en que la digestión extrae más compuestos fenólicos que el proceso de infusión sencillo, junto con el beneficio en ingestión de fibra. También se propuso una alternativa al ya documentado procedimiento de digestión *in vitro*, ya que

permite analizar a las muestras sin pretratamientos. En el comportamiento de digestión in vitro se mostró gráficamente las correlaciones estadísticamente significativas entre el número total de polifenoles y la actividad antioxidante de ambos métodos utilizados (FRAP y DMPD). El consumo de cálices de *H. sabdariffa* molidos contribuye a aumentar la bioaccesibilidad de una mayor concentración de compuestos fenólicos con una mayor expresión de la actividad antioxidante que beber el líquido de infusión habitual. Este efecto es estadísticamente significativo en las partículas de entre 0.180 y 0.247 mm (mesh 80). Correlaciones entre TPC, FRAP-Trolox y equivalentes TEAC muestran que existe una relación directa entre la liberación de compuestos fenólicos de la matriz y la expresión de la actividad antioxidante en una digestión gástrica simulada y también en el proceso de extracción simple.

### 3.2.12. Farmacología clínica

En el estudio publicado por Haji *et al.* (1999), se evaluó el impacto de un té de *H. sabdariffa* en hipertensión arterial esencial moderada. Se observó una disminución estadísticamente significativa en un 11.2% de la presión sanguínea sistólica y en un 10.7% de la presión diastólica en el grupo experimental 12 días después del inicio del estudio, siendo éste el día en el que los sujetos obtuvieron la menor presión arterial observada. Tres días después de detener el tratamiento, la presión sanguínea sistólica se elevó con significancia estadística en un 5.6% y la presión diastólica se elevó en un 6.2% en el grupo experimental. Según la revisión sistemática publicada por Wahabi *et al.* (2010), reportan que este estudio, según el séptimo reporte de la comisión nacional en prevención detección y tratamiento de hipertensión, los pacientes eran etapa II; la puntuación en la escala de Jadad fue de 0; no se está claro si existió ocultamiento de la secuencia de aleatorización; no se realizó cegamiento (solo los sujetos estuvieron en ciego); existió desbalance en la deserción de los grupos experimentales y de control, la deserción se debió a la presión arterial alta, sin la intención de tratar el análisis; y, algunos de los sesgos de este estudio fueron que no reportaron efectos adversos o precauciones de interacciones farmacológicas, no hay características iniciales de los sujetos, ni grupos de control para verificar la adecuación de la asignación al azar. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT



2001 para este estudio fue de 81.82 y la puntuación CONSORT en elaboración de intervenciones herbales fue de 27.78.

En el estudio realizado por Herrera-Arellano *et al.* (2004), se evaluó la efectividad (reducción diastólica mayor o igual a 10 mm Hg), tolerabilidad (ausencia de efectos adversos) y modificación de electrolitos urinarios, de sobrecitos de 10 g de cálices secos de *H. sabdariffa* (equivalentes a 9.62 mg de antocianinas) al añadirlos en 0.5 litros de agua, comparada con captopril, en sujetos con hipertensión leve a moderada. La rosa de Jamaica redujo la presión sanguínea sistólica (SBP) de 139.05 a 123.73 mm Hg, la diastólica (DBP) de 90.81 a 79.52 mm Hg, y la de pulso (PP) de 48.24 a 44.21 mm Hg; mientras que el captopril redujo la SBP de 143.51 a 127.0 mm Hg, la DBP de 91.62 a 78.43 mm Hg y la PP de 51.89 a 48.56 mm Hg. Las tasas de efectividad terapéutica fueron de 0.7895 para la rosa de Jamaica y 0.8438 para captopril, mientras que la tolerabilidad fue de 100% para ambos tratamientos. Se observó un efecto natriurético con el extracto de *H. sabdariffa* (un valor inicial de sodio en orina de 106.11 mEq/l/24 h a un valor final de 125.42 mEq/l/24 h), sin embargo los niveles de cloro, potasio y pH no fueron alterados significativamente. Se comprobó que el extracto estandarizado en 9.6 mg de antocianinas totales y captopril 50 mg/día, no muestran diferencias significativas entre sí en el efecto hipotensor, efectividad antihipertensiva y tolerabilidad. Según la revisión sistemática realizada Wahabi *et al.* (2010), reportan que este estudio, según el séptimo reporte de la comisión nacional en prevención detección y tratamiento de hipertensión, los pacientes eran prehipertensos y etapa I; la puntuación en la escala de Jadad fue de 2; no existió ocultamiento de la secuencia de aleatorización; no se realizó cegamiento; existió desbalance en la deserción de los grupos experimentales y de control, la deserción se debió al sabor amargo, sin la intención de tratar el análisis; y, uno de los sesgos de este estudio fue que existió un desbalance significativo en la línea base de ambos grupos en SBP, PP, etapa de hipertensión e IMC. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 81.82 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 60.00.

En el estudio publicado por Herrera-Arellano *et al.* (2007), se evaluó la efectividad (con una reducción diastólica mayor o igual a 10 mm Hg), tolerabilidad (ausencia de efectos adversos), seguridad (ausencia de modificaciones patológicas en las pruebas bioquímicas de función hepática y renal), modificación de electrolitos séricos y actividad en la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de 250 mg de antocianinas extraídas de los cálices secos de *H. sabdariffa* comparada con lisinopril como control, en sujetos con hipertensión etapa I o II. El extracto acuoso estandarizado de rosa de Jamaica redujo la presión sanguínea de 146.48/97.77 a 129.89/85.96 mm Hg, con un porcentaje de efectividad terapéutica de 65.12% y una tolerabilidad de 100%. Se observó una mayor reducción de la presión sanguínea y una mayor efectividad terapéutica en el grupo control. Con respecto a la modificación de electrolitos se observó una tendencia a reducir el sodio sérico (de 139.09 a 137.35 mEq/L) y aumento del cloro sérico (de 81.71 a 95.13 mmol/L), mientras que los niveles de potasio no resultaron modificados. Se observó una actividad inhibidora de la ECA sérica de 44.049 a 30.1 unidades. Se observó la efectividad antihipertensiva, con un margen de tolerabilidad y seguridad, y con una actividad demostrada en reducir la actividad de la ECA y en reducir el sodio sérico sin modificar los niveles de potasio. Según la revisión sistemática realizada Wahabi *et al.* (2010), reportan que este estudio, según el séptimo reporte de la comisión nacional en prevención detección y tratamiento de hipertensión, los pacientes eran etapa I y II; la puntuación en la escala de Jadad fue mayor de 3; no existió ocultamiento de la secuencia de aleatorización; el 12% de los sujetos fueron excluidos del análisis debido a falta de adherencia al tratamiento, sin la intención de tratar el análisis. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 68.18 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 55.00.

En el estudio publicado por Lin *et al.* (2007), se evaluó el potencial en reducir el colesterol sérico de 3 dosis diferentes de *H. sabdariffa* en humanos, en capsulas cada una con contenido de 20.1 mg de antocianinas, 10.0 mg de flavonoides y 14.0 mg de polifenoles. Los resultados indican que en el grupo 1 (1 cápsula 3 veces/día), existió un aumento del colesterol sérico de 201.9 a 205.4 mg/dL a las 2 semanas, y una reducción a 194.6 mg/dL a

las 4 semanas. En el grupo 2 (2 cápsulas 3 veces/día), existió una reducción de 223.4 a 219.1 mg/dL a las 2 semanas, y una reducción a 213.9 mg/dL a las 4 semanas. En el grupo 3 (3 cápsulas 3 veces/día), existió un aumento de 207.5 a 210.4 mg/dL a las 2 semanas, y un aumento a 212.6 mg/dL a las 4 semanas. La reducción del colesterol en los sujetos que respondieron al tratamiento en la semana 2 fue de 15.8 mg/dL (6 sujetos) para el grupo 1, 18.1 mg/dL (9 sujetos) para el grupo 2, y 17.7 mg/dL (6 sujetos) para el grupo 3; mientras que en la semana 4 fue de 29.3 mg/dL (7 sujetos) para el grupo 1 (14.4%), 26.7 mg/dL (10 sujetos) para el grupo 2 (12%), y 17.7 mg/dL (6 sujetos) para el grupo 3 (8.3%). Por lo que la mejor reducción en colesterol se obtuvo administrando 2 capsulas 3 veces al día (6 cápsulas diarias). Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue 59.09 y la puntuación CONSORT en elaboración de intervenciones herbales fue 65.00.

En el estudio publicado por Prasongwatana *et al.* (2007), se evaluó el potencial uricosúrico de un té de *H. sabdariffa* en sujetos con historia clínica de cálculos renales y en sujetos sin historial de cálculos renales, para evaluar la efectividad del tratamiento en cada sujeto y comparar entre sí ambos grupos. Se evaluaron los parámetros séricos de BUN, creatinina, ALT, ácido úrico, sodio, potasio, cloro y bicarbonato en ambos grupos, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos o entre la línea base y los periodos de administración en ninguno de los parámetros, excepto en la actividad de ALT, la cual tendía a ser más alta en el grupo de sujetos con historial de cálculos renales, sin embargo no existía diferencia estadísticamente significativa. En los parámetros urinarios, la línea base (antes del tratamiento) de la mayoría de los parámetros fueron similares en ambos grupos, excepto por el calcio, que tendía a ser más alto en el grupo de sujetos con historial de cálculos renales. Después del tratamiento, al comparar ambos grupos, el volumen urinario y el calcio aumentaron en ambos grupos pero tendían a ser más altos en el grupo con historial de cálculos renales, el oxalato y el citrato tendían a ser más altos en ambos grupos comparándolos con la línea base, e incrementó la excreción de ácido úrico y su aclaramiento en el grupo sin historial de ácido úrico. No se observaron diferencias significativas en el sodio sérico y en el volumen urinario entre la línea base y el período de administración de *H.*

*sabdariffa*, sugiriendo la ausencia del efecto diurético en dosis de 3 g por día. El aclaramiento del ácido úrico, la excreción de ácido úrico y la excreción fraccional de ácido úrico resultó incrementada después de la administración de *H. sabdariffa*, y posteriormente reducida al nivel basal en el final del período de lavado, por lo tanto se evidenció un efecto uricosúrico. El té de rosa de Jamaica no incrementó el nivel de ninguno de los inhibidores de cálculos urinarios, como citrato y magnesio, por lo tanto no se evidenció ningún efecto antilitiásico.

En el estudio publicado por Mozaffari-Khosravi *et al.* (2009), se evaluó el efecto antihipertensivo del té de *H. sabdariffa* en paciente con diabetes tipo II comparado con té negro (grupo control), considerándose como efectivo una reducción en la presión arterial diastólica  $\geq 10$  mm Hg. La presión arterial de los sujetos se midió en los días 0, 15 y 30 del estudio. La media de la SBP en el grupo experimental disminuyó de 134.4 en el inicio del estudio a 112.7 después de 1 mes, mientras que esta medida difirió de 118.6 a 127.3 mmHg en el grupo control durante el mismo período. La intervención no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la media de la Presión Arterial diastólica (SBP), ni en el grupo experimental (81.6 a 80.5 mm Hg) ni en el grupo control (76.7 a 80.0 mm Hg). La presión de pulso promedio (PP) de los pacientes en el grupo experimental se redujo de 52.2 a 34.5 mmHg, mientras que en el grupo control, aumentó de 41.9 a 47.3 mm Hg. Por lo tanto, se demostró que el té de rosa de Jamaica puede disminuir clínicamente la presión arterial sistólica y la presión del pulso en pacientes diabéticos. Según la revisión sistemática realizada Wahabi *et al.* (2010), reportan que este estudio, según el séptimo reporte de la comisión nacional en prevención detección y tratamiento de hipertensión, los pacientes eran prehipertensos y etapa I; la puntuación en la escala de Jadad fue de 1; no existió ocultamiento de la secuencia de aleatorización; no se está claro del cegamiento, ya que los sujetos fueron cegados pero no hay información del cegamiento de los asesores; el 10% de los sujetos de cada grupo fueron excluidos del análisis, sin embargo esto no afectó el balance entre ambos grupos; y, los sesgos de este estudio fue que existió un desbalance significativo en la línea base de ambos grupos en SBP, DBP, PP, que influyó directamente en el resultado, y que algunos sujetos del grupo control tenían un valor normal de BP . Según la revisión

publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 81.82 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 38.89.

El estudio publicado por Kuriyan *et al.* (2010), se evaluó el efecto hipolipidémico de un extracto de hojas de *H. sabdariffa*. Se observaron reducciones (en comparación con los valores basales) pequeñas pero significativas en el peso corporal y el IMC tanto en el grupo experimental y placebo, reducción significativa de 18% (28 mg/dl) de los niveles de LDL del grupo experimental y de 12% (19 mg/dl) en el grupo de placebo en el día 90, reducción significativa de 10% en los triglicéridos del grupo experimental en el día 90 (16.6 mg/dl) mientras el grupo placebo no mostró cambio significativo; a pesar de éstas reducciones no se observaron cambios significativos en el peso corporal, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa en ayunas y postprandial en la sangre entre ambos grupos. No hubo diferencias significativas observadas en el consumo de energía, proteínas, carbohidratos, grasas, y colesterol a través del tiempo entre los dos grupos. La ingesta de energía fue significativamente reducida en un 12% (214 kcal/d) en el grupo experimental, mientras que se observó una disminución significativa de alrededor del 9% (189 kcal/d) en el grupo placebo en el día 90. El cumplimiento medio informado a su dieta prescrita de los sujetos en el grupo experimental fue 83% y de 84% para la actividad física prescrita, mientras que en el grupo placebo fue de 85% a la dieta y 80% a la actividad física. No se informaron eventos adversos graves, limitándose a leves síntomas gastrointestinales tales como distensión abdominal, flatulencia y dolor epigástrico durante la primera semana de suplementación. Estos síntomas estaban presentes tanto en el grupo experimental (29%) y placebo (27%) de los sujetos y desaparecieron dentro de una semana. Por lo tanto, una dosis de 1 g/día de extracto de hoja de *H. sabdariffa* parece no tener un efecto reductor específico de lípidos por encima del efecto del asesoramiento dietético estándar y estilo de vida. Es posible que la reducción del peso corporal, índice de masa corporal, el colesterol LDL y triglicéridos séricos se hayan debido a los cambios en el consumo de alimentos y actividad física durante el periodo de observación experimental. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó

que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 72.73 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 50.00.

En el estudio publicado por Gurrola-Díaz *et al.* (2010), se evaluó el efecto de una cápsula de 100 mg de extracto en polvo de *H. sabdariffa* (HSEP), equivalente a 19.24 mg de antocianinas, en el colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, urea, creatinina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y glucosa, de pacientes con (grupo experimental) y sin (grupo control) síndrome metabólico. Ambos grupos se subdividieron en 3 tratamientos: T1, consistiendo únicamente en Dieta, T2, consistiendo únicamente en la administración de cápsulas con el HSEP, y T3, consistiendo en dieta combinada con las cápsulas con HSEP. Los marcadores bioquímicos considerados fueron resistencia a insulina (triglicéridos/colesterol HDL) mayor a 3.0, hipercolesterolemia como colesterol mayor a 200 mg/dL e hipertrigliceridemia como triglicéridos mayores a 150 mg/dL. Los pacientes con síndrome metabólico tratados con el HSEP redujeron significativamente la glucosa y los niveles totales de colesterol, aumentaron los niveles de HDL-c, y mejoraron la tasa de resistencia a insulina (TAG / HDL-c). También se observó una reducción en los triglicéridos en los pacientes con síndrome metabólico tratados con HSEP más dieta (T3 del grupo experimental), y en individuos sin Síndrome metabólico tratados con HSEP o dieta (T1 y T2 del grupo control). Existió una reducción significativa en hipercolesterolemia en pacientes con síndrome metabólico tratados con HSEP, mientras que en el caso de hipertrigliceridemia existió una reducción en pacientes con síndrome metabólico tratados con dieta y la combinación de dieta con HSEP. También existió una reducción en la presión arterial en el grupo experimental tratados con HSEP más dieta. La urea, creatinina, ALT y AST pre y post-tratamiento, se mantuvo en los niveles normales en todos los grupos. Por lo tanto, se sugiere el uso de HSEP en individuos con dislipidemia e hipertensión asociada con Síndrome metabólico. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 63.64 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 65.00.

En el estudio publicado por McKay *et al.* (2010), se evaluó el potencial antihipertensivo en adultos con prehipertensión e hipertensión moderada de un té (tisana) de *H. sabdariffa* comparada con placebo. Se observó una reducción significativa en la presión arterial sistólica (SBP) en el grupo experimental (7.2 mmHg), comparada con placebo (1.3 mmHg); también se observó una reducción en la presión arterial diastólica (DBP) del grupo experimental (3.1 mmHg), sin embargo ésta no difirió del placebo significativamente (0.5 mm Hg). El cambio en la presión arterial media fue de significación marginal en el grupo experimental (4.5 mmHg) en comparación con el placebo (0.8 mmHg). Los participantes con mayor SBP al inicio del estudio mostraron una mayor respuesta al tratamiento de rosa de Jamaica. No se observaron efectos con respecto a la edad, el sexo o el uso de suplementos dietéticos. Estos resultados sugieren que el consumo diario de té de rosa de Jamaica, en una cantidad incorporada fácilmente a la dieta, disminuye la PA en adultos pre-y moderadamente hipertensos. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 95.45 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 66.67.

En el estudio realizado por Tazoho *et al.* (2011), se evaluó el cambio en parámetros bioquímicos en humanos al consumir un jugo de *H. sabdariffa*. Se observó una reducción en niveles de hierro sérico, colesterol total, HDL, y aumento estadísticamente significativo en triglicéridos y hemoglobina. No se observaron diferencias significativas en glucosa, LDL y transaminasas.

El estudio publicado por Hernández-Pérez y Herrera-Arellano (2011), se evaluó la efectividad, tolerabilidad (ausencia de efectos adversos serios) y seguridad (ausencia de modificaciones patológicas en las pruebas bioquímicas de función hepática y renal: TGO, TGP, urea y creatinina) de 10 y 20 mg de antocianinas extraídas de los cálices de *H. sabdariffa*, comparada con Atorvastatina como control, en sujetos con hipercolesterolemia mayor o igual a 220 mg/dL. No hubo diferencias en edad, peso, índice de masa corporal, colesterol total, HDL, LDL VLDL y triglicéridos. El tratamiento experimental I (10 mg) redujo los triglicéridos; el tratamiento control redujo triglicéridos, colesterol total y sus

fracciones; finalmente, el tratamiento experimental II (20 mg) redujo HDL, VLDL y triglicéridos. Al efectuar las comparaciones intergrupales se encontraron reducciones significativas a favor del tratamiento control. Los tres tratamientos mostraron altos porcentajes de seguridad y tolerabilidad, sin diferencias significativas. Se concluye que los tratamientos con 10 y 20 mg de antocianinas no redujeron el CT, pero sí los triglicéridos, sin embargo el tratamiento control mostró mayor efecto reductor sobre CT.

En el estudio publicado por Mohagheghi *et al.* (2011), se evaluó la eficacia de *H. sabdariffa* en la reducción de los lípidos séricos en pacientes hipertensos. No hubo diferencias significativas entre los valores experimentales previos y posteriores dentro de los dos grupos. Una tendencia al alza en el colesterol total, HDL y LDL fue evidente en ambos grupos. El aumento en el colesterol total y HDL en ambos grupos en comparación con sus valores iniciales fueron significativos. Se concluye que no se observaron cambios significativos nocivos en colesterol, triglicéridos, urea, creatinina sérica, sodio y potasio dentro de los 15 días después de la discontinuación de la medicación. Según la revisión publicada por Hopkins *et al.* (2013), se reportó que la puntuación CONSORT 2001 para este estudio fue de 63.64 y la puntuación CONSORT en Elaboración de intervenciones herbales fue de 33.33.

### 3.2.13. Interacciones farmacológicas

En el estudio publicado por Kolawole y Maduenyi (2004), se determinó el efecto de un extracto acuoso de *H. sabdariffa* en la farmacocinética del acetaminofén en humanos sanos vía oral. El estudio fue llevado en 2 fases, en la primera se administraba una dosis oral de 1 g de acetaminofén, mientras que en la segunda se ingería el extracto acuoso de rosa de Jamaica 1.30 horas antes de la administración oral de 1g de acetaminofén. Los parámetros de la farmacocinética de absorción (Retardo de absorción, Constante de absorción ( $K_a$ ), Semivida de absorción ( $T_{1/2a}$ )) y de biodisponibilidad (Concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ), Tiempo al que se llega a la concentración plasmática máxima ( $T_{max}$ ), Área bajo la curva ( $ABC_{0-\infty}$ )) no mostraron diferencias significativas entre tomar acetaminofén solo o acompañado de rosa de Jamaica. Mientras que, la constante de la tasa de eliminación ( $K_\beta$ ) aumentó y el tiempo medio de eliminación ( $T_{1/2\beta}$ ) disminuyó, significativamente, lo que



resultó en un aumento en el Aclaramiento (CI) en un 11.69%, indicando que la rosa de Jamaica aumenta la eliminación de acetaminofén, por lo que éste deberá administrarse 3-4 horas antes de la ingestión de rosa de Jamaica para evitar disminuir el efecto terapéutico.

En el estudio publicado por Fakeye *et al.* (2007), se determinó que el efecto de un extracto acuoso de *H. sabdariffa* vía oral en humanos sanos puede llevar a concentraciones supra o subterapéuticas de diclofenaco. Se analizaron las muestras de orina por 8 horas después de la administración del extracto, observándose una reducción estadísticamente significativa en la cantidad de diclofenaco excretado al administrarlo con el extracto ( $0.56 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ ), comparado con agua como control ( $0.90 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ ). El extracto redujo significativamente (1.56–3.92%) las variaciones interindividuales de la cantidad de diclofenaco excretada que con el control. El valor de excreción obtenido de diclofenaco junto con rosa de Jamaica (0.029%) fue alrededor de una décima que el de diclofenaco solo (0.25%).

#### 3.2.14. Toxicidad

En el estudio publicado por Onyenekwe *et al.* (1999), se determinó la toxicidad aguda (LD50) a partir de la administración de un extracto de *H. sabdariffa*, en dosis de 1000, 3000 y 5000 mg/Kg de peso corporal, administrado vía intraperitoneal en 15 ratones albinos. Se observó un efecto dosis dependiente, donde a los 30 min todos los animales se habían recuperado. No se observó la muerte de ningún raton dentro de los 14 días de observación, representando al LD50 mayor a 5000 mg/Kg.

En el estudio publicado por Akindahunsi & Olaleye (2003), se evaluó la toxicidad de una fracción acuosa de un extracto acuoso-alcohólico de cálices secos de *H. sabdariffa* administrada a ratas albinas Wistar (150-200 g) por vía oral. Las ratas, alimentadas con una dieta comercial y agua *ad libitum*, se dividieron en seis grupos de cuatro ratas cada uno. Los tratamientos 1 a 6 recibieron 0, 1, 3, 5, 10 y 15 dosis de 250 mg/kg cada una, respectivamente; el grupo de control recibió solución salina fisiológica (0.9% NaCl). Se observó que los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina amino transferasa (ALT) fueron significativamente mayores en todos los tratamientos en comparación con el

grupo control. Sin embargo, los niveles séricos de fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa no fueron significativamente afectados. Sólo el grupo con 15 dosis tenía el nivel de albúmina en suero significativamente mayor. Los resultados de los estudios histopatológicos para todos los tratamientos mostraron que tanto hígados como corazones no dieron características patológicas. El uso prolongado de este extracto a nivel de 15-dosis podría causar lesión hepática mientras que el efecto fue leve a niveles de dosis pequeñas (1-10). El consumo medio de 150-180 mg/kg por día parece seguro.

En el estudio publicado por Fakeye *et al.* (2008), se evaluaron los cambios hematológicos, bioquímicos e histopatológicos cada 30 días de una administración oral de 90 días de extractos de agua y alcohol de cálices secos de *H. sabdariffa* en ratas albinas. La muerte de los animales fue precedida por una pérdida grave de peso, acompañada con diarrea en la dosis de 2000 mg/kg. Hubo un aumento en la ingesta de alimento (g) por kg de peso corporal por día en la fase acuosa (A) y etanólica (E) en los grupos con extractos de 300 mg/kg. Se observaron reducciones significativas en el recuento de eritrocitos, sin diferencias en el recuento total de leucocitos. La actividad de AST mejoró mediante la administración de la solución acuosa de etanol al 50% con un aumento significativo en su nivel a dosis mayores. Los niveles de ALT y creatinina fueron significativamente afectados por todos los extractos en las diferentes dosis, sin embargo, los extractos acuosos mostraron un incremento significativo en creatinina a las dosis más altas. Los niveles de colesterol en general no se vieron afectados de manera significativa. No se observaron cambios histopatológicos significativos, aunque hubo una reducción significativa en el peso del bazo de los animales administrados con extractos de etanol y agua en comparación con el control.

En el estudio publicado por Okasha *et al.* (2008) se evaluaron los efectos en los niveles de prolactina sérica de ratas hembras lactantes administradas con diferentes dosis de extractos acuosos de semillas de *H. sabdariffa* utilizando metoclopramida, extracto más dopamina y solución salina como controles (de 5 ratas cada uno). Se administraron diferentes dosis del extracto (100, 200, 400, 800 y 1600 mg/kg, vía oral), metoclopramida (5 mg/kg, vía oral), extracto (1600 mg/kg, vía oral) + dopamina (5 µg/kg, vía intraperitoneal), y control con

solución salina normal (por vía oral) del día 4 al 9 de lactancia. Los animales fueron sacrificados en el día 10 y los niveles de prolactina en suero fueron analizados mediante el kit de prolactina. El nivel de prolactina en suero de las ratas tratadas con extracto mostró un aumento significativo dosis-dependiente en comparación con el grupo control. El grupo tratado con extracto más dopamina, no mostró ningún cambio en el nivel de prolactina en suero cuando comparó con el grupo control. El LD50 del extracto de *H. sabdariffa* se encuentran por encima de 5000 mg/kg. La administración del extracto en una dosis de 1 g durante cuatro semanas no mostró cambios significativos en hígado o funciones renales.

En el estudio publicado por Omotuyi *et al.* (2010), se evaluó el efecto de las antocianinas de los cálices de *H. sabdariffa* en los niveles circulantes de las hormonas reproductivas en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Cuarenta conejos (20 machos y 20 hembras) fueron agrupados en 2 grupos controles (control del agua, estándar de antocianinas (delfinidina-3-monoglucósido)) y dos grupos experimentales (extracto completo y extracto de antocianinas). Mientras que el grupo control con agua recibió 1.0 ml agua a las 9:00 horas todos los días durante 28 días con régimen de luz/oscuridad 14:10, el control con antocianinas y el grupo experimental recibieron 200 mg/kg de las diferentes preparaciones. Las muestras de sangre fueron extraídas antes de la administración (día 0) y cada 7 días a las 9:00 horas para la estimación de prolactina en suero, hormona folículo estimulante (FSH) y testosterona usando ELISA. La administración oral por 28 días de delfinidina-3-monoglucósido y extracto de antocianinas de *H. sabdariffa* en conejos se asoció con niveles altos de prolactina circulante en machos y hembras no lactantes. Esto puede ser potencialmente importante en la inducción de producción de leche en animales en lactación. Este régimen de tratamiento también está asociado con reducción en la FSH circulante en conejos machos y hembras. Reducción a largo plazo en los niveles circulantes de FSH podrían desempeñar un rol importante en el desarrollo folicular fallido en hembras en desarrollo y atrofia gonadal en animales maduros.

En estudios clínicos en humanos, junto a su extenso uso popular, ha demostrado un buen perfil de seguridad y tolerancia como para justificar su consumo en humanos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La elaboración de productos fitofarmacéuticos a partir de extractos vegetales secos cuenta con diversas ventajas muy importantes con respecto a la utilización de drogas crudas pulverizadas, como lo es una mayor precisión en el contenido de principios activos, una menor cantidad para su utilización terapéutica (brindando menor dosificación, menor almacenaje y menor distribución), una mayor bioaccesibilidad producida por un menor tiempo de liberación de la matriz vegetal, y una mayor garantía microbiana. La conversión de extractos vegetales líquidos a secos es posible de realizarse por medio del proceso de secado por aspersión, poniendo en contacto extractos líquidos en forma de gotas finas con una corriente de aire caliente, que al ser el tiempo de contacto muy corto, el daño debido al calor es mínimo. Sin embargo el empleo del secado por aspersión para la elaboración de extractos vegetales secos con metabolitos termolábiles de los que depende su actividad biológica, no garantiza que se mantendrá la concentración de principios activos y su actividad esperada, lo que requiere la evaluación de éstas en la materia prima y en el producto terminado para justificar su uso medicinal.

Un limitante en el potencial como antihipertensivo de las antocianinas de *H. sabdariffa* es su limitada biodisponibilidad, menor al 1%, debido a una baja absorción sistémica. En investigaciones recientes a escala laboratorio, el proceso de digestión de cálices de *H. sabdariffa* molidos contribuye a aumentar la extracción de una mayor concentración de compuestos fenólicos en un período prolongado, con una mayor expresión de la actividad antioxidante, que la realización habitual del proceso de infusión. Sin embargo, la biodisponibilidad en este caso es limitada por la bioaccesibilidad de las antocianinas a liberarse de su matriz, por lo que es necesario hacer un extracto previo y administrarlo junto con la matriz extraída (cálices lixiviados) para evaluar la influencia de la fibra antioxidante en el desarrollo de una actividad biológica. Al mostrar que un fitofármaco desarrollado a partir de *H. sabdariffa*, tanto en sus antocianinas como su fibra, posee mejor actividad antioxidante que la administración únicamente de sus antocianinas, se podrá proponer una mejor herramienta fitoterapéutica que será de beneficio para pacientes con hipertensión arterial.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

5.1.1. Evaluar la incorporación de la fibra antioxidante de *H. sabdariffa* en extractos acuosos secados por aspersion, para el diseño de un fitofármaco antihipertensivo.

### 5.2. Específicos.

5.2.1. Establecer los parámetros de cultivo de la especie *H. sabdariffa*.

5.2.2. Establecer los parámetros de calidad de la especie *H. sabdariffa*.

5.2.3. Determinar los parámetros óptimos de operación del secado por aspersion para la obtención de extractos secos de *H. sabdariffa*.

5.2.4. Comparar la concentración de antocianinas totales, quercetina y polifenoles de un extracto de *H. sabdariffa*, al incluir a la fibra antioxidante de los cálices extraídos, en el secado por aspersion.

5.2.5. Comparar la concentración inhibitoria de radicales libres de los extractos de *H. sabdariffa*, al incluir a la fibra antioxidante de los cálices extraídos, en el secado por aspersion, a través de espectrometría con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), y el ensayo de decoloración del radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

5.2.6. Comparar la carga microbiana de los extractos de *H. sabdariffa*, al utilizar la fibra antioxidante de los cálices extraídos en el secado por aspersion como portador.

5.2.7. Comparar la concentración de antocianinas totales, quercetina y polifenoles en un fitofármaco de *H. sabdariffa* al utilizar la fibra antioxidante de los cálices extraídos o aerosil como excipientes.

5.2.8. Comparar la concentración inhibitoria de radicales libres en un fitofármaco de *H. sabdariffa*, al utilizar la fibra antioxidante de los cálices extraídos y aerosil como excipientes, a través de espectrometría con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil); y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

5.2.9. Comparar la carga microbiana de un fitofármaco de *H. sabdariffa*, al utilizar la fibra antioxidante de los cálices extraídos o aerosil como excipientes.

## 6. HIPOTESIS

- 6.1. “Existe una mayor concentración en principios activos y en actividad antioxidante en un extracto de *H. sabdariffa* utilizando su fibra antioxidante de los cálices pulverizados en el secado por aspersion”.
- 6.2. “Existe una mayor concentración en principios activos y en actividad antioxidante en un extracto de *H. sabdariffa* utilizando su fibra antioxidante de los cálices pulverizados como excipiente”.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. Universo de trabajo

#### 7.1.1. Población

La especie vegetal *H. sabdariffa*.

#### 7.1.2. Muestra

Extractos acuosos de *H. sabdariffa* secados por aspersion.

### 7.2. Medios

#### 7.2.1. Recursos humanos

7.2.1.1. Investigador: Lic. Rodrigo Castañeda Molina.

7.2.1.2. Asesor: Lic. Armando Cáceres.

7.2.1.3. Revisor: Ing. Agr. José Vicente Martínez Arévalo.

#### 7.2.2. Recursos Institucionales

7.2.2.1. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

7.2.2.2. Laboratorio Grupo Pheniel.

7.2.2.3. Laboratorio Pharmalat.

7.2.2.4. Laboratorios Farmaya

#### 7.2.3. Material y Equipo

7.2.3.1. Papelería en general y útiles de oficina.

7.2.3.2. Equipo de computo (computador, impresora, internet)

7.2.3.3. Alcohol etílico

7.2.3.4. Campana de extracción de gases

7.2.3.5. Guantes desechables

7.2.3.6. Reactivos de laboratorio

7.2.3.7. Procedimientos Operativos Estandar (POE)

7.2.3.8. Documentos de toma de datos

7.2.3.9. Extracto de rosa de Jamaica seco

- 7.2.3.10. Espectrofotómetro UV-VIS
- 7.2.3.11. Potenciómetro
- 7.2.3.12. Espectrómetro de absorción atómica
- 7.2.3.13. Placas para cromatografía en capa fina
- 7.2.3.14. Cámaras cromatográficas
- 7.2.3.15. Horno
- 7.2.3.16. Desecadora
- 7.2.3.17. Mufla
- 7.2.3.18. Marmita de concentración
- 7.2.3.19. Marmita de extracción
- 7.2.3.20. Spray Dryer (secador por aspersión)
- 7.2.3.21. Encapsuladora
- 7.2.3.22. Blisteadora
- 7.2.3.23. Papel filtro
- 7.2.3.24. Sonicador
- 7.2.3.25. Gradillas para tubo de ensayo
- 7.2.3.26. Cromatoplaque de Sílicagel 60 F254
- 7.2.3.27. Refrigeradora
- 7.2.3.28. Quercetina
- 7.2.3.29. Acetato de etilo
- 7.2.3.30. Ácido acético
- 7.2.3.31. Ácido fórmico
- 7.2.3.32. 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)
- 7.2.3.33. Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)
- 7.2.3.34. Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- 7.2.3.35. Ter- butilhidroxianisol (BHA)
- 7.2.3.36. Persulfato de potasio
- 7.2.3.37. Ácido Ascórbico
- 7.2.3.38. Ácido gálico
- 7.2.3.39. Reactivo de Folin-Ciocalteu



### **7.3. Procedimiento**

#### 7.3.1. Análisis del material Vegetal (rosa de Jamaica)

7.3.1.1. Se adquirió el material vegetal (*H. sabdariffa*).

7.3.1.2. Se realizó el control de calidad de la droga vegetal (*H. sabdariffa*) según farmacopea española en herbario BIGU, Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, LIPRONAT.

7.3.1.3. Se secó y molió la droga vegetal (*H. sabdariffa*).

7.3.1.4. Se determinó el procedimiento de extracción para la elaboración del extracto de *H. sabdariffa* a partir de sólidos totales.

#### 7.3.2. Elaboración del fitofármaco

7.3.2.1. Se elaboraron pruebas que permitieron obtener las condiciones óptimas de extracción y de operación en secado por aspersión.

7.3.2.2. Se pulverizaron los cálices de *H. sabdariffa* a mesh 30.

7.3.2.3. Se elaboró el extracto acuoso 1:10 por maceración dinámica

7.3.2.4. Se secó y pulverizó en mesh 120 a los cálices lixiviados.

7.3.2.5. Se elaboró el extracto seco de *H. sabdariffa* por medio de secado por aspersión.

7.3.2.6. Se encapsuló el producto en investigación.

7.3.2.7. Se blisteó el producto en investigación.

#### 7.3.3. Determinación de Antocianinas por el método de pH diferencial (Wrolstad, 2005)

7.3.3.1. Se determinó el factor de dilución apropiado para la muestra por dilución con amortiguador de cloruro de potasio, pH 1.0, hasta que la absorbancia de la muestra en el  $\lambda_{vis-max}$  estuviera dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro (inferior a 1.2). A fin de no exceder la capacidad del amortiguador, la muestra no superó 20% del volumen total.

7.3.3.2. Se colocó a cero el espectrofotómetro con agua destilada a todas las longitudes de onda utilizadas ( $\lambda_{vis-max}$  y 700 nm).

7.3.3.3. Se prepararon dos diluciones de la muestra, una con amortiguador de cloruro de potasio, pH 1.0, y el otro con tampón de acetato sódico, pH 4.5, diluyendo cada uno

por el factor de dilución determinado previamente. Se dejaron equilibrar por 15 min.

- 7.3.3.4. Se preparó una serie de diluciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 con metanol) con tres repeticiones de cada dilución añadiendo 0.3 mL de cada una y 2 mL de metanol.
- 7.3.3.5. Se midió la absorbancia de cada dilución en la  $\lambda_{vis-max}$  y a 700 nm (para corregir la turbidez), en una celda con agua destilada como blanco. Todas las medidas se hicieron entre 15 min y 1 hora después de la preparación de la muestra, ya que los tiempos de reposo más largos tendían a aumentar las lecturas observadas. Las lecturas de absorbancia se realizaron contra blancos de agua. Para corregir el efecto producido por materiales coloidales suspendidos, se corrigió la lectura a la longitud de onda donde no se produce absorbancia de la muestra, es decir, 700 nm.
- 7.3.3.6. Se calculó la absorbancia de la muestra diluida (A) de la siguiente manera:  $A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH 4.5}$
- 7.3.3.7. Se calculó la concentración de antocianinas monoméricas en la muestra original usando la fórmula siguiente: pigmento de antocianina monomérica (mg/litro) =  $(A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times 1)$ , donde MW es el peso molecular, DF = factor de dilución, y  $\epsilon$  es la absorptividad molar. NOTA IMPORTANTE: El MW y  $\epsilon$  utilizado en esta fórmula se corresponden con la antocianina predominante en la muestra, por lo que se utilizó el  $\epsilon$  reportado en la literatura para el pigmento de antocianina en disolvente ácido acuoso predominante, correspondiendo a delfinidina-3-sambubiósido, con un peso molecular de 577 g/mol y un coeficiente de extinción molar de 26.000 L/mol\*cm a 510 nm.

#### 7.3.4. Determinación de fenoles totales

- 7.3.4.1. Se prepararon los tubos de reacción y de la curva de lectura, utilizando tubos de vidrio con capacidad de 10 ml.
- 7.3.4.2. Se prepararon una serie de tubos con las siguientes diluciones, tomando en cuenta que los tubos 1a y 1b contienen la misma muestra con distintos volúmenes y se agitaron en un vortex durante 30 seg y se incubaron en baño maría en un rango de 90-100° C por 1 min, y luego se dejaron enfriar para leer la absorbancia a 765 nm.

	H <sub>2</sub> O (ml)	Ácido gálico (µL) solución 1µg/10µL	Reactivo de Folin- Ciocalteu (ml)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10%
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1b	3.900	100	0.4	0.8

7.3.4.3. Para realizar los cálculos se obtuvo la media de las absorbancia de la muestra; luego se determinó la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta, despejando “x”. El resultado así obtenido se utilizó para calcular los equivalentes de ácido gálico. El cálculo se realizó de la siguiente forma: mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto= [(Concentración obtenida en base a la curva/1000) \* (volumen reconstitución)/1000]\*Factor de dilución/g de muestra. Concentración en base a la curva= Absorbancia-Intersecto/Pendiente.

7.3.5. Cuantificación de flavonoides expresados en quercetina (Farmacopea brasileña)

7.3.5.1. Se preparó una solución metanólica de ácido acético al 5%, una solución metanólica de cloruro de aluminio al 2%, y una solución acuosa de metenamina (0.5 g en 1L)

7.3.5.2. Se preparó la solución madre adicionando 0.5 g de la muestra en polvo con 1 mL de la solución de metenamina, 10 mL de acetona, y 2 mL de HCl en un balón de fondo redondo. Se reflujo en baño maría por 30 min y se filtró con algodón colectando en un balón aforado de 100 mL. Se regresó el residuo de la droga y algodón al balón del fondo redondo, adicionando 20 mL de acetona y reflujo por 10 min. Se filtró con algodón colectando en el mismo balón aforado de 100 mL. Se regresó de nuevo el residuo de la droga y algodón al balón del fondo redondo, adicionando 20 mL de acetona y reflujo por 10 min. Se filtró y colectó en el mismo balón aforado de 100 mL y se llevó a volumen con acetona (solución A). En una ampolla de decantación se trató 20 mL de la solución A con 20 mL de agua y 15 mL de acetato

de etilo, colectando las porciones de acetato de etilo en un balón aforado de 50 mL y extrayendo la solución acuosa con otros 10 mL de acetato de etilo por duplicado. Se colectó las porciones de acetato de etilo y se lavó con 2 porciones de 50 mL de agua fría. Se transfirió las porciones de acetato de etilo al balón aforado de 50 mL y se llevó hasta volumen con acetato de etilo.

- 7.3.5.3. Para preparar la muestra se transfirieron 10 mL de la solución madre a un balón aforado de 25 mL, adicionando 1 mL de reactivo de cloruro de aluminio y se completó el volumen con solución etanólica de acetato de etilo.
- 7.3.5.4. Se preparó la solución blanco transfiriendo 10 mL de acetato de etilo en un balón aforado de 25 mL, aforando con una solución metanólica de ácido acético.
- 7.3.5.5. Se midió la absorbancia de la solución a 425 nm 30 min después de su preparación, utilizando la solución blanco para ajuste de cero. Se calculó el contenido de flavonoides totales utilizando la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * M}$$

Donde

Q = mg de flavonoides expresados en quercetina/g de muestra

A = Absorbancia de la muestra

M = Peso de la droga vegetal

- 7.3.6. Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina:
- 7.3.6.1. Se aplicó 10µL de muestra y 5µL del estándar antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatoplaca de silicagel 60F 254
- 7.3.6.2. Se colocó la placa en la cámara de vidrio, saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- 7.3.6.3. Se secó y asperjó con 2,2-defenil-2-pricrilhidrazilo (DPPH) (1 mg/ml en metanol).
- 7.3.6.4. La detección de actividad antioxidante se determinó al observar una decoloración del DPPH de morado a amarillo en las bandas respectivas.

7.3.7. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-pricril-hidrazilo) (Sharma & Bhat, 2008; Vasco *et al.*, 2008)

7.3.7.1. Se pesó 0.1 g de extracto seco y se agregó 5 ml de metanol absoluto, y se hizo pasar por sonicador por 30 min, para obtener la solución madre.

7.3.7.2. De la solución madre se prepararon una serie de diluciones (donde se encontró el porcentaje de inhibición entre 60-70%):

No. tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

7.3.7.3. Se preparó una solución de amortiguador de acetato, pesando 5.98 g de acetato de sodio disolviendolo con agua destilada en un vaso de precipitados; se trasvasó a un balón de 1000 ml y antes de aforar se adicionaron 3 ml de ácido acético glacial. Se aforó con agua destilada y se agitó. El amortiguador obtuvo un pH de 5.5

7.3.7.4. Para la preparació de la solución de DPPH 500 $\mu$ M en metanol, e pesó 0.0219 g de reactivo de DPPH y se disolvió con metanol hasta un volumen de 100 ml en un balón aforado. Se agitó la solución y se conservó en un recipiente ámbar Se preparó la solución en mismo día que se empleo, debido a su alta inestabilidad.

7.3.7.5. Se preparó una serie de tubos, cubiertos con aluminio, con los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco	Control	Blanco de ensayo	Ensayo*
Amortiguador de acetatos	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Metanol	2 ml	1.5 ml	1.9 ml	1.4 ml
Solución de DPPH	-----	0.5 ml	-----	0.5 ml
Dilución de cada muestra	-----	-----	0.1 ml	0.1 ml

7.3.7.6. Se agitaron los tubos en forma de vortex por 30 seg y se incubaron a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 min. Se leyeron a una longitud de onda de 517 nm, comparando el control y el ensayo versus el blanco respectivo.

7.3.7.7. Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución} * 100}{\text{Absorbancia del control}} = \% \text{ de inhibición}$$

7.3.7.8. Se graficó la concentración ensayada (eje X) vrs porcentaje de inhibición (eje Y).

7.3.7.9. Se determinó la ecuación de la recta y el  $r^2$  entre 0.97-0.99. Se expresó la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% ( $IC_{50}$ ). Para ello se empleó la ecuación de la recta:  $IC_{50} = (50 - \text{intercepto}) / \text{pendiente}$

7.3.8. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Re *et al.*, 1999; Vasco, *et al.*, 2008):

7.3.8.1. Se pesó 0.1 g de extracto seco, se agregó 5 ml de metanol absoluto, y se introdujo en sonificador por 30 min. De esta solución se prepararon las siguientes diluciones:

No. Tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

7.3.8.2. Se encontró el porcentaje de inhibición entre 60-70%, con un  $R^2$  entre 0.97-0.99.

7.3.8.3. Se prepararon los siguientes estándares: Trolox 2.5mM, en etanol, con diluciones entre 0-15 $\mu$ M; Vitamina C: 0.1g en 5 ml de metanol, con diluciones a 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5 ml; Vitamina E: 10mg en 5 ml de metanol, con diluciones a 0.8-0.9-1-1.1-1.2/5; Quercetina: 10mg en 5 ml de etanol, con diluciones a 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5; TBHQ: 10mg en 5 ml de etanol con diluciones a 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5.

7.3.8.4. Se preparó una solución de ABTS 7mM en agua, pesando 38.41mg y se diluyeron con agua hasta 10 ml.

7.3.8.5. Se preparó una solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua, pesando 3.31mg y se diluyeron con agua hasta 5 ml.

- 7.3.8.6. Se añadió la solución ABTS 7mM con la de persulfato de potasio 2.45mM, y se dejó por 16-18 h cubierta de la luz, a temperatura ambiente antes de su uso, para la formación del catión (ABTS<sup>+</sup>).
- 7.3.8.7. Se diluyó la solución ABTS<sup>+</sup> con etanol hasta lograr una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm y equilibrado a 30°C, empleando una dilución 1/35.
- 7.3.8.8. Se prepararon una serie de tubos, cubiertos con papel aluminio, con los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS <sup>+</sup>	3 ml	3 ml
Dilución de cada muestra	-----	30µl

- 7.3.8.9. Se preparó por triplicado cada dilución de muestra. El blanco de la corrida fue etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS<sup>+</sup> como la muestra estuvieron en incubadora a 30°C mínimo 30 min antes de mezclarlos. La absorbancia se tomó a 30°C exactamente un min después de la mezcla inicial, al cuarto y al sexto minuto.
- 7.3.8.10. Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución} * 100}{\text{Absorbancia del control}} = \% \text{ de inhibición}$$

- 7.3.8.11. Se graficó la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de inhibición (eje Y).
- 7.3.8.12. Se determinó la ecuación de la recta y el  $r^2$  entre 0.97-0.99.

- 7.3.8.13. Se expresó la actividad antioxidante en concentración de inhibición al 50% (IC<sub>50</sub>). Para ello se empleó la ecuación de la recta:  $IC_{50} = (50 - \text{intercepto}) / \text{pendiente}$ .

- 7.3.8.14. La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representó la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores TEAC se determinaron con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ Trolox}} - A_{T=6 \text{ Trolox}}) - \Delta A_{\text{solvent}(0-6 \text{ min})}$$

$$\Delta A_{\text{trolox}} = m[\text{Trolox}]$$

$$TEAC_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}} / m) * d$$

Donde  $\Delta A$  = reducción de la absorbancia,  $A$ =absorbancia al tiempo dado,  $m$  =pendiente de la curva estándar,  $[Trolox]$ = concentración de trolox,  $d$ = factor de dilución.

### 7.3.9. Control microbiológico

7.3.9.1. La cantidad de cada muestra se extrajo tomando 11 g en 1 frasco estéril con 99 ml de agua peptonada al 0.1%.

7.3.9.2. Antes de su uso, los frascos estériles se conservaron bien cerrados y protegidos de la luz, en el refrigerador (de -2 a +8 °C). Al usarse se llevó a temperatura ambiente lentamente (sin calentar).

7.3.9.3. Se registraron los datos de las muestras en un registro de análisis microbiológico.

7.3.9.4. Los 11 gramos se diluyeron con los 99 mL de agua peptonada estéril al 0.1%.

7.3.9.5. Se efectuaron diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 de la solución madre (1/10=muestra del frasco con 11g y 99ml).

7.3.9.6. En placas de petrifilm (para aerobios, *E. coli*, y hongos y levaduras) y en placas de agar (para *Salmonella*) por triplicado se incularon las soluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000, agregando 1 ml de las diluciones efectuadas, usando mechero.

7.3.9.7. Se dejaron incubar por 2 días para *E. coli*, *Salmonella* y aerobios totales, y por 5 días para hongos y levaduras.

7.3.9.8. Se contaron las colonias y se promediaron los valores de los triplicados. Se multiplicó por el factor de dilución, lo cual se reportó en UFC/g ó mL.

### 7.3.10. Análisis estadístico

7.3.10.1. Estadística descriptiva: Medidas de tendencia central y medidas de dispersión

7.3.10.2. Estadística inferencial: Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre medias con datos con distribución normal, se utilizó la prueba de t de student para muestras independientes asumiendo varianzas iguales. Valores de  $p \leq 0.05$  serán considerados para rechazar la hipótesis de nulidad o de no diferencias.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Producción agrícola del cultivo de *H. sabdariffa*

En el Cuadro 1 se observan los aspectos referentes al cultivo de la especie *H. sabdariffa*. Se tomaron en cuenta los aspectos que influyeron en la calidad de los cálices, como el modo de secado al sol por 5 días en el manejo postcosecha y la descripción que no fueron utilizados plaguicidas y abono en su cultivo. Así mismo, se observan los aspectos que influyeron en el rendimiento de los cálices, como 11-12 horas aproximadas de luz solar, 550 msnm como la altitud de cultivo, la siembra en época lluviosa, la cosecha en época fría, y la distribución de 1 m por 0.50 m entre cada planta en el cultivo.

**Cuadro 1.** Descripción agrotecnológica del cultivo de *H. sabdariffa*

<b>Aspecto agrotecnológico</b>	<b>Resultado</b>
Órgano de la planta	Cálices enteros en costales.
Estado	Material vegetal enteros y secado al sol
Presentación	Costales.
Lugar de origen	Palewitz, Buxup, Jacaltenango.
Localización geográfica del lugar de origen	Latitud norte 15°43'59'' y longitud oeste 91°49'51'', a 355 Km de la ciudad capital.
Altitud	550 msnm.
Información de siembra	Se sembró con semilla obtenida del ICTA en Julio del 2012, en época lluviosa, después de la cosecha de manía. Las flores salieron 60 días después.
Información de cosecha	Se cosechó en noviembre del 2012, cuando botó las hojas y el fruto estuviera seco. Se cosechó 30 días después que salieron las flores.
Distribución del cultivo	1 m por 0.50 m.
Abono o Plaguicidas	No se utilizaron.
Forma de secado	Al sol durante 5 días.
Experiencia del cultivo	6 años.
Fotoperíodo aproximado	11-12 horas.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en encuesta el 02/03/2013

## 8.2. Control de calidad de materia prima (cálices enteros de *H. sabdariffa*)

En el Cuadro 2 se observan los parámetros de calidad evaluados a los cálices enteros de *H. sabdariffa* como materia prima, como identidad botánica macroscópica y microscópica de la especie vegetal, identificación química de antocianinas y quercetina, y una pureza adecuada en los parámetros físicos (cenizas totales y elementos extraños) y biológicos de contaminación (crecimiento microbiano) para considerarla apta para consumo humano.

**Cuadro 2.** Control de calidad de los cálices de *H. sabdariffa*

Prueba	Resultado
Caracteres organolépticos	Color rojizo oscuro; olor ácido; sabor ácido
Identificación macroscópica	El cáliz es concrescente y urceolado en su mitad inferior, la mitad superior se separa en 5 dientes acuminados. Los dientes poseen una nervadura mediana bien marcada, ligeramente prominente, y llevan una gruesa glándula nectarífera que mide aproximadamente 1 mm de diámetro. El cálculo se compone de 8 a 12 folíolos pequeños, obovados, adheridos a la base del cáliz. El cáliz y el cálculo son carnosos, secos, friables, de color rojo brillante, algo más claro en la base de la cara interna. Corresponde a la descripción botánica de especie de <i>H. sabdariffa</i> , variedad rosicta 0205. Identificada en herbario BIGU, con número de voucher 62963 (Anexo 13.1).
Identificación microscópica	Fragmentos de parénquima de color rojo con drusas de oxalato de calcio; Células epidérmicas poligonales asociadas a cavidades de mucílago y pelos tectores unicelulares flexuosos (Anexo 13.2)
Identificación química	Del punto de partida hacia arriba: bandas rojo-azulada, violeta, azul y una banda más alargada color amarillo (Anexo 13.4).
Elementos extraños	0.75%
Pérdida por secado	10.14% ± 0.54
Cenizas totales	4.99% ± 0.35
Microbiología	400 UFC/g bacterias aerobias; 600 UFC/g hongos y levaduras; ausencia de <i>Salmonella</i> ; ausencia de <i>E. coli</i> (Anexo 13.3)

Fuente: Datos experimentales

La especie vegetal se identificó macroscópicamente hasta variedad Rosicta 0205 en el Herbario BIGU (Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos) con número de Voucher 62963. Microscópicamente, se identificaron en los fragmentos de parénquima a antocianinas almacenadas, de color rojo, con drusas de oxalato de calcio; además se identificó el mucílago en la epidermis con azul de

cresil, asociada a pelos tectores unicelulares flexuosos (United States Pharmacopoeia, 2013). Posteriormente, se identificaron por cromatografía en capa fina (TLC) a las diferentes antocianinas y a la quercetina, comparada con estándar, como sustancias de interés. Posteriormente, se aseguró su pureza al carecer de elementos extraños superiores a 2% (encontrando principalmente restos de hojas y fragmentos de cápsulas de frutos), cenizas totales inferiores a 10%, y pérdida por secado inferior al 11%. Se observó una carga microbiana aceptable, considerando que son materias primas de origen vegetal sujetas a decocción.

### **8.3. Control de calidad de materia prima (extractos secados por aspersión)**

Posterior al control de calidad de la materia prima vegetal, se procedió a realizar el secado en horno a 40° C, molienda, extracción dinámica con agua a 60 ± 10° C por 30 min, filtración, secado de cálices extraídos, molienda de los cálices extraídos, tamizaje y secado por aspersión, para el desarrollo tecnológico del extracto seco. Se evaluaron dos extractos 1:10 de *H. sabdariffa*, uno en solución y el otro en suspensión con los cálices extraídos secados y pulverizados tamizados a mesh 120. Los extractos fueron secados por aspersión a una temperatura promedio de entrada/salida de 119.4/63.6, para la solución, y 117.67/79.83, para la suspensión, respectivamente. Difieron en color según la clasificación Pantone® y en humedad, siendo el extracto secado con sus cálices extraídos secados y pulverizados con un menor contenido de humedad y un mejor mantenimiento de ésta en función del tiempo. Ambos extractos presentaron la identidad química de antocianinas y flavonoides según cromatografía en capa fina.

En el Cuadro 3 se observa un aumento estadísticamente significativo en antocianinas, flavonoides y polifenoles totales en los extractos secos sin fibra antioxidante. Sin embargo, el rendimiento del extracto seco con fibra antioxidante (46.23 g de extracto sólido/ L de extracto líquido) es mayor comparado a sin el uso de fibra antioxidante (5.49 g de extracto sólido/L de extracto líquido). La relación es proporcional en la actividad antioxidante por ABTS y DPPH, con una mayor concentración de extracto para alcanzar la actividad con el uso de fibra antioxidante como portador. La carga microbiana en hongos y levaduras fue mayor en el extracto secado por aspersión junto con su fibra antioxidante como portador.

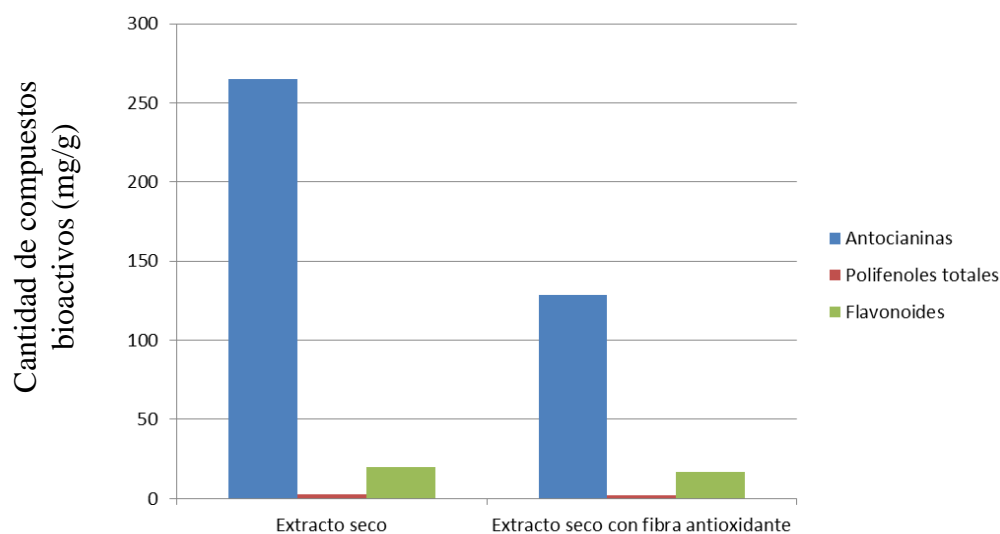
**Cuadro 3.** Comparación en los indicadores de calidad de los extractos de *H. sabdariffa* 1:10 secados por aspersión con el uso de fibra antioxidante como portador

<b>Indicador de calidad</b>	<b>Extracto seco de <i>H. sabdariffa</i> 1:10<sup>1</sup></b>	<b>Extracto seco de <i>H. sabdariffa</i> 1:10<sup>1</sup> con fibra antioxidante</b>
Evaluación organoléptica	Polvo, color rojo Pantone ® 490, olor ácido, sabor ácido	Polvo, color rojo Pantone ® 492, olor ácido, sabor ácido
Identidad química por TLC	Una banda azul, una banda rojo-violeta, una banda azul y una banda color amarillo (identificada como quercetina) <sup>2</sup> .	Una banda azul, una banda rojo-violeta, una banda azul y una banda color amarillo, (identificada como quercetina) <sup>2</sup> .
Portador	No aplica	Fibra antioxidante tamizada por mesh 120 al 15%
Te/Ts (°C) <sup>3</sup>	119.4 ± 1.14/63.6 ± 2.30	117.67 ± 0.75/79.83 ± 3.34
Rendimiento	5.49 g de extracto sólido/L de extracto líquido	46.23 g de extracto sólido/ L de extracto líquido
Humedad	7.01 ± 0.56 %	5.88 ± 0.45 %
Cambios después de 30 días <sup>4</sup>	Humedad 9.81 ± 1.13 %. Formación de una masa; color rojo, sabor ácido	Humedad 6.40 ± 0.71 %. Polvo; color rojo, sabor ácido
Antocianinas <sup>5</sup>	264.75 ± 9.36*	128.87 ± 6.30
Polifenoles totales <sup>6</sup>	2.70 ± 0.18*	1.96 ± 0.18
Flavonoides <sup>7</sup>	19.58 ± 0.56*	17.01 ± 0.76
Actividad antioxidante <sup>8</sup> por DPPH	4.25 ± 0.03*	5.01 ± 0.21
Actividad antioxidante por ABTS <sup>8</sup>	T <sub>1min</sub> : 8.19 ± 0.30* T <sub>4min</sub> : 6.76 ± 0.26* T <sub>6min</sub> : 6.33 ± 0.24*	T <sub>1min</sub> : 11.48 ± 0.82 T <sub>4min</sub> : 9.76 ± 0.49 T <sub>6min</sub> : 9.24 ± 0.43
TEAC <sup>9</sup>	4.80 ± 0.17	2.63 ± 1.97
Microbiología	0 UFC/g bacterias aerobias; 20 UFC/g hongos y levaduras; Ausencia de Salmonella; ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes	0 UFC/g bacterias aerobias; 100 UFC/g hongos y levaduras; Ausencia de Salmonella; ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes

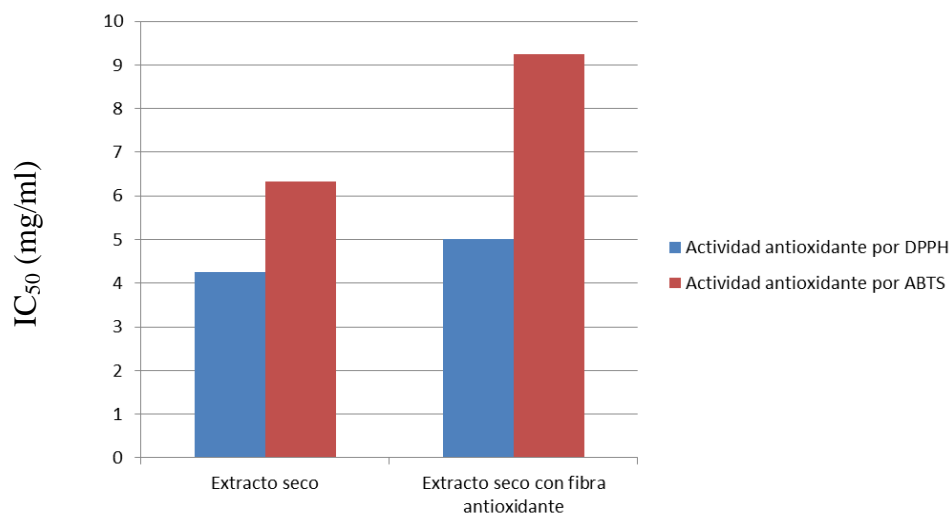
<sup>1</sup>Kg de materia vegetal molida/L de extracto; <sup>2</sup>Del punto de partida hacia arriba en la cromatopla; <sup>3</sup>Ts = Temperatura de Salida, Te = Temperatura de entrada; <sup>4</sup>Después de 30 días a 41 ± 7.42 % de humedad relativa; <sup>5</sup>Equivalentes de D3S (mg)/ g muestra; <sup>6</sup>Equivalentes de ácido gálico (mg)/g muestra; <sup>7</sup>Equivalentes de quercetina (mg)/ g muestra; <sup>8</sup>Expresado como IC50 (mg/ml); <sup>9</sup>Capacidad antioxidante equivalente al trolox expresado en mmol/g. \*Diferencia significativa con un  $\alpha$  de 0.05 entre ambos grupos.

En la gráfica 1 se observa una mayor cantidad de compuestos bioactivos (antocianinas, flavonoides y polifenoles totales) en el extracto secado por aspersión sin portador, lo que se relaciona con una menor concentración para alcanzar la actividad antioxidante (gráfica 2), comparado con el uso de fibra antioxidante como portador; sin embargo, esto es superado por un mayor rendimiento al utilizar la fibra antioxidante como portador (gráfica 3).

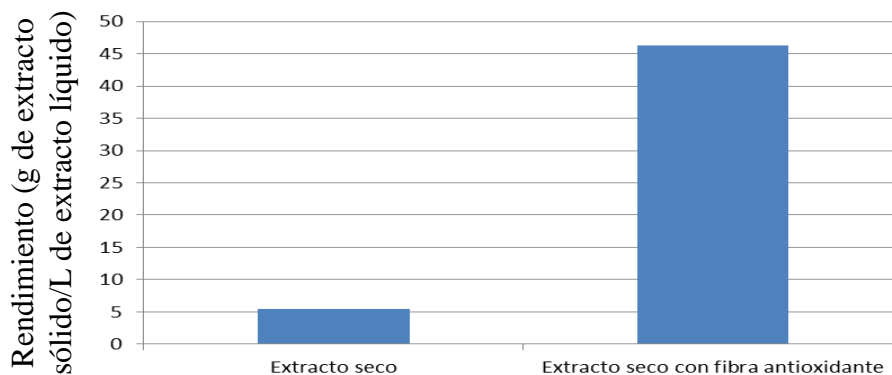
**Gráfica 1.** Cantidad de compuestos bioactivos en los extractos de *H. sabdariffa* 1:10 secados por aspersión con el uso de su fibra antioxidante como portador



**Gráfica 2.** Actividad antioxidante de los extractos de *H. sabdariffa* 1:10 secados por aspersión con el uso de su fibra antioxidante como portador



**Gráfica 3.** Rendimiento de los extractos de *H. sabdariffa* 1:10 secados por aspersión con el uso de su fibra antioxidante como portador



#### 8.4. Descripción de estándares

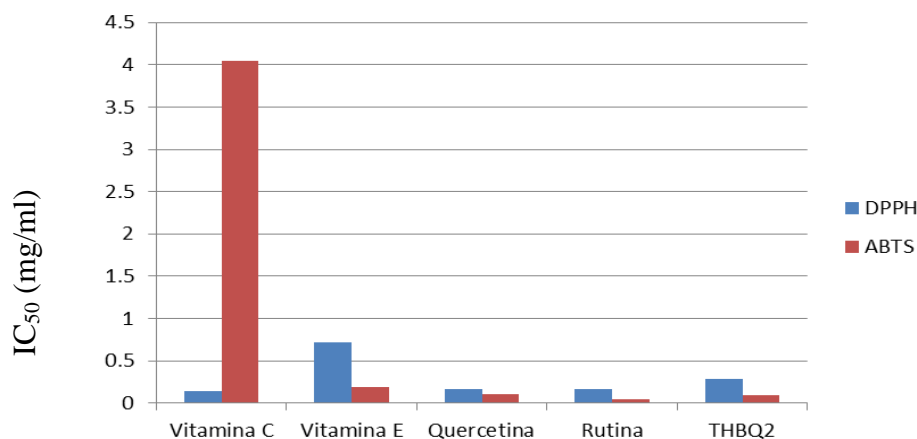
En el Cuadro 4 y Gráfica 4 se observan los  $IC_{50}$  de diversos estándares, que al compararlos con los obtenidos de los extractos de *H. sabdariffa*, se observa una actividad antioxidante por ABTS comparable con vitamina C.

**Cuadro 4.** Actividad antioxidante por DPPH y ABTS de estándares de comparación

Estándar	$IC_{50}$ de la actividad antioxidante por DPPH <sup>1</sup>	$IC_{50}$ de la actividad antioxidante por ABTS <sup>1</sup>
Vitamina C	$0.14 \pm 0.0003$	$4.04 \pm 0.03$
Vitamina E	$0.72 \pm 0.01$	$0.1923 \pm 0.003$
Quercetina	$0.16 \pm 0.0004$	$0.10 \pm 0.004$
Rutina	$0.16 \pm 0.001$	$0.05 \pm 0.0002$
THBQ <sup>2</sup>	$0.29 \pm 0.002$	$0.0996 \pm 0.001$

<sup>1</sup>Expresado como  $IC_{50}$  (mg/ml); <sup>2</sup>butil hidroquinona terciaria

**Gráfica 4.** Actividad antioxidante de estándares de comparación



### 8.5. Control de calidad del producto terminado (cápsulas con extracto seco)

En el Cuadro 5 se observa una mayor cantidad, estadísticamente significativa, en flavonoides y polifenoles totales, al utilizar a la fibra antioxidante como excipiente de relleno, comparado con aerosil. La actividad antioxidante por ABTS presentó una menor concentración, estadísticamente significativa, para alcanzar la actividad antioxidante al utilizar a la fibra antioxidante como excipiente de relleno, comparado con aerosil.

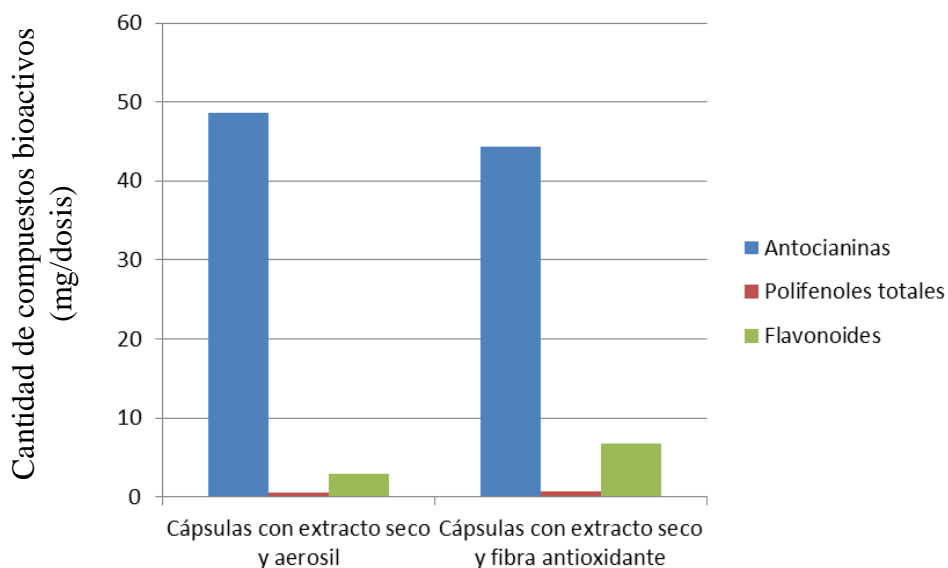
**Cuadro 5.** Comparación en los indicadores de calidad de los extractos secados por aspersión de *H. sabdariffa* con el uso de la fibra antioxidante como excipiente

Indicador de calidad	Extracto seco de <i>H. sabdariffa</i> mezclado con aerosil	Extracto seco de <i>H. sabdariffa</i> mezclado con su fibra antioxidante
Evaluación organoléptica	Polvo, color morado Pantone ® 521, olor ácido, sabor ácido	Polvo, color rojo Pantone ® 202, olor ácido, sabor ácido
Identidad química por TLC	Una banda azul, una banda rojo-violeta, una banda azul y una banda color amarillo (identificada como quercetina) <sup>1</sup> .	Una banda azul, una banda rojo-violeta, una banda azul y una banda color amarillo, (identificada como quercetina) <sup>1</sup> .
Excipiente	Aerosil	Fibra antioxidante tamizada por mesh 120 al 15%
Humedad	6.54 ± 0.23 %	6.44 ± 0.41 %
Antocianinas <sup>5</sup>	48.60 ± 3.26	44.34 ± 2.62
Polifenoles totales <sup>6</sup>	0.55 ± 0.05	0.63 ± 0.03*
Quercetina <sup>7</sup>	2.92 ± 0.07	6.80 ± 0.39*
Actividad antioxidante por DPPH <sup>8</sup>	3.27 ± 0.34	3.39 ± 0.02
Actividad antioxidante por ABTS <sup>8</sup>	T <sub>1min</sub> : 7.92 ± 5.41 T <sub>4min</sub> : 6.74 ± 4.64 T <sub>6min</sub> : 6.28 ± 4.33	T <sub>1min</sub> : 6.93 ± 4.75* T <sub>4min</sub> : 5.85 ± 3.94* T <sub>6min</sub> : 5.54 ± 3.70*
TEAC	1.06 ± 0.63	1.60 ± 0.24
Microbiología	0 UFC/g bacterias aerobias; 0 UFC/g hongos y levaduras; Ausencia de Salmonella; Ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes	200 UFC/g bacterias aerobias; 0 UFC/g hongos y levaduras; Ausencia de Salmonella; Ausencia de <i>E. coli</i> y coliformes

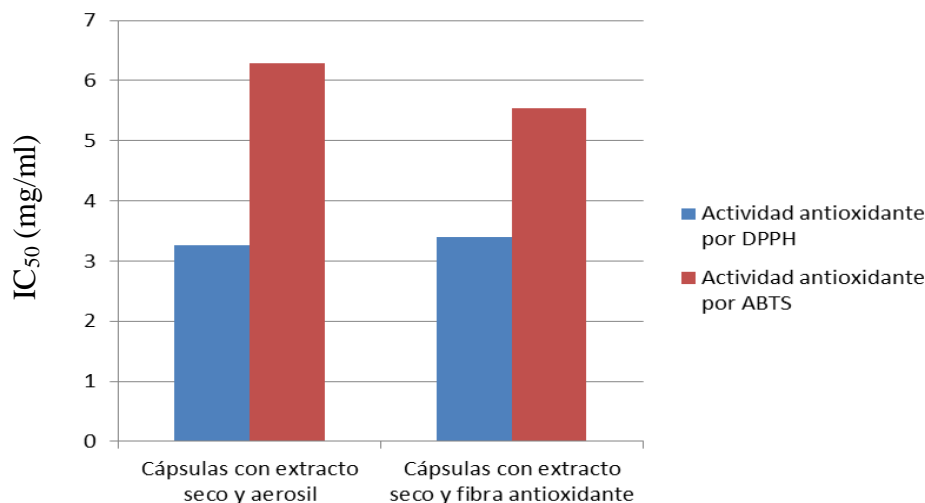
<sup>1</sup> Del punto de partida hacia arriba en la cromatoplaca; <sup>3</sup>Ts = Temperatura de Salida, Te = Temperatura de entrada; <sup>4</sup>Después de 30 días a 41 ± 7.42 % Humedad Relativa; <sup>5</sup>Equivalentes de D3S (mg)/3 cápsulas; <sup>6</sup>Equivalentes de ácido gálico (mg)/3 cápsulas; <sup>7</sup>Equivalentes de quercetina (mg)/ 3 cápsulas; <sup>8</sup>Expresado como IC50 (mg/ml); <sup>9</sup>Capacidad antioxidante equivalente al trolox expresado en mmol/g; \*Diferencia significativa con un  $\alpha$  de 0.05 entre ambos grupos.

En la Gráfica 5 y 6 se observa una mayor cantidad, estadísticamente significativa, en flavonoides, polifenoles totales y actividad antioxidante por ABTS, al utilizar a la fibra antioxidante como excipiente de relleno comparado con aerosil; sin embargo, la cantidad de antocianinas y actividad antioxidante por DPPH, no presentaron diferencias con significancia estadística entre fibra antioxidante y aerosil, al usarlos como excipientes de relleno.

**Gráfica 5.** Cantidad de compuestos bioactivos en los extractos secos de *H. sabdariffa* con el uso de aerosil o fibra antioxidante como excipiente



**Gráfica 6.** Actividad antioxidante de los extractos secos de *H. sabdariffa* con el uso de aerosil o fibra antioxidante como excipiente





## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se consideró a la especie vegetal *H. sabdariffa* como fuente de principios activos y como fuente de su propio excipiente, para el diseño de un fitofármaco estandarizado. La utilización de *H. sabdariffa* como materia prima en el desarrollo de productos fitoterapéuticos depende de sus parámetros de calidad y rendimiento, los cuales varían según su variedad botánica y de la forma en como se realiza su cultivo, lo que repercute en la cantidad de principios activos biodisponibles. Se han reportado diversas variedades de *H. sabdariffa* comercializadas en el país (Hidalgo-Villatoro *et al.*, 2006), por lo que experimentalmente fue necesario utilizar una variedad genética que reportara un alto rendimiento y alta calidad, lo que orientó la utilización de la variedad Rosicta 0205, la cual ha demostrado el mayor rendimiento y la mayor resistencia a enfermedades de las variedades comercializadas en el país (Hidalgo-Villatoro *et al.* 2006). Fue utilizado un cultivo utilizado en un estudio previo (Cano, 2008), con la determinación de parámetros agrícolas a partir de una encuesta (Cuadro 1), lo que permitió estandarizar las variables que afectan la calidad de la especie vegetal previo a su análisis, como la descripción del uso de plaguicidas y abono en el cultivo y el modo de secado de los cálices frescos en el manejo postcosecha; así mismo, estandarizar los aspectos que repercuten en el rendimiento de los cálices, como las horas aproximadas de luz solar, la altitud y coordenadas del cultivo, la época de siembra y cosecha, y la distribución entre cada planta en el cultivo. El cultivo fue obtenido de Huehuetenango, departamento que ocupa el segundo lugar en la producción de rosa de Jamaica en el país con un 28.37% (Hidalgo-Villatoro *et al.*, 2009).

En el proceso de desarrollo de productos fitoterapéuticos, después de la estandarización agrícola debe realizarse un control de calidad a la materia prima vegetal para asegurar que cumpla con las especificaciones necesarias para ser utilizada en seres humanos (Farmacopea Europea, 2005; World Health Organization, 1998). El análisis de control de calidad de la especie vegetal, como puede observarse en el Cuadro 2, cumplió con las especificaciones de calidad reconocidas internacionalmente (farmacopea europea), considerándose apta para consumo humano.

El diseño del fitofármaco a base de *H. sabdariffa* comenzó con la elaboración de un extracto seco, lo que se fundamenta en tecnología farmacéutica y en terapéutica. En tecnología farmacéutica, la transformación de extractos líquidos a sólidos aumenta la conservación de productos de tipo biológico al reducir la actividad acuosa, lo que reduce al mínimo la actividad microbiológica y el deterioro químico por disminución en las reacciones bioquímicas, resultando en un aumento en el tiempo de vida útil del producto, reduciendo el espacio de almacenamiento del producto y facilitando el manejo y distribución. Experimentalmente, la transformación de un extracto líquido a uno sólido involucró la consideración de la estabilidad química de los compuestos bioactivos en la temperatura de secado para llevar a cabo la transformación, ya que la temperatura juega un papel fundamental en la estabilidad y en la concentración de antocianinas y flavonoides (Maccarone *et al.*, 1985; Palamidis & Markakis, 1978). Por lo que la primera fase en la evaluación experimental de la fibra antioxidante involucró el proceso de secado por aspersión con una función de protección a los compuestos bioactivos, ya que en este proceso el tiempo de contacto es muy corto entre los sólidos (disueltos o suspendidos) y las altas temperaturas que permiten el secado, sin embargo el potencial de degradación existe. El considerar a un material de desecho, como lo son los cálices extraídos pulverizados, para proteger a los compuestos bioactivos de la degradación, resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos naturales y en un mejor rendimiento industrial.

Desde el punto de vista terapéutico, la administración de formas farmacéuticas sólidas favorece la utilización de unidosos, lo que incrementa la adherencia al tratamiento y la estandarización de principios activos de las dosis administradas, reduciendo el sesgo en la práctica e investigación clínica de productos fitoterapéuticos. Experimentalmente, el uso de la fibra antioxidante tiene un potencial terapéutico, en el aumento en la biodisponibilidad y vida media de los principios activos, y en el propio beneficio que produce la fibra en la salud humana. Por lo que en ésta segunda fase de evaluación de la fibra antioxidante, involucró su uso como excipiente en el proceso de encapsulado, con la función de aumentar la concentración de los compuestos bioactivos retenidos en los cálices lixiviados, como ha sido reportado en otros estudios (Leyva *et al.*, 2012).

Se realizaron tres condiciones diferentes de secado por aspersión para el mismo extracto acuoso 1:10, uno del extracto solo (sin portador), otro de una suspensión del extracto con sus cálices extraídos pulverizados a mesh 30 al 15% como portador, y otro de la suspensión del extracto con sus cálices extraídos pulverizados con mesh 120 al 15% como portador. El extracto seco obtenido de la suspensión con los cálices extraídos pulverizados a mesh 30 como portador, presentó la formación de conglomerados en el proceso de microencapsulación y un porcentaje de humedad bastante elevado, ocasionado por el peso del tamaño de partícula elevado de la fibra antioxidante a este tamiz y una resultante mayor viscosidad, lo que no permitió una distribución uniforme en la suspensión, probablemente porque la cantidad de agua que rodeaba el sistema de fibra-sólidos extraídos era muy grande para favorecer la evaporación del agua en el interior de dicho sistema, lo que impidió su análisis, razón por lo que no fue considerado en el apartado de resultados. Sin embargo, la suspensión del extracto con los cálices extraídos pulverizados a mesh 120 como portador presentó tras el secado por aspersión una buena apariencia organoléptica en forma de polvo y una menor higroscopicidad comparada con el extracto secado sin portadores (Cuadro 3). La atomización se realizó a temperaturas de entrada y salida diferentes en ambos extractos secos, siendo mayor para el extracto con los cálices extraídos pulverizados a mesh 120 que el extracto sin portador, lo que resultó en una humedad menor en el primero que en el segundo. Los cambios de humedad en función del tiempo para ambos extractos también mostraron comportamientos diferentes, siendo el extracto sin portador más higroscópico y con una mayor tendencia a solidificarse en una masa, perdiendo su aspecto de polvo, lo que se traduce en una menor estabilidad del extracto seco y por lo tanto una menor viabilidad para ser utilizado industrialmente. Este último aspecto le brindó una potencial ventaja industrial al uso de fibra antioxidante como portador, ya que ésta estabilidad le brinda una vida útil mayor. El uso de fibra antioxidante como portador le brindó al extracto seco un rendimiento superior, lo cual puede explicarse en que la fibra antioxidante le brinda un peso adicional comparándose con el extracto sin portador, y ese peso adicional microencapsulando al extracto, favorece a que dentro del secador por aspersión se movilice hacia el recolector en vez de adherirse a las paredes del secador. Sin embargo, el extracto seco con fibra antioxidante como portador presentó una menor relación estadísticamente

significativa de principios activos/peso de material (Gráfica 1) y actividad antioxidante/peso de material (Gráfica 2), comparado con el extracto sin portador, debido a que el peso en fibra ocupa un volumen mayor que el peso de extracto. Sin embargo, esta menor relación no sugiere evitar el uso de la fibra antioxidante, ya que al considerar el rendimiento (Gráfica 3) la cantidad total de principios activos obtenida es mayor a escala industrial, lo cual se explica por un aumento en la movilización de partículas, así como una mayor protección de la degradación de la temperatura y retarda la higroscopicidad.

De los extractos secos obtenidos, se seleccionó únicamente al extracto seco sin portador para su evaluación posterior en el diseño de la fibra antioxidante como excipiente, utilizando como muestra el peso de tres cápsulas con cada uno de los dos diferentes excipientes utilizados, fibra antioxidante y aerosil, los cuales eran diferentes en proporción del excipiente debido al volumen que cada uno de estos representa para ocupar el espacio de las cápsulas. Se escogieron tres cápsulas para hacer más representativa la muestra, debido a que las dosis de *H. sabdariffa* que han evidenciado efectos terapéuticos en hipertensión y dislipidemia se encuentran entre 7 y 20 mg de antocianinas (Hernández-Pérez & Herrera-Arellano, 2011; Herrera-Arellano *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Gurrola-Díaz, *et al.*, 2010; McKay *et al.*, 2010), cada 8 horas, por su baja vida media (Frank *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2012), por lo que 45 mg de antocianinas por día en 3 fracciones para mantener el efecto, se consideró como la dosis a evaluar. La incorporación de la fibra antioxidante como excipiente en el uso de extractos vegetales, considera las nuevas tendencias internacionales establecidas por la Organización Mundial de la Salud de usar extractos vegetales estandarizados, en lugar del uso de drogas vegetales pulverizadas. De igual manera los extractos vegetales de *H. sabdariffa* poseen poca estabilidad por una alta higroscopicidad y los polifenoles presentan una baja absorción, razón por la que evaluar el uso de mezclas de extracto con fibra antioxidante es necesaria para brindar alternativas efectivas en el diseño de fármacos fitoterapéuticos, principalmente en el uso de cápsulas como forma farmacéutica.

El uso de la fibra antioxidante como excipiente (Cuadro 5) no mostró diferencias significativas en la cantidad de antocianinas expresadas en equivalentes de cianidina-3-

sambubiósido, actividad antioxidante por el método de DPPH y equivalentes Trolox, sin embargo se evidenció que la fibra antioxidante comparada con aerosil le brindó un aumento significativo en la cantidad de quercetina ( $6.80 \pm 0.39$  mg comparado con  $2.92 \pm 0.07$  mg, respectivamente), polifenoles totales ( $0.63 \pm 0.03$  comparado con  $0.55 \pm 0.05$  mg de equivalentes de ácido gálico, respectivamente) y actividad antioxidante por el método de ABTS ( $5.54 \pm 3.70$  mg/mL comparada con  $6.28 \pm 4.33$  mg/mL para inhibir en un 50%, respectivamente), lo cual puede explicarse a partir de la solubilidad de las antocianinas y quercetina, y de la sensibilidad que dichos compuestos le brindan a la actividad antioxidante por DPPH y ABTS, respectivamente.

Los métodos cuantitativos para medir la actividad antioxidante empleados, difieren en que el método por DPPH sirve para la detección de moléculas de tipo polar, y el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido ABTS permite la detección de moléculas de tipo apolar (Guha *et al.*, 2011). Las antocianinas son moléculas cargadas positivamente y por lo tanto por ser altamente polares son más sensibles al método por DPPH, mientras que la quercetina es menos soluble en agua (Jullian, 2007) y por tanto más sensible al método por ABTS. Al haberse utilizado un sistema de extracción acuoso para la elaboración del extracto 1:10, se favoreció al agotamiento de moléculas afines a este tipo de sistema, por lo que la fibra antioxidante no aumentó la cantidad de antocianinas al agregarla al extracto seco (al igual que en la actividad antioxidante por DPPH), sin embargo las moléculas que no son tan solubles en agua quedaron retenidas en la fibra antioxidante después de la extracción, por lo que la quercetina aumentó al agregar la fibra antioxidante al extracto seco (al igual que la actividad antioxidante por ABTS). En el extracto seco con fibra antioxidante como excipiente, se observó una menor  $IC_{50}$  estadísticamente significativa que con en el método por ABTS ( $5.54 \pm 3.70$  mg/mL), comparada con el extracto seco con aerosil ( $6.28 \pm 4.33$ ), observando que con la fibra antioxidante se necesita una menor concentración para presentar dicha actividad antioxidante.

Como se mencionó anteriormente los extractos secos presentaron una menor carga microbiológica que el material vegetal entero, sin embargo pudo evidenciarse que la fibra

antioxidante en el uso como portador o como excipiente, le brindó un mayor contenido microbiológico comparado al secado por aspersión sin portador (100 UFC/g hongos y levaduras comparadas con 20, respectivamente) o al uso de aerosil como excipiente (200 UFC/g bacterias aerobias comparadas con 0, respectivamente), lo cual es de esperarse debido a que el secado de los cálices extraídos pulverizados no involucra temperaturas tan altas como en el secado por aspersión, para la reducción de carga microbiana. Todas las operaciones se realizaron de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), con rangos de temperatura entre 19 y 21° C y humedad relativa entre 30 y 40%, con control de aire con filtros HEPA, por lo que se considera que tales diferencias son debidas a propiedades inherentes a la fibra.

La actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS brinda aproximaciones de la actividad antioxidante de las especies vegetales a partir de la sensibilidad a reaccionar con los compuestos que la presenten de acuerdo a su polaridad, razón por la cual la actividad por DPPH se explica a partir de la concentración de antocianinas, expresadas en cianidina 3-sambubiósido por ser ésta la antocianina mayoría de *H. sabdariffa*, y la actividad por ABTS se explica a partir de la concentración de flavonoides, expresados en quercetina debido a que es el flavonoide mayoritario de *H. sabdariffa*. Los resultados de los extractos secos al compararse con estándares que son encontrados en especies vegetales (Cuadro 4), como los flavonoides quercetina y rutina, y vitaminas lipofílicas (Vitamina E) o hidrofílicas (Vitamina C), mostraron una menor concentración para expresar su actividad antioxidante, debido a que éstas se encuentran aisladas, y la proporción de principio activo por gramo es mayor que en los extractos vegetales. De éstos estándares la vitamina C y la quercetina son encontrados en *H. sabdariffa*, con lo que aportan a la actividad antioxidante observada. El THBQ no es encontrado en especies vegetales, sin embargo permite visualizar la actividad antioxidante de compuestos sintéticos. Los extractos secos de *H. sabdariffa* utilizados experimentalmente son comparables en actividad antioxidante con vitamina C.

El uso de portadores para mejorar la estabilidad de las moléculas funcionales de *H. sabdariffa* con el fin de aumentar su concentración y bioaccesibilidad se ha considerado en

múltiples estudios (Chiou *et al.*, 2007; Gradinaru, Biliaderis, Kallithraka, Kefalas, García-Viguera, 2003; Idham, Muhamad, Sarmidi, 2012). Posteriormente, Sáyago-Ayerdi y Goñi (2010) añaden los cálices de *H. sabdariffa* a la lista de materias primas vegetales calificadas como fibra dietética antioxidante, debido a su alto contenido en fibra, con actividad antioxidante significativa, concluyendo que todo el cáliz podría ser utilizado como un ingrediente funcional rico en fibra antioxidante. En este estudio se abordó el uso de extractos secos y las funciones y aportes específicos en contenido químico y en actividad antioxidante que la fibra desempeña en el diseño de fitofármacos, evidenciando que el uso de la fibra antioxidante como excipiente aún retiene compuestos fenólicos, con una superioridad de 4 mg de quercetina. Algunos autores (Alarcón-Alonso *et al.*, 2012) han atribuido que la actividad antihipertensiva se debe a quercetina, por un efecto diurético explicado por una vasodilatación mediada sobre el endotelio vascular causando la liberación de óxido nítrico, aumentando vasorrelajación renal mediante el aumento de la filtración renal.

Finalmente, hay que considerar el costo en la elaboración de extractos líquidos y su transformación a estado sólido que conlleva una inversión económica considerable, principalmente en el cumplimiento con BPM, particularmente en el tratamiento de agua y control de temperatura y humedad, en equipo, especialmente en el reactor con lixiviación dinámica, una caldera y el secador por aspersion, y personal, involucrado en tareas de operación y mantenimiento. Tal inversión debe justificarse con una evaluación de mercado para observar competitividad comercial con antihipertensivos e hipolipemiantes disponibles de origen sintético y con un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado, con el fin de evaluar su impacto en la sociedad como una alternativa para solucionar un problema de salud importante a nivel global.

## 10.CONCLUSIONES

- 10.1. La incorporación de la fibra antioxidante de *H. sabdariffa* a extractos acuosos secados por aspersión, como portador y como excipiente, mejora propiedades cualitativas y cuantitativas a la materia prima y al producto terminado, para el diseño de un fitofármaco antihipertensivo.
- 10.2. Los parámetros del cultivo de *H. sabdariffa* y su determinación a variedad Rosicta 0205, permitió su estandarización agrícola para el desarrollo de productos fitoterapéuticos.
- 10.3. El control de calidad realizado a los cálices enteros de *H. sabdariffa* permitió asegurar, según especificaciones farmacopeicas, que su uso es apto para consumo humano.
- 10.4. El cáliz de *H. sabdariffa* extraído, pulverizado y secado (fibra antioxidante), tamizado por mesh 120, utilizado como portador en el secado por aspersión, favoreció a la formación de extractos secos con menor humedad y mayor estabilidad que el tamizado por mesh 30.
- 10.5. La fibra antioxidante como portador en el proceso de secado por aspersión le brindó al extracto seco de *H. sabdariffa* resultante una menor cantidad de antocianinas, flavonoides, quercetina, polifenoles totales y actividad antioxidante con significancia estadística, debido a diferencias en la relación volumen/peso de principios activos.
- 10.6. La fibra antioxidante como portador en el proceso de secado por aspersión le brindó al extracto seco de *H. sabdariffa* un considerable mayor rendimiento en la recolección del extracto seco (5.49 g de extracto sólido/L de extracto líquido) comparado al uso sin portador (46.23 g de extracto sólido/ L de extracto líquido).
- 10.7. La carga microbiana de los extractos secados por aspersión fue menor en bacterias aerobias (400 UFC/g) y en hongos y levaduras (600 UFC/g), comparadas con la droga vegetal entera (0 y 100 UFC/g, respectivamente).
- 10.8. No existen diferencias estadísticamente significativas en el uso de la fibra antioxidante como excipiente en la concentración de antocianinas y actividad antioxidante por DPPH comparadas al uso de aerosil, debido a que el sistema



acuoso de maceración dinámica utilizado favoreció al agotamiento de sustancias polares de la fibra, limitando un aporte superior.

- 10.9. La cantidad de flavonoides, polifenoles totales y actividad antioxidante por ABTS fue mayor con significancia estadística al usar a la fibra antioxidante como excipiente comparada con aerosil, debido a que la quercetina no fue totalmente soluble en el sistema acuoso de maceración dinámica, quedando retenida en los cálices extraídos.
- 10.10. La carga microbiana de los extractos secados por aspersion con fibra antioxidante como excipiente fue mayor en bacterias aerobias (200 UFC/g), comparadas con el extracto seco sin portador (0 UFC/g).

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Utilizar la fibra antioxidante de *H. sabdariffa*, a escala industrial, como materia prima para el uso como portador en procesos de secado por aspersión y como excipiente de relleno.
- 11.2. Utilizar para uso industrial la fibra antioxidante como portador en procesos de secado por aspersión con un tamizado por mesh 120.
- 11.3. Evaluar la aplicabilidad industrial y los efectos biológicos de la fibra antioxidante de especies vegetales nativas del país.
- 11.4. Comparar los extractos secos con fibra antioxidante con la materia vegetal pulverizada.
- 11.5. Evaluar la estabilidad en anaquel de las cápsulas elaboradas con el fin de estandarizar la vida útil del producto.
- 11.6. Realizar un estudio de mercado para determinar la competitividad comercial que tiene un fitofármaco a base de *H. sabdariffa* comparado con los antihipertensivos disponibles.
- 11.7. Evaluar los efectos biológicos de *H. sabdariffa* utilizando la fibra antioxidante como excipiente en un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado (con los lineamientos CONSORT)

## 12. REFERENCIAS

- Adams, J. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin in acidified aqueous solution. *J Sci Food Agric*, 24, 747-762.
- Ajay, M., Chai, H.J., Mustafa, A.M, Gilani, A.H. & Mustafa, M.R. (2007). Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 388-393. doi:10.1016/j.jep.2006.08.005
- Akindahunsi, A.A. & Olaleye, M.T. (2003). Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 161-164. doi:10.1016/S0378-8741(03)00276-9
- Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Alarcón, F., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J. & Jimenez-Ferrer, E. (2011). Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 751-756. doi:10.1016/j.jep.2011.12.005
- Ali, B., Al, W. & Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy research*, 19, 369-375
- Al-Kahtani, H. & Hassan, B. (1990). Spray drying of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Science*, 55, 1073-1076. doi: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb01601.x
- Alonso, J. (2007). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Rosario, Argentina: Corpus Editorial y Distribuidora.
- Andrade, I. & Flores, H. (2004). Optimization of spray drying of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Drying Proceedings of the 14th International Drying Symposium, Sao Paulo, Brazil*, 597-604.
- Attoe, E. & Von Elbe, J. (1981). Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *J Food Sci*, 46, 1934-1937.
- Azza, A., Abou-Arab, Ferial M., Abu-Salem & Esmat A. Abou-Arab. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of American Science*, 7, 445-454.

- Blanquer-Hernandez, A., Herrera-Arellano, A., Zamilpa-Alvarez, A., Olivar, T. & Martínez, M. (2009). Interés de la Flor de Hibisco en problemas cardiovasculares. *Revista de Fitoterapia*, 9, 25-33.
- Bolade, M.K., Oluwalana, I.B. & Ojo, O. (2009). Commercial practice of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage production: Optimization of hot water extraction and sweetness level. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5, 126-131.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. Anthocyanins as Food Colors. Academic Press Inc., 1-38.
- Cano, L.E. (2008). Efecto de dos épocas de poda sobre el rendimiento de siete cultivares de rosa jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Huehuetenango y Baja Verapaz, Guatemala. (Tesis inédita de licenciatura). Centro Universitario de Noroccidente CUNUROC. Universidad de San Carlos de Guatemala
- Chiou, D. & Langrish, T. (2007). Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *Journal of Food Engineering*, 82, 84-91. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.01.021
- Chumsri, P., Sirichote, A. & Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 133-139.
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M. & Dornier, M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109, 16-21.
- Cisse, M., Vaillant, F., Kane, A., Ndiaye, O. & Dornier, M. (2011). Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1214-1221.
- Duangmal, K., Saicheua, B. & Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1437-1445. doi:10.1016/j.lwt.2007.08.014

- Fakeye, T. O., Adegoke, A. O., Omoyeni, O. C. & Famakinde, A. A. (2007). Effects of water extract of *Hibiscus sabdariffa*, Linn (Malvaceae) 'Roselle' on excretion of a diclofenac formulation. *Phytotherapy Research*, 21, 96-98. doi: 10.1002/ptr.2019
- Fakeye, T., Pal, A., Bawankule, D., Yadav, N. & Khanuja, S. (2008). Toxic Effects of Oral Administration of Extracts of Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae). *Phytotherapy Research*, 23, 412-6. doi: 10.1002/ptr.2644
- Fenández-Arroyo, S., Herranz-López, M., Beltrán-Debón, R., Borrás-Linares, I., Barrajon-Catalán, E., Joven, J., *et al.* (2012). Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 1590-1595. doi: 10.1002/mnfr.201200091
- Frank, F., Netzel, G., Kammerer, D.R., Carle, R., Kler, A., Kriesl, E., Bitsch, I., Bitsch, R. & Netzel, M. (2012). Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in healthy subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2207-2218. doi: 10.1002/jsfa.5615
- Frank, T., Janßen, M., Netzel, M., Straß, B., Kler, A., Kriesl, E. & Bitsch, I. (2005). Pharmacokinetics of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. Extract. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45, 203-210. doi: 10.1177/0091270004270561
- Giusti, M. & Wrolstad, R. (2001). Current Protocols in Food Analytical Chemistry, F1.2.1-F1.2.13
- Gonzalez-Palomares, S., Estarrón-Espinosa, M., Gómez-Leyva, J.F. & Andrade-González, I. (2009). Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 62-67. doi: 10.1007/s11130-008-0103-y
- Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallitharka, S., Kefalas, P. & Garcia-Viguera, C. (2003). Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83, 423-436. doi:10.1016/S0308-8146(03)00125-0

- Guha, G., Rajkumar, V., Kumar, R. & Mathew, L. (2011). Therapeutic Potential of Polar and Non-Polar Extracts of *Cyanthillium cinereum* In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- Gurrola-Díaz, C.M., García-López, P.M., Sánchez-Enríquez, S., Troyo-Sanromán, R., Andrade-Gonzales, I. & Gómez-Leyva, J.F. (2010). Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic síndrome (MeSy). *Phytomedicine*, 17, 500-505. doi:10.1016/j.phymed.2009.10.0142010
- Haji, M. & Haji, A.H. (1999). The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 231-236.
- Hassellund, SS., Flaa, A., Kjeldsen, SE., Seljeflot, I., Karlsen, A. & Rostrup, M. (2013). Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. *Journal of Human Hypertension*, 27, 100-106.
- Hernández-Pérez & Herrera-Arellano, A. (2011). Tratamiento de la hipercolesterolemia con *Hibiscus sabdariffa*. Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguridad Social*, 49, 469-480.
- Herrera-Arellano, A., Flores-Romero, S., Chávez-Soto, M.A. & Tortoriello, J. (2004). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 11, 375-382. doi:10.1016/j.phymed.2004.04.001
- Herrera-Arellano, A., Miranda-Sánchez, J., Ávila-Castro, P., Herrera-Álvarez, S., Jiménez-Ferrer, J.E., Zamila, A., et al. (2007). Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Medica*, 73, 6-12.
- Hidalgo-Villatoro, S. (2009). El cultivo de Rosa Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y la nueva variedad ROSICTA. *Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA- y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT, Guatemala.*

- Hidalgo-Villatoro, S; De León, W; Ruano, H. & Cano, L. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 101-109.
- Hopkins, A., Lamm, M.G., Funk, J. & Ritenbaugh, C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 85, 84-94. doi: 10.1016/j.fitote.2013.01.003
- Idham, Z., Muhamad, I.I. & Mohd, S.H. (2012). Effect of thermal processes on roselle anthocyanins encapsulated in different polymer matrices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 176-184. doi: 10.1111/j.1745-4549.2011.00572.x
- Inuva, O., Ali, B., Al-Lawati, O., Beegam, S., Ziada, A. & Blunden, G. (2012). Long-term ingestion of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract enhances myocardial capillarization in the spontaneously hypertensive rat. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 563-569. 10.1258/ebm.2012.011357
- Jackman, R., Yada, R., Tung, M. & Speers, R. (1987). Anthocyanins as food colorants - a review. *J Food Biochem*, 11, 201-247.
- Jiménez-Ferrer, E., Alarcón-Alonso, J., Aguilar-Rojas, A., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, I., Tortoriello, J. & Herrera-Ruiz, M. (2012). Diuretic effect of compounds from *Hibiscus sabdariffa* by modulation of the aldosterone activity. *Planta Medica*, 78, 1893-1898. doi: 10.1055/s-0032-1327864
- Juliani, H.R., Welch, C.R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D. & Simon, E. (2009). Chemistry and quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of food science and technology*, 74, S113-S121. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01076.x
- Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C. & Olea-Azar, C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 67,230-4.
- Kolawole, J. & Maduenyi, A. (2004). Effect of Zobo drink (*Hibiscus sabdariffa*) water extract on the pharmacokinetics of acetaminophen in human volunteers. *European Journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 24, 25-29.

- Kuriyan, R., Kumar, D., Rajendran, R. & Kurpad, A. (2010). An evaluation of the hypolipidemic effect of an extract of *Hibiscus Sabdariffa* leaves in hyperlipidemic Indians. a double blind, placebo controlled. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 1-8. doi: 10.1186/1472-6882-10-27
- Lakshmi, T., Anitha, R. & Durgha K, Manjusha. (2011) “Coping with Hypertension Using Safer Herbal Medicine – A Therapeutic Review”. *International Journal of Drug Development & Research*, 3, 31-57
- Leyva D., Barragán, B.E., Sosa, A. & Vizcarra, M.G. (2012). Effect of fixed bed drying on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Industrial Crops and Products*, 40, 268-276. doi:10.1016/j.indcrop.2012.03.015
- Lin, T., Lin, H., Chen, C., Lin, M., Chou, M. & Wang, C. (2007). *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*, 27, 140-145. doi:10.1016/j.nutres.2007.01.007
- Maccarone, E., Maccarrone, A. & Rapisarda, P. (1985). Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of food science*, 50, 901-904
- Markakis, P., Livingston, G., Fellers, C. (1957). Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Food Research*, 22, 117-130.
- Masters, K. (1985). *Spray drying*. George Godwin. London. 684
- McKay, D.L., Chen, O., Saltzman, E. & Blumberg, J. B. (2010). *Hibiscus sabdariffa* L. Tea (Tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *Journal of Nutrition*, 140, 298-303. doi:10.3945/jn.109.115097
- Mertens-Talcott, S., Rios, J., Jilma-Stohlwetz, P., Pacheco-Palencia, L., Meibohm, B. & Derendorf, H. (2008) Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea*) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7796-7802
- Ministerio de Sanidad y Consumo & Ministerio de la presidencia. Real Farmacopea Española. (2005). *Boletín oficial del estado*. 3era edición.
- Mohagheghi, A., Maghsoud, S., Khashayar, P. & Ghazi-Khansari, G. (2011). The effect of *Hibiscus Sabdariffa* on lipid profile, creatinine, and serum electrolytes: A randomized



- clinical trial. *International Scholarly Research Network Gastroenterology*. 1-4. doi:10.5402/2011/976019.
- Mojiminiyi, F.B, Dikko, M., Muhammad, B.Y., Ojobor, P.D., Ajagbonna, O.P., Okolo, R.U. *et al.* (2007). Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. *Fitoterapia*, 78, 292-297. doi:10.1016/j.fitote.2007.02.011
- Mozaffari-Khosravi, H., Jalali-Khanabadi, B-A., Afkhami-Ardekani, M., Fatehi, F. & Noori-Shadkam, M. (2009). The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. *Journal of Human Hypertension*, 23, 48-54. doi:10.1038/jhh.2008.100.
- Odigie, I.P., Ettarh, R.R., Adigun, S.A. (2003). Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 181-185. doi:10.1016/S0378-8741(03)00078-3
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J. & Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 7-10. doi:10.1016/j.jep.2009.09.059
- Okasha, M.A., Abubakar, M.S. & Bako, I.G. (2008). Study of the effect of aqueous *Hibiscus Sabdariffa* Linn seed extract on serum prolactin level of lactating female abino rats. *European Journal of Scientific Research*, 22, 575-583.
- Olatunji, L., Usman, T., Adebayo, J. & Olatunji, V. (2012). Effects of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* on renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  y  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  activities in Wistar rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 10, 1049-1055. doi: 10.3736/jcim20120914
- Olawale, A.S. (2011). Studies in concentration and preservation of sorrel extract. *African Journal of Biotechnology*, 10, 416-423.
- Omotuyi, I.O., Ologundudu, A., Onwubiko, V.O., Wogu, M.D. & Obi, F.O. (2010). *Hibiscus sabdariffa* Linn anthocyanins alter circulating reproductive hormones in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Diabetes and Endocrinology*, 1, 36-45.

- Onyenekwe, P.C., Ajani, E.O., Ameh, D.A. & Gamaniel, K.S. (1999) Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*, 17, 199-206
- Palamidis, N. & Markakis, P. (1978). Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *Semana Vitivinicola*, 33, 2633-2639
- Ponciano-Samayoa, K. & Hidalgo-Villatoro, S. (2012). Diversidad genética de rosa de Jamaica en Guatemala revelada por marcadores aflp. *Agronomía Mesoamericana*, 23, 63-71.
- Prasongwatana, V., Woottisin, S., Sriboonlue, P. & Kukongviriyapan, V. (2008). Uricosuric effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal-stone former subjects. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 491-495. doi:10.1016/j.jep.2008.02.036
- Prenci, E., Berto, S., Daniele, P. & Toso, S. (2007). Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, 100, 433-438. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.063
- Ramirez-Rodriguez, M., Plaza, M., Azeredo, A., Balaban, A. & Marshall, M. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x
- Ramírez-Rodríguez, M., Plaza, M., Azeredo, A., Balaban, M. & Marshall, M. (2012). Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed *Hibiscus sabdariffa* beverage during storage. *Food Chemistry*, 134, 1425-1431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.042>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Tesis de doctorado. University of Helsinki.

- Rojas, P. (1999). Perspectivas de ampliación del mercado de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), del estado de Guerrero. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. División de ciencias económico administrativas. Chapingo, México
- Ruangsrri, P., Chumsri, P., Sirichote, A. & Itharat, A. (2008). Changes in quality and bioactive properties of concentrated Roselle (*Hibiscus sabdariffa*Linn.) extract. *Asian Journal of Food and Agricultural Industries*, 1, 62-67.
- Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F., Ortega-Regules, A. & Guerrero-Beltrán, J. (2012). Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Ciencia e investigación agraria*, 39, 79-90
- Sáyago-Ayerdi, S. G. & Goñi, I. (2010). *Hibiscus sabdariffa* L: fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 60, 79-84.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J. & Goñi, I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7886-7890.
- Schulz V, Hansel R, Tyler VE. (1997). Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine. *Berlin: Springer*, 306.
- Serrano-Cruz, M., Villanueva-Carvajal, A., Morales-Rosales, J., Ramírez-Dávila, J. & Dominguez-Lopez, A. (2013). Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 554-561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.013>
- Sharma, O. & Bhat, T. (2008). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 2, 154-160.
- Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by Spray Drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *J Food Sci.*; 68, 2256-62.
- Starr, M & Francis, F. (1968). Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. *Food Tech*, 22, 1293-1295.

- Tazoho, M., Loé, E., Mfonkeu, P., Bertrand, J., Mathieu, F., Kuate, F., Mbiapo, T. & Inocent, G. (2011). Effect of Folére juice (Calix of *Hibiscus sabdariffa* Lin) on some biochemical parameters in humans. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10, 755-759.
- Tsai, P.J. & Huang, H.P. (2004). Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International*, 37, 313-318. doi:10.1016/j.foodres.2003.12.007
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816-823.
- Villanueva-Carvajal, A., Bernal-Martínez, A., García-Gasca, A., Dominguez-Lopez, A. (2013). In vitro gastrointestinal digestion of *Hibiscus sabdariffa* L.: The use of its natural matrix to improve the concentration of phenolic compounds in gut. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 260-265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.007>
- Wahabi, H.A., Alansary, L.A., Al-saqbban, A.H. & Glasziuo, P. (2010). The effectiveness of *Hibiscus sabdariffa* in the treatment of hypertension: A systematic review. *Phytomedicine*, 17, 83-86. doi:10.1016/j.phymed.2009.09.002
- Wallace, T (2011). Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Advances in Nutrition*, 2, 1-7
- Wang, L. & Stoner, G. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269, 281-290.
- Wong, P.K., Yusof, S., Mohd, H., Che, Y. (2003). Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology. A comparative study with other extraction methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1273-1278. doi: 10.1002/jsfa.1416
- World Health Organization. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. Ginebra
- World Health Organization. (2007). Who guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Ginebra
- Wrolstad, R., Durst, R., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 423-428. doi:10.1016/j.tifs.2005.03.019

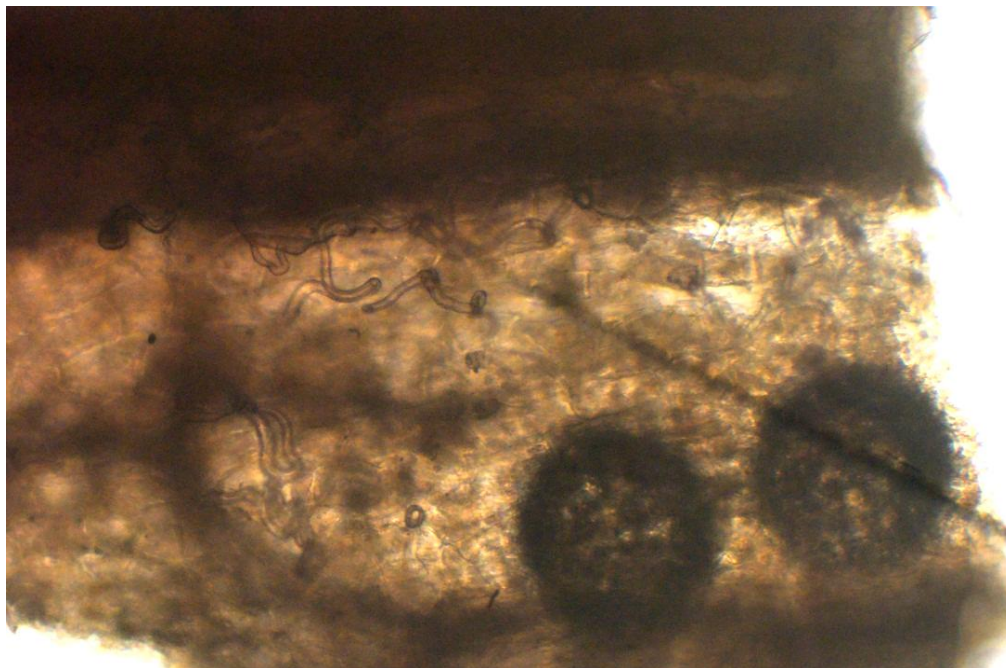
## **13. ANEXOS**

### **13.1. Identificación Macroscópica**

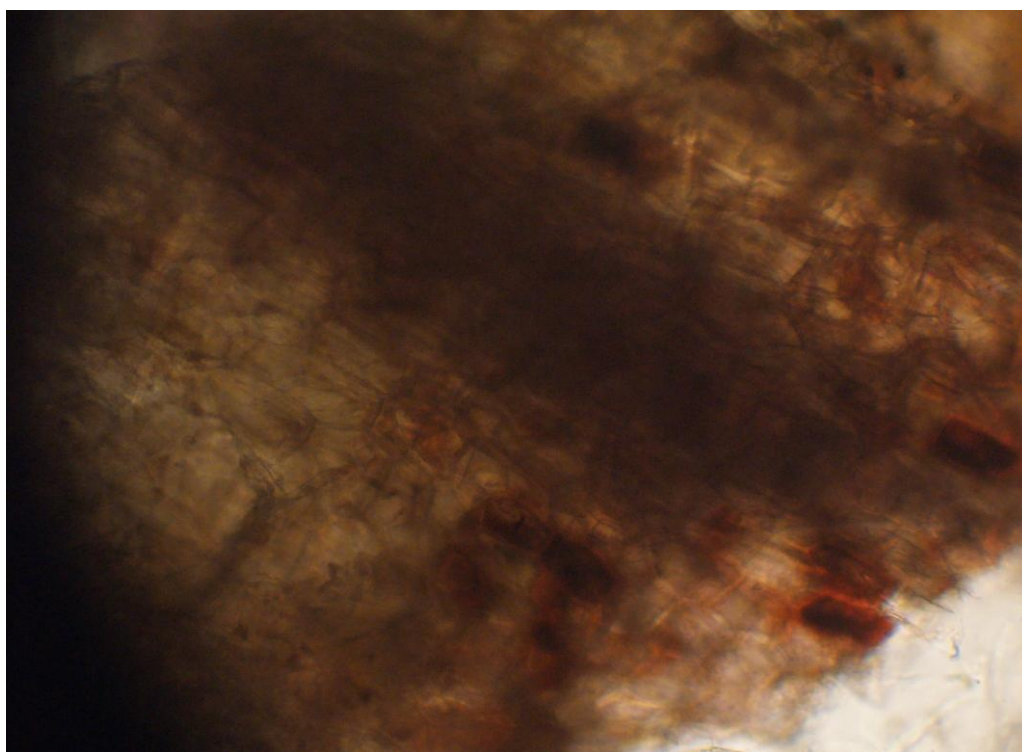


### 13.2. Identificación microscópica

13.2.1. Células epidérmicas poligonales asociadas a cavidades de mucilago y pelos tectores unicelulares flexuosos

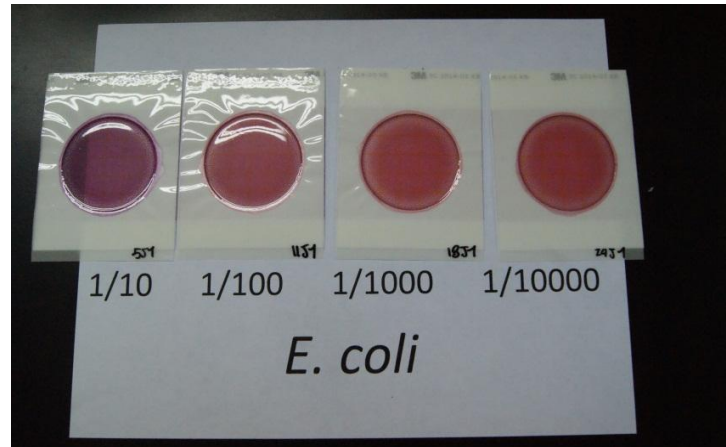


13.2.2. Fragmentos de parénquima de color rojo con drusas de oxalato de calcio



### 13.3. Microbiología de los cálices enteros de *H. sabdariffa*

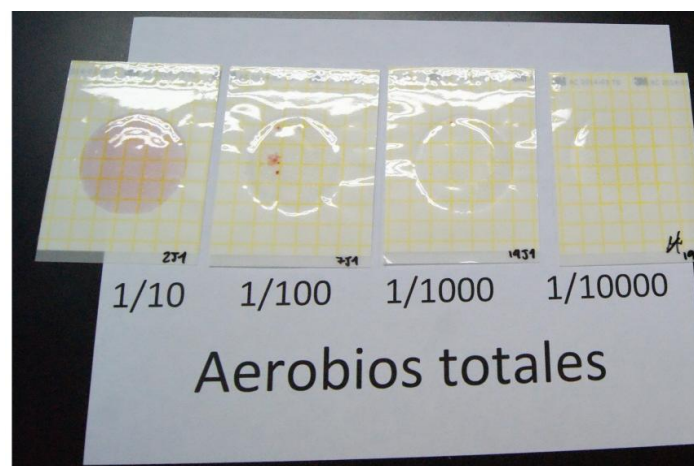
13.3.1. Determinación de *E. coli* y coliformes en placas Petrifilm™ a distintas diluciones



13.3.2. Determinación de hongos y levaduras con placa Petrifilm™ a distintas diluciones



13.3.3. Determinación de recuento aerobio con placa Petrifilm™ a distintas diluciones



#### 13.4. Identificación química





### 13.5. Certificado de calidad de los cálices de *H. sabdariffa*

Prueba	Especificaciones	Dictamen
Caracteres organolépticos	Color rojizo oscuro a café violáceo; olor ácido	Cumple
Identificación macroscópica	Cáliz concrecente y urceolado en su mitad inferior, la mitad superior se separa en 5 dientes acuminados o recurvados. Los dientes poseen una nervadura mediana bien marcada, ligeramente prominente, y llevan una gruesa glándula nectarífera que mide aproximadamente 1 mm de diámetro. El cálculo se compone de 8 a 12 folíolos pequeños, obovados, adheridos a la base del cáliz. El cáliz y el cálculo son carnosos, secos, friables, de rojo brillante a violeta oscuro, algo más claro en la base de la cara interna.	Cumple
Identificación microscópica	Fragmentos de parénquima de color rojo, que contienen numerosas drusas de oxalato de calcio y, esporádicamente, cavidades rellenas de mucílago, a veces asociadas a células epidérmicas poligonales y estomas anisocíticos; numerosos fragmentos de haces conductores con vasos espiralados y reticulados; fibras esclerenquimatosas con lumen ancho; escasas fibras parenquimatosas rectangulares punteadas; fragmentos de pelos tectores unicelulares lisos y flexuosos, y ocasionalmente pelos glandulosos; granos de polen redondeados con exina espinosa.	Cumple
Identificación química	3 bandas azul-violeta cerca del punto de partida y una banda violeta pálida encima de éstas, con fase móvil de ácido acético, agua, butanol (15:30:60 V/V/V)	Cumple
Elementos extraños	Como máximo 2% de fragmentos de frutos.	Cumple
Pérdida por secado	Como máximo 11.0%.	Cumple
Cenizas totales	Como máximo 10.0%.	Cumple
Microbiología	No más de $10^5$ bacterias aerobias; No más de $10^4$ hongos por gramo; No más de $10^4$ Enterobacterias y otras gram-negativas por gramo; Ausencia de <i>Salmonella</i> (10g); Ausencia de <i>Escherichia coli</i> (1g).	Cumple

### 13.6. Secador por aspersión



### 13.7. Recolección del extracto seco de *H. sabdariffa*



#### 13.7.1. Cápsulas del Fitofármaco de *H. sabdariffa*

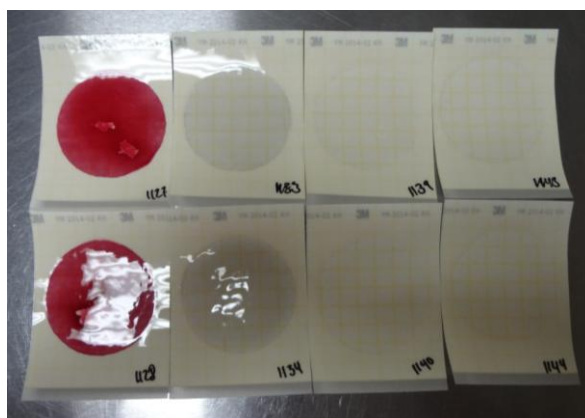


**13.8. Microbiología de los extractos secos de *H. sabdariffa* y productos terminados**

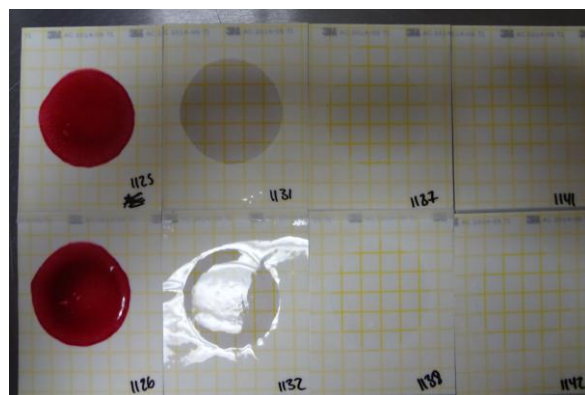
- 13.8.1. Determinación de *E. coli* y coliformes en placas Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* secado por aspersión



- 13.8.2. Determinación de hongos y levaduras con placa Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* secado por aspersión



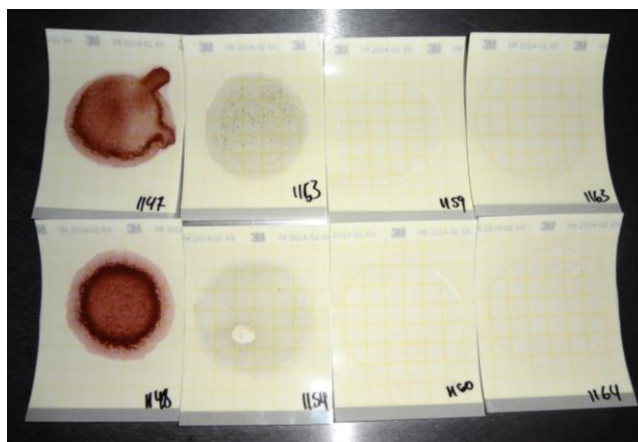
- 13.8.3. Determinación de recuento aerobio con placa Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* secado por aspersión



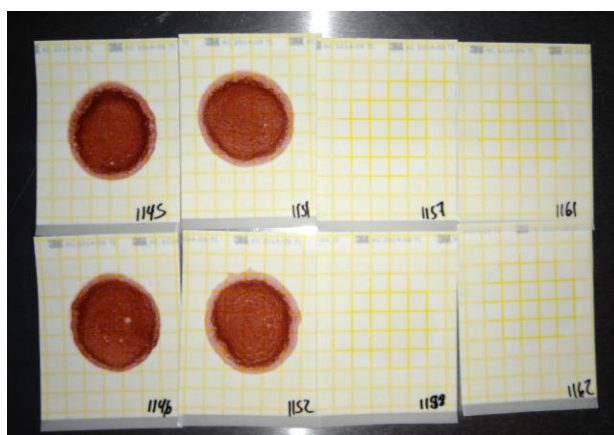
13.8.4. Determinación de *E. coli* y coliformes en placas Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante secado por aspersión



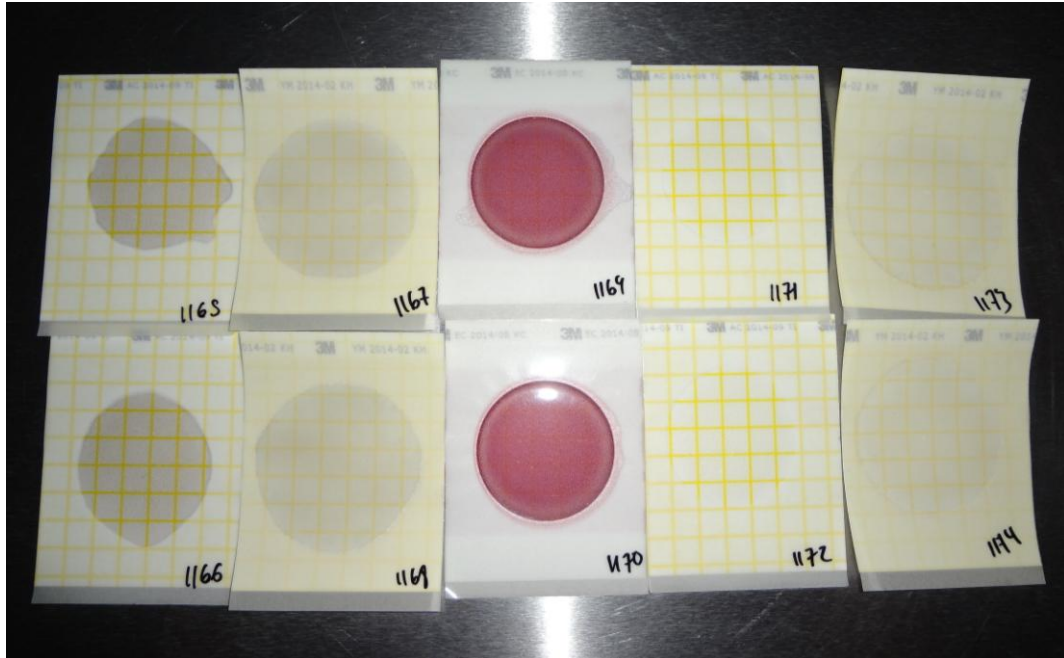
13.8.5. Determinación de hongos y levaduras con placa Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante secado por aspersión



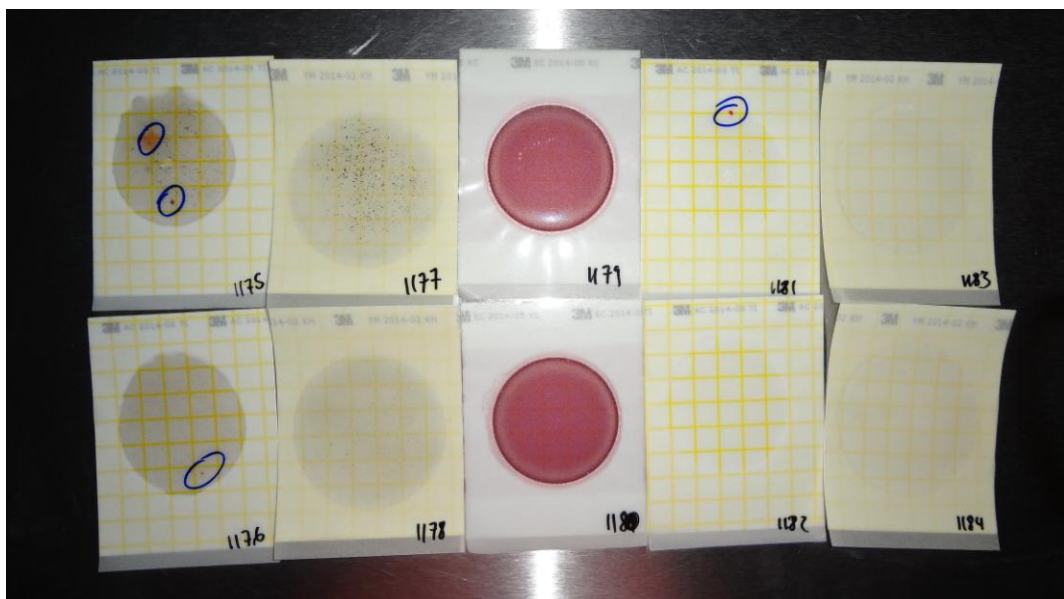
13.8.6. Determinación de recuento aerobio con placa Petrifilm™ a distintas diluciones del extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante secado por aspersión



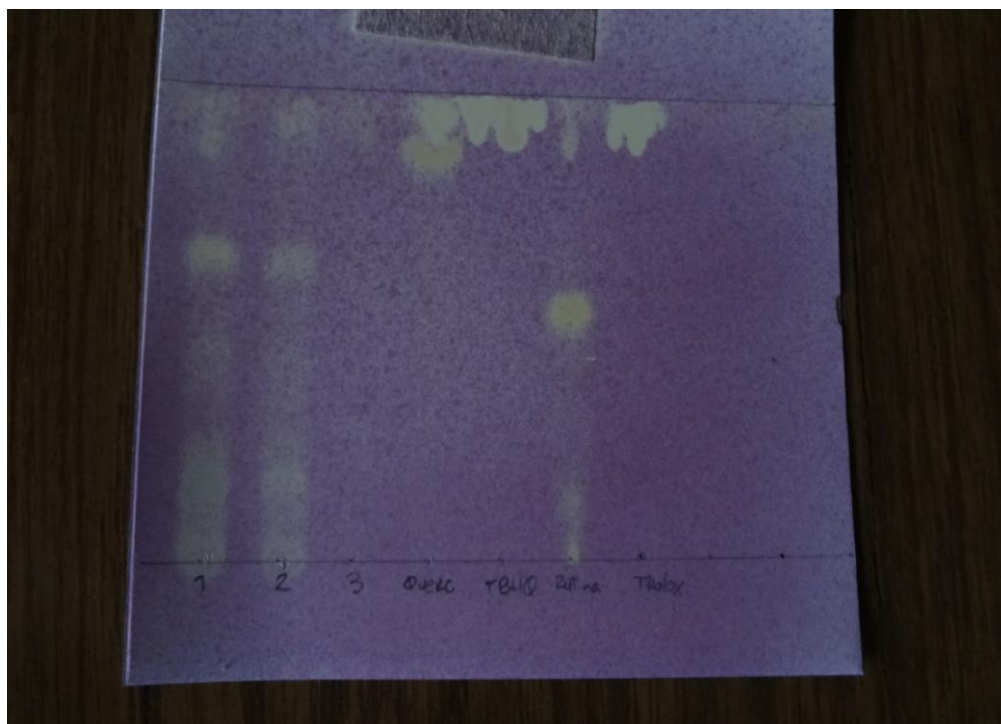
- 13.8.7. Recuento aerobio, hongos y levaduras, y *E. coli* y coliformes en placas Petrifilm™ a distintas diluciones de la mezcla del extracto de *H. sabdariffa* secado por aspersión con aerosil



- 13.8.8. Recuento aerobio, hongos y levaduras, y *E. coli* y coliformes en placas Petrifilm™ a distintas diluciones de la mezcla del extracto de *H. sabdariffa* secado por aspersión con su fibra antioxidante

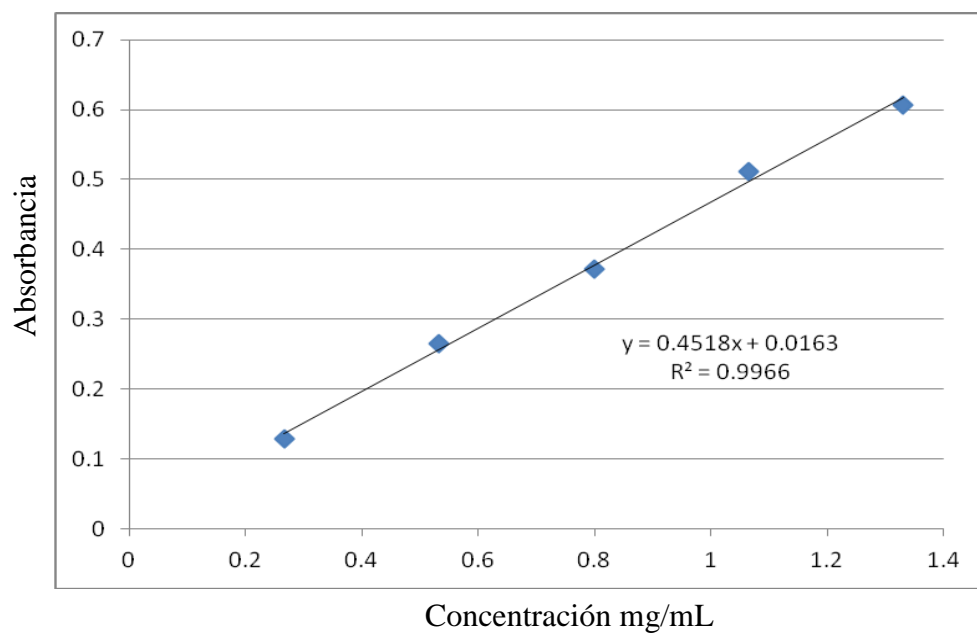


### 13.9. Cromatografía en capa fina de la detección de actividad antioxidante con revelador de DPPH

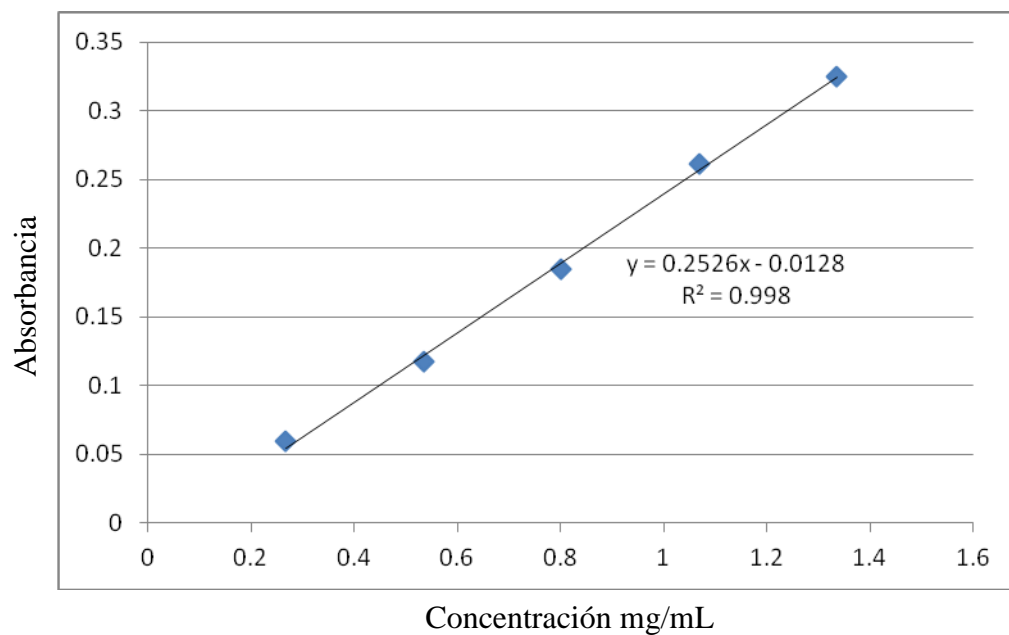


### 13.10. Curvas de calibración de las muestras de antocianinas

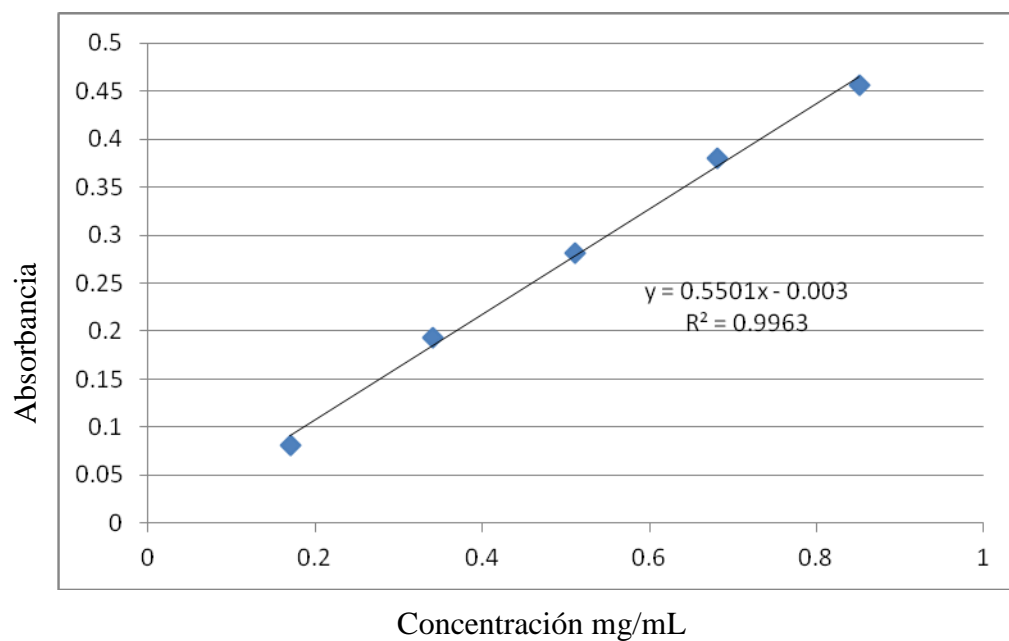
13.10.1. Extracto de *H. sabdariffa* (sin portador) secado por aspersión



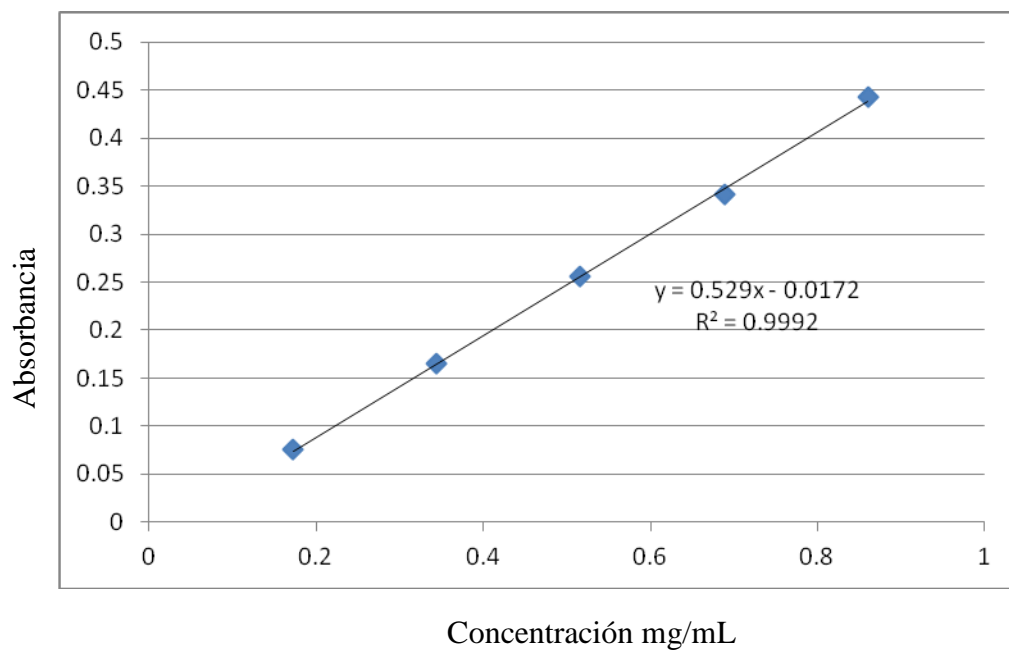
13.10.2. Extracto de *H. sabdariffa* con fibra antioxidante como portador secado por aspersión



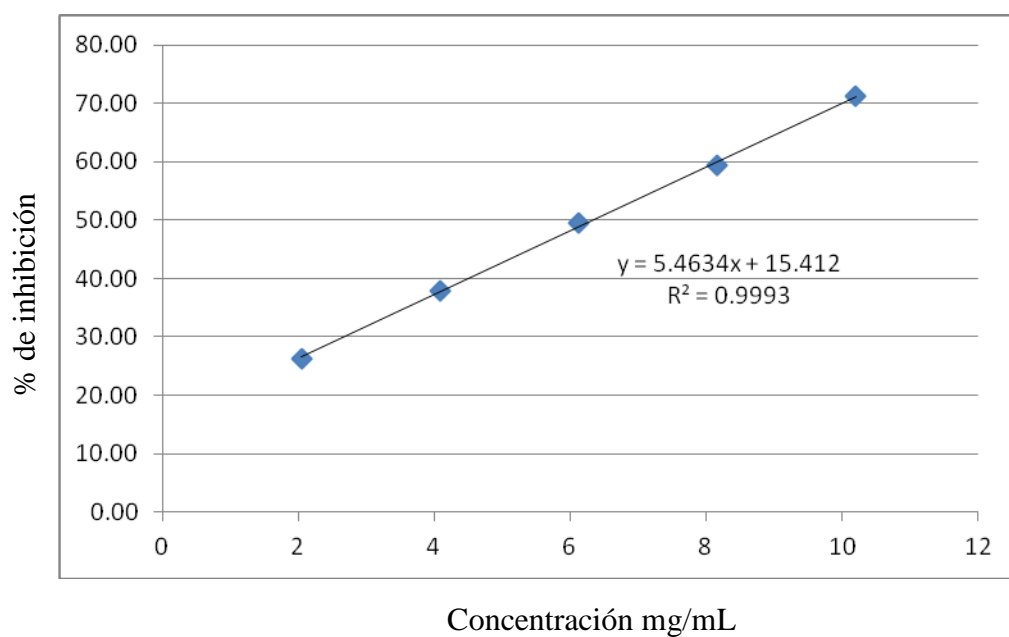
13.10.3. Extracto de *H. sabdariffa* con aerosil como excipiente



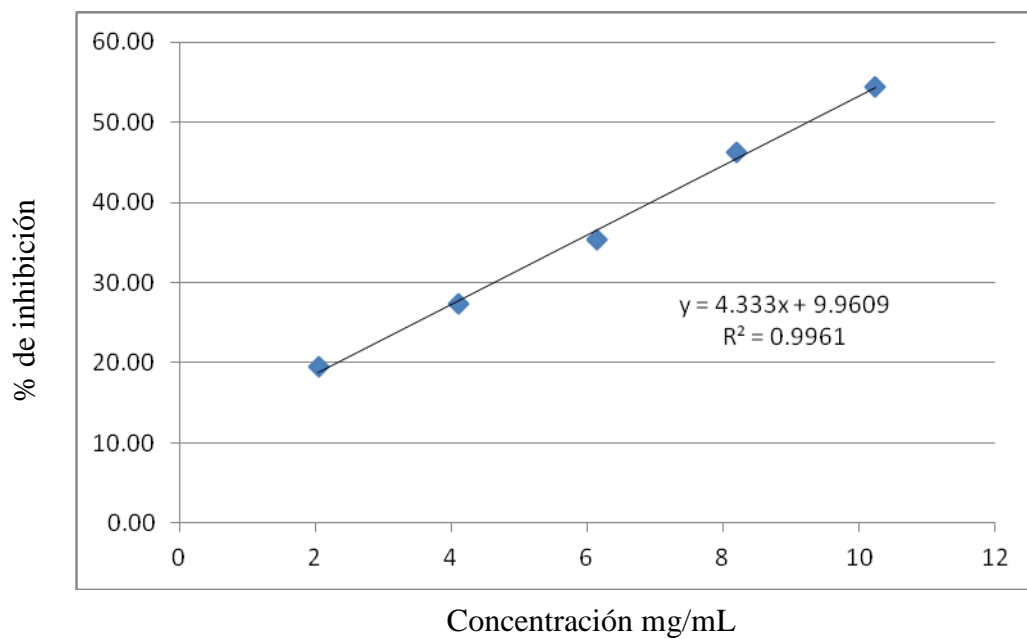


13.10.4. Extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante como excipiente

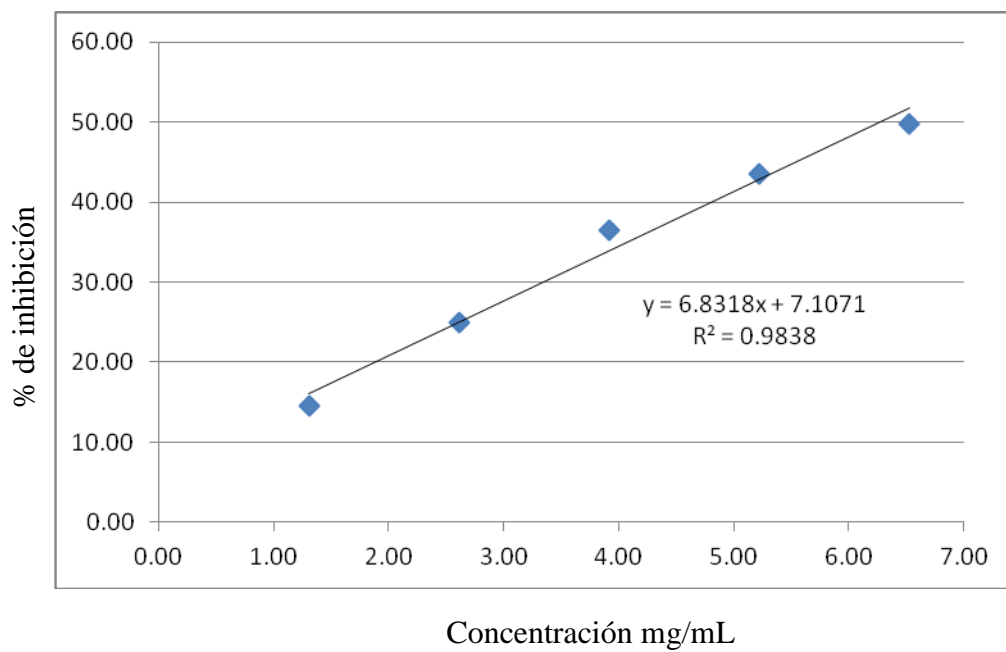
## 13.11. Curvas de calibración usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS (Tiempo: 6 min)

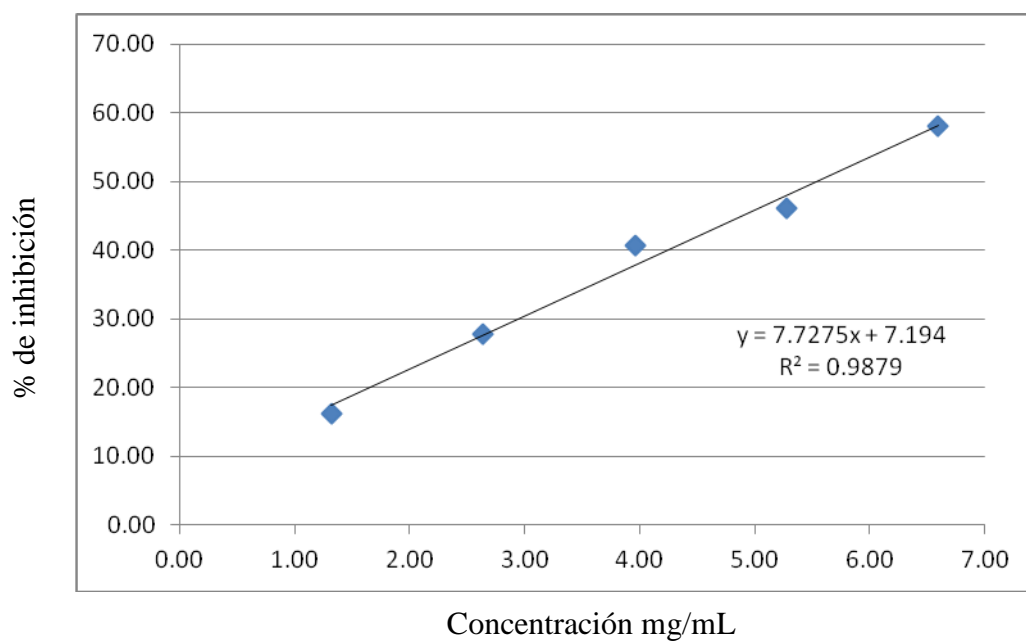
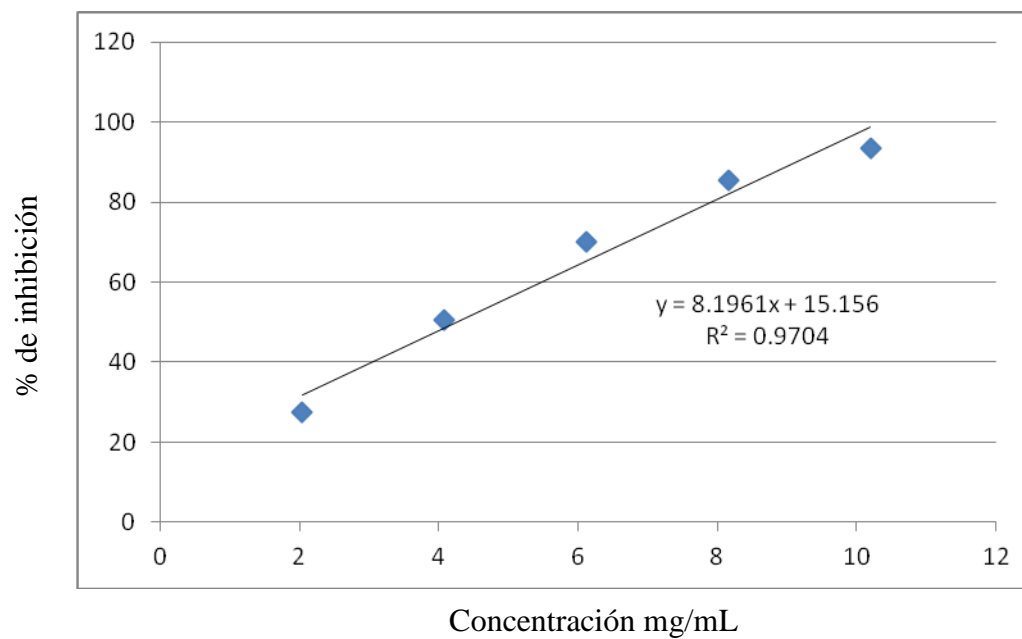
13.11.1. Extracto de *H. sabdariffa* (sin portador) secado por aspersión

13.11.2. Extracto de *H. sabdariffa* con fibra antioxidante como portador secado por aspersión

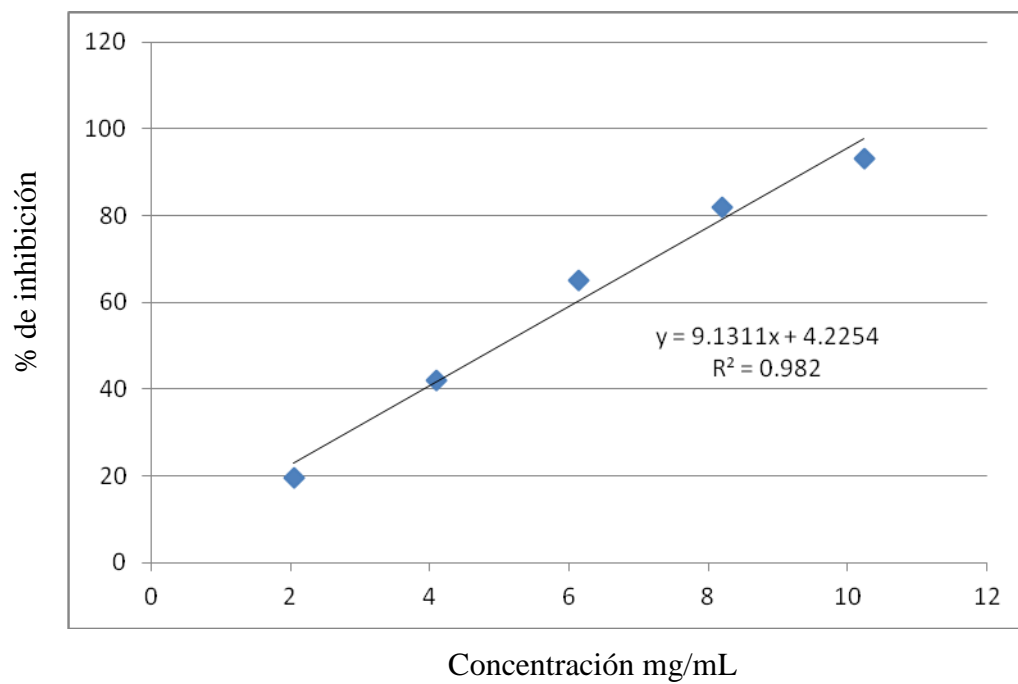


13.11.3. Extracto de *H. sabdariffa* con aerosil como excipiente

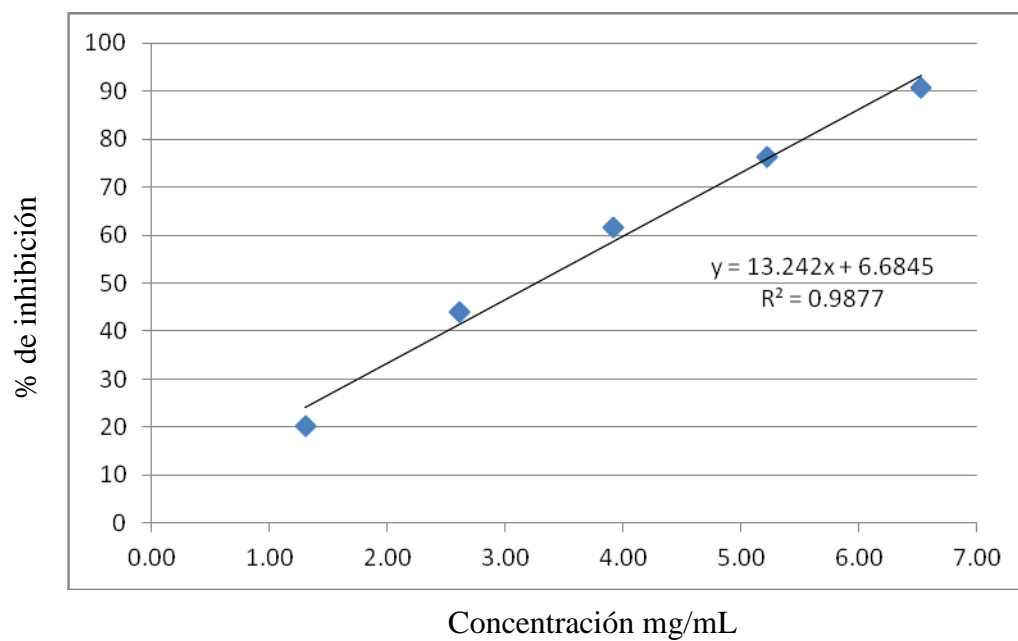


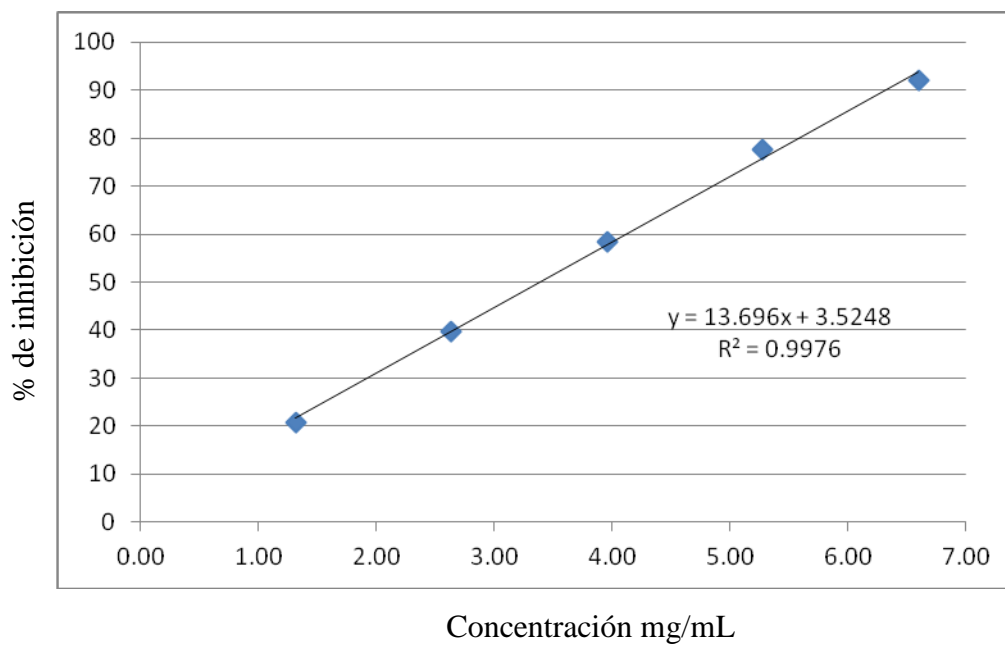
13.11.4. Extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante como excipiente**13.12. Curvas de calibración usadas en la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH**13.12.1. Extracto de *H. sabdariffa* (sin portador) secado por aspersión

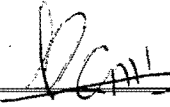
13.12.2. Extracto de *H. sabdariffa* con fibra antioxidante como portador secado por aspersion



13.12.3. Extracto de *H. sabdariffa* con aerosil como excipiente



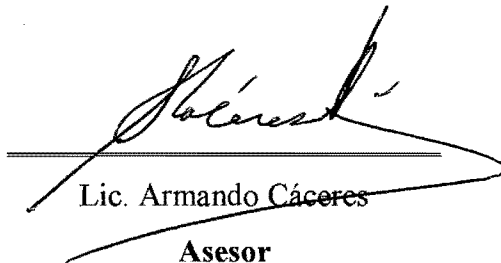
13.12.4. Extracto de *H. sabdariffa* con su fibra antioxidante como excipiente



---

Lic. Rodrigo Castañeda Molina

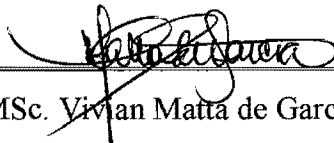
**Autor**



---

Lic. Armando Cáceres

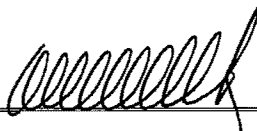
**Asesor**



---

MSc. Vivian Matta de García

**Directora**



---

Oscar Cobar Pinto, Ph.D

**Decano**