



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INFLUENCIA DEL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN SOBRE LA  
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CÁLCICES DE LA ESPECIE *HIBISCUS*  
*SABDARIFFA* LINN.

GRANJA RIZZO DONNA FIORELLA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2019



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Influencia del método de secado por aspersión sobre la composición química de los cálices de la especie *Hibiscus sabdariffa* Linn.**

**GRANJA RIZZO DONNA FIORELLA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**MACHALA  
2019**



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

Influencia del método de secado por aspersion sobre la composición química de los cálices de la especie *Hibiscus sabdariffa* Linn.

GRANJA RIZZO DONNA FIORELLA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

MACHALA, 12 DE SEPTIEMBRE DE 2019

MACHALA  
2019



# Trabajo de titulación (Donna Granja)

*por* Donna Granja Rizo

---

**Fecha de entrega:** 09-sep-2019 09:37a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1169601326

**Nombre del archivo:** Versi3n turnitin.doc (1.09M)

**Total de palabras:** 18734

**Total de caracteres:** 103748



## **AGRADECIMIENTO**

Gracias a mis padres y hermanos, por su guía, paciencia, amor y apoyo.

Gracias a mis maestros, con mención especial a la Lic. Mercedes Campo, por su ayuda, confianza, dedicación y enseñanzas.

A todos, muchas gracias.

***Donna Fiorella Granja Rizzo***

## RESUMEN

Los cálices de la especie *Hibiscus sabdariffa* L. también conocida como flor de jamaica, contienen gran cantidad de compuestos químicos, entre los que destacan: ácidos orgánicos, ácidos fenólicos y antocianinas, siendo las más significativas dentro de este último grupo, la delphinifina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido. Entre las propiedades terapéuticas que se le asocian a las antocianinas están: hipolipemiente, antioxidante, diurética, antipirética, antihipertensiva, además de su posible uso como colorante, tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica. Aunque dichos flavonoides poseen un gran potencial, desafortunadamente presentan el inconveniente de su inestabilidad. Estos compuestos son susceptibles a la degradación por diferentes condiciones, tales como pH, enzimas, oxígeno, luz, entre otros.

Teniendo en cuenta la gran utilidad que los cálices de jamaica reportan, el objetivo de la investigación fue analizar las microcápsulas obtenidas mediante el método de secado por aspersión, para determinar la influencia de dicho proceso, sobre las propiedades físico-químicas y la capacidad antioxidante, del extracto seco de los cálices de la especie *H. sabdariffa*.

Los cálices de *H. sabdariffa* fueron recolectados en los terrenos de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias (UACA), recibiendo el debido tratamiento poscosecha, previo al proceso de secado.

Para determinar la mejor condición de extracción, se realizó un diseño experimental con dos variables de estudio y dos condiciones para cada variable: mensturo (agua y agua/etanol) y la relación temperatura/tiempo de extracción (25°C/60 min. y 60°C/30 min.), para lo cual se hicieron doce corridas experimentales. En todos los casos el método de extracción usado fue la maceración con agitación ultrasónica.

Para evaluar la influencia de los factores: mensturo y relación tiempo/temperatura sobre los doce experimentos realizados, se determinaron varios parámetros físico-químicos, tales como: rendimiento, pH, grados Brix (°Bx), cuantificación de fenoles totales mediante Folin-Ciocalteu y de antocianinas monoméricas totales por el método de pH diferencial. Además, se determinó la capacidad secuestradora de radicales libres por el método DPPH.



Del análisis estadístico efectuado se pudo concluir que las variables independientes consideradas en el estudio, no mostraron influencia en los valores de pH, sobre la cantidad de sólidos solubles (°Bx) extraídos, ni en la capacidad secuestradora de radicales libres. De los dos disolventes evaluados, el agua fue el que logró mayor rendimiento de extracción, independientemente de las condiciones de tiempo y temperatura. Con relación a la cuantificación de fenoles totales, la mayor extracción de estos se obtuvo al utilizar como menstuo la mezcla agua:EtOH (80:20), sin embargo, al realizar la maceración a 60 °C por un tiempo de 30 min., se logró mayor extracción de los pigmentos antocianinas.

Otra de las variables analizadas fue el estudio químico cualitativo mediante CLAE-EM (Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas) de los doce extractos. Se analizaron los cromatogramas a cuatro longitudes de onda diferentes (250, 280, 330 y 520 nm), así como los espectros de absorción de cada uno de los compuestos separados. Como sistema de detección adicional y para efectos de identificación estructural, se procedió a la realización del análisis por espectrometría de masas, en modo positivo y negativo, de todos los experimentos realizados. La identificación final de los compuestos se realizó sobre la base del espectro UV-visible; de la masa del ion molecular y de los iones fragmentos referidos en la literatura, para extractos de los cálices de jamaica y utilizando un análisis espectrométrico similar. Los metabolitos identificados en modo negativo fueron: ácido hibiscus; ácidos fenólicos (ácido-5-cafeoilquínico y sus isómeros 3 y 4; ácido-5-O-coumaroilquínico y su isómero el ácido-3-O-coumaroilquínico y el ácido cafeoilshikímico, además de un isómero de este); las antocianinas delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido y varios glicósidos de flavonoles tales como: miricetina-3-arabinogalactósido, quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinosido, un derivado de la quercetina glicosidada y el kaempferol-3-(p-coumaroil glucósido). En el modo positivo se identificaron cinco compuestos: un fenol simple (ácido-5-cafeoilquínico), las dos antocianinas antes referidas y dos glicósidos de flavonoles (miricetina-3-sambubiósido y quercetina-3-sambubiósido).

Los extractos que serían sometidos al secado por atomización se decidieron elaborar utilizando como menstuo la mezcla agua:EtOH (80:20), una temperatura de 60 °C y por un

tiempo de 30 min. Para la decisión se consideró, básicamente, la capacidad extractiva de compuestos fenólicos y el ahorro en tiempo cuando se emplea la temperatura de 60 °C.

Una vez obtenida la mejor condición de extracción, se procedió a la realización del estudio de secado por aspersión, donde se ensayaron cuatro condiciones diferentes. Para el proceso se establecieron dos variables y dos niveles: temperatura de entrada: 150 °C y 190 °C y la mezcla de encapsulantes: goma arábiga (G) y maltodextrina (MD), en relaciones G40%:MD60% y G60%:MD40%. Para analizar la influencia del proceso de secado por atomización sobre las propiedades físico-químicas (°Bx, humedad residual, fenoles totales, antocianinas monoméricas totales) y sobre la capacidad antioxidante de las microcápsulas resultantes (método del DPPH), se realizaron, paralelamente, dos experimentos donde el secado del extracto se llevó a cabo con ayuda del rotoevaporador (temperatura del baño 40 °C). Estos dos experimentos difirieron solamente en la mezcla de encapsulantes utilizada.

Al evaluar el proceso de secado, se pudo apreciar que, el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, cuando se utiliza el secado con el rotoevaporador, resultó ser el mejor. Las menores afectaciones, al utilizar el secado por atomización, se obtuvieron con la temperatura de 150 °C en las tres variables fundamentales analizadas (fenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante), sin embargo, la mezcla encapsulante G60/MD40, favoreció la presencia de compuestos fenólicos totales y de antocianinas, sin embargo, la capacidad antioxidante resultó ser mejor cuando se empleó la combinación G40/MD60. Del estudio por CLAE-EM, se pudo determinar que no existieron cambios cualitativos.

Los estudios realizados permitieron sentar las bases para el desarrollo de un diseño experimental donde, podrían analizarse variables como la temperatura de entrada (inferior a 150 °C) y proporción de encapsulante en la mezcla final (extracto). Adicional a ello evaluar la capacidad antioxidante por otras técnicas, para sustentar su uso en la terapéutica y valorar la influencia del proceso sobre el color, lo que tributaria de manera más directa, a su empleo como colorante natural.

### **Palabras claves**

*Hibiscus sabdariffa* L., flor de jamaica, secado por aspersión, antocianinas, Spray Dryer.

## ABSTRACT

The calyces of the *Hibiscus sabdariffa* L., also known as jamaica flower, contain a large number of chemical compounds, the main ones are: organic acids, phenolic acids and anthocyanins, the most important are delphinidin-3-sambubioside and cyanidin-3-sambubioside. Among the therapeutic properties that are associated with anthocyanins are: lipid lowering, antioxidant, diuretic, antipyretic, antihypertensive, in addition to its possible use as a dye, both in the food and pharmaceutical industries. Although these flavonoids have great potential, unfortunately their main disadvantage is the instability. These compounds are susceptible to degradation by different conditions, such as pH, enzymes, oxygen, light, among others.

Considering the great utility that the calyces of jamaica report, the objective of the investigation was to analyze the microcapsules obtained by the spray drying method, to determine the influence of the process, on the physicochemical properties and the antioxidant capacity, of the dry extract of the calyces of the species *H. sabdariffa*.

The calyces of *H. sabdariffa* were collected on the grounds of the Academic Unit of Agricultural Sciences (UACA), it receiving the correct post-harvest treatment, prior to the drying process.

To determine the best extraction condition, an experimental design was carried out with two variables and two conditions for each variable: solvent (water and water/ethanol) and the ratio temperature/extraction time (25°C/60 min. and 60°C/30 min.), for which twelve experimental runs were made. In all cases the extraction method used was maceration with ultrasonic agitation.

To evaluate the influence of the factors: solvent and the ratio time/temperature on the twelve experiments performed, several physical-chemical parameters were determined, such as: yield, pH, Brix degrees (°Bx), quantification of total phenols by Folin-Ciocalteu and of total monomeric anthocyanins by the differential pH method. Furthermore, the free radical sequestration capacity was determined by the DPPH method.

From the statistical analysis effected, it could be concluded that the independent variables considered in the study did not show influence on the pH values, on the amount of soluble solids ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) extracted, or on the free radical sequestration capacity. Of the two solvents evaluated, the water showed the highest yield extraction, regardless of the time and temperature conditions. For the quantification of total phenols, the greatest extraction was obtained by using as a solvent the mixture water:EtOH (80:20), however, when mashing at  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 min., greater extraction of anthocyanin pigments was achieved.

Another of the variables analyzed was the qualitative chemical study using HPLC-MS (High performance liquid chromatography-mass spectrometry) of the twelve extracts. Chromatograms were analyzed at four different wavelengths (250, 280, 330 and 520 nm), as well as the absorption spectra of each one of the separated compounds. As an additional detection system and for structural identification purposes, the analysis was carried out by mass spectrometry, in a positive and negative mode, of all the experiments made. The final identification of the compounds was made on the basis of the UV-visible spectrum; of the molecular ion mass and of the fragment ions referred to in the literature, for extracts of the chalice of Jamaica and using a similar spectrometric analysis. The metabolites identified in negative mode were: hibiscus acid; phenolic acids (5-cafeoylquinic acid and its isomers 3 and 4; 5-O-coumaroylquinic acid and its isomer, 3-O-coumaroylquinic acid and caffeoylshikimic acid, in addition to an isomer thereof); the anthocyanins delphinidine-3-sambubioside and cyaniding-3-sambubioside and various flavonol glycosides such as: myricetin 3-arabinogalactoside, quercetin-3-sambubioside, quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-glucosyl-O-rutinoside, a derivative of quercetin glycoside and kaempferol-3-(p-coumaroyl glycoside). In the positive mode, five compounds were identified: a simple phenol (5-caffeoquinic acid), the two anthocyanins before referred to above and two flavonol glycosides (myricetin-3-sambubioside and quercetin-3-sambubioside).

The extracts would be subjected to spray drying were decided to prepare using as solvent the mixture water:EtOH (8: 2), temperature of  $60^{\circ}\text{C}$  and 30 min. Basically, the extractive capacity of phenolic compounds and the saving in time when using the temperature of  $60^{\circ}\text{C}$  were considered for the decision.

Once the best extraction condition was obtained, the spray drying study was carried out, where four different conditions were tested. Two variables and two levels were established for the process: inlet temperature: 150 °C and 190 °C and mixture of encapsulants: gum arabic (G) and maltodextrin (MD), in G40%:MD60% and G60%:MD40%. To analyze the influence of the spray drying process on the physical-chemical properties (°Bx, residual humidity, total phenols, total monomeric anthocyanins) and on the antioxidant capacity of the resulting microcapsules (DPPH method), they were done, in parallel, two experiments where the drying of the extract was carried out with the help of the rotary evaporator (bath temperature 40 °C). These experiments differed only in the mixture of encapsulants used.

When evaluating the drying process, it was observed that the total phenolic content and the antioxidant activity, when drying with the rotary evaporator, was the best condition. The minor effects, when using spray drying, were obtained with the temperature of 150 °C in the three fundamental variables analyzed (total phenols, anthocyanins and antioxidant activity), however, the encapsulating mixture G60/MD40, favour the presence of total phenolic compounds and anthocyanins, however the antioxidant capacity proved to be better when the G40/MD60 combination was used. From the chromatographic study by HPLC-EM, it was determined that there were no qualitative changes.

The investigation made it provide some grounds for the development of an experimental design where variables such as the inlet temperature (below 150 °C) and the proportion of encapsulant in the final mixture (extract) could be analyzed. In addition to this, evaluate the antioxidant capacity by other techniques, to support its use in therapeutics and assess the influence of the process on color, which would contribute more directly to its use as a natural dye.

### **Keywords**

*Hibiscus sabdariffa* L., jamaica flower, anthocyanins, Spray Dryer.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	18
I.1 <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn	18
I.1.1 Generalidades	18
I.1.2 Descripción botánica	18
I.1.3 Métodos de extracción	19
I.1.4 Composición química	19
I.1.5 Métodos de análisis	20
I.1.6 Actividad biológica	20
I.2 Secado por atomización	23
I.2.1 Generalidades de la técnica	23
I.2.2 Etapas del proceso	23
I.2.3 Parámetros a optimizar	24
I.2.4 Materiales encapsulantes	25
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	26
II.1 Material vegetal	26
II.2 Tratamiento poscosecha y embalaje de la materia prima	26
II.2.1 Determinación de la humedad residual	26
II.3 Estudio del procedimiento de extracción	26

II.4 Parámetros para evaluar el procedimiento de extracción	28
II.4.1 Rendimiento	28
II.4.2 Determinación de pH	28
II.4.3 Determinación de grados Brix (°Bx)	28
II.4.4 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	29
II.4.5 Determinación de antocianinas por el método de pH diferencial	30
II.4.6 Análisis químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)	31
II.5 Secado por atomización	32
II.5.1 Parámetros físico-químicos evaluados	34
II.5.1.1 Determinación de grados Brix (°Bx)	34
II.5.1.2 Determinación de humedad residual del extracto encapsulado	34
II.5.1.3 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	34
II.5.1.4 Determinación de pH	34
II.5.1.5 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	34
II.5.1.6 Análisis químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)	35
II.6 Análisis estadístico	35

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
III.1 Material vegetal y tratamiento poscosecha	36
III.2 Procedimiento de extracción	36
III.2.1 Parámetros físico-químicos evaluados en los extractos	39
III.2.2 Análisis cromatográfico mediante CLAE-EM de los extractos de los cálices de <i>H. sabdariffa</i>	44
III.3 Microencapsulación por Spray Dryer	56
III.3.1 Estudio del proceso de secado por aspersión	59
III.3.2 Parámetros físico-químicos evaluados en los microencapsulados	60
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	75
ANEXOS	76
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	98



## Índice de figuras

Figura 1: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda (250, 280, 330 y 520 nm). Condición 1: Menstruo H <sub>2</sub> O:EtOH (80:20); T(°C)/t (min.) 25/60 (ensayo 4)	47
Figura 2 Perfiles cromatográficos obtenidos para el ensayo 4 (condición 1). A: cromatograma UV a 250 nm, cromatograma UV a 520 nm (B), el cromatograma del pico base en modo positivo (C) y el cromatograma del pico base en modo negativo (D)	48
Figura 3: Espectros de masa en ambos modos de ionización (A: modo positivo; B: modo negativo), iones fragmentos identificados (C: modo positivo; D: modo negativo) y espectro UV de la delphinidina-3-O-sambubiósido (E).	50
Figura 4: Espectro de masa en modo negativo (A) e iones fragmentos identificados de quercetina-3-sambubiósido (B)	51
Figura 5: Espectros de masa en ambos modos de ionización (A: modo positivo; B: modo negativo), iones fragmentos identificados (C: modo positivo; D: modo negativo) y espectro UV de cianidina-3-O-sambubiósido (E)	53
Figura 6: Espectros de masa modo de ionización negativo (A y B), iones fragmentos identificados (C) y cromatograma UV del ácido clorogénico y sus isómeros	55
Figura 7: Influencia de la temperatura sobre el contenido fenoles (A), antocianinas (B) y actividad antioxidante (C)	65
Figura 8: Gráfico de triple entrada de las variables independientes (A: fenoles totales, B: antocianinas, C: actividad antioxidante) frente a las combinaciones ensayadas de encapsulante y temperatura de entrada	66
Figura 9: Comportamiento de cada una de las variables independientes (A: fenoles totales, B: antocianinas, C: actividad antioxidante) frente a las combinaciones ensayadas de encapsulante y temperatura de entrada.	69

## Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>H. sabdariffa</i> <sup>19</sup> .	19
Tabla 2: Corridas experimentales desarrolladas para el estudio de extracción	27
Tabla 3: Experimentos realizados para evaluar el método de secado por atomización	33
Tabla 4: Resultados de los análisis realizados a los extractos obtenidos de <i>H. sabdariffa</i>	41
Tabla 5: Análisis físico-químicos realizados a los extractos obtenidos de <i>H. sabdariffa</i> , conteniendo la correspondiente mezcla encapsulante	61

## Índice de anexos

Anexo 1: Métodos y condiciones de extracción utilizados en los cálices de <i>H. sabdariffa</i>	76
Anexo 2: Principales compuestos químicos identificados en cálices de <i>H. sabdariffa</i>	78
Anexo 3: Métodos de análisis utilizados para la identificación de compuestos químicos en los cálices de <i>H. sabdariffa</i>	79
Anexo 4: Condiciones de secado por atomización de diferentes extractos vegetales	80
Anexo 5: Análisis estadístico t de student para los extractos	81
Anexo 6 Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 1: Menstruo H <sub>2</sub> O; T(°C)/t (min.) 25/60 (ensayos: 4, 5, 11)	83
Anexo 7: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 2: Menstruo H <sub>2</sub> O:EtOH (80:20); T(°C)/t (min.) 25/60 (ensayos: 1, 8, 10)	84
Anexo 8: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 3: Menstruo H <sub>2</sub> O; T(°C)/t (min.) 60/30 (ensayos: 2, 7, 9)	85
Anexo 9: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 4: Menstruo H <sub>2</sub> O:EtOH (80:20); T(°C)/t (min.) 60/30 (ensayos: 3, 6, 12)	86
Anexo 10 Superposición de los cromatogramas obtenidos, a diferentes valores de longitud de onda, para un ensayo correspondiente a cada condición de extracción: experimento 4 (condición 1), 1(condición 2), 2 (condición 3), 3 (condición 4)	87
Anexo 11: Análisis de los espectros de masas en modo positivo (Full MS)	88
Anexo 12: Análisis de los espectros de masas en modo negativo (Full MS)	89
Anexo 13: Compuestos identificados utilizando la CLAE con detector de arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo positivo	90
Anexo 14: Compuestos identificados en todos los experimentos (E1-E12) utilizando CLAE con detector de arreglo de diodos acoplada a	91

espectrometría de masas con ionización en modo negativo

Anexo 15: Procesamiento estadístico de Anova multifactorial del proceso de microencapsulación	93
Anexo 16: Cromatogramas UV del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-1, G40/MD60) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-2, temperatura de entrada 150 °C; M-3, temperatura de entrada 190 °C)	94
Anexo 17: Cromatogramas UV del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-4, G60/MD40) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-5, temperatura de entrada 150 °C; M-6, temperatura de entrada 190 °C)	95
Anexo 18: Cromatogramas UV de las cuatro condiciones de secado por atomización (M-2, M-3, M-5 y M-6)	95
Anexo 19: Cromatograma del pico base del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-1, G40/MD60) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-2, temperatura de entrada 150 °C; M-3, temperatura de entrada 190 °C)	97
Anexo 20: Cromatograma del pico base del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-4, G60/MD40) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-5, temperatura de entrada 150 °C; M-6, temperatura de entrada 190 °C)	97

## INTRODUCCIÓN

*Hibiscus sabdariffa* Linn, es una especie vegetal oriunda de Malasia e India <sup>1</sup>, esta planta fue domesticada en la región de Sudán, para de esta manera utilizar sus cálices y hojas. Actualmente la jamaica, es cultivada alrededor del mundo en diferentes zonas de climas subtropicales y tropicales <sup>2</sup>.

Los principales componentes químicos de los cálices de *H. sabdariffa* son: antocianinas, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos y flavonoides <sup>1</sup>.

Los cálices de *H. sabdariffa* destacan por su contenido en antocianinas encontrándose mayoritariamente: delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido <sup>3</sup>. Las antocianinas son compuestos químicos que se encuentran incluidos en la familia de los flavonoides <sup>4</sup>, son pigmentos que otorgan una coloración roja al producto que lo contenga, son solubles en agua y se encuentran en un sinnúmero de plantas en la naturaleza <sup>5</sup>.

En la actualidad ha crecido el interés por el estudio de estos compuestos químicos, debido a las propiedades farmacológicas y terapéuticas que se les adjudica <sup>6</sup>. Dentro de dichos efectos terapéuticos se menciona: la reducción de problemas cardiacos, efectos antitumorales, anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, entre otros. Estas propiedades son atribuidas al carácter antioxidante de tales productos naturales <sup>5</sup>.

Las antocianinas pueden ser extraídas de diversas maneras, siendo los métodos más utilizados: maceración, infusión, decocción, extracción asistida con ultrasonido, entre otras. Los disolventes para su extracción se escogen acorde a su polaridad siendo los más usados: agua, etanol, metanol, acetona. Debido a que son compuestos de estabilidad reducida y muy sensibles a factores externos como: pH, temperatura, luz, oxígeno, se requiere la selección de las condiciones de extracción adecuadas para evitar pérdidas <sup>4,7</sup>.

El método de secado por aspersion o también llamado secado por atomización, *Spray Dryer*, constituye una alternativa útil para proteger a compuestos inestables tales como las antocianinas, evitando la pérdida de sus características. Mediante la microencapsulación, la sustancia que se desea conservar es revestida y forma una cápsula que alcanza un diámetro comprendido entre 5 y 300 micrones <sup>7</sup>.

El secado por aspersión es un procedimiento en el cual, se ingresa un producto en estado líquido y se hace pasar por un atomizador. Dicho líquido, es transformado en finas gotículas, es secado por una corriente de aire a temperaturas elevadas, obteniéndose de manera inmediata el extracto seco en forma de polvo <sup>8</sup>.

Esta técnica involucra distintas etapas, la primera es la atomización, la cual busca que se transfiera la máxima cantidad de calor entre la corriente de aire y el líquido que se desea secar, la segunda etapa es la evaporación del agua de la sustancia y finalmente se separa el polvo del aire húmedo, con la utilización de un ciclón que se encuentra en el equipo de secado <sup>7</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Necesidad de analizar las microcápsulas obtenidas mediante el método de secado por aspersión, para determinar la influencia de dicho proceso sobre la composición química del extracto seco de los cálices de la especie *H. sabdariffa*.

## **HIPÓTESIS**

El método de secado por aspersión influye en la composición química y actividad antioxidante de las microcápsulas obtenidas a partir de un extracto de los cálices de la especie *H. sabdariffa*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar las microcápsulas obtenidas mediante el método de secado por aspersión, para determinar la influencia de dicho proceso, sobre las propiedades físico-químicas y la capacidad antioxidante, del extracto seco de los cálices de la especie *H. sabdariffa*

### **Objetivos específicos**

- Determinar las mejores condiciones de extracción para los cálices de *H. sabdariffa*.
- Evaluar la influencia del secado por aspersión en la composición química y actividad antioxidante, del extracto seco de los cálices de la especie *H. sabdariffa*.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### I.1 *Hibiscus sabdariffa* Linn.

#### I.1.1 Generalidades

*H. sabdariffa*, nombre científico de la especie conocida como “roseta” o “flor de jamaica”<sup>1,2</sup>, se presume que fue domesticada por poblaciones negras en el este de Sudán, aproximadamente hace 4000 AC<sup>9</sup>. Es una planta tropical de crecimiento anual o bianual<sup>1,2</sup>, tiene gran popularidad en países de Oriente medio en especial en Egipto donde se encuentra muy cultivada<sup>10</sup>. Esta planta crece en lugares tropicales como el Caribe, Centro América, India, Brasil, Australia, Hawái, Florida, ubicándose Sudán como mayor exportador de esta especie<sup>11,12</sup>.

La propagación de esta planta es mediante semillas y su mayor aprovechamiento se da en los cálices, los cuales son recolectados luego de 15 a 20 días de la floración<sup>11</sup>.

A partir de los cálices de *H. sabdariffa*, pueden elaborarse productos como: jaleas, vinos, refrescos artesanales o industriales, infusiones, productos de pastelería<sup>13,14</sup>, yogurt y como colorante natural de mermeladas y caramelos<sup>15</sup>.

#### I.1.2 Descripción botánica

*H. sabdariffa* es una planta de carácter arbustivo y es considerada semileñosa. Su altura fluctúa entre 1 y 3 metros de altura, con raíz de tipo pivotante<sup>16</sup>.

Posee tallos muy ramificados, abundantes, de una corteza rojiza; sus hojas, ubicadas de manera alterna, miden de 7,5 a 12,5 cm de longitud, tienen una coloración verde con nervios rojizos y presentan bordes aserrados de forma irregular<sup>1,17</sup>.

Las flores de color amarillo, hermafroditas, solitarias y axilares, poseen cinco pétalos. Luego de un corto periodo, la corola se pierde y solo quedan los cálices, los cuales poseen 5 sépalos alargados, carnosos y de una coloración rojo oscuro, asemejando la forma de una copa, siendo más ancho que largo<sup>16,18</sup>. El fruto es de forma ovalada, posee vellos en abundancia, en su interior se encuentran generalmente, 20 semillas de color negro reniformes<sup>16,18</sup>.



En la tabla 1, se encuentra la clasificación taxonómica de *H. sabdariffa*.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *H. sabdariffa* <sup>19</sup>.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
Sub-reino	Tracheobionta
División	Anthophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

### **I.1.3 Métodos de extracción**

Los métodos y los disolventes empleados para la extracción en los cálices de *H. sabdariffa*, están direccionados a la extracción de antocianinas, compuestos que aportan el color característico e incluso dan las propiedades bioactivas. En el anexo 1 [Anexo 1](#) se resumen los principales métodos y condiciones de extracción empleadas en los cálices de *H. sabdariffa*, según referencias bibliográficas.

Como se puede apreciar se emplean, básicamente, dos métodos de extracción sólido-líquido: maceración a diferentes condiciones de temperatura y decocción. La maceración, en especial la asistida por ultrasonido, refiere muy buenos rendimientos <sup>20</sup>. Como menstruos se informan, fundamentalmente, agua, alcoholes de bajo peso molecular (etanol y metanol), mezclas hidroalcohólicas y disolventes acidificados <sup>21-25</sup>.

La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol con bajos porcentajes de ácidos, con el propósito de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable bajo dichas condiciones <sup>5</sup>.

### **I.1.4 Composición química**

Los principales componentes químicos de importancia farmacológica de los cálices de *H. sabdariffa* son: antocianinas, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos <sup>14</sup>. En el anexo 2 se muestran algunos de los compuestos naturales identificados y sus correspondientes estructuras químicas.

Los ácidos orgánicos reportados en extractos acuosos de los cálices son: ácido cítrico, ácido málico <sup>26</sup>, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, (2S, 3R)-ácido hidroxicítrico, ácido hibiscus <sup>14,27</sup>, siendo estos dos últimos los que se encuentran en mayor proporción tanto en las hojas como en los cálices de *H. sabdariffa* <sup>28</sup>.

En los extractos acuosos de cálices de *H. sabdariffa* se han identificado como ácidos fenólicos principales: el ácido clorogénico y sus respectivos isómeros I y II <sup>29</sup>, ácido protocatequico <sup>3</sup>, ácido caféico, galocatequina <sup>30</sup>.

Se han identificado antocianinas como: delfinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido, cianidina-3-5-diglucósido, entre otros <sup>3</sup>. La delfinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido y cianidina-3-5-diglucósido, son los componentes que se encuentran en mayor cantidad en esta planta <sup>28,31-33</sup>.

Dentro de los principales flavonoides encontrados en esta especie, se encuentran: hibiscitrina, sabdaritrina, gosipitrin, quercetina, luteolina <sup>34,3</sup>, miricetin 3-arabinogalactósido, quercetin-3-sambubiósido, quercetin-3-rutinósido, kaempferol-3-O-rutinósido <sup>35</sup>.

### **I.1.5 Métodos de análisis**

La literatura refiere múltiples métodos de análisis químico, cualitativos y cuantitativos, empleados en el estudio de extractos de *H. sabdariffa*. En el anexo 3 se relaciona los diversos métodos cromatográficos y espectroscópicos que han sido empleados para la identificación, fundamentalmente, de ácidos fenólicos, antocianinas y ácidos orgánicos.

### **I.1.6 Actividad biológica**

#### **Usos tradicionales**

En la medicina tradicional, las infusiones de cálices de *H. sabdariffa* son utilizadas como diuréticos, antifebriles y antihipertensivos <sup>1</sup>. En Egipto, algunas preparaciones de los cálices también son usadas para el tratamiento de problemas cardiacos, hepáticos y nerviosos <sup>36</sup>. En el Norte de África se consumen los cálices en preparaciones para dolencias de la garganta, tos, problemas genitales; además, la pulpa de las hojas es usada de manera externa para tratar abscesos e infestación por gusanos <sup>37</sup>. La decocción de las semillas es usada para reducir el dolor por problemas urinarios e indigestión <sup>1</sup>.

### **Estudios biológicos de extractos de cálices de *H. sabdariffa***

La peroxidación de los lípidos es un fuerte mecanismo de daño en las células del organismo, el ácido protocatéquico presente en los extractos acuosos de los cálices de *H. sabdariffa* es capaz de inhibir este mecanismo, otorgándole propiedades antioxidantes. Otro punto importante es la capacidad de inhibir la acción cancerígena de: dietilnitrosoamina a nivel hepático, 1-oxido-4-nitroquinoleína en la boca, N-metil-N-nitrosourea a nivel del estómago, N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina a nivel de la vesícula biliar <sup>38</sup>.

Los extractos etanólicos de cálices secos de *H. sabdariffa*, reducen los niveles de malondialdehído, el mismo que es un compuesto que induce la peroxidación de los lípidos con la respectiva disminución en sangre y la elevación de enzimas como la superóxido dismutasa y catalasa, indican claramente su acción antioxidante incluyendo un efecto citoprotector <sup>39</sup>.

El efecto antiproliferativo de células que provocan cáncer de mama y cuello uterino es atribuido a la actividad antioxidante de los extractos de cálices dado su elevado contenido de antocianinas <sup>40</sup>.

Un estudio en ratas con hiperamonemia inducida por la administración de cloruro de amonio a las que se les suministró de forma oral extracto de jamaica en dosis de 250 mg/kg peso, equilibró los niveles de forma significativa de urea, ácido úrico, creatinina amoniaco y nitrógeno <sup>41</sup>.

La acción antiproliferativa ante células cancerígenas en humanos que han sido cultivadas con leiomioma se encuentra relacionada a la presencia de ácido protocatéquico en los

extractos de cálices de *H. sabdariffa*. Al tratar estas células con una concentración de 5 mmol/L de ácido protocatéuico, se observó una reducción del 70% en el crecimiento de las mismas en un tiempo de 72 horas, lo cual indica el potencial de este compuesto para el tratamiento de la patología mencionada <sup>42</sup>.

El ácido protocatéuico contenido en *H. sabdariffa*, ha demostrado mediante estudios *in vitro* los efectos protectivos ante la citotoxicidad y genotoxicidad de los hepatocitos inducida con terbutil-hidroxiperoxidasa <sup>14</sup>.

Estudios avalan el efecto de disminución de colesterol total y LDL al administrar el extracto de *H. sabdariffa* a diferentes concentraciones, en ratas inducidas con fenobarbitona <sup>43</sup>.

Los extractos acuosos de jamaica son capaces de reducir o inhibir en al menos un 30% la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II, que es la causante de la hipertensión arterial <sup>17</sup>.

Se ensayaron diferentes concentraciones de extracto de cálices de jamaica, el más efectivo se reporta con 20 mg/kg de extracto etanólico liofilizado, ya que mostró un comportamiento muy similar a la hidroclorotiazida, evidenciando su efecto diurético <sup>44</sup>.

Se ha demostrado la actividad antipirética de los extractos de jamaica, con ensayos realizados en ratones albinos suizos y ratas Wistar cuya fiebre fue inducida por levaduras. El efecto antipirético se evidenció con el suministro de extractos acuosos de 800 mg/kg y extractos etanólicos de 400 y 800 mg/kg <sup>45</sup>.

En un estudio clínico que fue realizado con la participación de diez voluntarios, en el que se suministró mediante ingesta cálices secos de *H. sabdariffa*, mostró una disminución de la concentración de proteína-1-quimioatrayente de monocitos MCP-1, el cual es un biomarcador utilizado en la evaluación de enfermedades inflamatorias <sup>28</sup>.

El efecto protector del extracto acuoso de *H. sabdariffa* en ratas fue comprobado mediante la administración del mismo durante cuatro semanas, lo cual mejoró la función hepática de las ratas, luego de inducido el daño hepático mediante la dosificación oral de 700 mg/kg de paracetamol <sup>46</sup>.

## **I.2 Secado por atomización**

### **I.2.1 Generalidades de la técnica**

El secado por aspersión es un procedimiento mediante el cual una sustancia de carácter líquido, es atomizada en una corriente de aire o gas a elevadas temperaturas para eliminar el agua o disolvente que contenga y obtener como resultado un polvo de forma instantánea. La corriente utilizada para el secado, generalmente, es aire común, aunque en ciertas operaciones se puede utilizar nitrógeno como gas de secado <sup>47</sup>.

La sustancia inicial puede ser una emulsión, suspensión o una solución. En dependencia de la sustancia inicial utilizada y de las condiciones de funcionamiento, el secado por aspersión puede producir polvos de diferentes tamaños de partícula, estos van desde polvos muy finos de 10-50  $\mu\text{m}$  hasta partículas de mayor tamaño de 2-3 mm <sup>47</sup>.

La calidad del producto que se obtiene mediante el secado por aspersión depende de las características de la solución alimentada (viscosidad), del aire de secado (presión, flujo de aire, presión), contacto entre el aire caliente y las gotas de la sustancia en la cámara de secado y el tipo de atomizador utilizado <sup>48</sup>.

La técnica de secado por aspersión es usada ampliamente para el secado de alimentos termosensibles, fármacos y otros compuestos. Además, puede ser usada como método de microencapsulación para realizar el recubrimiento de una matriz. La microencapsulación es una forma de encapsular sustancias en forma de micro y nanopartículas. La técnica de secado por aspersión es la más usada para la encapsulación de antocianinas <sup>49</sup>.

### **I.2.2 Etapas del proceso**

Durante la operación de secado por aspersión se pueden diferenciar 4 fases o etapas y son las siguientes:

- **Atomización**

La atomización consiste en la conversión del líquido inicial en pequeñas gotas, lo cual es llevado a cabo mediante presión o por el uso de energía centrífuga. Las condiciones de

elección del atomizador se encuentran en dependencia de la naturaleza del líquido y de las características que se desean para el polvo final <sup>47</sup>.

- **Contacto de gota – aire caliente**

En esta etapa se inicia el proceso de secado y se da durante la atomización. La temperatura de entrada oscila entre 150 – 220 °C y la temperatura de salida depende de la sustancia a secar y de parámetros tales como temperatura de entrada y flujo de atomización <sup>47</sup>.

- **Evaporación del agua**

Se lleva a cabo una transferencia de calor entre el aire caliente y el líquido a secar, además de una transferencia de agua, gracias a la diferencia de presión de vapor en el interior del equipo. El secado de las gotas del líquido termina cuando la temperatura de estas alcanzan y se igualan con la temperatura del aire de secado <sup>47</sup>.

- **Separación del producto seco y aire húmedo**

La separación del aire húmedo y del producto seco, se lleva a cabo gracias a la ayuda de ciclones, estos están colocados en el exterior de la cámara de secado, las partículas de mayor tamaño y densidad, se van acumular en la base de la cámara, mientras que las partículas más pequeñas que se encuentran suspendidas, deben pasar a través de un ciclón para su separación, generalmente estos se encuentran equipados con filtros que ayudan al proceso <sup>47</sup>.

### **I.2.3 Parámetros a optimizar**

#### **Temperatura de alimentación**

Modifica la viscosidad de la sustancia a secar, de esta forma, puede cambiar la capacidad del líquido o emulsión de poder ser atomizada de forma homogénea. A mayor temperatura de alimentación la sustancia es menos viscosa y las partículas pueden disminuir su tamaño, pero existe un riesgo mayor de volatilización y degradación del material termosensible <sup>50</sup>.

#### **Temperatura de aire de entrada**

Es un parámetro directamente proporcional a la velocidad de secado del producto y al porcentaje de agua final. Una deformación de las microcápsulas del producto, evaporación

lenta, un contenido de agua final elevado, y la tendencia de las microcápsulas a aglomerarse, son provocados por una temperatura de aire de entrada baja. Mientras que una temperatura de aire de entrada alta, propiciará una evaporación muy elevada, lo que traerá como consecuencia la ruptura de la membrana de las microcápsulas y la posterior degradación del producto encapsulado, debido a una liberación prematura <sup>50</sup>. En el anexo 4 se refieren algunas condiciones de estudios de secado por para diferentes extractos que presentan en su composición química antocianinas u otros metabolitos secundarios.

### **Temperatura de aire de salida**

Se encuentra en dependencia de la temperatura de entrada, la temperatura en la zona final de proceso de secado se encuentra oscilando entre 50 y 80 °C en sustancias con compuestos fenólicos <sup>50</sup>.

### **I.2.4 Materiales encapsulantes**

Los materiales encapsulantes cumplen la función de formar una pared alrededor del núcleo activo. Los encapsulantes de uso común a nivel farmacéutico son: poliestirenos, poliamidas, polímeros fenólicos, polietilenglicol. En la industria alimenticia los más utilizados son: gomas, polisacáridos naturales, azúcares, entre otros <sup>50</sup>.

Existe un sinnúmero de materiales encapsulantes, los mismos que han sido empleados para la encapsulación de antocianinas contenidas en *H. sabdariffa*. Entre los más utilizados se encuentran: maltodextrina, goma arábiga, inulina, tapioca, proteína de soya, proteína de suero de leche, sirope de glucosa, entre otros. Las combinaciones de encapsulantes pueden reunir las propiedades necesarias para encapsular sustancias complejas <sup>49</sup>.

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.1 Material vegetal**

Se cosecharon los cálices de *H. sabdariffa* en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, realizándose dos colectas en horas de la mañana, la primera en febrero 2019 con la que se trabajaron los extractos y la segunda en junio 2019 con la que se trabajó el secado por atomización. La especie fue identificada y clasificada taxonómicamente en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

### **II.2 Tratamiento poscosecha y embalaje de la materia prima**

La droga vegetal fue sometida a un proceso de lavado y desinfección con 20 L de agua potable y 15 mL de hipoclorito de sodio al 5%, se eliminó el exceso de líquido y se procedió a extraer la semilla. Una vez separada de los cálices, estos fueron sometidos a secado en estufa (MEMMERT UF 55, Alemania) a una temperatura de  $45 \pm 2$  °C, con circulación de aire forzado (100 %) y trampilla abierta (100%), por un tiempo aproximado de 24 horas.

Una vez secos los cálices, se embalaron en fundas de nylon con cierre hermético para su posterior almacenamiento a temperatura ambiente, protegidos de la luz y baja humedad ambiental.

La molienda de los cálices secos de *H. sabdariffa*, previo al desarrollo del estudio, se llevó a cabo en un molino artesanal (MAGRICO, Ecuador), con una criba de 1 mm de grosor. El material resultante se almacenó en condiciones similares a las descritas anteriormente.

#### **II.2.1 Determinación de la humedad residual**

La humedad residual fue determinada en una balanza con fuente de calentamiento halógeno (Ohaus, modelo MB90, USA). Se pesó, aproximadamente, 1 g de cálices secos, y el equipo procedió a la determinación automática hasta que alcanzó una masa constante (variación de peso menor a 1 mg durante 60 segundos) a una temperatura de 105 °C. El análisis se realizó por triplicado, reportándose la media y la desviación estándar.

### **II.3 Estudio del procedimiento de extracción**



Se realizó un estudio del proceso de extracción a través de un diseño experimental en el cual se manipularon las variables y las condiciones para cada una de ellos. Los factores de estudio fueron los siguientes:

1. Menstruos: agua y agua/etanol (80:20)
2. Relación temperatura/tiempo de extracción: 25°C/60 min. y 60°C/30 min.

Se realizaron un total de 12 corridas experimentales, las cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Corridas experimentales desarrolladas para el estudio de extracción

<b>Número de experimento</b>	<b>Menstruo</b>	<b>T(°C)/t (min.)</b>
<b>1</b>	<b>A/E</b>	<b>25/60</b>
<b>2</b>	<b>A</b>	<b>60/30</b>
<b>3</b>	<b>A/E</b>	<b>60/30</b>
<b>4</b>	<b>A</b>	<b>25/60</b>
<b>5</b>	<b>A</b>	<b>25/60</b>
<b>6</b>	<b>A/E</b>	<b>60/30</b>
<b>7</b>	<b>A</b>	<b>60/30</b>
<b>8</b>	<b>A/E</b>	<b>25/60</b>
<b>9</b>	<b>A</b>	<b>60/30</b>
<b>10</b>	<b>A/E</b>	<b>25/60</b>
<b>11</b>	<b>A</b>	<b>25/60</b>
<b>12</b>	<b>A/E</b>	<b>60/30</b>

**Leyenda: A: agua, A/E: agua/etanol (80:20)**

El método de extracción empleado fue maceración con agitación ultrasónica. Se pesaron 2 g de cálices molinados, se agregaron 4 mL del menstruo y se mantuvo en reposo durante 15

minutos para humectar la muestra. Posterior a la humectación se añadieron 100 mL del menstruo y se colocó en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific) para llevar a cabo la sonicación durante el tiempo establecido en las corridas experimentales. Luego de obtenidos los extractos se filtraron y se colocaron en balones de 500 mL llevándose a sequedad total con un rotoevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001 efficient) acoplado a un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8) y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania).

Los extractos secos fueron almacenados en frascos de vidrio, protegidos de la luz, a temperatura ambiente y en una desecadora, para ser evaluados según diferentes parámetros físico-químicos.

#### **II.4 Parámetros para evaluar el procedimiento de extracción**

##### **II.4.1 Rendimiento**

El rendimiento se calculó por diferencia de pesada entre el balón vacío y el balón con el extracto seco, considerando, además, el peso inicial de la droga cruda sometida a extracción. Los resultados fueron referidos en porciento (%).

##### **II.4.2 Determinación de pH**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,003 g de extracto seco, se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 0,3 mg/mL).

**Ensayo:** El análisis se realizó por triplicado utilizando un pH-metro digital (Fisher Scientific accumet AE150).

##### **II.4.3 Determinación de grados Brix (°Bx)**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,0250 g de extracto seco y se llevó a un balón volumétrico de 25 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 0,1 mg/mL).

La prueba se realizó por triplicado en un refractrómetro (ANTON PAAR) colocando una gota de muestra en la recámara del mismo.

#### **II.4.4 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,07 g de extracto seco y se llevaron a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 7 mg/mL)

**Ensayo:** Se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) y la metodología descrita por Singleton *et al.*<sup>51</sup> con algunas modificaciones. Se colocaron 50 µL de agua destilada (blanco), de muestra o de ácido gálico (patrón) en tubos de ensayo de, aproximadamente, 10 mL. Se adicionaron 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) al 10% y 450 µL de agua destilada, se agitó con un vortex (Thermo Scientific, USA) y se dejó reposar durante 5 minutos. Posterior al tiempo de espera se adicionaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% se agitó nuevamente y se esperó durante 120 minutos. Las lecturas se realizaron a 765 nm utilizando microceldas de 2 mL y con la ayuda de un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA).

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante una curva de calibración con ácido gálico 10 mg/mL (Sigma Aldrich) en concentraciones de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/mL. Todas las diluciones y muestras fueron analizadas por triplicado.

Los fenoles totales fueron determinados a partir de la curva de calibración que se obtuvo para el ácido gálico mediante un análisis de regresión lineal dando la siguiente ecuación: Absorbancia = 0,0200528 + 0,92912\*concentración (coeficiente de correlación de 0,99668).

#### **II.4.4 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

**Preparación de la muestra:** Se pesó 0,003 g de extracto seco, se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 0,3 mg/mL).

**Ensayo:** La determinación de la actividad antioxidante se desarrolló mediante el método de Brand-Willians *et al.*<sup>52</sup>. La lectura se efectuó a 517 nm en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) usando

microceldas de 2 mL y empleando como blanco el metanol. El método se basó en medir la capacidad secuestradora del radical libre, luego de transcurridos 30 minutos de reacción.

Para el ensayo se preparó una disolución de DPPH a  $6 \times 10^{-5}$  mol/L con metanol. De cada solución madre de concentración de 0,3 mg/mL se tomaron 100  $\mu$ L y se le adicionaron 3,9 mL de disolución de DPPH ( $A_1$ ) por separado. Para la preparación de la disolución correctora del color se tomaron 100  $\mu$ L de cada solución madre y se mezclaron con 3,9 mL de metanol ( $A_2$ ). La solución control de DPPH fue preparada con 100  $\mu$ L de metanol y 3,9 mL de DPPH ( $A_0$ ). Todas las disoluciones se mantuvieron protegidas de la luz y a temperatura ambiente durante 30 minutos para, posteriormente, realizar la lectura en el espectrofotómetro.

El porcentaje de secuestro de DPPH a los 30 minutos se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Secuestro de DPPH} = [(1 - (A_1 - A_2)) / A_0]$$

Donde:

$A_0$ = Absorbancia de mezcla DPPH y metanol

$A_1$ = Absorbancia de DPPH y el extracto

$A_2$ = Absorbancia del extracto con metanol

#### **II.4.5 Determinación de antocianinas por el método de pH diferencial**

**Preparación de la muestra:** Fueron pesados 0,01 g de extracto seco y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 1 mg/mL).

**Ensayo:** El ensayo se realizó por triplicado a cada muestra, según protocolos de química analítica de alimentos <sup>53</sup>.

Se prepararon soluciones buffer de pH 1 con cloruro de potasio y pH 4,5 con acetato de sodio.

Se tomó 1 mL de cada muestra preparada a una concentración: 1 mg/mL y se le adicionaron 3 mL de cada buffer por separado. Se dejó en reposo durante 15 minutos y se procedió a la

lectura en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) usando como blanco agua destilada. Las lecturas se hicieron en microceldas de 2 mL, a longitudes de onda de 510 nm y 700 nm.

La absorbancia de las muestras fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

La concentración del pigmento de antocianina monomérica de cada muestra fue calculada en base al pigmento cianidina-3-glucósido, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/L)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Dónde:

A= Absorbancia calculada

MW= Peso molecular (cianidina-3-glucósido=449,2 g/mol)

FD= Factor de dilución: 4

$\epsilon$ = Capacidad de absorción molar de la cianidina-3-glucósido: 26900

#### **II.4.6 Análisis químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,002 g de cada extracto seco en viales plásticos, se agregó 1 mL de metanol y se sonicó hasta su completa disolución. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro y se trasvasaron a viales de vidrio.

**Ensayo:** Se utilizó un sistema UHPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000), equipado con una bomba cuaternaria, automuestrador, compartimiento de columna, un sistema DAD (Detector de diodos) DIONEX UltiMate 3000 RS; el mismo que esta acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ XL. El software computarizado que fue empleado para la realización de método y observación de los cromatogramas fue “Thermo Xcalibur”.

Se usó una columna Accucore RP-MS C18 de fase reversa con un tamaño de 100 x 2,1 mm; tp de 2,6  $\mu\text{m}$ . Se trabajó con un flujo de 0,400 mL/min, presión desde 50 a 5000 psi,

temperatura de 35 °C y 2 µL de volumen de inyección de las muestras. La fase móvil estuvo conformada por acetonitrilo (B) y ácido fórmico al 0,1% (D) utilizando el método de elución en gradiente, iniciando con 2% (B) y 98% (D).

En el espectrómetro de masas se usaron las siguientes condiciones: temperatura del capilar: 225,00 °C, voltaje capilar: -50,00 V y voltaje de Spray: 5,00 kV. El flujo utilizado en el procedimiento de atomización fue configurado por un gas principal: 34; gas auxiliar: 5 y un gas de barrido: 3 Unidades arbitrarias.

Se estudiaron las fracciones de las muestras en modo positivo y en modo negativo, por medio del modo Full Scan con rangos de 100 – 1000 DA, en modo dependiente MS/MS, en modo UV con cuatro longitudes de onda: 250 nm, 280 nm, 330 nm, 520 nm y se utilizó el modo SIM para escanear iones específicos de las fracciones contenidas en las muestras estudiadas.

## **II.5 Secado por atomización**

Para el estudio de secado por aspersión en el *Spray Dryer* (BÜCHI MINI SPRAY DRYER B-290, Suiza) se ensayaron cuatro condiciones diferentes, considerando para el proceso dos variables y dos niveles:

1. Temperatura de entrada: 150 °C y 190 °C
2. Mezcla de encapsulantes: goma arábica (G) y maltodextrina (MD), en relaciones G40%:MD60% y G60%:MD40%.

En todos los experimentos realizados se mantuvo invariable la concentración del encapsulante en la mezcla (3%) y las condiciones de extracción.

Para analizar la influencia del proceso de secado por atomización sobre las propiedades físico-químicas y la capacidad antioxidante de las microcápsulas resultantes, se realizaron, paralelamente, dos experimentos donde el secado del extracto se llevó a cabo con ayuda del rotoevaporador (temperatura del baño 40°C). Estos dos experimentos difirieron solamente en la mezcla de encapsulantes utilizada.

La nomenclatura asumida para cada experimento se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Experimentos realizados para evaluar el método de secado por atomización

Nomenclatura	Método de secado	Temperatura de entrada (°C)	Porcentaje de encapsulante	
			G (%)	MD (%)
M-1	Rotoevaporador (40°C)	-	40	60
M-2	Secado por aspersión	150	40	60
M-3	Secado por aspersión	190	40	60
M-4	Rotoevaporador (40°C)	-	60	40
M-5	Secado por aspersión	150	60	40
M-6	Secado por aspersión	190	60	40

Para el procedimiento de extracción se pesaron 30 g de cálices molinados y se llevaron a un erlenmeyer, se agregaron 60 mL de una mezcla agua:etanol (80:20) a 60 °C y se mantuvo en reposo durante 15 minutos para humectar la muestra. Posterior a la humectación se añadieron 1,5 L del menstuo a la misma temperatura y se colocó en un baño ultrasónico a 60 °C durante 30 min. Luego de obtenidos los extractos se filtraron con ayuda de un embudo Büchner conectado a un kitasato y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania).

Del extracto se tomaron 300 mL para cada condición de secado, las que fueron mezcladas con 3% de encapsulantes de manera independiente, según los porcentajes establecidos. Los extractos con sus correspondientes aditivos, fueron sometidos al proceso de secado, siguiendo las condiciones antes descritas en la Tabla 3.

Una vez obtenidos los extractos secos por ambos métodos, fueron almacenados en frascos de vidrio (M1 y M4) y en frascos de plástico con boca ancha (M2, M3, M5 y M6). Todos

fueron protegidos de la luz y mantenidos en un desecador a temperatura ambiente, hasta su correspondiente evaluación.

## **II.5.1 Parámetros físico-químicos evaluados**

### **II.5.1.1 Determinación de grados Brix (°Bx)**

La determinación de °Bx se realizó en los seis experimentos previos al proceso de secado. La prueba se realizó por triplicado en un refractómetro colocando una gota de muestra en la recámara del mismo.

### **II.5.1.2 Determinación de humedad residual del extracto encapsulado**

La humedad residual se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe II.2.1.

### **II.5.1.3 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,07 g del extracto seco y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 7 mg/mL).

**Ensayo:** Se realizó el mismo procedimiento descrito en el epígrafe II.4.4.

### **II.5.1.4 Determinación de pH**

**Preparación de la muestra:** La preparación fue la misma descrita en el epígrafe II.4.2.

**Ensayo:** El análisis fue realizado por triplicado en el pH-metro digital.

### **II.5.1.5 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)**

**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,1 g de extracto seco, se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 10 mg/mL).

**Ensayo:** Se realizó el procedimiento antes descrito en el epígrafe II.4.5, pero utilizando una disolución de DPPH (0,1 mM) y empleando agua:metanol (80:20).

### **II.5.1.6 Determinación de antocianinas por pH diferencial**



**Preparación de la muestra:** Se pesaron 0,04 g del extracto seco obtenido por ambos métodos y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se sometió a sonicación hasta lograr su total solubilización y se enrasó con agua destilada (concentración: 4 mg/mL).

**Ensayo:** Se siguió la metodología antes descrita.

#### **II.5.1.6 Análisis químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)**

**Preparación de la muestra:** El análisis se realizó a los seis experimentos. Fueron pesados 0,003 g de cada muestra en viales plásticos, se agregó 1 mL de metanol y se sonicó hasta su completa disolución. Posteriormente, se pasó la disolución por filtros de 0,2 µm de diámetro, conservándose el filtrado en viales de vidrio.

**Ensayo:** El procedimiento utilizado se corresponde con el descrito en el epígrafe II.4.7.

#### **II.6 Análisis estadístico**

El análisis de la media y desviación estándar se realizó mediante el programa Excel 2016 correspondiente al *Office\_Professional\_Plus\_2016*. El procesamiento estadístico de los datos del análisis de regresión lineal se llevó a cabo con el paquete estadístico *Statgraphics Plus* versión 5.0. Los análisis estadísticos realizados en los estudios de extracción y secado se hicieron con el programa estadístico *IBM SPSS Statistics* versión 22.

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **III.1 Material vegetal y tratamiento poscosecha**

Los cálices de *H. sabdariffa* fueron recolectados en 2 cosechas en los terrenos de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias (UACA). El tratamiento poscosecha inició con la selección, lavado y desinfección del material vegetal para descartar cualquier presencia de materia extraña (polvo, insectos) con el fin de evitar el deterioro de los compuestos presentes en la droga vegetal.

Los cálices lavados se colocaron sobre una superficie aséptica durante 5 minutos para escurrir el exceso de agua y proceder a extraer el ovario que contiene a las semillas. Posteriormente, se realizó el secado de la droga en una estufa con recirculación de aire, lo que facilita la deshidratación del material vegetal en un menor tiempo. La materia prima objeto de estudio se caracteriza por tener un alto porcentaje de agua, por lo que mientras más rápida sea la deshidratación, menor será la posibilidad de que ocurran reacciones que propicien la degradación de los metabolitos secundarios.

Una vez obtenida la materia seca se realizó la determinación de la humedad residual, la que se encuentran dentro de los valores estimados en la norma NTE INEN 2392:2013<sup>54</sup>, para material vegetal (<12%). La materia prima será sometida, posteriormente, a diferentes estudios, por lo que debe garantizarse este parámetro, además de su correcto empaque y almacenamiento, para garantizar una debida conservación. Valores elevados de humedad en la materia vegetal, podrían propiciar el crecimiento de microorganismos tales como bacterias y hongos, así como la degradación de sus metabolitos por procesos enzimáticos<sup>55</sup>.

### **III.2 Procedimiento de extracción**

Para el estudio del procedimiento de extracción a emplear se utilizó el método de maceración. La maceración es un método de extracción sólido-líquido en donde se emplea un menstruo o disolvente, el cual, al ponerse en contacto con la matriz vegetal, propicia el fenómeno de difusión de los metabolitos del interior de las células al medio exterior. De acuerdo a la ley de la difusión molecular, para aumentar la velocidad de transporte de los

metabolitos a través del menstruo, se puede utilizar la agitación, ya que esta logra una mayor efectividad en el proceso, tomando el nombre de maceración dinámica <sup>55,56</sup>.

En el presente estudio se utilizó una versión de dicho proceso llamado extracción asistida por ultrasonido; esta facilita el ingreso del menstruo a las células del material vegetal, mediante la implosión de burbujas cavitacionales en la superficie de las células, generando la ruptura de la pared celular y facilitando la liberación de los metabolitos <sup>57</sup>. Adicionalmente, este procedimiento favorece la rehidratación del tejido cuando se parte de materiales secos, al abrir los poros, lo cual a su vez acelera el transporte de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos <sup>58</sup>.

Dentro de las ventajas que ofrece este método, se encuentran: la reducción en los tiempos de extracción, disminución en el consumo de energía y costos, alta reproducibilidad de los experimentos y reducción en el consumo de disolventes <sup>57</sup>. Como desventajas se plantea la disminución del poder de energía con el tiempo y la poca uniformidad en la distribución de la energía ultrasónica, ya que solo una fracción del líquido total experimenta la fuerza de cavitación <sup>59</sup>.

Un estudio realizado por Pinela *et al.* <sup>21</sup>, demostró que la maceración ultrasónica resultó ser más efectiva en la extracción de los cálices de *H. sabdariffa*, en comparación con la extracción asistida con calor. Los autores concluyeron que se observó un mayor rendimiento en la extracción de antocianinas mediante la maceración ultrasónica a condiciones óptimas de tiempo, temperatura y menstruo (26,1 min., 25°C y EtOH:agua 39,1: 60,9) <sup>21</sup>.

Basado en la búsqueda bibliográfica realizada, se decidió evaluar dos condiciones en cuanto a disolvente de extracción (agua y la mezcla agua:etanol). En tal sentido, existen diversos trabajos que refieren el uso de agua, etanol, metanol y mezclas hidroalcohólicas en diferentes proporciones <sup>21-25</sup>. Para definir el porcentaje del etanol en la mezcla se tuvo en cuenta, fundamentalmente, las recomendaciones de los especialistas de Büchi, quienes sugieren que, para procesar muestras de forma segura con aire comprimido, sin el empleo del Inert Loop, el menstruo a evaporar no debe contener más de un 20% de disolventes orgánicos.

Lógicamente, también se consideró que las antocianinas son los componentes mayoritarios en los cálices de *H. sabdariffa*, estas son moléculas de carácter polar, siendo los disolventes más comúnmente utilizados para su extracción, agua, mezclas hidroalcohólicas, etanol, metanol o acetona <sup>60</sup>. De estos menstruos el más eficiente es el metanol, el que es un 20% más eficaz que el etanol y un 73% más efectivo que el agua <sup>61</sup>, sin embargo, dada la posible utilización del producto final en la industria farmacéutica o alimentaria, se descartó el metanol por su toxicidad y se trabajó con etanol. La extracción con disolventes acidificados, especialmente con ácidos fuertes, puede causar la degradación de las antocianinas aciladas por hidrólisis, pudiendo destruir los enlaces glicosidados de la misma <sup>62</sup>.

En relación a la temperatura empleada, también se han publicado múltiples investigaciones donde se realizan las extracciones a temperatura ambiente o utilizando calor (decocción) <sup>24</sup>. En tal sentido se manejó como otra variable en el proceso, el uso de temperatura ambiente y de calor (60 °C). En este último caso, se decidió ese nivel tomando en consideración que el baño ultrasónico permite el trabajo hasta una temperatura de 69 °C y que uno de los menstruos es el etanol, cuyo azeótropo con el agua tiene una temperatura de ebullición de 78,2 °C <sup>63</sup>. Resulta interesante agregar que un incremento en la temperatura podría provocar la pérdida del azúcar del C-3 que forma parte del glicósido, con la subsecuente apertura de anillo para dar lugar a las chalconas incoloras <sup>64</sup>.

En el supuesto caso de considerar el factor temperatura, independiente del tiempo de extracción, el número de experimentos a realizar resultaba muy elevado, por lo que se decidió evaluar en el proceso solo la combinación temperatura/tiempo, utilizando dos condiciones diferentes: 25 °C por 60 min. y 60 °C durante 30 min. Como consecuencia de todo el análisis realizado, el estudio de extracción se llevó a cabo con la realización de doce experimentos, tal como se describe en la tabla 2, donde se consideraron las correspondientes réplicas que le dan mayor fiabilidad al estudio.

Los doce extractos obtenidos fueron llevados a sequedad mediante un rotoevaporador acoplado a un criostato y a una bomba de vacío, logrando la evaporación del disolvente a temperaturas bajas, lo que permite preservar la composición química del mismo sin

alteración<sup>56</sup>. El conservar los extractos en estado seco, también facilita su almacenamiento del mismo por periodos de tiempo prolongados, previniendo la degradación de los metabolitos activos<sup>65</sup>. Estudios plantean que incrementos en la actividad de agua del medio puede provocar degradación de las antocianinas, posiblemente debido a una mayor interacción entre el catión flavilio y el agua para formar la pseudobase inestable<sup>6</sup>.

Los extractos secos, además de ser almacenados en recipientes de vidrio a temperatura ambiente en un desecador, fueron debidamente protegidos de la luz, debido a que las antocianinas mayoritariamente presentes en *H. sabdariffa* son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación por factores tales como: temperatura de almacenamiento, luz, oxígeno y pH<sup>62</sup>.

### **III.2.1 Parámetros físico-químicos evaluados en los extractos**

Para evaluar la influencia de los factores manipulados en la investigación (menstruo y relación tiempo/temperatura) se determinaron varios parámetros físico-químicos a los doce experimentos (cuatro condiciones y tres réplicas por cada condición evaluada), los que se muestran en la tabla 4.

Como se puede apreciar en la tabla 4, los valores de rendimiento oscilaron entre 43,50% y 50,09%. Al realizar la comparación estadística a través de la t de student, se pudo demostrar, con un nivel de confiabilidad del 95%, que ni el factor menstruo de extracción, ni la relación temperatura/tiempo de extracción tienen una influencia, estadísticamente significativa, en el rendimiento de extracción, debido a que el p-valor es mayor a 0,05. El resultado del análisis estadístico se presenta en el anexo 5.

Resultados obtenidos por Anokwuru *et al.*<sup>66</sup>, refieren que al agua es el disolvente que menor rendimiento logra, siendo superado por acetona, etanol y metanol, este último es el mejor menstruo de extracción mediante maceración de los cálices de flor de jamaica. Pinela *et al.*<sup>21</sup>, indica que el mejor rendimiento (73.30±4.51%) de extracción en cálices de flor de jamaica fue obtenido mediante maceración ultrasónica con una mezcla de etanol:agua (71,4:28,6). Estos resultados pudieran estar influenciados, no solo por el disolvente y el método de extracción, sino también por factores intrínsecos y extrínsecos asociados, a la especie en su área de recolección.

De acuerdo a la determinación de pH se observó que estos valores no mostraron grandes variaciones. Sin embargo, según criterios estadísticos se determinó que, con un nivel de confianza del 95%, el p-valor es superior al nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ) cuando se analizó la influencia del menstuo, pero si es estadísticamente diferente, al efectuar la comparación de medias respecto a la influencia de la relación temperatura/tiempo. En este último caso cuando se aplica una temperatura de 60 °C por 30 min., el pH experimenta un ligero ascenso a valores de 3,05.

Los valores de pH obtenidos oscilan en el rango entre 2,88 a 3,07 (tabla 4), encontrándose estos entre los sugeridos en la literatura. Se plantea que valores de pH entre 2 y 4 suelen ser óptimos para conservar las antocianinas, las mismas que otorgan la coloración purpura y roja a la droga vegetal <sup>62</sup>.

El pH puede influir en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. Cuando los valores de pH en soluciones acuosas resultan ser inferiores a 2, se favorece la forma estructural más estable (catión flavilio), apreciándose el color rojo intenso. Sin embargo a valores de pH superiores a 7, se presentan las formas quinoidales que dan lugar a una coloración púrpura y que se degradan rápidamente por oxidación <sup>67</sup>.

En otro sentido es lógico que los extractos presenten pH que los caracteriza como ácidos, pues los compuestos químicos mayoritarios de estos, son de naturaleza fenólica, lo que propician dicha acidez.

Tabla 4: Resultados de los análisis realizados a los extractos obtenidos de *H. sabdariffa*.

Nº experimento	Menstruo	T(°C)/t (min.)	Rendimiento	pH	Fenoles totales mgEAG/g ESJ±DS	DPPH (%±DS)	Antocianinas mg ECG/g ESJ±DS	°Bx
1	A/E	25/60	43,88	2,97	113,60±2,02	22,63±1,06	66,58±4,88	0,66
2	A	60/30	44,27	3,07	112,43±1,34	21,88±0,59	63,95±2,44	0,67
3	A/E	60/30	44,08	3,05	112,95±3,62	22,96±2,32	69,02±2,95	0,69
4	A	25/60	48,27	2,99	103,83±2,39	33,00±8,58	59,66±2,60	0,67
5	A	25/60	46,91	3,04	104,69±2,11	24,69±1,04	63,00±1,70	0,67
6	A/E	60/30	45,24	3,03	114,14±3,44	21,55±1,10	69,59±3,27	0,67
7	A	60/30	46,40	2,98	113,91±1,34	19,91±1,27	70,80±2,31	0,66
8	A/E	25/60	49,97	2,99	113,19±1,73	18,87±0,49	59,90±1,70	0,67
9	A	60/30	50,09	3,05	110,48±0,79	24,27±2,51	77,16±1,41	0,67
10	A/E	25/60	45,03	2,94	115,71±1,72	21,13±0,51	64,29±3,36	0,67
11	A	25/60	43,50	3,02	102,42±0,38	29,01±4,50	60,09±1,97	0,67
12	A/E	60/30	43,92	3,05	112,28±1,36	21,36±0,94	62,34±1,34	0,67

**Leyenda:** A: agua, A/E: agua/etanol (80:20); ESJ: Extracto seco de jamaica; EAG: Equivalente de ácido gálico; ECG: Equivalente a cianidina-3-glucósido

Al analizar los °Bx, aunque el valor más alto lo presentó el experimento 3, el análisis estadístico realizado demostró que en ningún caso el p-valor es menor que 0,05, por lo que ninguno de los factores (menstruo y temperatura/tiempo) influyen sobre dicha medición. Los °Bx se relacionan con la cantidad de sólidos solubles que se encuentran en los extractos, indicando una relación especial con la presencia de azúcares, ácidos orgánicos en frutos <sup>68</sup>.

Otro de los parámetros determinados en los doce experimentos fue la cuantificación de fenoles totales equivalentes a ácido gálico (EAG). Para la detección de los compuestos fenólicos totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, el cual emplea la transferencia de electrones desde el compuesto fenólico hacia el reactivo de Folin-Ciocalteu, reacción que tiene lugar en un medio alcalino <sup>69</sup>.

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en el crecimiento, reproducción y protección contra patógenos en las plantas <sup>70</sup>. Para los seres humanos muestran un gran rango de efectos beneficiosos tales como: antiaterogénico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antitrombótico, cardioprotectivo, presenta efectos vasodilatadores e incluso puede ser usado para la prevención y tratamiento contra el cáncer. La mayoría de sus efectos biológicos guardan una estrecha relación con su capacidad antioxidante <sup>70,71</sup>.

Estructuralmente, los compuestos polifenólicos están estructurados por un anillo aromático al que se encuentra unidos uno o más sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos pueden encontrarse desde simples moléculas como ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos <sup>70,71</sup>.

El contenido de fenoles totales, luego de someter los cálices a las diferentes condiciones de extracción se muestra en la tabla 4.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos va desde 102,42 a 115,71 mgEAG/g ESJ. Los extractos obtenidos de los experimentos 4, 5, 11 (A / 25 °C / 60 min.) presentaron las menores cantidades de fenoles totales; mientras que dichos experimentos bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo, pero realizándose la extracción con la mezcla hidroalcohólica (A/E / 25 °C / 1 h), lograron mayor extracción de dichos metabolitos.



Luego de realizar el análisis estadístico se pudo observar que sí existe una influencia estadísticamente significativa (confiabilidad del 95%) entre la variable disolvente de extracción y la cantidad de fenoles que se pueden extraer en cada procedimiento (p-valor resultó inferior a 0,05 (anexo 5). La variable temperatura/tiempo no presentó influencia alguna, sin embargo, al realizar la extracción con el disolvente hidroalcohólico (A/E), se pudo lograr una mayor extracción de compuestos fenólicos.

Salazar-González *et al.* <sup>72</sup>, mencionan que con la combinación etanol/agua como mensturo de extracción se obtienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos. Anokwuru *et al.* <sup>66</sup>, indican que los alcoholes son mejores disolventes para la extracción de compuestos fenólicos en cálices de *H. sabdariffa* comparados con el agua y acetona. Según Sotomayor y Vargas <sup>7</sup>, al realizar extracciones con etanol/agua en donde la proporción de etanol va incrementándose, la cantidad de antocianinas y la cantidad de compuestos fenólicos tiende a comportarse de forma ascendente, encontrando como valor óptimo de 41,59 % de EtOH en la mezcla hidroalcohólica. Respecto a lo reportado por Miranda-Medina *et al.* <sup>73</sup>, la mejor combinación de mensturo de extracción de compuestos fenólicos como antocianinas es 96% etanol y 4% agua.

A continuación, se realizó la determinación de la capacidad antioxidante, a través del método del DPPH. En la actualidad existen múltiples técnicas que permiten la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de plantas medicinales, siendo una de las más conocidas y empleadas, aquella que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo <sup>74</sup>.

Diversos estudios hacen alusión a la actividad antioxidante que presenta *H. sabdariffa* evaluada por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) <sup>24,39,66,75-77</sup>.

El DPPH al ser un radical libre es capaz de reaccionar ante compuestos antioxidantes, mediante un proceso que involucra la cesión de un átomo de hidrógeno por parte de la sustancia antioxidante <sup>74</sup>, lo que produce de forma progresiva la decoloración del DPPH desde un color púrpura hasta una coloración amarillenta.

Para la determinación de la actividad antioxidante, se cuantifico la capacidad secuestradora de radicales libres con el uso espectrofotometría UV, cuyos resultados fueron expresados en el porcentaje de secuestro a los 30 minutos los mismos que se muestran en la tabla 4.

Al realizar la comparación de medias para los valores de porcentaje de secuestro del radical DPPH, asociado a los factores (variables independientes) temperatura/tiempo y disolvente, se pudo llegar a la conclusión que, con un 95,0% de nivel de confianza, ningún p-valor es inferior a 0,05, por lo que ninguna de las condiciones manipuladas tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la capacidad secuestradora de radicales libres.

La última variable independiente analizada fue la cuantificación de antocianinas, a través del método de pH diferencial. Los valores de antocianinas monoméricas obtenidos para los 12 experimentos realizados, oscilaron entre 59,66 y 77,16 mg ECG/g ESJ.

La comparación de medias a través de la t de student para ambos factores, con un nivel de confiabilidad de 95,0% se muestra en el anexo 5 se puede apreciar para el factor tiempo/temperatura el p-valor obtenido es inferior a 0,05; por lo que en este caso si existen diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, se pudo concluir que, se logra extraer mayor cantidad de antocianinas de los cálices de jamaica, cuando el proceso se desarrolla a 60 °C por un tiempo de 30 minutos.

Con relación a la variable disolvente y su influencia en el contenido de antocianinas, aunque esta no mostró diferencias estadísticas entre los experimentos, existen estudios que refieren que las mezclas etanol:agua reflejan una mayor capacidad extractiva de cianidina-3-glucósido por cada 100 g de cálices *H. sabdariffa*, presumiblemente atribuible a la afinidad entre la antocianina y el disolvente hidroalcohólicos (etanol:agua) <sup>23</sup>.

### **III.2.2 Análisis cromatográfico mediante CLAE-EM de los extractos de los cálices de *H. sabdariffa***

Los doce experimentos realizados fueron también analizados mediante CLAE acoplada a espectrometría de masas. Dichos extractos corresponden a cuatro condiciones diferentes y cada una de ellas se realizó por triplicado.

Para evaluar si el proceso de extracción, con las variantes ensayas, ejercía alguna influencia en la composición química cualitativa, se realizó un análisis en diferentes etapas:

1. Demostrar si entre las tres réplicas para una misma condición (menstruo y relación temperatura/tiempo) y a una misma longitud de onda (250, 280, 330 y 520 nm), existían diferencias cualitativamente, a través de los cromatogramas obtenidos para cada  $\lambda$ .
2. Analizar, comparativamente, un experimento de cada una de las condiciones ensayadas, a través de los cromatogramas obtenidos para cada  $\lambda$ .
3. Analizar comparativamente los doce experimentos por espectrometría de masas y mediante los cromatogramas correspondientes al pico base, tanto en el modo positivo como en el modo negativo.
4. Luego de evidenciar la similitud entre todos los ensayos realizados, usando ambas técnicas de análisis, se realizó el estudio de caracterización química tomando como modelo una de las muestras. La identificación de los compuestos se realizó analizando la masa del ion molecular, los iones fragmentos y su espectro UV-visible.

Se procedió, en primera instancia, a demostrar cualitativamente si entre las réplicas para una misma condición y a una misma longitud de onda, existían diferencias cualitativamente apreciables. Debe acotarse que se emplea un detector de arreglo de diodos, por lo que en los cromatogramas solo se mostrarían señales propias de compuestos con grupos cromóforos conjugados, tales como los ácidos fenólicos y flavonoides que se refieren para la droga vegetal objeto de estudio <sup>53</sup>.

En los anexos 6, 7, 8, 9 se presentan los cromatogramas obtenidos para las 4 longitudes de ondas evaluadas en cada ensayo. Como se puede apreciar los cromatogramas obtenidos en condiciones similares de extracción y para una misma  $\lambda$  de absorción, son superponibles, por lo que sugieren la presencia de los mismos metabolitos.

Posteriormente, se procedió a realizar la superposición de los experimentos 4, 1, 2 y 3, correspondientes a las condiciones de extracción 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Tal como lo

muestra el anexo 10, no se aprecian cambios químicos cualitativos para una misma longitud de onda, entre los cuatro escenarios de extracción empleados.

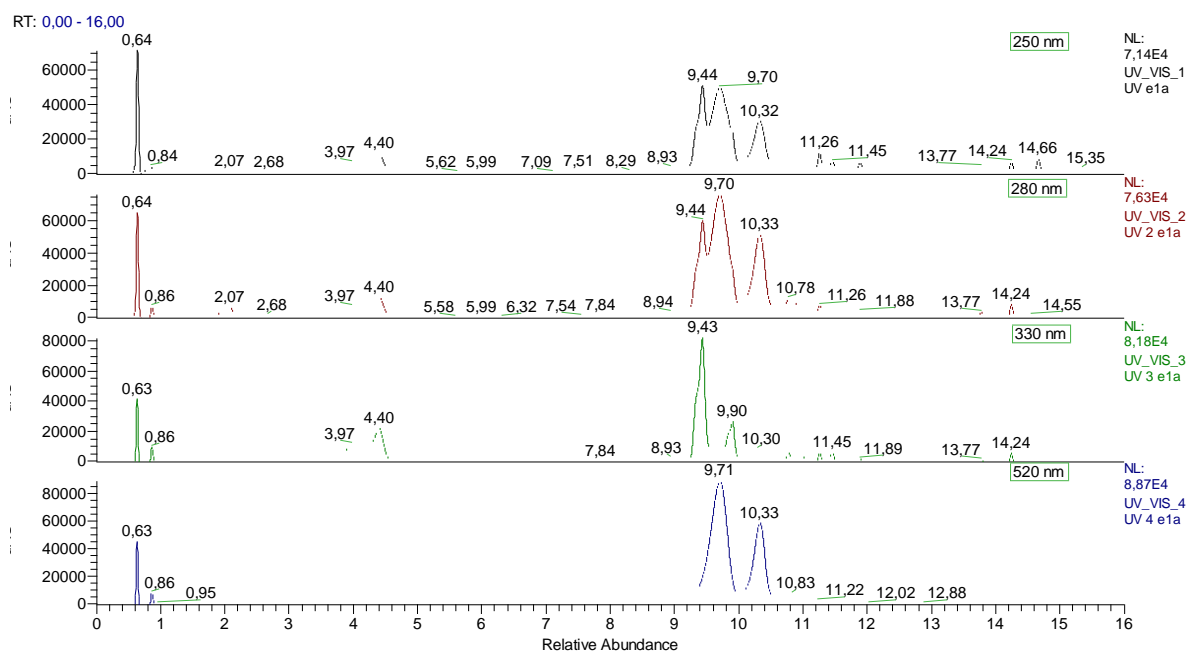
La elección de las longitudes de onda para la obtención de los cromatogramas obedece a que los flavonoides se caracterizan por presentar máximos de absorción en dos rangos del espectro UV, en la zona de 240 a 285 y en la zona entre 300 a 550 nm. Es importante resaltar que los distintos tipos de flavonoides pueden ser reconocidos por sus espectros UV.

Un análisis más detallado de las señales presentes en los cromatogramas a las cuatro longitudes de onda, se muestra en la figura 1. El resultado expuesto corresponde al ensayo 4.

Al observar los cromatogramas obtenidos para las longitudes de onda de 250, 280 y 330 nm, se puede apreciar que no existen grandes diferencias. En los tres casos se observan dos grupos de señales, uno entre 3,9 y 4,5 min. y un segundo con mayores tiempos de retención y mayor intensidad, entre 9,4 y 11,5 min., aproximadamente. Este segundo grupo de señales, se sugiere correspondan a los compuestos de mayor abundancia en los extractos objeto de estudio, bajo dichas condiciones de análisis.

En el cromatograma obtenido a 520 nm se logran visualizar, casi exclusivamente, dichas señales a tiempos de retención entre 9,7 y 11,22 min. Según se refiere en la literatura, las antocianinas presentan máximos de absorción en el espectro UV-Vis a diferentes valores, los que oscilan entre 496 y 547, en dependencia del disolvente en el que se presenten <sup>53</sup>.

Figura 1: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda (250, 280, 330 y 520 nm).  
Condición 1: Menstruo H<sub>2</sub>O:EtOH (80:20); T(C)/t (min.) 25/60 (ensayo 4)



Como sistema de detección adicional y para efectos de identificación estructural se procedió a la realización del análisis por espectrometría de masas de todos los experimentos realizados. Se puede observar que el cromatograma correspondiente al pico base de las doce muestras, presenta características muy similares, tanto en modo positivo (anexo 11) como en negativo (anexo 12). En ambos casos las señales de mayor interés e intensidad se presentan, aproximadamente, a tiempos de retención entre 9,4 y 11,0 min.

El contar con un equipo de CLAE acoplado a un detector DAD, permite la obtención de los espectros de absorción de cada uno de los compuestos separados. En ausencia de estándares, dicha información espectral, favorece la identificación de los posibles metabolitos presentes en la muestra.

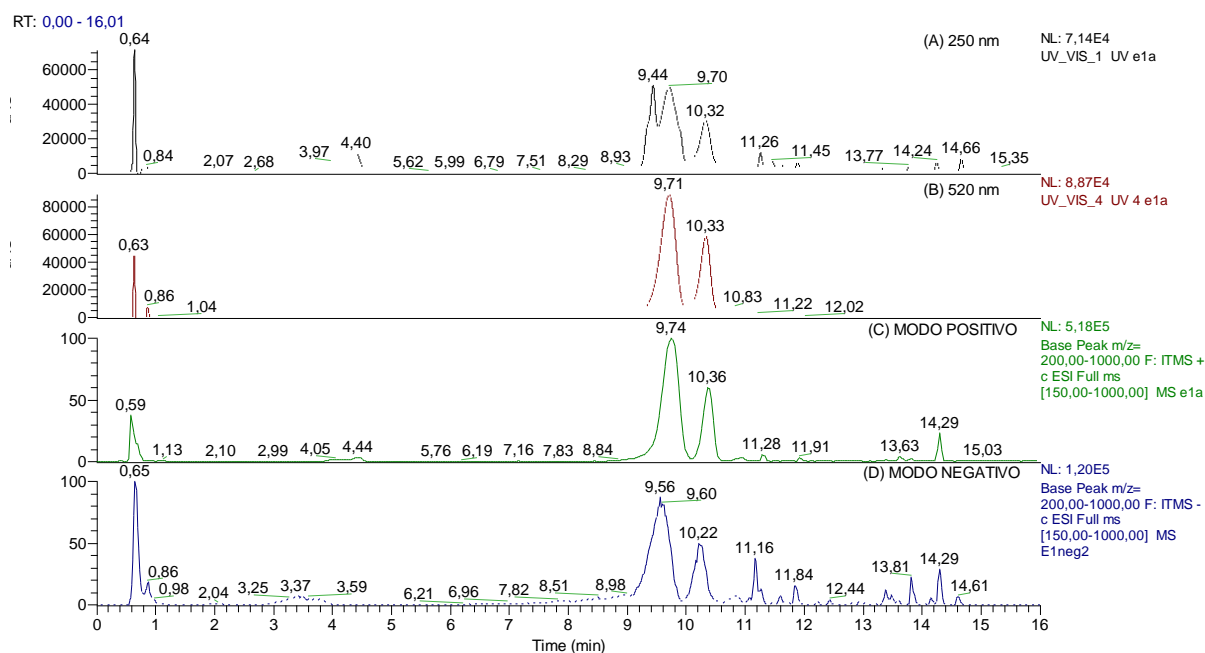
Debe tomarse en consideración que cambios en la composición de la fase móvil pudieran propiciar cambios en el espectro de absorción de un mismo compuesto. Por ejemplo, se han apreciado valores de hasta 15 nm hacia longitudes de onda más bajas, cuando se sustituye el agua por el metanol. Por lo tanto, podría obtenerse espectros con ligeras diferencias en

sus máximos de absorción, para el mismo flavonoide en diferentes disolventes, lo que podría influir en la identificación precisa del compuesto <sup>78</sup>.

En tal sentido la combinación de CLAE con detección en línea por UV y EM resulta una herramienta muy valiosa para el análisis de productos naturales, especialmente en extractos donde existen complejas mezclas de productos naturales o metabolitos <sup>78</sup>.

Luego de evidenciar la similitud entre todos los ensayos realizados, se procedió al estudio de caracterización tomando como modelo una de las muestras (ensayo 4). En la figura 2 se puede apreciar el cromatograma UV a 250 nm (A), a 520 nm (B), el cromatograma del pico base en modo positivo (C) y negativo (D).

Figura 2 Perfiles cromatográficos obtenidos para el ensayo 4 (condición 1). A: cromatograma UV a 250 nm, cromatograma UV a 520 nm (B), el cromatograma del pico base en modo positivo (C) y el cromatograma del pico base en modo negativo (D).



La identificación de los compuestos se realizó sobre la base del espectro UV-visible; de la masa del ion molecular y de los iones fragmentos referidos en la literatura, para extractos de los cálices de jamaica y utilizando un análisis espectrométrico similar.

Los compuestos identificados, con su correspondiente tR (tiempo de retención),  $\lambda_{\max}$  (máximos de absorción en el espectro UV), [M+H], [M-H] e iones fragmentos correspondientes a cada modo de ionización (MS<sup>2</sup>), se presentan en los anexos 13 y 14.

En el modo positivo (anexo 13) solo pudieron ser identificados cinco compuestos: un fenol simple (ácido-5-cafeoilquínico), las dos antocianinas más referidas para la especie (delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido) y dos glicósidos de flavonoles (miricetina-3-sambubiósido, quercetina-3-sambubiósido), estos últimos con señales de muy baja intensidad.

En el modo negativo (anexo 14) se identificaron mayor cantidad de metabolitos, tales como: una lactona del ácido hidroxicítrico (ácido hibiscus), ácidos fenólicos (ácido-5-cafeoilquínico y sus isómeros 3 y 4; ácido-5-O-coumaroilquínico y su isómero el ácido-3-O-coumaroilquínico y el ácido cafeoilshikímico, además de un isómero de este). En este modo también pudieron ser identificadas las antocianinas antes referidas (delfinidina-3-sambubiósido, cianidina-3-sambubiósido) y varios glicósidos de flavonoles tales como miricetin-3-arabinogalactósido, quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido, un derivado de la quercetina glicosidada y el kaempferol-3-(*p*-coumaroil glucósido).

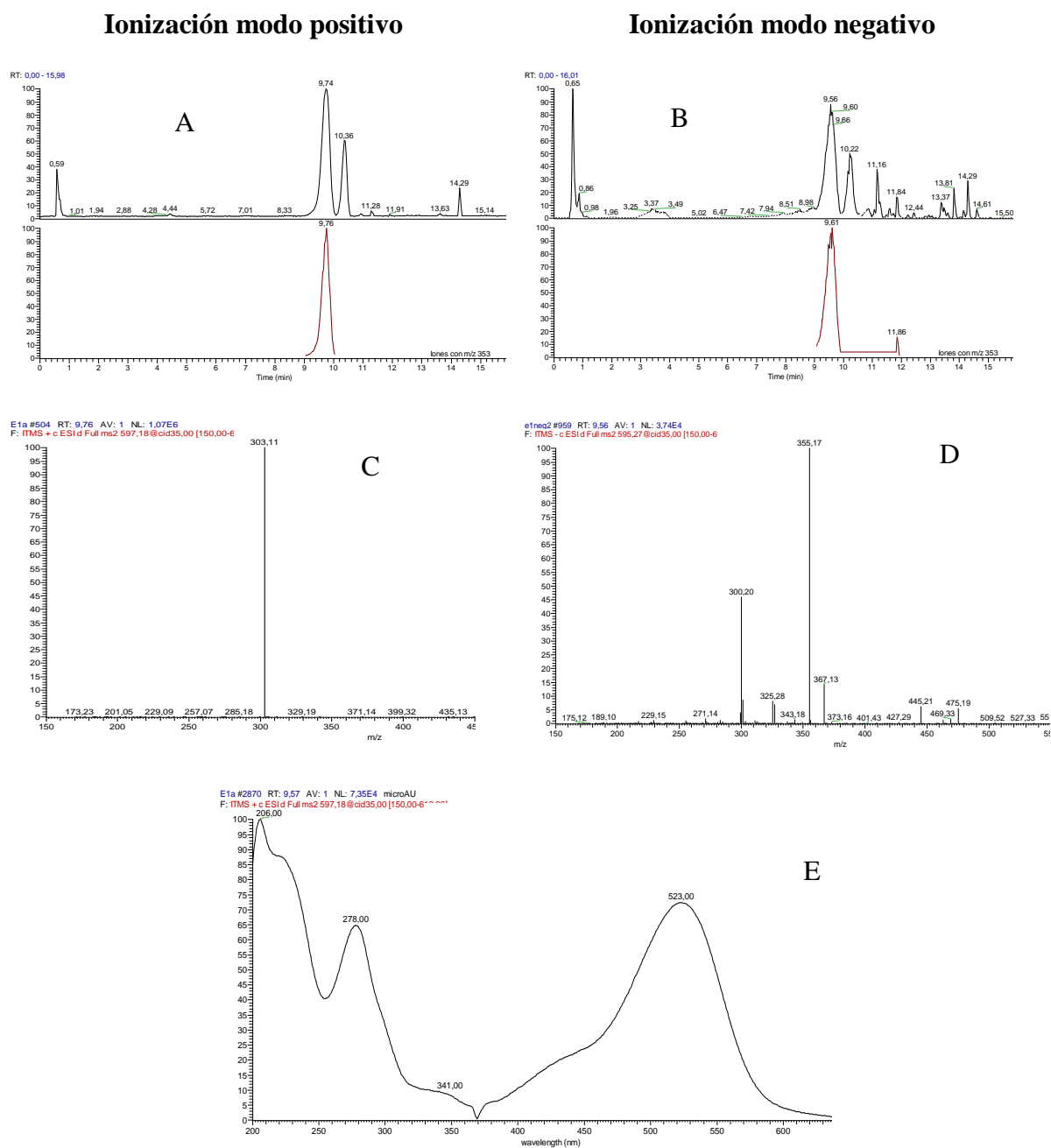
Como se pudo apreciar las antocianinas pudieron ser identificadas en ambos modos de ionización, eluyendo entre 9,6 y 10,4 min., aproximadamente. Para su identificación, en primer lugar, se procedió a un análisis de su espectro de masas en modo positivo y negativo.

Con el m/z 597 (9,74 min., modo positivo, figura 3 A) y m/z 595 (9,56 min., modo negativo figura 3 B) se detectó la presencia de la delfinidina-3-O-sambubiósido, siendo, además, consistente con los fragmentos obtenidos para dicha molécula (MS<sup>2</sup>) a un m/z de 303 (100%) en el modo positivo y m/z 355 (100%), 300 y 301 (modo negativo), los cuales corresponden a la pérdida del azúcar (figura 3 C y D, respectivamente).

Aunque no fue posible demostrar la existencia de dicho compuesto con su estándar de referencia, se pudo observar que sus máximos de absorción en el espectro UV-visible están alrededor de los 278 y 523 nm (figura 3 E), lo cual concuerda con los resultados obtenidos

por otros autores, quienes plantean que la  $\lambda_{max}$  de la delfinidina-3-O- sambubiósido se presenta alrededor de los 280 nm y 520 nm <sup>35,79,80</sup>.

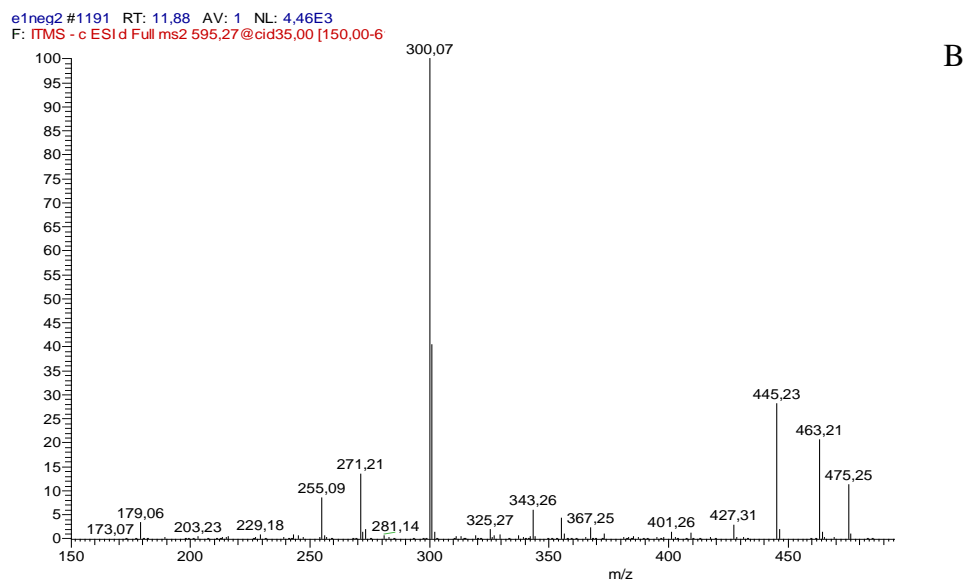
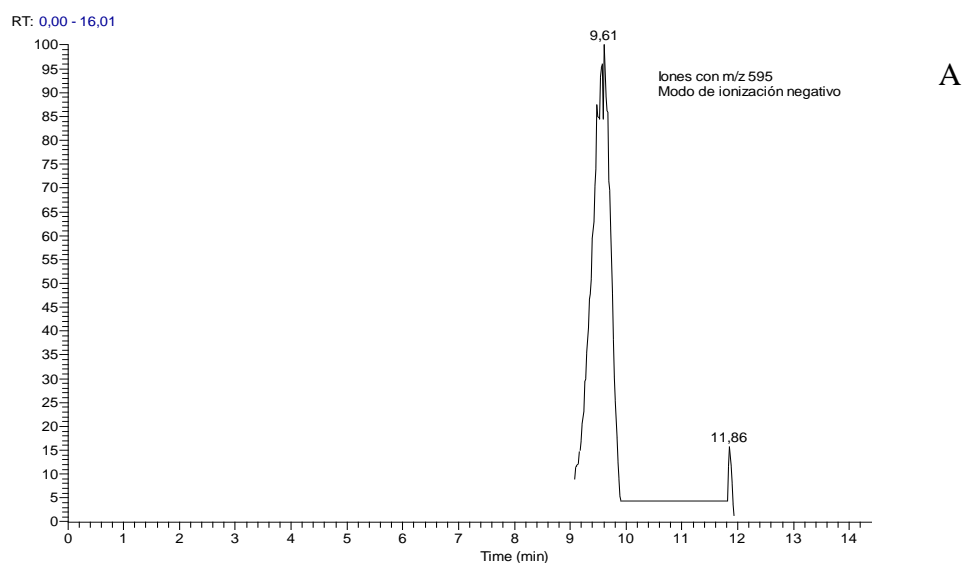
Figura 3: Espectros de masa en ambos modos de ionización (A: modo positivo; B: modo negativo), iones fragmentos identificados (C: modo positivo; D: modo negativo) y espectro UV de la delfinidina-3-O-sambubiósido (E).





Debe acotarse que con igual  $m/z$  de 595, a un tiempo de retención de 11,86 min. y en el modo de ionización negativo se identificó la quercetina-3-sambubiosido (figura 4 A). Los iones fragmentos de  $m/z$  300 (100%), 463, 445, 301 permiten sugerir dicha estructura, lo que concuerda con la literatura especializada (figura 4 B) <sup>28,35,80,81</sup>. Dicho flavonol glicosidado se presenta en muy baja concentración casi imperceptible en los cromatogramas a las diferentes longitudes de onda analizadas (anexo 10).

Figura 4: Espectro de masa en modo negativo (A) e iones fragmentos identificados de quercetina-3-sambubiósido (B)

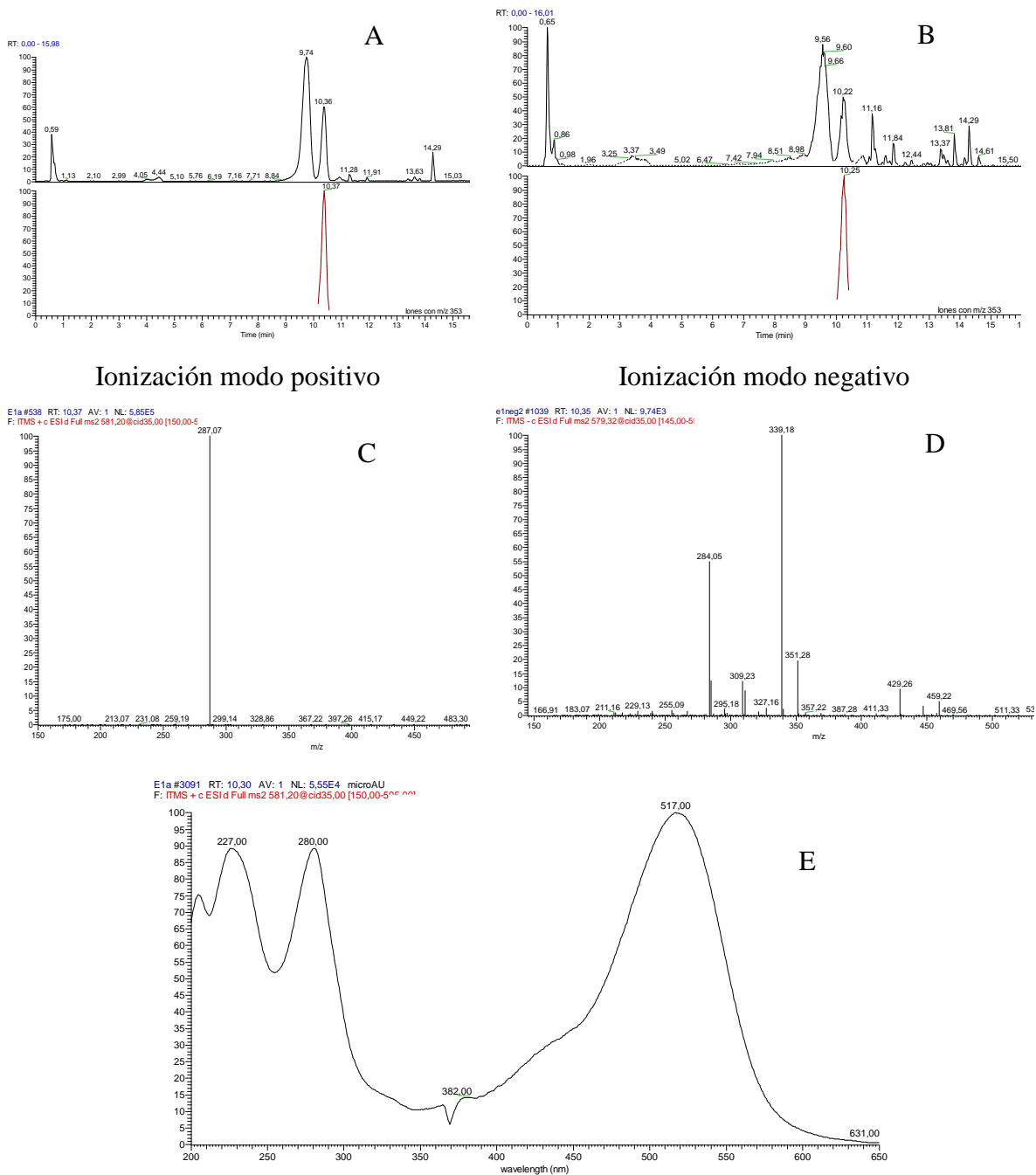


Otra de las antocianinas identificadas con un m/z 581(10,41 min., modo positivo, figura 5 A) y m/z 579 (10,25 min., modo negativo, figura 5 B), así como los fragmentos correspondientes para ambos modos de ionización, m/z 287 (figura 5 C) y m/z 339 (100%) y 205 (figura 5 D), respectivamente, sugiere la presencia de cianidina-3-O-sambubiósido.

De manera similar, aunque no se contó con su estándar de referencia, se pudo observar que sus máximos de absorción en el espectro UV-visible están alrededor de los 280 y 517 nm (figura 5 E), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores<sup>35,79-81</sup>.

Ambos tipos de antocianinas han sido reportadas con anterioridad en extractos de *H. sabdariffa* y son responsables de la fuerte pigmentación de sus extractos<sup>35,79-81</sup>. Diversos autores han reportado que ambas antocianinas suelen ser las que prevalecen, resultando superior la concentración de la delfinidina-3-O- sambubiósido<sup>79</sup>.

Figura 5: Espectros de masa en ambos modos de ionización (A: modo positivo; B: modo negativo), iones fragmentos identificados (C: modo positivo; D: modo negativo) y espectro UV de cianidina-3-O-sambubiósido (E)

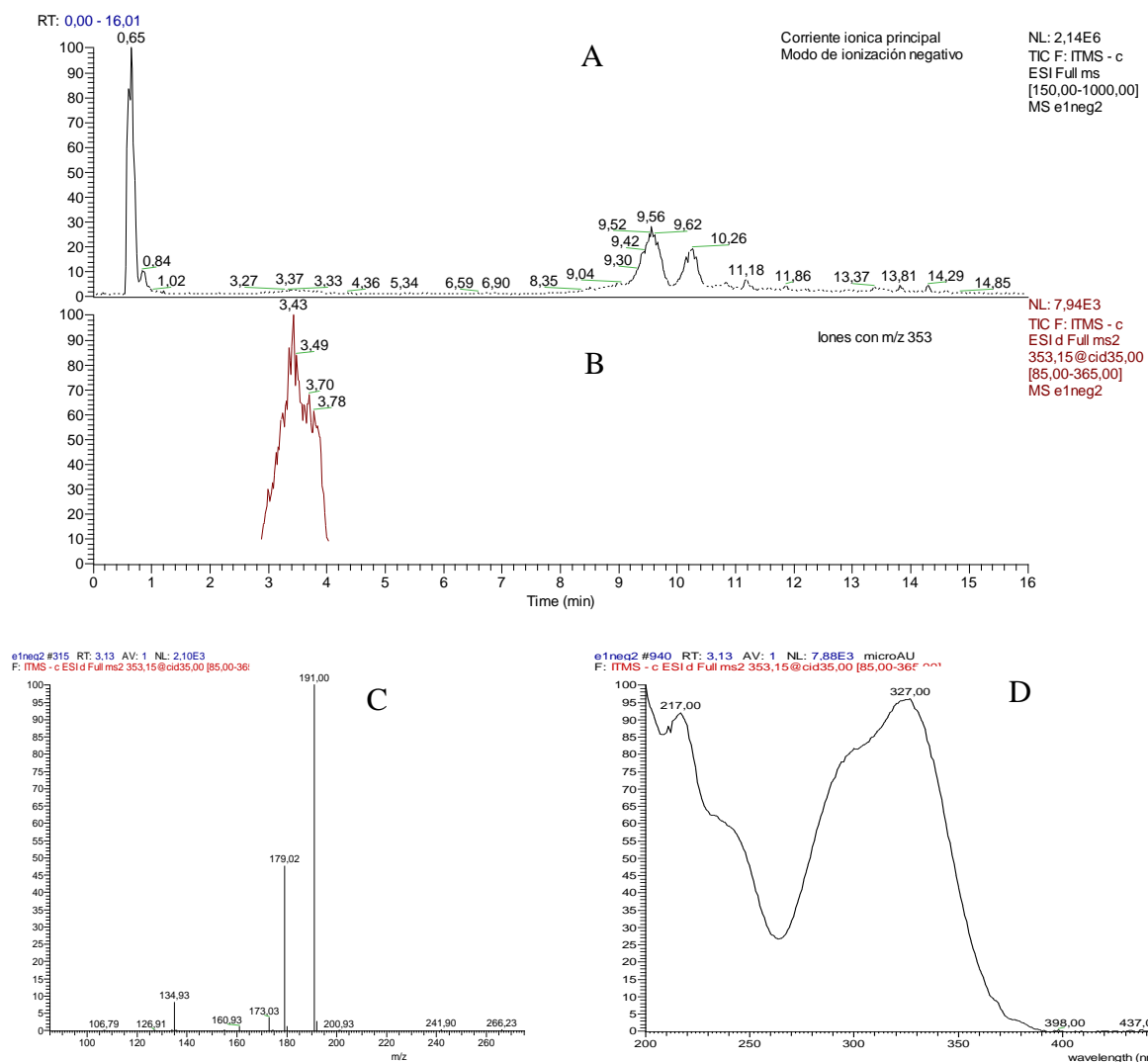


A menor tiempo de retención (3,9 y 4,4 min., aproximadamente) se observa en el espectro UV (250 nm) (figura 2 A) unas señales, cuyos valores de  $m/z$  en ambos modos de ionización y máximos de absorción al UV, sugieren la presencia del ácido cafeoilquínico y sus isómeros. El ácido clorogénico (ácido-5-cafeoilquínico) y su isómero el ácido neoclorogénico (ácido-3-cafeoilquínico) se identificaron de mejor manera en el modo de ionización negativo, mostrando en el cromatograma del pico base señales con igual  $m/z$  a tiempos de retención entre 3 y 4 minutos (figura 6 A y B). La presencia de ambos isómeros puede ser sustentada a través de los iones fragmentos ( $MS^2$ ), ya que diversos autores refieren que en ambos el pico base (100%) es el de  $m/z$  191, además de los  $m/z$  179, 135, 161, 173 (figura 6 C) <sup>92,95</sup>. Adicionalmente, al analizar el espectro UV-vis, para tales señales se apreciaron dos máximos de absorción 300 y 327, los cuales son informados en la literatura para tales isómeros (figura 6 D) <sup>80-82</sup>.

Con relación al ácido criptoclorogénico (ácido 4-cafeoilquínico), no se puede evidenciar de manera similar su presencia, sin embargo, al profundizar en los espectros de la señal que sale alrededor de 9 min. (Figura 6 A) se puede apreciar que existe una coelución de tal metabolito con la antocianina. Justo al inicio de la señal el espectro de masas de la corriente iónica principal, muestra el  $m/z$  el 353 y el  $m/z$  595, este último característico de la delfinidina-3-O-sambubiósido. Adicionalmente, para dicho ion de  $m/z$  de 353, se pueden observar  $\lambda_{max}$  de 300 y 237 en el espectro UV-visible.

Ácidos como el 3-, 4- y 5-cafeoilquínicos han sido identificados en diversos extractos de los cálices de jamaica <sup>80-82</sup>.

Figura 6: Espectros de masa modo de ionización negativo (A y B), iones fragmentos identificados (C) y cromatograma UV del ácido clorogénico y sus isómeros



El resto de los metabolitos fueron identificados atendiendo, básicamente, a la masa de su ion molecular y los correspondientes iones fragmentos obtenidos en el modo de ionización negativo (anexo 14) **Anexo 14**. Para estos compuestos fenólicos que eluyeron por encima de los 11 min., las señales en los cromatogramas UV a 250 nm fueron de muy baja intensidad, lo cual no permitió la correcta apreciación de sus correspondientes espectros de absorción (Figura 2).

Todos los compuestos identificados en el presente estudio, han sido referidos en la literatura para la droga vegetal objeto de estudio, incluso utilizando igual método de separación y caracterización, tal como se refiere en las citas acotadas en los anexos 1 y 3.

Luego de evaluar la influencia de las dos condiciones o variables establecidas (menstruo y temperatura/tiempo), sobre la composición química, se pudo concluir que:

- Los factores manipulados en el estudio no mostraron influencia alguna sobre la cantidad de sólidos solubles (°Bx) extraídos, el rendimiento del proceso de extracción ni sobre la capacidad de captación de radicales libres.
- La mayor extracción de compuestos fenólicos (mgEAG/g ESJ) se obtuvo al utilizar como menstruo la mezcla agua:EtOH (80:20).
- La mayor extracción de los pigmentos antocianinas (mg ECG/g ESJ) se obtuvo al realizar la extracción a 60 °C por un tiempo de 30 min.
- El análisis de CLAE-EM pudo confirmar que en todos los experimentos existe una composición química cualitativamente similar, pudiendo sugerirse en todos los casos que las antocianinas: delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, son las responsables de las señales de mayor intensidad en los cromatogramas, tanto en modo positivo como en modo negativo.

Por todo lo antes expuesto se tomó la decisión de elaborar los extractos que serían sometidos al secado por atomización, utilizando como menstruo la mezcla agua:EtOH (80:20), una temperatura de 60 °C y por un tiempo de 30 min. Fundamentalmente, se consideró la capacidad extractiva de compuestos fenólicos, de antocianinas en particular y el ahorro en tiempo cuando se emplea temperatura de 60 °C.

### **III.3 Microencapsulación por *Spray Dryer***

La composición química fundamental de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de los cálices de *H. sabdariffa*, como se pudo constatar, resultan ser los compuestos fenólicos, siendo las antocianinas las que se encuentran de forma mayoritaria. El aprovechamiento de este tipo de compuestos, debido a las propiedades terapéuticas y la incorporación de estos a

diferentes productos en el campo de la industria alimenticia, ha motivado su investigación desde diversos puntos de vista <sup>7</sup>.

Las antocianinas son compuestos altamente sensibles, ante cambios de temperatura, incidencia de la luz, pH, oxígeno, iones metálicos, enzimas y demás factores, lo que trae como consecuencia que presenten una corta durabilidad <sup>49,83</sup>, siendo esta la principal limitante en su aplicación y en el aprovechamiento de sus propiedades <sup>84</sup>.

La microencapsulación por *Spray Dryer* es una técnica útil para disminuir el daño de los compuestos sensibles, ya que atrapa estas sustancias en el interior de una matriz, generándose una barrera y formando una cápsula que favorece su conservación y estabilidad <sup>7,73,84-86</sup>. Esta técnica es comúnmente utilizada, de hecho cerca del 80-90% de la encapsulación de antocianinas se realiza mediante secado por atomización <sup>49</sup>.

En el estudio actual se realizó una evaluación preliminar de secado por aspersión del extracto hidroalcohólico, obtenido mediante maceración por sonicación a 60 °C durante 30 min. Se realizaron cuatro experimentos, sin réplicas, considerándose, solo dos variables de estudio, la temperatura de entrada del extracto a la cámara de secado y la proporción de la mezcla de encapsulantes (goma arábiga y maltodextrina). Se consideró un estudio preliminar, pues es la antesala para realizar un diseño experimental que permita la optimización de las condiciones de secado para dicho extracto. Lógicamente, buscando que, luego del proceso de secado, se logre la menor pérdida de los principios activos y que estos sean estables durante un tiempo considerable. La selección de las condiciones (variables independientes de estudio) se realizó sobre la base de los artículos publicados al respecto para dicha planta, u otras, cuya composición química mayoritaria fueran las antocianinas.

Según González-Palomares *et al.* <sup>87</sup>, una temperatura de entrada de 190 °C, usando el *Spray Dryer* como método de secado de extractos de *H. sabdariffa*, mostró la más alta concentración de compuestos volátiles y la más baja concentración de compuestos degradados, en comparación con otras temperaturas ensayadas en el mismo estudio (150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 200 °C, 210 °C).

Idham *et al.* <sup>88</sup>, publicaron la microencapsulación por *Spray Dryer* de un extracto hidroalcohólico de *H. sabdariffa* utilizando temperaturas entre 100-150 °C. Salazar-

González *et al.* <sup>89</sup>, utilizaron un secador por aspersión con EtOH:agua de cálices de flor de jamaica usando temperaturas de aire de entrada de 180 °C. Sotomayor *et al.* <sup>7</sup>, secaron extractos hidroalcohólicos de cálices a diferentes concentraciones de *H. sabdariffa* con temperaturas de entrada desde 153 °C a 198 °C.

Para disminuir la degradación de los metabolitos bioactivos es muy común el uso de sustancias encapsulantes <sup>87</sup>. Diferentes biopolímeros son utilizados como encapsulantes de antocianinas, entre los que se encuentran: goma arábiga, inulina, proteína de suero, proteína aislada de soya, maltodextrina, entre otros <sup>49,90</sup>.

Los encapsulantes manejados en el estudio actual fueron maltodextrina y goma arábiga. La maltodextrina es un carbohidrato muy usado, de bajo costo, soluble en agua, de baja viscosidad, que protege de la oxidación y no aporta color a las sustancias a encapsular, permitiendo la conservación de la integridad de las antocianinas durante el proceso de encapsulación <sup>49,91,92</sup>. La goma arábiga ha sido utilizada durante años, siendo una buena opción para la formación de emulsiones estables y para evitar la volatilización de compuestos <sup>88</sup>.

La maltodextrina ya ha sido utilizada anteriormente en mezcla con la goma arábiga, para la encapsulación de antocianinas de *H. sabdariffa*. Según Idham *et al.* <sup>88</sup>, la combinación de maltodextrina y goma arábiga logró la mayor eficiencia de encapsulación del 99,87%, seguido por maltodextrina con un 99,69% y goma arábiga con 98,4%.

Adicionalmente, las mezclas de maltodextrina y goma arábiga han mostrado formación de partículas más homogéneas <sup>93</sup>, menores cambios en las coloraciones de las antocianinas encapsuladas y un mayor tiempo de vida útil <sup>88</sup>.

Mezclas de 60% maltodextrina y 40% goma arábiga han sido usadas para la encapsulación de proantocianinas con una eficiencia de encapsulación de 99%, en semillas de uvas <sup>94</sup>. De acuerdo con Burin *et al.* <sup>95</sup>, la mezcla maltodextrina/goma arábiga como material encapsulante de las antocianinas de uvas *Cabernet Sauvignon*, logró alargar la vida media y disminuyó la degradación de las mismas.

Existen algunos estudios de microencapsulación de diversos extractos de *H. sabdariffa*, mediante secado por atomización; por ejemplo, extractos obtenidos con etanol-agua (50:50)



<sup>89,96</sup>, etanol-agua (50:50) con 2% de ácido cítrico <sup>88</sup>, etanol-agua (42:58) <sup>7</sup>, metanol-agua (30:70) <sup>87</sup> y agua <sup>97</sup>. En otro sentido, los encapsulantes más empleados para tal proceso han sido son goma de mezquite <sup>89,96</sup>, almidón-alginato <sup>7</sup>, maltodextrina <sup>88,97</sup>, goma arábiga, maltodextrina-goma arábiga (40:60) <sup>88</sup>.

Por todo lo antes expuesto se decidió evaluar la incidencia sobre diferentes propiedades físico-químicas de dos mezclas en proporciones diferentes de maltodextrina y goma arábiga. Según la revisión realizada, el extracto de los cálices de *H. sabdariffa* que se sometió al secado por atomización, no ha sido referido con anterioridad. La combinación del encapsulante maltodextrina-goma arábiga (60:40), tampoco ha sido ensayada en tales extractos.

### **III.3.1 Estudio del proceso de secado por aspersión**

Con el objetivo de evaluar la influencia del proceso de secado por atomización sobre las propiedades físico-químicas y biológicas de las microcápsulas resultantes, se realizaron, además de los cuatro experimentos de encapsulación, dos ensayos en donde el secado del extracto se llevó a cabo a baja temperatura y vacío (rotoevaporador). Por tanto, como resultado final se obtuvieron seis experimentos (Tabla 3).

Luego de someter los extractos a cada una de las condiciones de secado, se pudo apreciar que los extractos con encapsulantes secados mediante el rotoevaporador, mostraron una textura viscosa, pegajosa y resultaron de coloración rojo-rosado intensa. Sin embargo, los extractos con encapsulantes secados por *Spray Dryer* se presentaron como polvos de coloración rojo-rosado, pero de tonalidad más pálida. La diferencia en apariencia, evidentemente, se atribuye al proceso de secado. En la técnica de secado por atomización tiene lugar una inmediata evaporación del disolvente que entra a la cámara de secado en forma de finas gotículas. Aunque con frecuencia se considera un proceso de deshidratación, precisamente, su mayor utilidad es que logra encapsular o revestir al extracto con el material encapsulante. De esta manera, se crea una fina película que recubre a los compuestos bioactivos, brindándole no solo protección ante factores medioambientales, sino también impidiendo su aglomeración <sup>49,88</sup>; a diferencia del secado por rotoevaporador que solo elimina el disolvente del extracto, sin que se genere la barrera protectora.

Los resultados de los análisis realizados a los diferentes experimentos se muestran en la tabla 5Tabla 5.

### **III.3.2 Parámetros físico-químicos evaluados en los microencapsulados**

Con relación a los °Bx los valores más altos de este parámetro corresponden a M-2 y M-3, los mismos que contenían la mezcla de encapsulantes G40:MD60, mientras que M-5 y M-6 mostraron valores menores. La cantidad de maltodextrina en la mezcla es proporcional a los °Bx, debido a que este encapsulante es un carbohidrato complejo soluble que provoca un aumento de los sólidos solubles. Precisamente, la maltodextrina se reporta como un aditivo para generar el aumento del rendimiento de las sustancias a secar <sup>98</sup>.

La determinación de humedad residual, como se puede apreciar en la tabla 5, solo se determinó en los extractos obtenidos a través del secado en el *Spray Dryer*. El porcentaje de humedad residual resultó ser inferior cuando se aplicó una temperatura de entrada del extracto de 190 °C, independientemente de la mezcla de encapsulantes utilizada (M3 y M6). Lo anterior se atribuye a que cuando la temperatura es más elevada existe una mayor tasa de transferencia de calor entre las partículas, conllevando a un mayor porcentaje de evaporación de la humedad y por consiguiente a una eliminación de agua de forma más rápida <sup>99</sup>. Lógicamente, paralelo a ello debe ser analizada la incidencia que pudiera tener sobre los metabolitos bioactivos, el empleo de altas temperaturas, aun cuando se logren bajos porcentajes de humedad residual.

Este comportamiento también ha sido observado por Silva *et al.* <sup>93</sup>, quienes planteaban que bajas temperaturas de entrada no producen un secado apropiado, causando aglomeración en los polvos de *Myrciaria jaboticaba*. Similares resultados fueron encontrados por Mishra *et al.* <sup>99</sup>, en donde, al aumentar la temperatura de secado de 125 °C a 200 °C, se produjo una disminución significativa del contenido de humedad residual de los polvos de jugo de *Emblica officinalis* de 6,3 a 3,8%.

Tabla 5: Análisis físico-químicos realizados a los extractos obtenidos de *H. sabdariffa*, conteniendo la correspondiente mezcla encapsulante.

<b>Muestras</b>	<b>Brix</b>	<b>Temp. Salida (1±°C)</b>	<b>Hr±DS</b>	<b>Masa de polvo final (g)</b>	<b>Fenoles totales (mg EAG/g ES)±DS</b>	<b>Antocianinas (mg ECG)/g ES)±DS</b>	<b>DPPH (%)±DS</b>
M-1 G40/MD60 T=40 °C	—	—	—	—	34,13± 0,689	14,29±0,09	91,80±0,99
M-2 G40/MD60 T=150 °C	9,7	64	4,71±0,2 2	9,9	28,28±0,461	14,61±0,06	90,42±0,17
M-3 G40/MD60 T=190 °C	9,7	82	3,97±0,8 4	9,8	28,36±0,385	14,16±0,06	87,59±0,94
M-4 G60/MD40 T=40 °C	—	—	—	—	32,01±0,857	13,68±0,19	85,89±0,44
M-5 G60/MD40 T=150 °C	9,4	44	6,66±0,1 5	8,4	31,09±0,535	15,07±0,21	84,51±0,42
M-6 G60/MD40 T=190 °C	9	71	5,08±0,3 0	9,5	28,67±0,267	13,88±0,08	83,02±1,28

Leyenda: Hr= Humedad residual, G=Goma arábica, MD=Maltodextrina

Adicionalmente, se pudo apreciar que cuando se utilizó la combinación G40/MD60, los valores de humedad residual, para ambas temperaturas de entrada del extracto, fueron inferiores, lo que resulta de gran interés para lograr una mejor conservación de los polvos obtenidos. Al existir valores elevados de humedad relativa en la materia vegetal, podría propiciarse el crecimiento de microorganismos tales como bacterias y hongos, así como la degradación de sus metabolitos por procesos enzimáticos <sup>100</sup>. No obstante, la humedad residual lograda para la combinación G60/MD40 no sería un criterio para descartar el empleo de esta combinación, se precisan estudio de estabilidad posteriores, pues los polvos obtenidos no mostraron características organolépticas inadecuadas.

Por otra parte se observa un mayor porcentaje de humedad residual en los tratamientos con mezcla de encapsulantes en los cuales existe mayor cantidad de goma arábica, resultados similares fueron obtenidos por Páramo *et al.* <sup>101</sup>, para el secado por aspersion de ajo usando goma arábica como material de encapsulación. De manera similar lo indican Nadaff *et al.* <sup>102</sup>, en el secado por aspersion de jugo de naranja se obtuvo mayor humedad residual en los tratamientos trabajados con goma arábica en comparación con los procesados con maltodextrina.

Colateralmente, cuando se aplican valores elevados de temperatura de entrada del extracto a la cámara de secado, se observa un incremento de la temperatura de salida del producto seco y se previene la pegajosidad del extracto en las paredes del secador. Como se puede observar en la tabla 5 la temperatura de salida en ambos experimentos cuando se utiliza 190 °C resulta ser más elevada (M3 y M6).

En otro sentido, cuando la temperatura de entrada es más alta también se obtiene mayor cantidad de polvo seco. Los estudios preliminares, parecen indicar que cuando se utiliza la mezcla G40/MD60, es decir, mayor cantidad de MD, se favorece el rendimiento en el proceso de secado. Este resultado se podría confirmar cuando se realicen réplicas con cada una de las condiciones ensayadas.

Para evaluar la incidencia de ambos factores (encapsulante y la relación temperatura/tiempo), se tomaron las variables independientes (fenoles totales, antocianinas

y actividad antioxidante) con los cuales se realizó un análisis multifactorial a través del programa estadístico *SPSS* (versión 22).

Dichos parámetros se consideraron como los de mayor impacto, sobre todo, desde el punto de vista biológico, ya que de ellos depende su uso en la terapéutica.

Como se puede apreciar en el anexo 15, el factor temperatura incide de manera significativa sobre la cantidad de fenoles y de antocianinas presentes en el producto final, así como, sobre la capacidad secuestradora del radical libre DPPH. Al analizar cada una de estas variables, con una confiabilidad del 95%, se obtuvo un p-valor inferior a 0,05, por lo que se puede inferir que, al menos en uno de los grupos de análisis la media difiere estadísticamente de la media de la población.

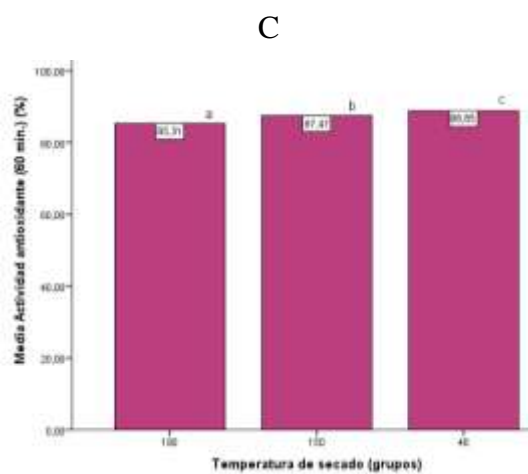
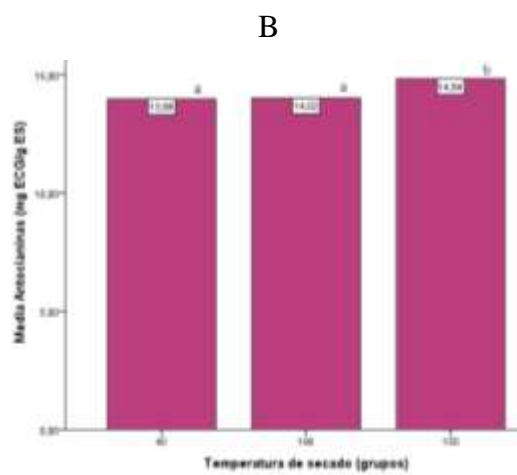
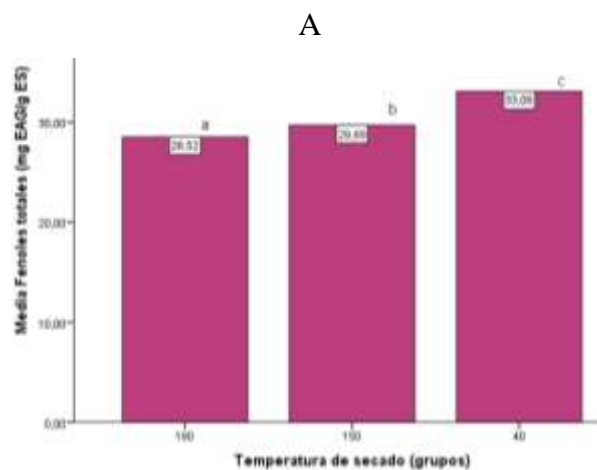
Analizando cómo influye la temperatura con relación al contenido de fenoles totales, se pudo apreciar que este es más elevado cuando se seca el extracto a través del rotoevaporador (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** figura 7 A). Sin embargo, al evaluar dicho parámetro utilizando el secado por atomización, la temperatura más elevada (190 °C), es con la que se obtiene un producto final con la menor concentración de compuestos fenólicos. Este resultado podría ser atribuido a la sensibilidad de algunos compuestos fenólicos al ser sometidos a elevadas temperaturas de secado <sup>89</sup>, Dicho resultado es congruente con lo obtenido por Mishra *et al.* <sup>99</sup>, donde el contenido de fenoles totales de *Emblica officinalis*, secado por *Spray Dryer*, disminuye en la medida en que aumenta la temperatura de entrada de 125°C a 175°C. Según Jiménez-Aguilar *et al.* <sup>103</sup>, plantea un pérdida de compuestos fenólicos del 26% en extractos etanólicos de arándanos cuando la temperatura de entrada del extracto de secador es de 160 °C.

En relación a la cuantificación de antocianinas, resultó que a la temperatura de 150 °C se obtuvo la mayor cantidad de dichos metabolitos, valores que difieren estadísticamente, de los obtenidos cuando se realizó el secado a 40 y 190 °C. Estas dos condiciones no presentaron diferencias significativas entre sí (figura 7 B). Arrazola *et al.* <sup>84</sup>, mencionan que el ascenso de la temperatura de entrada desde 150 a 202 °C, produce un incremento en la degradación de antocianinas, debido a su alta sensibilidad ante temperaturas elevadas. De forma semejante Ersus y Yurdagel <sup>91</sup>, evaluaron el contenido de antocianinas posterior a un

proceso de secado por aspersión y mencionan que temperaturas de entrada superiores a 160 °C hasta 180 °C, causan mayores pérdidas de estos compuestos. Espinoza *et al.*<sup>104</sup>, muestra que mediante *Spray Dryer*, la mejor temperatura de entrada para el secado de flores de mastuerzo es de 160 °C, ya que conserva la mayor cantidad del pigmento.

Para el análisis de la capacidad secuestradora del radical libre DPPH se observó que, entre las tres condiciones de temperaturas ensayadas, existieron diferencias significativas (figura 7 C), mostrando mayor capacidad antioxidante los extractos secados en el rotoevaporador, seguidos de los obtenidos a 150 °C. Es decir, se pudo apreciar un comportamiento congruente con la cuantificación de fenoles totales. Mientras mayor es la concentración de compuestos fenólicos, mayor es la capacidad antioxidante y esto se logró cuando el extracto se secó a baja temperatura. Bajo las condiciones del secado por atomización, el empleo de una temperatura de entrada de 150 °C, lograría mejores resultados que cuando se ingresa el extracto a la cámara en temperaturas muy elevadas.

Figura 7: Influencia de la temperatura sobre el contenido fenoles (A), antocianinas (B) y actividad antioxidante (C).

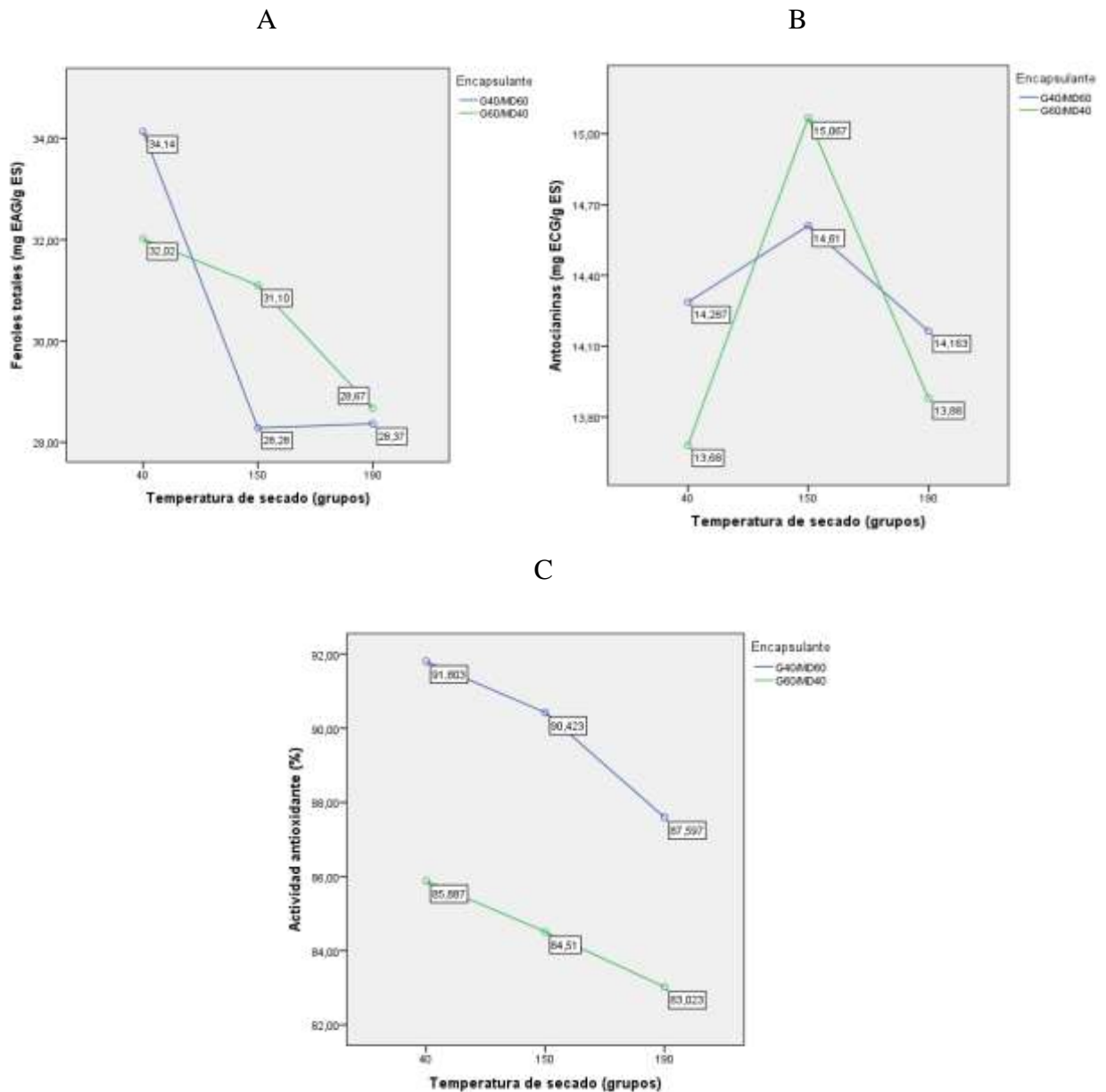


Nota: Letras diferentes denotan que existen diferencias estadísticamente significativas,

donde el p-valor es inferior a 0,05, con un nivel de confiabilidad del 95%.

Al realizar un análisis similar, pero con relación a la mezcla de encapsulante, se encontró que dicho factor influyó de manera significativa, con una confiabilidad del 95%, sobre el contenido de antocianinas y sobre la actividad antioxidante por el método del DPPH. Para ambos resultados el p-valor fue inferior a 0,05.

Posteriormente, se realizó el análisis integrado de cómo influyen las dos variables independientes sobre las variables dependientes, a través de gráficos de triple entrada Figura 8: Gráfico de triple entrada de las variables independientes (A: fenoles totales, B: antocianinas, C: actividad antioxidante) frente a las combinaciones ensayadas de encapsulante y temperatura de entrada.





En la figura 8 A, se puede apreciar que en la medida que se incrementa la temperatura de secado, disminuye la cantidad de compuestos fenólicos equivalentes a ácido gálico presentes en los extractos secos. Incluso puede notarse que esa disminución es mucho más acentuada cuando el encapsulante que se utiliza es la combinación G40/MD60; lo que pudiera sugerir, preliminarmente, que este encapsulante no logra una buena protección de los metabolitos de naturaleza fenólica, siendo superior la combinación que posee mayor porcentaje de goma arábica. Lo anterior guarda relación con lo informado por Mishra *et al.*<sup>99</sup>, en donde el contenido de fenoles totales se ve significativamente reducido cuando la concentración de maltodextrina aumenta. Adicionalmente, se observa que, a 190 °C, usando ambos tipos de encapsulante, los valores de fenoles totales no difieren apreciablemente, siendo los más bajos.

Al observar la Figura 8 B, donde se analiza el comportamiento del contenido de antocianinas equivalentes a cianidina glucósido (ECG), se aprecia que, a la temperatura de 150 °C con ambos encapsulantes, se logra una mayor concentración de antocianinas. Según Ersus y Yurdagel<sup>91</sup>, una temperatura de entrada elevada (>160–180 °C) causa una mayor pérdida de antocianinas en extractos de *Daucus carota* L.

Si se analiza en base al encapsulante, el resultado sugiere que la combinación G60/MD40 podría ser la que logre una mayor protección de dichos metabolitos, pero solo a 150 °C, lo que llama la atención que no ocurra de la misma manera para el resto de las temperaturas. Este resultado merita ser verificado, sobre todo, cuando se realicen réplicas para dichas condiciones en el secado por atomización.

Salazar-González, *et al.*<sup>89</sup>, demostraron que la goma de mezquite, ejerce un efecto protector sobre las antocianinas encontradas en la flor de jamaica cuando es usado como encapsulante en el secado por aspersión. Dicha goma es un polisacárido cuyas propiedades químicas y funcionales son similares a las de la goma arábica, siendo de gran aplicación en la industria de los alimentos, bebidas y farmacia<sup>105</sup>.

La valoración de la incidencia de los factores en estudio, sobre la actividad antioxidante, se muestra en la figura 8 C. Para esta variable se puede apreciar visiblemente que en la medida

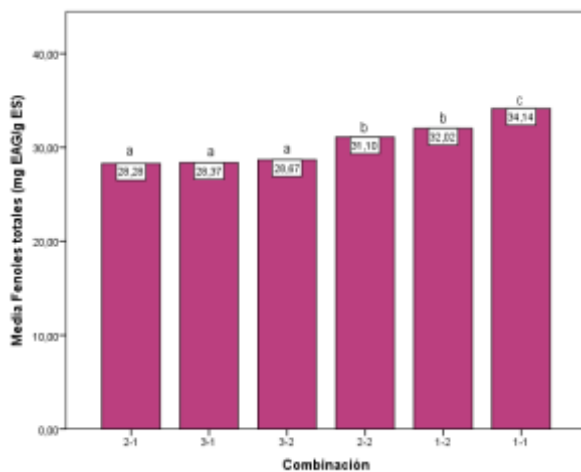
que se incrementa la temperatura, la actividad antioxidante disminuye significativamente, para ambos tipos de encapsulante. Sin embargo, los valores resultan ser superiores cuando se emplea la combinación G40/MD60.

Para determinar cuáles son las condiciones más apropiadas que lograrían preservar la mayor cantidad de metabolitos bioactivos y como consecuencia la actividad antioxidante, se realizó el análisis por Anova de un factor para la variable que combinaba todas las posibles opciones de agente encapsulante y la relación temperatura/tiempo. Los resultados se muestran en la figura 9.

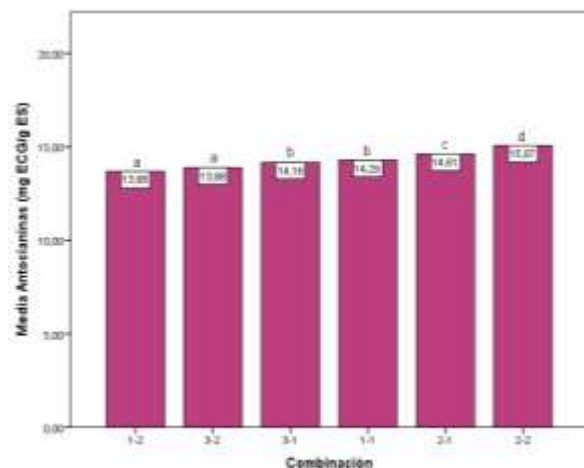
Al analizar la figura 9 A, correspondiente a la cantidad de fenoles presentes en los extractos secos, se pudo apreciar que los procesos donde se realizó la concentración con el rotoevaporador, independientemente de la matriz encapsulante utilizada, fueron los que presentaron mayor porcentaje de fenoles totales. Cuando el extracto se sometió a secado por atomización la combinación de 150 °C y G60/MD40 (2-2) mostró el segundo mejor comportamiento, siendo estadísticamente diferente a la combinación 1-1 (40 °C y G40/MD60, pero similar a la 1-2 (40 °C y G60/MD40). Lo anterior resulta de gran importancia pues denota que usando la matriz G60/MD40, no hubo afectación aparente de dichos metabolitos por efecto de la temperatura, lográndose un producto con mayor concentración del encapsulante bioactivo. En otro sentido haciendo un análisis de las condiciones de secado, solo con el uso del Spray *Dryer*, coincide que el mejor encapsulante en sentido general es la combinación G60/MD40.

Figura 9: Comportamiento de cada una de las variables independientes (A: fenoles totales, B: antocianinas, C: actividad antioxidante) frente a las combinaciones ensayadas de encapsulante y temperatura de entrada.

**A**



**B**

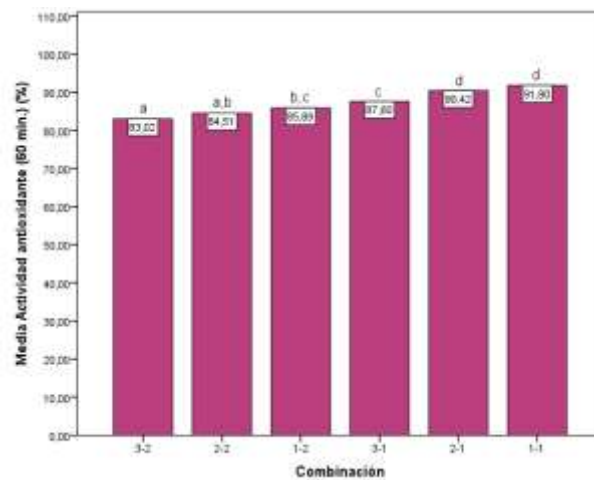


**Combinaciones**

1-1	40 °C	G40/MD60
1-2	40 °C	G60/MD40
2-1	150 °C	G40/MD60
2-2	150 °C	G60/MD40
3-1	190 °C	G40/MD60
3-2	190 °C	G60/MD40

Nota: Letras diferentes denotan que existen diferencias estadísticamente significativas, donde el p-valor es inferior a 0,05, con un nivel de confiabilidad del 95%.

**C**



En la figura 9 B, relacionada con la cuantificación de las antocianinas, se pudo observar que la mejor opción también es la mezcla G60/MD40, trabajada a 150 °C, la cual difiere estadísticamente del resto de los experimentos. Resultados obtenidos por Zhang *et al.*<sup>94</sup>,

mostraron que la condición óptima para la microencapsulación de las proantocianinas de jugo y semillas de uvas fue la mezcla 60% maltodextrina y 40% goma arábiga, lo que podría explicarse debido a que la maltodextrina y la goma arábiga forman interacciones químicas que facilitan la retención de las antocianinas. Según Shahidi y Naczki<sup>106</sup>, las antocianinas pueden formar complejos con polisacáridos cuando el catión flavilio interactúa con las dextrinas, previniendo de esta forma su transformación y formando enlaces estables. Al centrarse el análisis solo en el proceso de encapsulación, las mejores condiciones son aquellas donde se trabaja a 150 °C, lo cual coincide con lo obtenido por Nayak y Rastogi<sup>107</sup>, en el secado por aspersión de *Garcinia indica*, siendo la temperatura de entrada óptima los 150 °C.

Por último, se realizó el análisis integrado con relación a la capacidad antioxidante que mostraron los extractos, luego de ser sometidos a las diferentes condiciones de secado figura 9 C. En este sentido las mejores condiciones fueron la combinación 1-1 (40 °C, G40/MD60) y la 2-1 (150 °C, G40/MD60), entre las cuales no existe diferencias estadísticas significativas. Los extractos con la mezcla encapsulante de mayor cantidad de MD, resultaron ser los que presentaron mejor capacidad antioxidante. Este comportamiento resultó inverso a cuando se evaluó el contenido de fenoles totales (figura 9 A), pues en este caso, aunque la temperatura de 150 °C también fue la mejor, la mezcla con mayor cantidad de goma, logró los mejores resultados.

### **III.3.3 Análisis cromatográfico mediante CLAE-EM luego de realizar el secado por atomización**

De manera similar al estudio antes realizado en el epígrafe III.2.2, se procedió al análisis cromatográfico de los encapsulados obtenidos. En este caso se realizó una comparación entre el extracto con los correspondientes aditivos (secado con ayuda de un rotoevaporador), y los encapsulados obtenidos con iguales mezclas de encapsulantes. Paralelamente, se realizó la comparación entre las cuatro condiciones de secado utilizadas, buscando en todos los casos si hubo afectación química cualitativa de los extractos.

En el anexo 16 se presentan los cromatogramas obtenidos para las 4 longitudes de ondas evaluadas (250, 280, 330, 520 nm) de los ensayos M-1, (extracto con G40/ MD60 secado

por rotoevaporador) y de los experimentos de secado por atomización a las dos condiciones establecidas M-2 (temperatura de entrada 150 °C) y M-3 (temperatura de entrada 190 °C). Como se puede apreciar los cromatogramas obtenidos para las mezclas de igual composición y a la misma  $\lambda$  de absorción, son muy similares. Lo anterior sugiere que no ocurrieron cambios cualitativos luego de someterlos al secado por atomización, donde las temperaturas son muy elevadas en comparación con el extracto concentrado mediante el rotoevaporador.

Algo similar sucede cuando se analiza la otra mezcla de encapsulante (G60/MD40). Al parecer no hay cambios cualitativos cuando se compara el secado o concentración mediante rotoevaporador (M-4) con los dos secados mediante el *Spray dryer* (M-5 y M-6)( anexo 17).

Finalmente, se procedió a comparar, también mediante espectrofotometría UV, si al cambiar la mezcla encapsulante y someterla a secado por atomización, hubo cambios apreciables en la composición química cualitativa. Para tal análisis el anexo 18 muestra la superposición de los experimentos M-2, M-3, M-5 y M-6. Se puede apreciar que bajo una misma longitud de onda los cromatogramas resultan ser superponibles, lo que sugiere que los parámetros utilizados en el secado, parecen no provocar cambios químicos cualitativos en el extracto.

Para completar el análisis anterior, de manera análoga a como se realizó en el estudio de extracción, se efectuó la comparación entre los seis experimentos, pero en esta ocasión mediante la espectrometría de masas, en ambos modos de ionización. En los anexos 19 y 20 se observa que entre los cromatogramas del pico base obtenidos para un mismo modo de ionización y entre las muestras con similar composición de encapsulantes, no existen cambios cualitativamente apreciables.

Finalmente, se realizó la identificación de los compuestos de manera análoga a lo antes realizado para los extractos. El análisis se sustentó en el espectro UV-visible; la masa del ion molecular y los iones fragmentos referidos en la literatura, para extractos de los cálices de jamaica, utilizando similar método espectrométrico.

Dada la similitud existente entre las muestras se tomó como modelo la M-1 para demostrar si los compuestos presentes coinciden con los antes referidos para los extractos.

Los resultados permitieron llegar a la conclusión que, en el modo de ionización positivo, continúan siendo las señales más prominentes del cromatograma iónico principal las dos antocianinas: delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, las que estuvieron presentes en todos los experimentos. De igual manera se identificó, con señales muy débiles, los dos glicósidos de flavonoles miricetin-3-sambubiósido, quercetin-3-sambubiósido, lo que coincide con lo descrito en el anexo 13.

En el modo de ionización negativo se pudieron identificar los mismos compuestos antes referidos en los experimentos del 1 al 12 (anexo 14) resaltando la presencia de las antocianinas.

De dicho análisis se puede concluir que luego de someter el extracto, con sus correspondientes encapsulantes, al secado mediante atomización por *Spray Dryer*, no se evidencian cambios cualitativos que permitan establecer diferencias entre las muestras analizadas. Aparentemente, el usar una temperatura de entrada del extracto de 150 o 190 °C, no se afecta la composición química cualitativa del mismo; como tampoco se afecta con el uso de los dos tipos de combinaciones encapsulantes.

Trabajos posteriores estarán encaminados a la cuantificación de los metabolitos mayoritarios, haciendo uso de la CLAE-EM. De esta manera podría definirse la influencia de las condiciones de secado (temperatura y agentes encapsulantes) en la concentración en el producto final de los metabolitos de interés.

Haciendo un análisis integral, con el secado por rotoevaporador se puede apreciar que, tanto en el contenido de fenoles como en la actividad antioxidante, este método resulta ser el mejor. Lógicamente, el sentido de este experimento fue solo comparar cuánto podría afectarse químicamente el extracto, luego de ser sometido a las condiciones de deshidratación con el *Spray Dryer*.

Organolépticamente, en este último, el polvo que se obtiene ofrece ventajas en cuanto a su posible manipulación como ingrediente activo de otras formas farmacéuticas.

Adicionalmente, la mayor ventaja estaría dada en la estabilidad que dicho encapsulado les propiciaría a los metabolitos, sobre todo, de interés terapéutico, sin descartar su posible empleo como colorantes en la industria tanto farmacéutica como alimentaria.

Analizando solo el proceso de secado por atomización, las menores afectaciones se lograron al utilizar 150 °C en las tres variables analizadas, sin embargo, la mezcla G60/MD40, favoreció la presencia de compuesto fenólicos en general y de antocianinas en particular. La capacidad antioxidante resultó ser mejor cuando se empleó la combinación G40/MD60.

Con relación al estudio por CLAE-EM, se pudo apreciar que no existen cambios en el orden cualitativo, por lo que se recomienda realizar una cuantificación que brinde criterios más concluyentes respecto a la cantidad de los metabolitos bioactivos de mayor interés que serían las antocininas.

Se debe considerar que el estudio realizado es preliminar, donde las variables analizadas y los factores manipulados brindaron información valiosa para proseguir la investigación con un diseño experimental. Para darle continuidad a la investigación, se sugiere realizar el diseño experimental con posibles variables tales como: temperatura de entrada (nunca superior a 150 °C según los resultados actuales) y proporción del encapsulante en el extracto a secar (valores superiores a 3%, porcentaje no manipulado en la investigación actual).

Con relación a las variables independientes, se sugiere la determinación del rendimiento del proceso, la evaluación de la capacidad antioxidante por más de un método analítico, para darle mayor fiabilidad al resultado de la investigación y la influencia del proceso sobre el color, lo que tributaría de manera más directa, en este último caso, a su uso como colorante natural. Lógicamente, los estudios de estabilidad de tales extractos microencapsulados, sería otro aspecto en el que se trabajaría, una vez concluido el diseño experimental.

## CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

- Al evaluar la incidencia del disolvente de extracción y la relación temperatura/tiempo, en el proceso de extracción por maceración ultrasónica, se pudo determinar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH, sobre la cantidad de sólidos soluble (°Bx) extraídos, ni en la capacidad secuestradora de radicales libres, de los extractos elaborados.
- De los dos disolventes evaluados, el agua fue el que logró mayor rendimiento de extracción, independientemente de las condiciones de tiempo y temperatura. Con relación a la cuantificación de fenoles totales, la mayor extracción de estos se obtuvo al utilizar como menstuo la mezcla agua:EtOH (80:20), sin embargo, al realizar la extracción a 60 °C por un tiempo de 30 min., se logró mayor extracción de los pigmentos antocianinas.
- El análisis cromatográfico mediante CLAE-EM permitió la identificación, de las antocianinas delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, como los compuestos responsables de las señales más relevantes, bajo las condiciones de análisis; acompañadas de ácidos fenólicos y flavonoides glicosidados, como metabolitos minoritarios. Según las diferentes condiciones de extracción, la composición química de los extractos, desde el punto de vista cualitativo, no sufrió alteración.
- La mejor condición de extracción para los cálices de jamaica, fue el empleo de la mezcla agua:EtOH (80:20), una temperatura de 60 °C y por un tiempo de 30 min.
- Las menores afectaciones, al utilizar el secado por atomización, se obtuvieron con la temperatura de 150 °C en las tres variables fundamentales analizadas (fenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante).
- La mezcla encapsulante G60/MD40, favoreció la presencia de compuestos fenólicos totales y de antocianinas. La capacidad antioxidante resultó ser mejor cuando se empleó la combinación G40/MD60. El estudio cromatográfico por CLAE-EM,



demonstró que no existieron cambios cualitativos en ninguno de los experimentos realizados.

## CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos sirven como base para realizar un diseño experimental donde se analizarán variables como la temperatura de entrada (inferior a 150 °C) y la proporción de encapsulante en la mezcla (mayor al 3%).
- Cuantificar los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos de los cálices de *H. sabadariffa* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas.
- Se sugiere evaluar la capacidad antioxidante por otras técnicas, para sustentar su empleo en la terapéutica.
- Valorar la influencia del proceso de secado sobre el color del producto final, lo que tributaria de manera más directa, a su empleo como colorante natural.
- Realizar el estudio en el tiempo de los parámetros físico-químicos medidos a los microencapsulados, para evaluar la influencia de las condiciones de secado en la estabilidad del producto final.

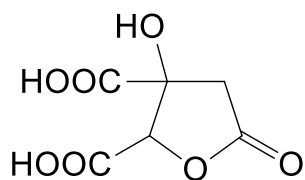
## ANEXOS

Anexo 1: Métodos y condiciones de extracción utilizados en los cálices de *H. sabdariffa* L.

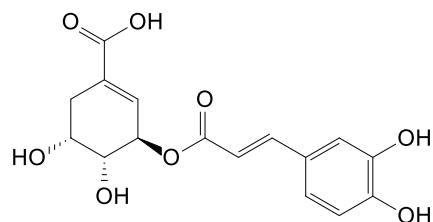
Métodos	Condiciones			Citas	
	Menstruo	Tiempo (min)	Temperatura (°C)		
Extracción por maceración dinámica asistida con ultrasonido	Etanol:agua (20,3:79,7)	30-35	11,5	21	
			36,5		
	Etanol:agua (79,7; 20,3)		11,5		
			36,5		
	Etanol:agua (50: 50)		3		
			45		
			24		
	Etanol		24		
Agua	24				
Extracción por maceración dinámica con calor	Acetona, Acetona: ácido fórmico 4%	25	60	108	
	Etanol:agua (80:20)	25	60	81	
	Etanol:agua (50:50) y (70:30%)	25	120	23	
					Etanol:HCl (85:15%)
					Etanol (96%)
	Etanol 40%	60	60	109	
		50	60		
		40	60		
	Etanol 80%	60	60		
		50	60		
	Agua	40	60		
		60	60		
50		60			
100		5	81		

		50	30	25
		25	120	23
Extracción por decocción	Agua	100	10	24
	Agua con 1% ácido fórmico	100	10	
	Metanol	64,7	10	
	Metanol con 1% ácido fórmico	64,7	10	

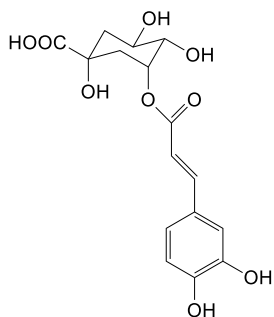
Anexo 2: Principales compuestos químicos identificados en cálices de *H. sabdariffa*



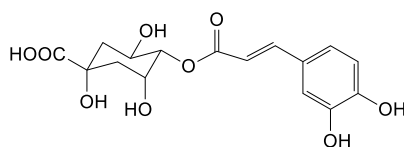
ácido hibiscus



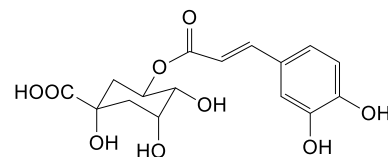
ácido 5-O-cafeoilshikímico



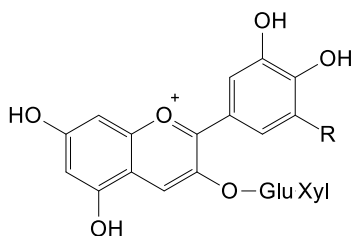
ácido 3-O-cafeoilquínico



ácido 4-O-cafeoilquínico

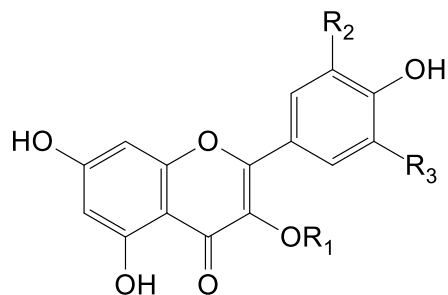


ácido 5-O-cafeoilquínico



R=OH delfinidina-3-sambubiósido

R=H cianidina-3-sambubiósido



R<sub>1</sub>= Glu-Xyl, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH

R<sub>1</sub>= Glu-Xyl, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>=H

R<sub>1</sub>= Rutinósido, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>=H

R<sub>1</sub>= Glu, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>=H

R<sub>1</sub>= Rutinósido, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>=H

R<sub>1</sub>= *p*-coumarilglucósido, R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>=H

Miricetin-3-sambubiósido

quercetin-3-sambubiósido

quercetin-3-O-rutinósido

quercetin-3-O-glucósido

kampferol-3-O-rutinósido

kampferol-3-(*p*-coumaril glucósido)

Anexo 3: Métodos de análisis utilizados para la identificación de compuestos químicos en los cálices de *H. sabdariffa*.

Extracto	Compuestos identificados	Método analítico
Acuoso	ácido clorogénico y sus isómeros, ácido cafeíco, delphinidina-3-O-sambubiósido, cianidina-3-O-sambubiósido, delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-glucósido, miricetina-3-arabino galactósido, quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido, kaempferol-3-O-rutinósido, ácido hidroxicatéquico, ácido hibiscus, ácido hidroxicítrico	HPLC-DAD ESI/MS <sup>77,83</sup> HPLC-DAD-ESI/MS <sup>82</sup> HPLC-DAD <sup>28</sup> HPLC/UV/VIS LC-MS <sup>25</sup>
Hidroalcohólico (80:20)	ácido clorogénico e isómeros, delphinidina-3-O-sambubiósido, cianidina-3-O-sambubiósido, delphinidina-3-O-glucósido, miricetina-pentosilhexósido, quercetina-pentosilhexósido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido	HPLC-DAD-ESI/MS <sup>81</sup>
Acuoso con 1% ácido fórmico	delphinidina-3-O-sambubiósido, cianidina-3-O-sambubiósido, delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-glucósido, quercetina, luteolina	HPLC/UV/VIS LC-MS <sup>24</sup> . HPLC <sup>110</sup>
Metanólico con 1% ácido fórmico		
Metanólico	delphinidina-3-O-sambubiósido, cianidina-3-O-sambubiósido, delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-glucósido, quercetina, luteolina	HPLC/UV/VIS LC-MS <sup>24</sup> . HPLC <sup>110</sup>

Anexo 4: Condiciones de secado por atomización de diferentes extractos vegetales

<b>Sustancia a secar</b>	<b>Temperatura de entrada °C</b>	<b>Temperatura de salida °C</b>	<b>Encapsulante</b>	<b>Cita</b>
<i>Opuntia ficus-indica</i>	110 - 140	-	Grenetina:maltodextrina	56
<i>Tropaeolum majus</i> L. (antocianinas)	150 , 160, 170	-	Maltodextrina	104
<i>Passiflora mollisima</i> Baley	170	90	Maltodextrina	111
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	150, 160, 170, 180, 190, 200, 210	80	-	87
	93,3, 99,1, 98,8, 103, 101,8, 111,2	-	-	112
	180	104	Goma de mezquite	89
	153, 176, 192, 198	-	Almidón:alginato	7
Jugo de piña y jamaica	140, 160, 180, 200	88	Maltodextrina	97
<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	140	78	Maltodextrina, goma arábica, almidón de tapioca	113

Anexo 5: Análisis estadístico t de student para los extractos

**t de student para los extractos según el factor menstuo**

Estadísticas de grupo					
Parámetro	Menstruo de extracción	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
PH	Agua:Etanol (8:2)	6	3,0050	,04550	,01857
	Agua	6	3,0250	,03507	,01432
Rendimiento	Agua:Etanol (8:2)	6	45,3533	2,33570	,95355
	Agua	6	46,5733	2,45519	1,00233
Fenoles totales (mgEAG/g ESJ)	Agua:Etanol (8:2)	6	113,6450	1,18866	,48527
	Agua	6	107,9600	4,90255	2,00146
DPPH (%)	Agua:Etanol (8:2)	6	21,4167	1,44518	,58999
	Agua	6	25,4600	4,79754	1,95859
Antocianinas (mg ECG/g ESJ)	Agua:Etanol (8:2)	6	65,2867	3,81632	1,55801
	Agua	6	65,7767	6,86458	2,80245
Grados brix	Agua:Etanol (8:2)	6	,6717	,00983	,00401
	Agua	6	,6683	,00408	,00167

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
PH	Se asumen varianzas iguales	1,047	,330	-,853	10	,414	-,02000	,02345	-,07225	,03225
	No se asumen varianzas iguales			-,853	9,391	,415	-,02000	,02345	-,07272	,03272
Rendimiento	Se asumen varianzas iguales	,128	,728	-,882	10	,399	-1,22000	1,38344	-4,30250	1,86250
	No se asumen varianzas iguales			-,882	9,975	,399	-1,22000	1,38344	-4,30354	1,86354
Fenoles totales (mgEAG/g ESJ)	Se asumen varianzas iguales	31,948	,000	2,760	10	,020	5,68500	2,05945	1,09626	10,27374
	No se asumen varianzas iguales			2,760	5,586	,035	5,68500	2,05945	,55374	10,81626
DPPH (%)	Se asumen varianzas iguales	5,904	,035	-1,977	10	,076	-4,04333	2,04552	-8,60104	,51437
	No se asumen varianzas iguales			-1,977	5,900	,096	-4,04333	2,04552	-9,06918	,98251
Antocianinas (mg ECG/g ESJ)	Se asumen varianzas iguales	2,353	,156	-,153	10	,882	-,49000	3,20642	-7,63435	6,65435
	No se asumen varianzas iguales			-,153	7,821	,882	-,49000	3,20642	-7,91354	6,93354
Grados brix	Se asumen varianzas iguales	1,125	,314	,767	10	,461	,00333	,00435	-,00635	,01302
	No se asumen varianzas iguales			,767	6,674	,469	,00333	,00435	-,00705	,01371



Anexo 5: Análisis estadístico t de student para los extractos (continuación)

**t de student para los extractos según el factor temperatura/tiempo**

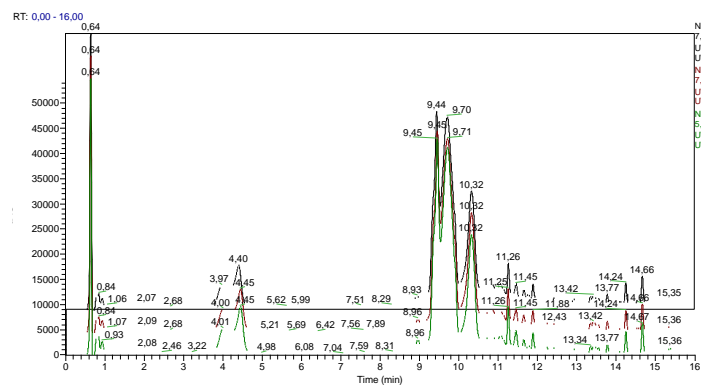
Estadísticas de grupo

Parámetro	Relación temperatura/tiempo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
PH	60/30	6	3,0383	,03125	,01276
	25/60	6	2,9917	,03545	,01447
Rendimiento	60/30	6	45,6667	2,35817	,96272
	25/60	6	46,2600	2,56989	1,04915
Fenoles totales (mgEAG/g ESJ)	60/30	6	112,6983	1,32498	,54092
	25/60	6	108,9067	5,87008	2,39645
DPPH (%)	60/30	6	21,9883	1,48784	,60741
	25/60	6	24,8883	5,25875	2,14687
Antocianinas (mg ECG/g ESJ)	60/30	6	68,8100	5,28802	2,15882
	25/60	6	62,2533	2,84145	1,16002
Grados brix	60/30	6	,6717	,00983	,00401
	25/60	6	,6683	,00408	,00167

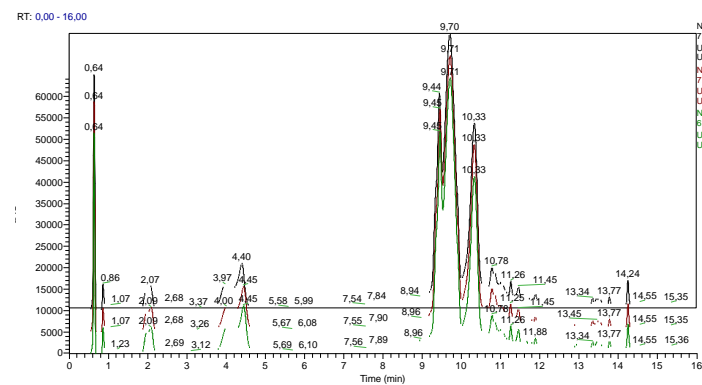
Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
PH	Se asumen varianzas iguales	,078	,786	2,419	10	,036	,04667	,01929	,00368	,08965
	No se asumen varianzas iguales			2,419	9,845	,036	,04667	,01929	,00359	,08975
Rendimiento	Se asumen varianzas iguales	,306	,592	-,417	10	,686	-,59333	1,42392	-3,76602	2,57936
	No se asumen varianzas iguales			-,417	9,927	,686	-,59333	1,42392	-3,76919	2,58252
Fenoles totales (mgEAG/g ESJ)	Se asumen varianzas iguales	58,560	,000	1,543	10	,154	3,79167	2,45674	-1,68229	9,26563
	No se asumen varianzas iguales			1,543	5,508	,178	3,79167	2,45674	-2,35230	9,93564
DPPH (%)	Se asumen varianzas iguales	6,323	,031	-1,300	10	,223	-2,90000	2,23115	-7,87130	2,07130
	No se asumen varianzas iguales			-1,300	5,795	,243	-2,90000	2,23115	-8,40649	2,60649
Antocianinas (mg ECG/g ESJ)	Se asumen varianzas iguales	,975	,347	2,675	10	,023	6,55667	2,45075	1,09606	12,01727
	No se asumen varianzas iguales			2,675	7,665	,029	6,55667	2,45075	,86197	12,25136
Grados brix	Se asumen varianzas iguales	1,125	,314	,767	10	,461	,00333	,00435	-,00635	,01302
	No se asumen varianzas iguales			,767	6,674	,469	,00333	,00435	-,00705	,01371

Anexo 6: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 1: Menstruo H2O; T(C)/t (min.) 25/60 (ensayos: 4, 5, 11)

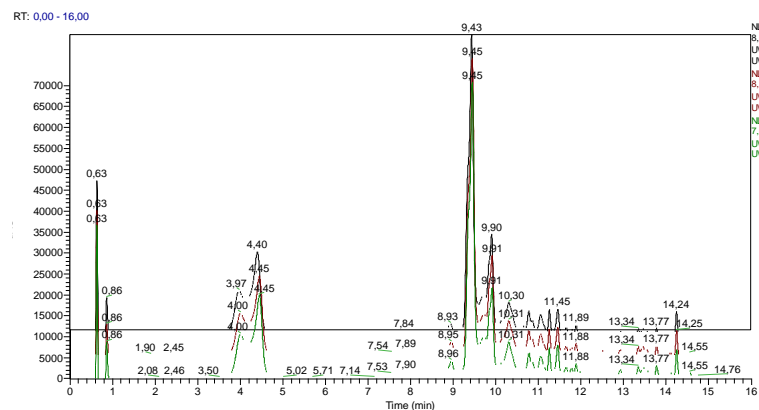
$\lambda=250$  nm



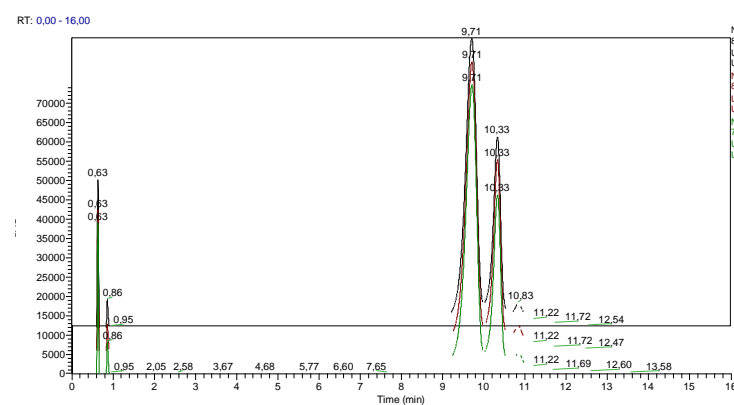
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

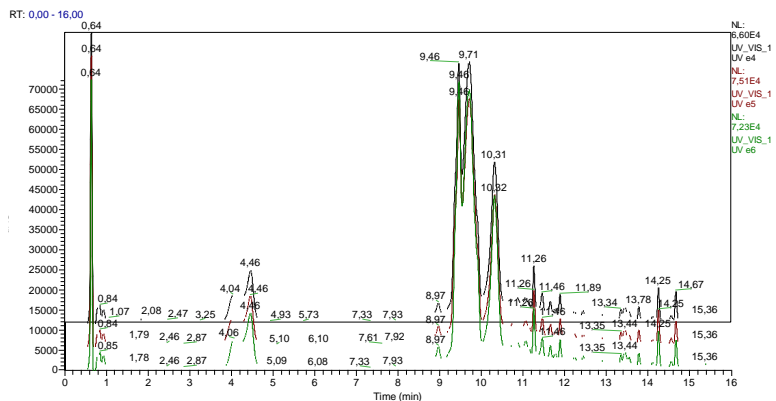


$\lambda=520$  nm

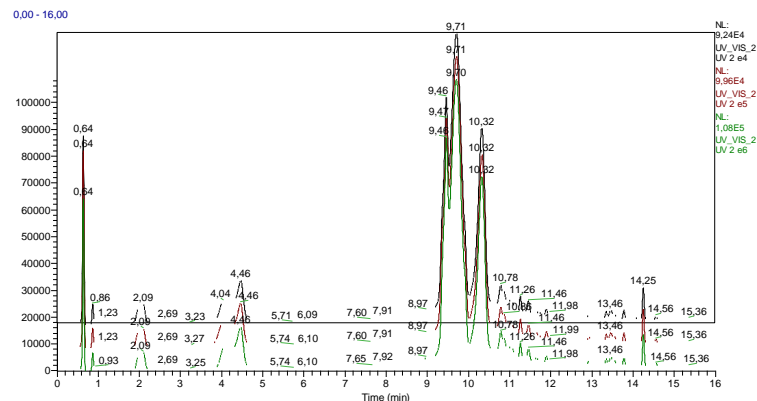


Anexo 7: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 2: Menstruo H<sub>2</sub>O:EtOH (80:20); T(°C)/t (min.) 25/60 (ensayos: 1, 8, 10)

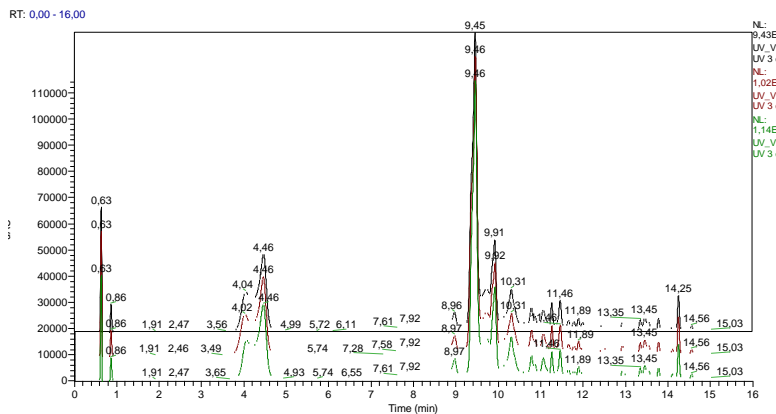
$\lambda=250$  nm



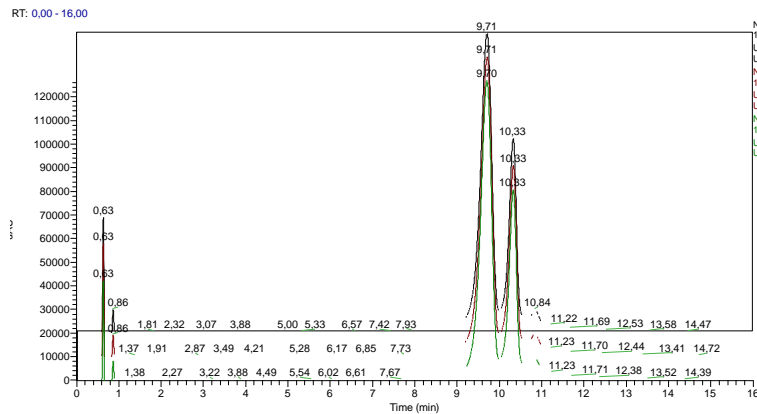
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

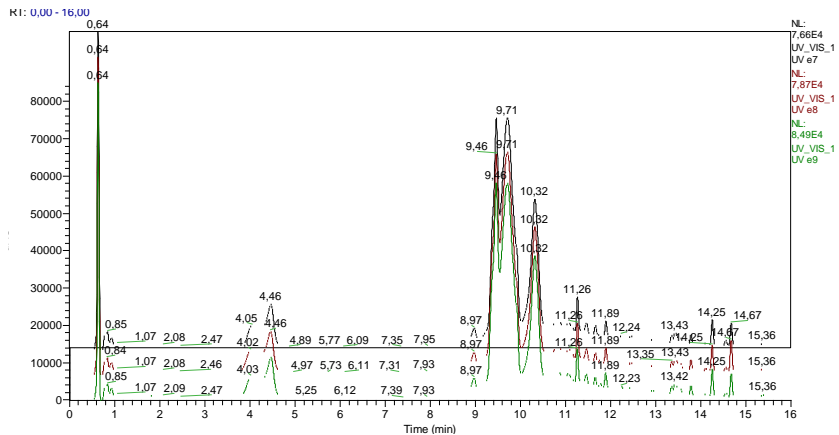


$\lambda=520$  nm

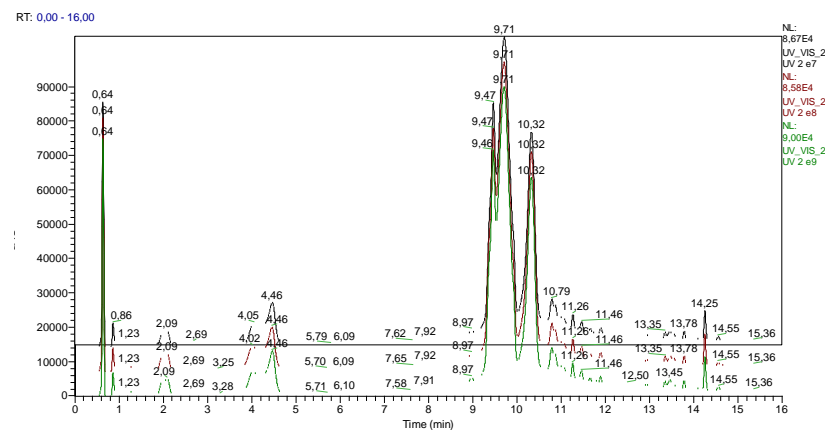


Anexo 8: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 3: Menstruo H<sub>2</sub>O; T(C)/t (min.) 60/30 (ensayos: 2, 7, 9)

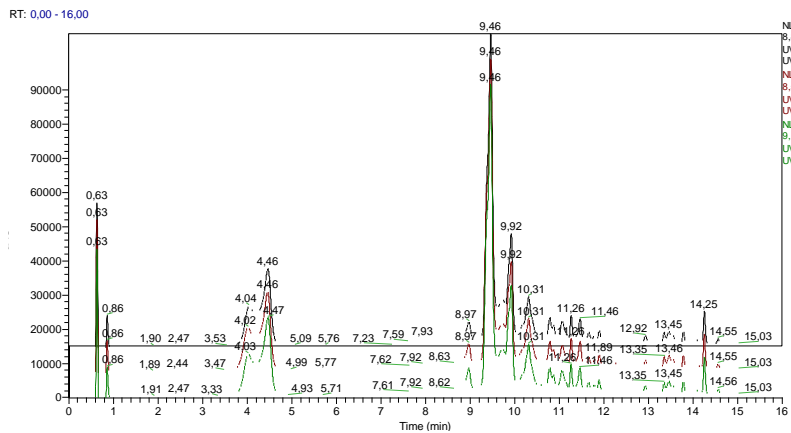
$\lambda=250$  nm



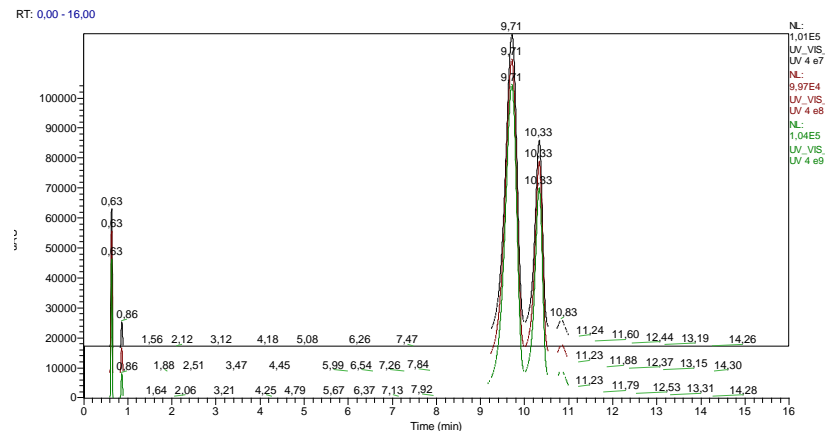
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

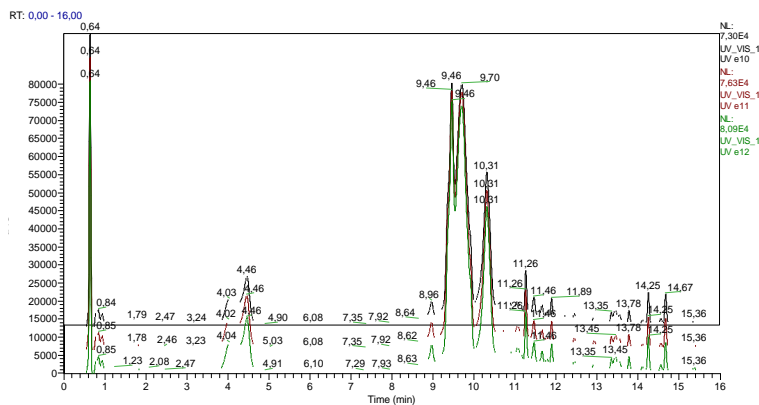


$\lambda=520$  nm

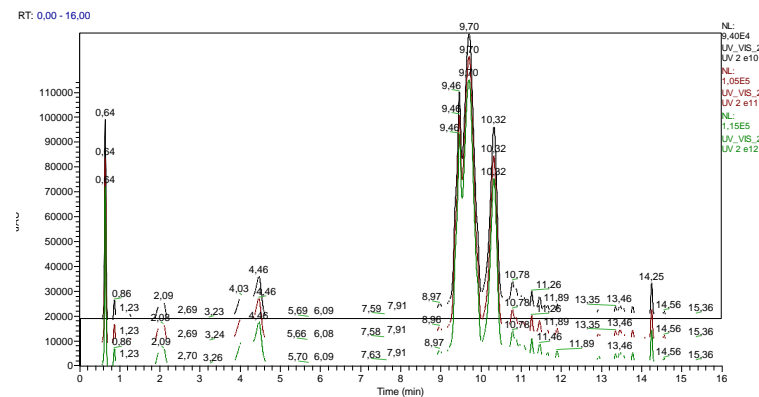


Anexo 9: Cromatogramas UV a diferentes longitudes de onda. Condición 4: Menstruo H<sub>2</sub>O:EtOH (80:20); T(°C)/t (min.) 60/30 (ensayos: 3, 6, 12)

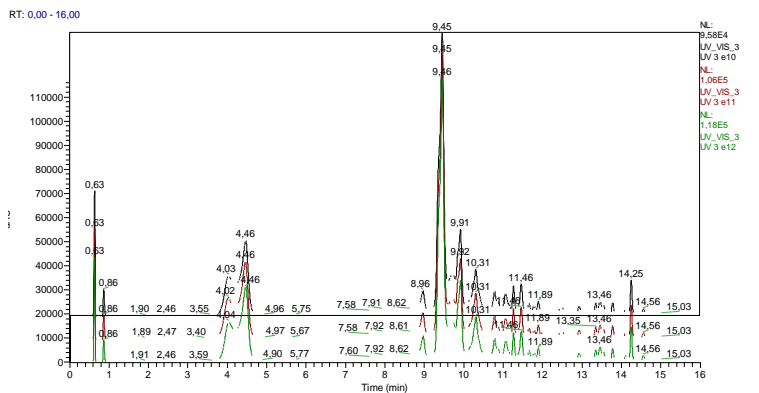
$\lambda=250$  nm



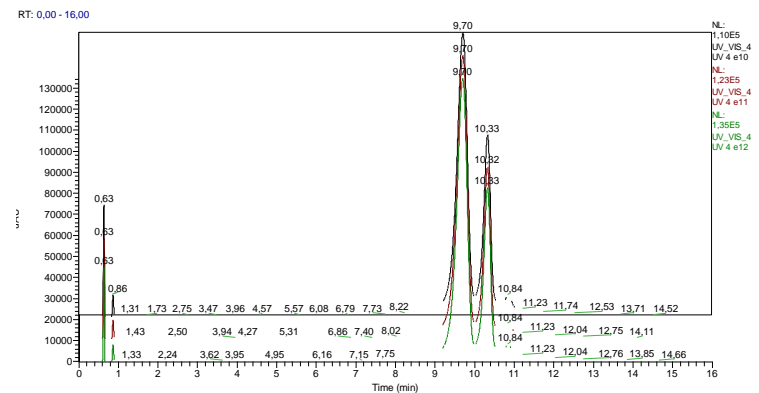
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

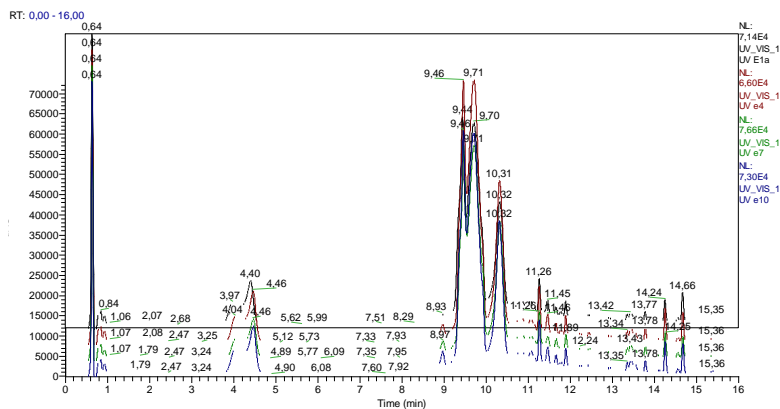


$\lambda=520$  nm

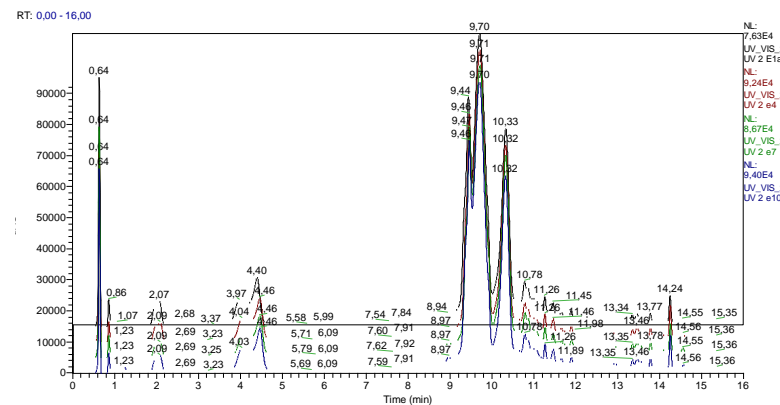


Anexo 10 Superposición de los cromatogramas obtenidos, a diferentes valores de longitud de onda, para un ensayo correspondiente a cada condición de extracción: experimento 4 (condición 1), 1(condición 2), 2 (condición 3), 3 (condición 4).

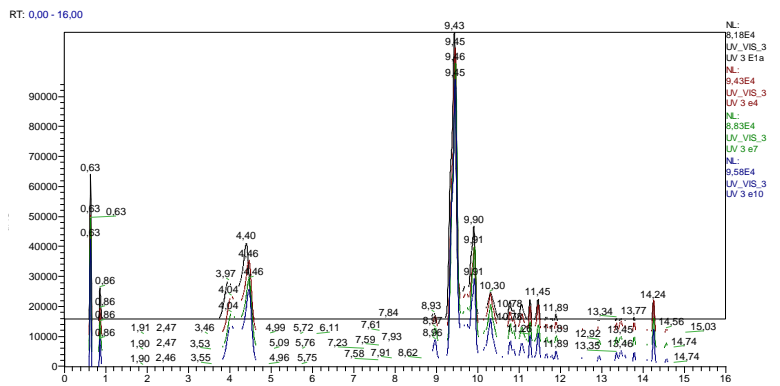
$\lambda=250$  nm



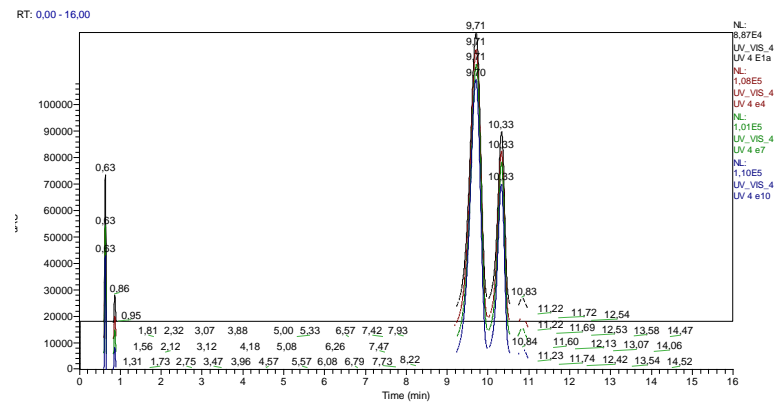
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm



$\lambda=520$  nm



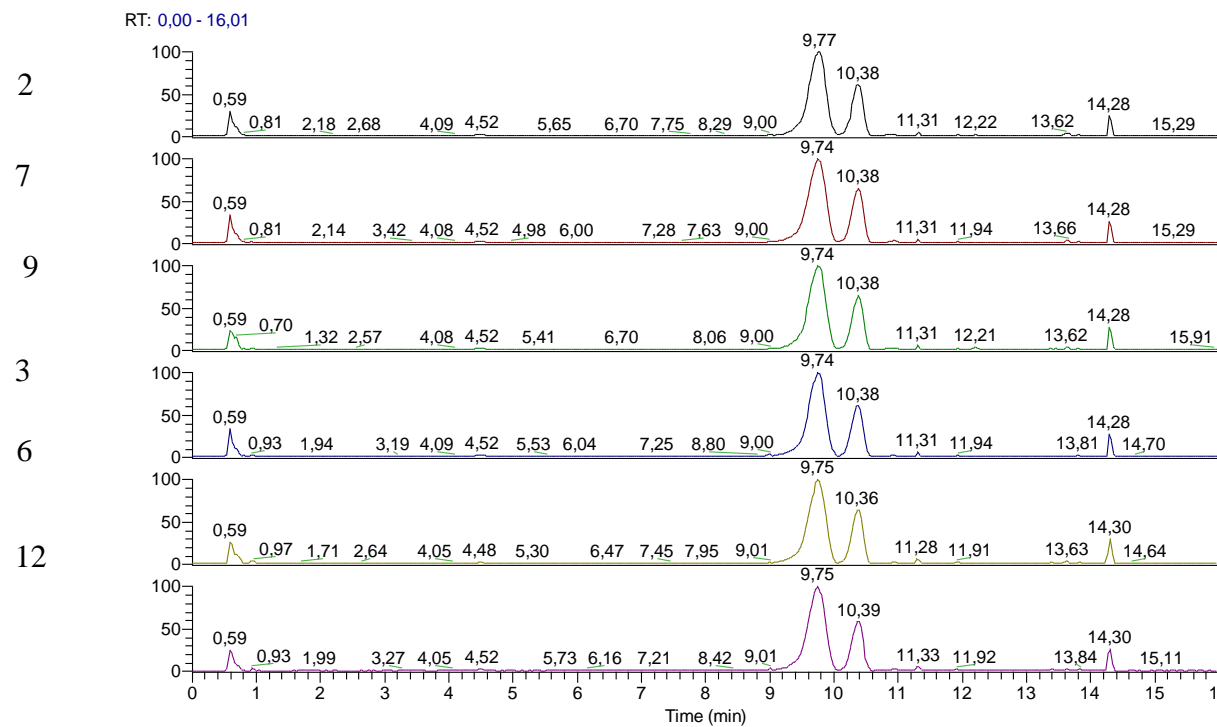
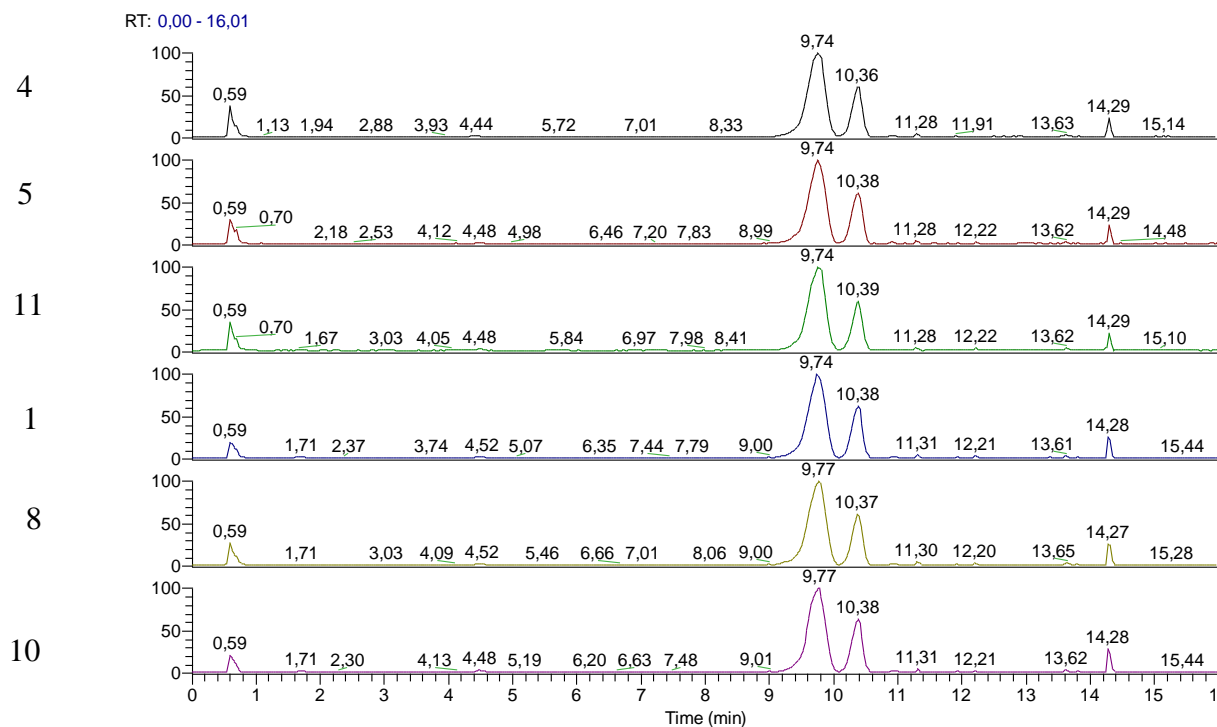
Nota:

- Condición 1.- Agua; 25 °C/60 min
- Condición 2.- Agua/EtOH (80:20); 25 °C/60 min
- Condición 3.- Agua; 60 °C/30 min
- Condición 4.- Agua/EtOH (80:20); 60 °C/30 min

# Anexo 11: Análisis de los espectros de masas en modo positivo (Full MS)

## Ensayo

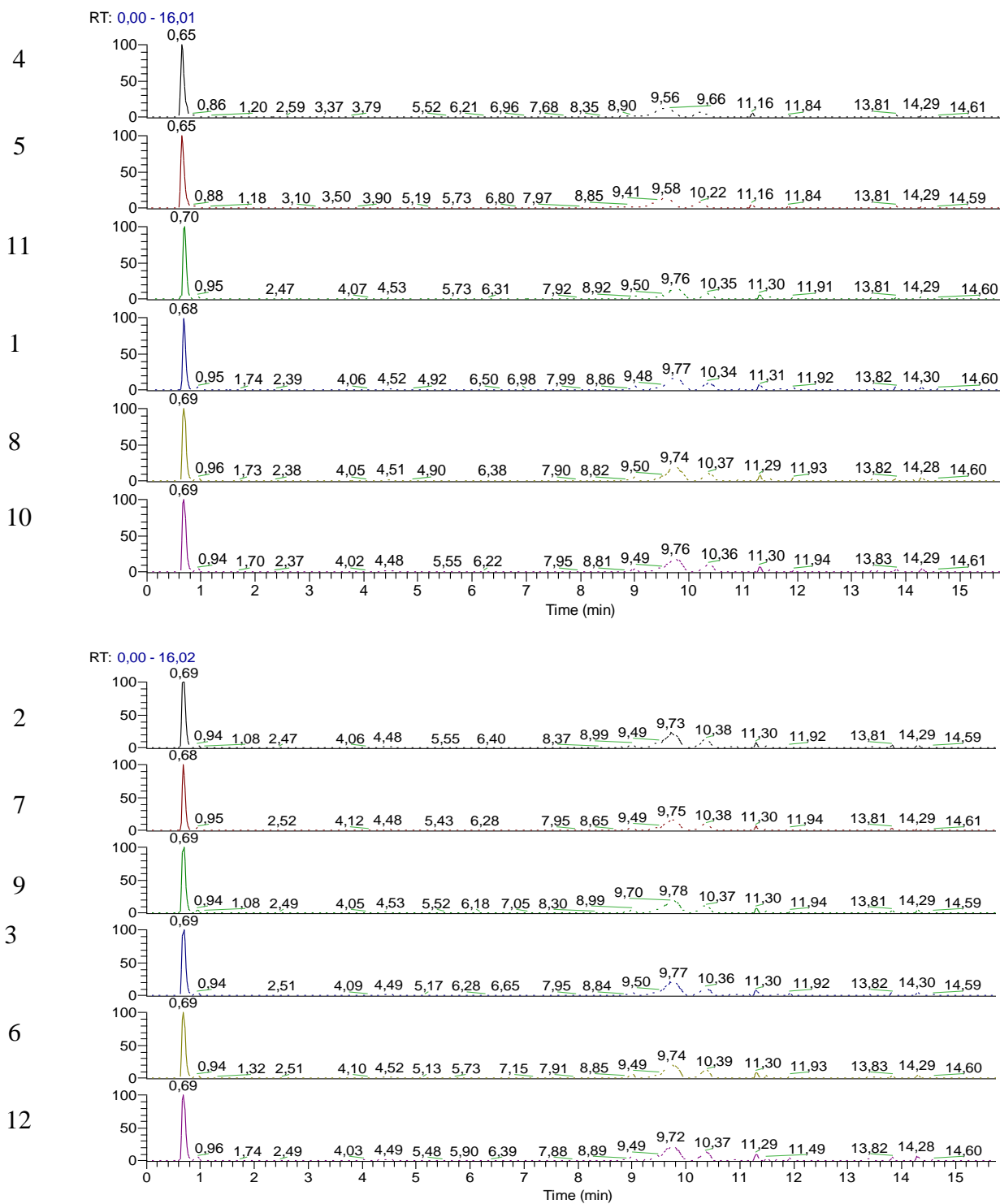
## Cromatogramas del pico base



## Anexo 12: Análisis de los espectros de masas en modo negativo (Full MS)

Ensayo

### Cromatogramas del pico base





Anexo 13: Compuestos identificados utilizando la CLAE con detector de arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo positivo

<b>Compuesto</b>	<b>tR (min)</b>	<b><math>\lambda</math> max</b>	<b>[M+H] (m/z)</b>	<b>MS<sup>2</sup></b>
ácido 5-cafeoilquínico <sup>80</sup>	4,45	323, 300 (h) <sup>80</sup>	355	163
delfinidina-3-sambubiósido <sup>35,80,81</sup>	9,76	524, 278 <sup>22,28,35,80-82</sup>	597	303
cianidina-3-sambubiósido <sup>35,80,81</sup>	10,37	519, 280 <sup>22,28,35,80-82</sup>	581	287
miricetina-3-sambubiósido <sup>80</sup>	11,30	-	613	319
quercetina-3-sambubiósido <sup>80</sup>	11,93	-	597	303

Anexo 14: Compuestos identificados en todos los experimentos (E1-E12) utilizando CLAE con detector de arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo negativo

Compuesto	tR (min)	$\lambda$ max	[M-H] (m/z)	MS <sup>2</sup>
ácido hibiscus <sup>28,35,80,82</sup>	0,72	-	189	127
ácido 5-cafeoilquínico <sup>80-82</sup>	3,5-4,5	300 (h), 327 <sup>79,80,82</sup>	353	191, 179, 173, 161, 135
ácido 3-cafeoilquínico <sup>80-82</sup>	3,5-4,5	300 (h), 327 <sup>79,80,82</sup>	353	191, 179, 173, 161, 135
ácido 4-cafeoilquínico <sup>80-82</sup>	9,99	300 (h), 327 <sup>79,80,82</sup>	353	191, 179, 173, 161, 135
ácido 5-O-coumaroilquínico	7,67	-	337	191, 173, 163, 119
ácido 3-O-coumaroilquínico	10	-	337	191,163,119
delfinidina-3-O-sambubiósido <sup>28,35,79,80</sup>	9,61	278,524 <sup>35,79</sup>	595	355,300,301
cianidina-3-O-sambubiósido <sup>35,79,80</sup>	10,35	281,518 <sup>35,79</sup>	579	339,285
miricetin-3-arabinogalactósido <sup>28,35</sup>	11,25	-	611	317, 316
ácido cafeoilshikímico <sup>22,79-82</sup>	11,60	-	335	161, 135
ácido cafeoilshikímico (isómero) <sup>22,79-82</sup>	11,80	-	335	161, 135
quercetina-3-sambubiósido <sup>28,35,80,81</sup>	11,86	-	595	463, 445, 300, 301
quercetina-3-O-rutinósido <sup>22,28,79-82</sup>	12,27	-	609	301
quercetina-3-O-glucósido <sup>22,35,80,81</sup>	12,42	-	463	301
kaempferol-3-O-rutinósido <sup>22,28,35,79-81</sup>	12,85	-	593	285

derivado de quercetina glicosidada <sup>22,35,79,81,82</sup>	14,15	-	609	463
kaempferol-3-(p-coumaroil glucósido) <sup>35</sup>	14,60	-	593	447, 285

h: La señal se visualiza como un hombro.

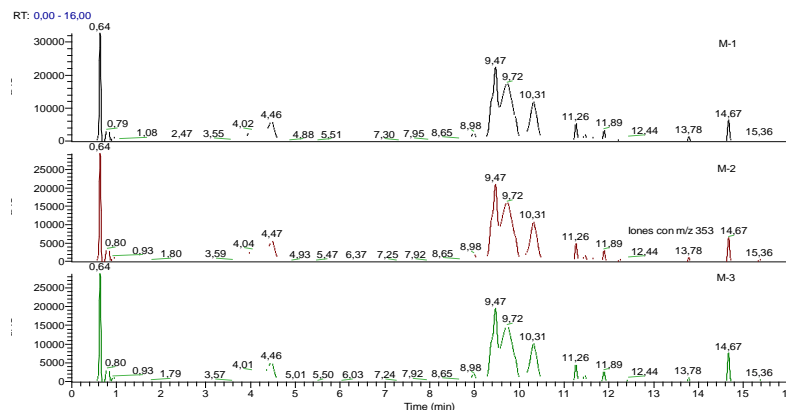
Anexo 15: Procesamiento estadístico de Anova multifactorial del proceso de microencapsulación

Pruebas de efectos inter-sujetos

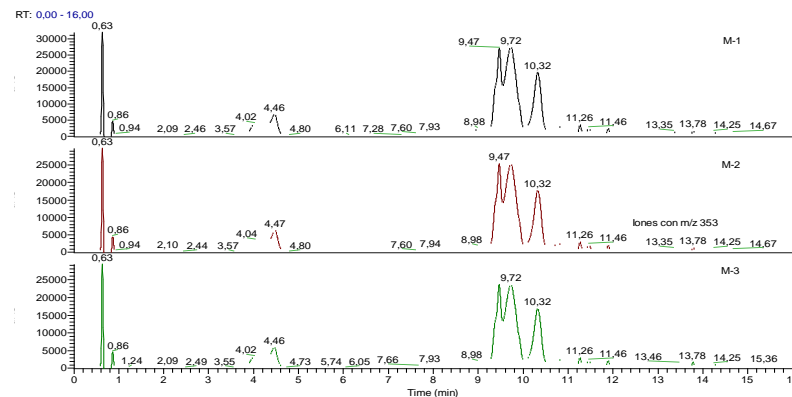
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	85,982 <sup>a</sup>	5	17,196	53,499	,000
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	3,784 <sup>b</sup>	5	,757	41,853	,000
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	174,429 <sup>c</sup>	5	34,886	30,724	,000
Interceptación	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	16666,694	1	16666,694	51850,764	,000
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	3671,102	1	3671,102	203010,272	,000
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	136891,793	1	136891,793	120560,530	,000
Temperatura	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	67,235	2	33,618	104,586	,000
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	2,799	2	1,399	77,388	,000
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	38,094	2	19,047	16,775	,000
Encapsulante	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	,504	1	,504	1,569	,234
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	,094	1	,094	5,192	,042
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	134,535	1	134,535	118,485	,000
Temperatura * Encapsulante	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	18,243	2	9,121	28,377	,000
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	,891	2	,446	24,647	,000
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	1,800	2	,900	,793	,475
Error	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	3,857	12	,321		
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	,217	12	,018		
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	13,626	12	1,135		
Total	Fenoles totales (mg EAG/g ES)	16756,533	18			
	Antocianinas (mg ECG/g ES)	3675,104	18			
	Actividad antioxidante (60 min.) (%)	137079,848	18			

Anexo 16: Cromatogramas UV del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-1, G40/MD60) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-2, temperatura de entrada 150 °C; M-3, temperatura de entrada 190 °C)

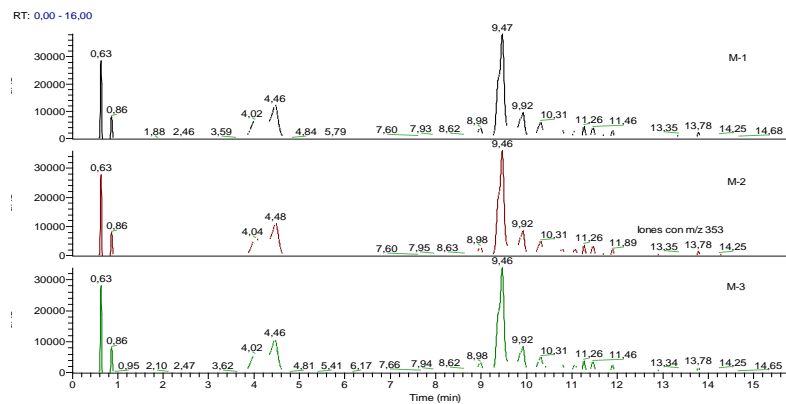
$\lambda=250$  nm



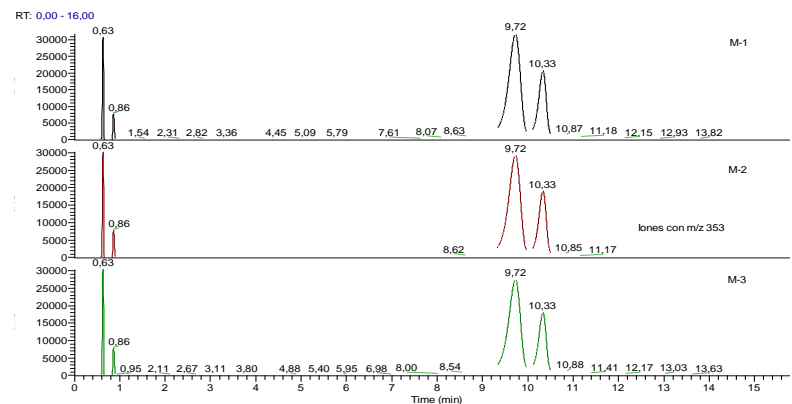
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

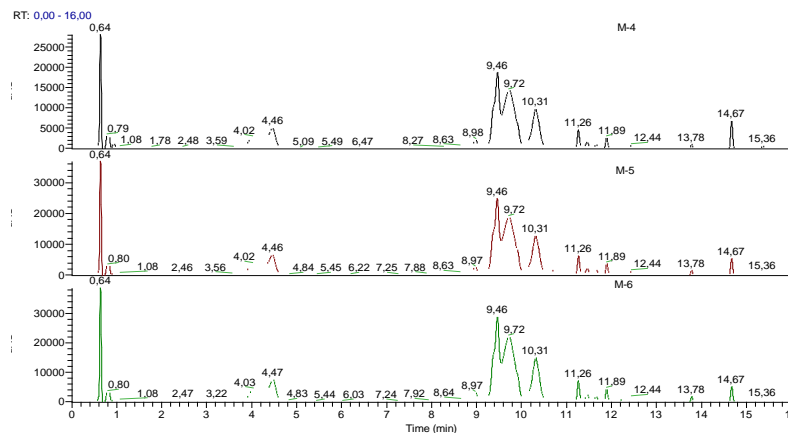


$\lambda=520$  nm

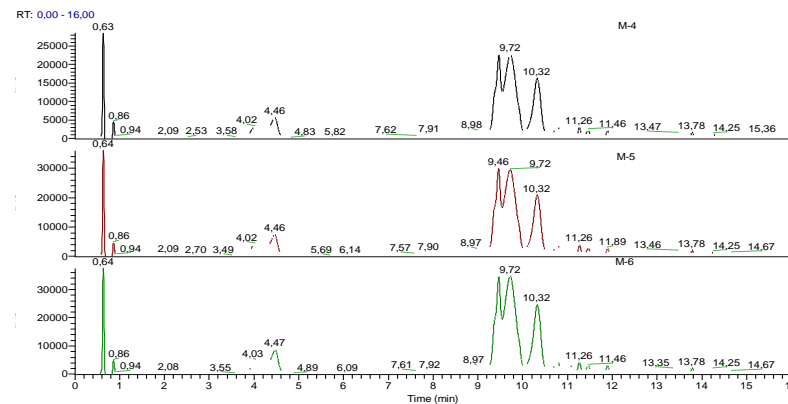


Anexo 17: Cromatogramas UV del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-4, G60/MD40) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-5, temperatura de entrada 150 °C; M-6, temperatura de entrada 190 °C)

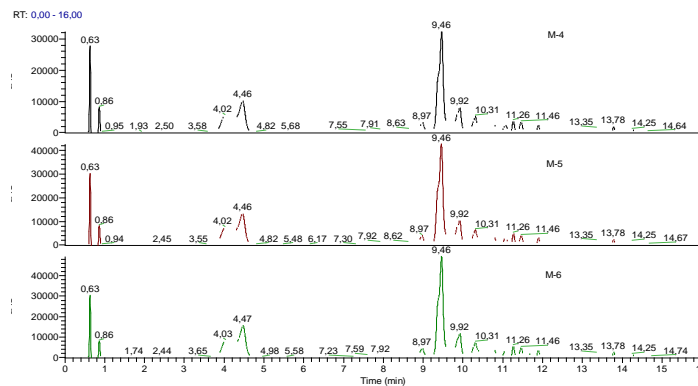
$\lambda=250$  nm



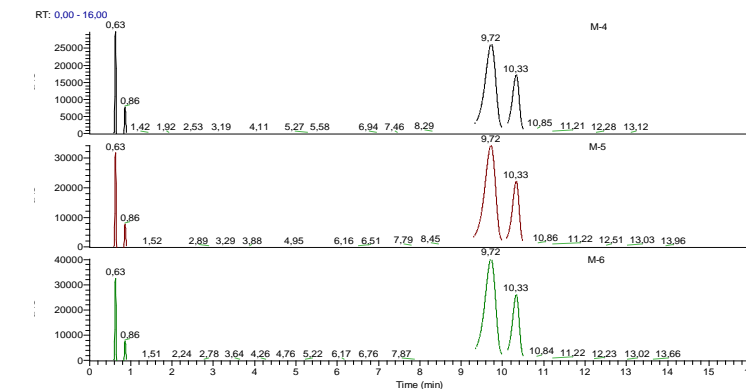
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

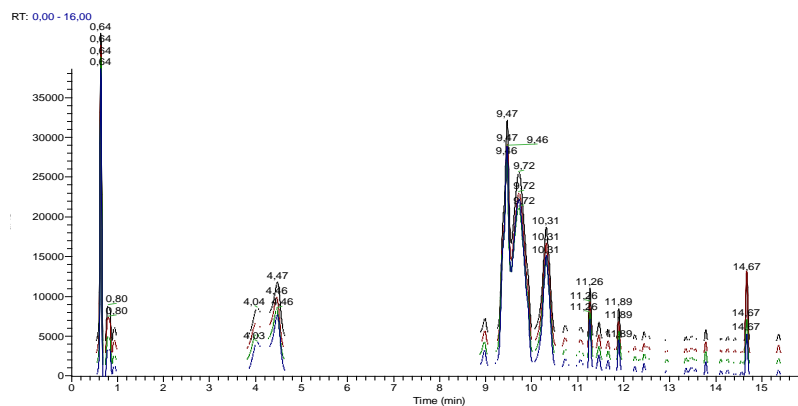


$\lambda=520$  nm

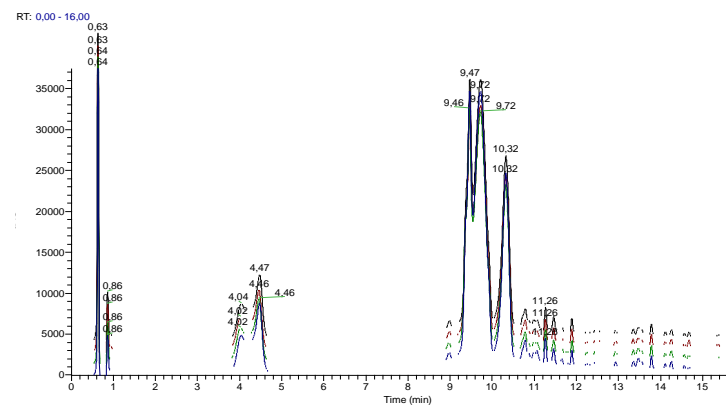


Anexo 18: Cromatogramas UV de las cuatro condiciones de secado por atomización (M-2, M-3, M-5 y M-6)

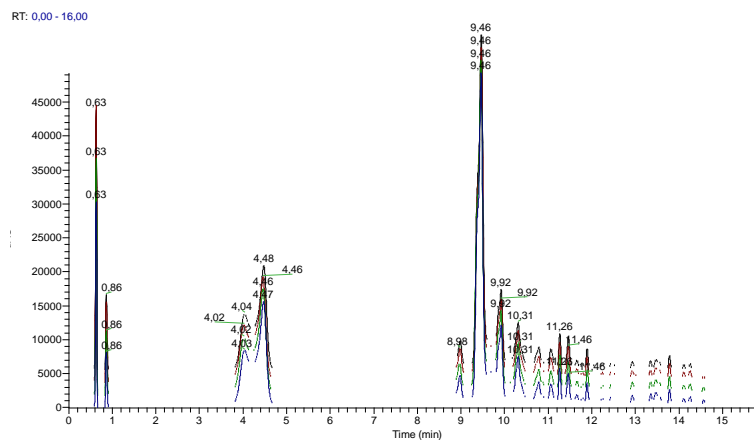
$\lambda=250$  nm



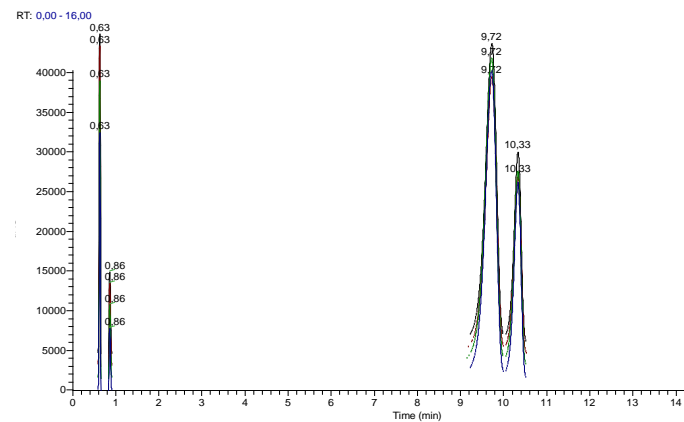
$\lambda=280$  nm



$\lambda=330$  nm

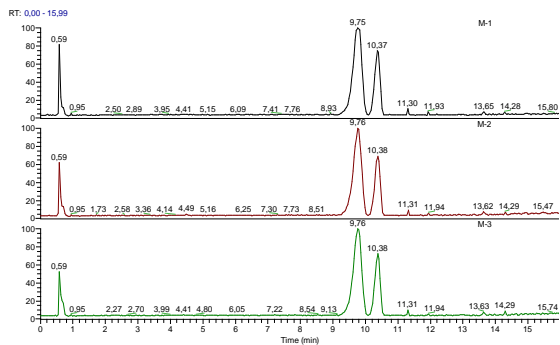


$\lambda=520$  nm

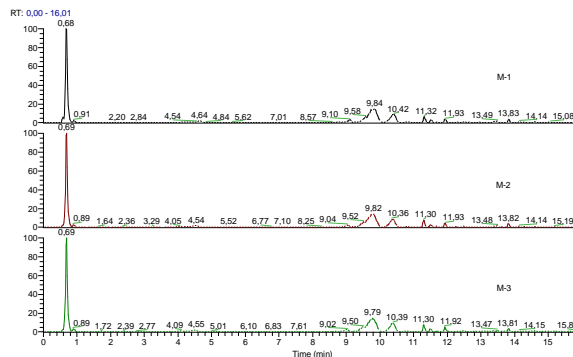


Anexo 19: Cromatograma del pico base del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-1, G40/MD60) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-2, temperatura de entrada 150 °C; M-3, temperatura de entrada 190 °C)

Modo positivo

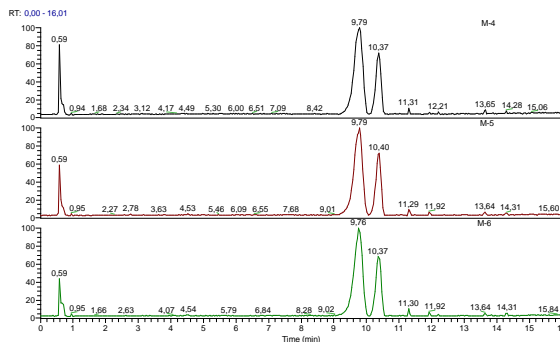


Modo negativo

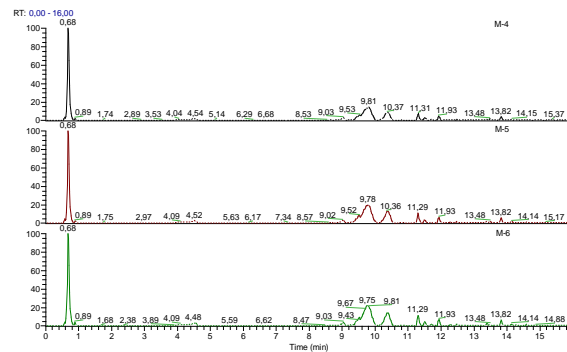


Anexo 20: Cromatograma del pico base del extracto con encapsulante secado por rotoevaporación (M-4, G60/MD40) y de las dos condiciones de secado por atomización (M-5, temperatura de entrada 150 °C; M-6, temperatura de entrada 190 °C)

Modo positivo



Modo negativo





## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Morton, J. *Fruits of warm climates*; Echo Point Books & Media: Miami, 1987.
- (2) Luna, V.; Romano, M.; Romero, C. Estrategia para el fortalecimiento de la producción de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Huaquechula, Puebla. *Rev. Educ.* **2017**, *15* (16), 140–153.
- (3) Williamson, E.; Driver, S.; Baxter, K. *Stockley's herbal medicines interactions: a guide to the interactions of herbal medicines, dietary supplements and nutraceuticals with conventional medicines*; Pharmaceutical Press, Ed.; 2009.
- (4) Vuarant, C. Optimización del proceso de secado de arándanos por infrarrojos, Universidad Politécnica de Valencia, 2013.
- (5) Aguilera-Otíz, M.; Reza-Vargas, M.; Chew-Madinaveita, R.; Meza-Velázquez, J. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Rev. Biotecnia* **2011**, *13* (2), 16–22.
- (6) Garzón, G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica Colomb.* **2008**, *13* (3), 27–36.
- (7) Sotomayor, M.; Carrasco, D. Optimización de extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) mediante secado por aspersión, Universidad Zamorano, 2017.
- (8) Martín-Villena, M.; Morales-Hernández, M.; Gallard- Lara, V.; Ruiz-Martínez, M. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm.* **2009**, *50* (1), 43–50.
- (9) Gleason, H.; Murdock, G. Africa: Its peoples and their culture history. In *McGraw-Hill*; New York, 1959; Vol. 36, pp 470–475. <https://doi.org/10.2307/410978>.
- (10) Mahadevan, N.; Kamboj, S.; Kamboj, P. *Hibiscus sabdariffa* Linn.—An overview. *Nat. Prod. Radiance* **2009**, *8* (1), 77–83.
- (11) Gautam R. A lesser known source of medicinal sort drinks and foods in India. *Nat. Prod. Radiance* **2004**, *3* (5), 338–342.
- (12) Bandaipheth, C.; Kennedy, J. *Encyclopedia of common natural ingredients used in*

- food, drugs and cosmetics*, 3era ed.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.05.002>.
- (13) Meza, C. Guía: flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) e (*Hibiscus cruentus* Bertol). *Asoc. para el Desarro. Eco-Sostenible (ADEES). Chicandega, Nicar.* **2012**, 25.
- (14) Da-Costa-Rocha, I.; Bonnlaender, B.; Sievers, H.; Pischel, I.; Heinrich, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* **2014**, *165*, 424–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>.
- (15) Cid-Ortega, S.; Guerrero-Beltrán, J. Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (11), 6859–6869. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9>.
- (16) Hidalgo-Villatoro, S.; Cifuentes-Reyes, W.; Ruano-Solís, H.; Cano-Castillo, L. Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en guatemala. *Agron. Mesoam.* **2009**, *20* (1), 101–109.
- (17) Cid-Ortega, S.; Guerrero-Beltrán, J. Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.). *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2012**, *6* (2), 47–63.
- (18) Martínez, J.; Bernal, H.; Cáceres, A. fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. *Rev Cuba. Plant Med* **2000**, *5* (3), 125.
- (19) Ortiz, S. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en calices de jamaica cultivada en el Estado de Monagas. *Rev. Voces Tecnol. y Pensam.* **2008**, *3* (1), 61–75.
- (20) Cai, Z.; Qu, Z.; Lan, Y.; Zhao, S.; Ma, X.; Wan, Q.; Jing, P.; Li, P. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chem.* **2016**, *197*, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.110>.
- (21) Pinela, J.; Prieto, M.; Pereira, E.; Jabeur, I.; Barreiro, M.; Barros, L.; Ferreira, I. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chem.* **2019**, *275*, 309–

321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118>.
- (22) Jabeur, I.; Pereira, E.; Barros, L.; Calhelha, R.; Soković, M.; Oliveira, B.; Ferreira, I. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073>.
- (23) Salazar-González, C.; Vergara-Balderas, F.; Ortega-Regules, A.; Beltrán, J. antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Cienc. e Investig. Agrar.* **2012**, *39* (1), 79–90. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202012000100006>.
- (24) Sindi, H.; Marshall, L.; Morgan, M. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chem.* **2014**, *164*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>.
- (25) Ifie, I.; Ifie, B. E.; Ibitoye, D. O.; Marshall, L. J.; Williamson, G. Seasonal variation in *Hibiscus sabdariffa* (roselle) calyx phytochemical profile, soluble solids and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Food Chem.* **2018**, *261*, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.052>.
- (26) Ali, B.; Wabel, N.; Blunden, G. Phytochemical, Pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review. *Phyther. Res.* **2005**, *19* (5), 369–375. <https://doi.org/10.1002/ptr.1628>.
- (27) Wong, P.; Yusof, S.; Ghazali, H.; Che-Man, Y. physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* **2002**, *32* (2), 68–73. <https://doi.org/10.1108/00346650210416994>.
- (28) Beltrán-Debón, R.; Alonso-Villaverde, C.; Aragonès, G.; Rodríguez-Medina, I.; Rull, A.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Camps, J.; Joven, J. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* **2010**, *17* (3–4), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.08.006>.
- (29) Fernández-Arroyo, S.; Rodríguez-Medina, I.; Beltrán-Debón, R.; Pasini, F.; Joven, J.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Quantification of the

- polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (5), 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>.
- (30) Lin, H.-H.; Chan, K.-C.; Sheu, J.-Y.; Hsuan, S.-W.; Wang, C.-J.; Chen, J.-H. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem.* **2012**, *132* (2), 880–891. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.057>.
- (31) Khafaga, E.; Koch, H.; El Afry, M.; Prinz, D. Stage of maturity and quality of karkadeh (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). *Angew. Bot.* **1980**, *54* (5), 287–318.
- (32) Alarcon-Aguilar, F.; Zamilpa, A.; Perez-Garcia, M.; Almanza-Perez, J.; Romero-Nuñez, E.; Campos-Sepulveda, E.; Vazquez-Carrillo, L.; Roman-Ramos, R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in msg mice. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114* (1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.020>.
- (33) Alarcón-Alonso, J.; Zamilpa, A.; Aguilar, F.; Herrera-Ruiz, M.; Tortoriello, J.; Jimenez-Ferrer, E. Pharmacological Characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (malvaceae) extract. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139* (3), 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.005>.
- (34) McKay, D.; Chen, C.-Y.; Saltzman, E.; Blumberg, J. *Hibiscus sabdariffa* L. Tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J. Nutr.* **2010**, *140* (2), 298–303. <https://doi.org/10.3945/jn.109.115097>.
- (35) Rodríguez-Medina, I.; Beltrán-Debón, R.; Molina, V.; Alonso-Villaverde, C.; Joven, J.; Menéndez, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to esi and ion trap ms. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (20), 3441–3448. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900298>.
- (36) Leung, A.; Foster, S. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, 3era ed.; Khan, I., Abourashed, E., Eds.; John Wiley & Sons,

Inc: New York, 2009.

- (37) Neuwinger, H. *Book African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications.*; Stuttgart: Medpharm Scientific Publication., 2000.
- (38) Carvajal, O.; Waliszewski, S.; Infanzon, R. M. Los usos y maravillas de la jamaica. *Rev. Divulg. Cient. y Tecnol. la Univ. Veracruzana* **2006**, *XIX*, 3.
- (39) Usoh, I.; Akpan, E.; Etim, E.; Farombi, E. Antioxidant actions of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite -induced oxidative stress in rats. *Pakistan J. Nutr.* **2005**, *4* (3), 135–141.
- (40) Akim, A.; Ling, L. C.; Rahmat, A.; Zakaria, Z. antioxidant and anti-proliferative activities of roselle juice on Caov-3, MCF-7, MDA-MB-231 and HeLa cancer cell lines. *African J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *5* (7), 957–965. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.207>.
- (41) Essa, M.; Subramanian, P. *Hibiscus sabdariffa* affects ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2007**, *4* (3), 321–325. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel087>.
- (42) Tseng, T.-H.; Kao, T.-W.; Chu, C.-Y.; Chou, F.-P.; Lin, W.-L.; Wang, C.-J. Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60* (3), 307–315. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00322-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00322-1).
- (43) Asagba, S.; Adaikpoh, M.; Kadiri, H.; Obi, F. Influence of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. petal on cadmium toxicity in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2007**, *115* (1), 47–58. <https://doi.org/10.1385/BTER:115:1:47>.
- (44) Márquez, V.; De la Rosa, C.; Rivero, C.; Medina, M. Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad Wistar. *Sci. Tech.* **2007**, No. 33, 377–381.
- (45) Reanmongkol, W.; Itharat, A. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces in experimental animals. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2007**,

- 29 (1), 29–38.
- (46) Ali, B.; Mousa, H.; El-Mougy, S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phyther. Res.* **2003**, *17* (1), 56–59. <https://doi.org/10.1002/ptr.1084>.
- (47) Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res. Int.* **2007**, *40* (9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
- (48) Ferrari, C.; Marconi, S.; De Aguirre, J. Effects of Spray-Drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Dry. Technol.* **2012**, *30* (2), 154–163. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.628429>.
- (49) Mahdavi, S.; Jafari, S.; Ghorbani, M.; Assadpoor, E. Spray-Drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. *Dry. Technol.* **2014**, *32* (5), 509–518. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.839562>.
- (50) Esquivel-González, B.; Ochoa, L.; Rutiaga-Quñones, O. Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Rev. Iberoam. Tecnol. Postcosecha* **2015**, *16* (2), 180–192.
- (51) Singleton, V.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1998**, *299* (1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- (52) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28* (1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- (53) Giusti, M.; Wrolstad, R. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Handb. Food Anal. Chem.* **2005**, *2–2*, 19–31. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>.
- (54) Servicio Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 2392. 2016.

- (55) Miranda-Martínez, M.; Cuéllar-Cuéllar, A. *Farmacognosia y productos naturales*; Editorial Félix Varela: La Habana, 2000.
- (56) Sharapin, N.; Rocha, L. M.; Pinzón S., R. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*; Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo, 2000.
- (57) Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. a review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- (58) Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, *8* (3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2).
- (59) Luque-García, J. .; Luque de Castro, M. . Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2003**, *22* (1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X).
- (60) Kähkönen, M.; Hopia, A.; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (8), 4076–4082. <https://doi.org/10.1021/jf010152t>.
- (61) Metivier, R.; Francis, F.; Clydesdale, F. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* **1980**, *45* (4), 1099–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07534.x>.
- (62) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.; Rodríguez, J.; Galán-Vidal, C. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- (63) Rousseau, R. W. *Handbook of separation process technology*; John Wiley & Sons, Inc: Estados Unidos, 1987.

- (64) Timberlake, C. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem.* **1980**, *5* (1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(80)90065-5).
- (65) Álvarez, A.; González, J.; Urquiola, A.; García, M.; Monteagudo, R. Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *Erythroxylum minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Rev. Cuba. Química* **2007**, *XIX* (1), 33–35.
- (66) Anokwuru, C.; Esiaba, I.; Ajibaye, O.; Adesuyi, A. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Res. J. Med. Plant* **2011**, *5*, 557–566. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.557.556>.
- (67) Hutchings, J. B. *Food color and appearance*; Springer US, 1999.
- (68) Salinas-Moreno, Y.; Zúñiga-Hernández, A.; Jiménez-De la Torre, L.; Serrano-Altamirano, V.; Sánchez-Feria, C. Color in calyxes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and their relationship with physicochemical characteristics of their aqueous extracts. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **2012**, *XVIII* (3), 395–407. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.08.038>.
- (69) Fu, L.; Xu, B.-T.; Xu, X.-R.; Qin, X.-S.; Gan, R.-Y.; Li, H.-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from south china. *Molecules* **2010**, *15* (12), 8602–8617. <https://doi.org/10.3390/molecules15128602>.
- (70) Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **2009**, *56* (11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- (71) Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **2006**, *99* (1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
- (72) Salazar-González, C.; Vergara-Balderas, F. T.; Ortega-Regules, A. E.; -Beltrán, J. antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Cienc. e Investig. Agrar.* **2012**, *39* (1), 79–90. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202012000100006>.



- (73) Miranda-Medina, A.; Hayward-Jones, P.; Carvajal-Zarrabal, O.; Ladrón, A.; Ramírez-Villagómez, Y.; Barradas-Dermitz, D.; Luna-Carrillo, G.; Aguilar-Uscanga, M. Optimization of *Hibiscus sabdariffa* L. (roselle) extraction parameters using response surface methodology. *Sci. Study Res.* **2018**, *19* (1), 53–62.
- (74) Guija, E.; Inocente, M.; Ponce, J.; Zarzosa, E. Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Med. (Barcelona)*. **2015**, *15* (1), 57–60.
- (75) Reyes, A.; Salinas, Y.; Ovando, M.; Arteaga, R.; Martínez, M. Analysis of phenolic acids and antioxidant activity of aqueous extracts of jamaica. *Agrociencia* **2015**, *49* (3), 277–290.
- (76) Andzi-Barhé, T.; Feuya-Tchouya, G. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.048>.
- (77) Formagio, A.; Ramos, D.; Vieira, M.; Ramalho, S.; Silva, M.; Zárata, N.; Foglio, M.; Carvalho, J. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian J. Biol.* **2015**, *75* (1), 69–76. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07413>.
- (78) Quideau, S. *Chemistry, biochemistry and applications*; Øyvind, A., Kenneth, M., Eds.; CRC Press: Boca Ratón, 2006.
- (79) Sinela, A.; Rawat, N.; Mertz, C.; Achir, N.; Fulcrand, H.; Dornier, M. Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chem.* **2017**, *214*, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>.
- (80) Piovesana, A.; Rodrigues, E.; Zapata, C. Composition analysis of carotenoids and phenolic compounds and antioxidant activity from *Hibiscus* calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Phytochem. Anal.* **2019**, *30* (2), 208–217. <https://doi.org/10.1002/pca.2806>.

- (81) Jabeur, I.; Pereira, E.; Caleja, C.; Calhelha, R.; Soković, M.; Catarino, L.; Barros, L.; Ferreira, I. C. Exploring the chemical and bioactive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces from Guinea-Bissau (West Africa). *Food Funct.* **2019**, *10* (4), 2234–2243. <https://doi.org/10.1039/C9FO00287A>.
- (82) Ramirez-Rodrigues, M.; Plaza, M.; Azeredo, A.; Balaban, M.; Marshall, M. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.* **2011**, *76* (3), C428–C435. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x>.
- (83) Diaz, Y.; Torres, L.; Serna, J.; Sotelo, L. Efecto de la encapsulación en secado por atomización de biocomponentes de pitahaya amarilla con interés funcional. *Inf. tecnológica* **2017**, *28* (6), 23–34. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600004>.
- (84) Arrazola, G.; Herazo, I.; Alvis, A. Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersion y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Inf. Tecnol.* **2014**, *25* (3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>.
- (85) Sharifi, A.; Niakousari, M.; Maskooki, A.; Mortazavi, S. Effect of spray drying conditions on the physicochemical properties of barberry (*Berberis vulgaris*) extract powder. *Int. Food Res. J.* **2015**, *22* (6), 2364–2370.
- (86) Olaya, C.; Castaño, M.; Garzón, G. Stability of anthocyanins from *rubus glaucus* benth and *Solanum betaceum* Cav. dark-red strain as affected by temperature, storage time and water activity. *Acta Biológica Colomb.* **2009**, *14* (3), 141–156.
- (87) Gonzalez-Palomares, S.; Estarrón-Espinosa, M.; Gómez-Leyva, J. F.; Andrade-González, I. Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **2009**, *64* (1), 62–67. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0103-y>.
- (88) Idham, Z.; Muhamad, I.; Sarmidi, M. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. *J. Food Process*

- Eng.* **2012**, *35* (4), 522–542. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x>.
- (89) Salazar-González, C.; Vergara-Balderas, F.; Guerrero-Beltrán, J. Evaluación de agentes antioxidantes de un extracto de flor de jamaica microencapsulado. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2009**, *3*, 14–25.
- (90) Selim, K.; Khalil, K.; Abdel-Bary, M.; Abdel-Azeim, N. Extraction, encapsulation and utilization of red pigments from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as natural food colourants. *J. Food Sci. ...* **2008**, *Special Vo* (Mar), 7–20.
- (91) Ersus, S.; Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by Spray Drier. *J. Food Eng.* **2007**, *80* (3), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009>.
- (92) Robert, P.; Gorena, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J.; Saenz, C. Encapsulation of Polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by Spray Drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45* (7), 1386–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>.
- (93) Silva, P.; Stringheta, P.; Teófilo, R.; Nolasco, I. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *J. Food Eng.* **2013**, *117* (4), 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039>.
- (94) Zhang, L.; Mou, D.; Du, Y. Procyanidins: extraction and microencapsulation. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 2192–2197. <https://doi.org/10.1002/jsfa>.
- (95) Burin, V.; Rossa, P.; Ferreira-Lima, N.; Hillmann, M.; Boirdignon-Luiz, M. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet sauvignon grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46* (1), 186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02486.x>.
- (96) Ochoa-Velasco, C.; Salazar-González, C.; Cid-Ortega, S.; Guerrero-Beltrán, J. Antioxidant characteristics of extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces encapsulated with mesquite gum. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54* (7), 1747–1756. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2564-1>.

- (97) Ahmad, O. Spray drying of roselle-pineapple juice effects of inlet temperature and maltodextrin on the physical properties. *2nd Int. Conf. Environ. Comput. Sci.* **2009**, 267–270. <https://doi.org/10.1109/ICECS.2009.91>.
- (98) Lopez, B.; Carvajal, L.; Millan, L. Establecimiento de condiciones de la mezcla de pulpa de banano (*Musa paradisiaca* L.) para someter a secado por aspersion. *Vitae* **2009**, 16 (3), 287–296.
- (99) Mishra, P.; Mishra, S.; Mahanta, C. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food Bioprod. Process.* **2014**, 92 (3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.003>.
- (100) Enriquez, A.; Prieto, E. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “jengibre” de la ciudad de Chanchamayo-Región Junín-Perú, Universidad Nacional de Trujillo, 2007.
- (101) Páramo, D.; Robles, V.; García, A.; Rodríguez, G. Efecto de La Adición de Goma Arábica y Maltodextrina Sobre Las Propiedades Del Ajo Deshidratado Por Aspersion. *V Congr. Iberoam. Tecnol. Postcosecha y Agroexportaciones* **2007**, 1061–1071.
- (102) Naddaf, L.; Avalo, B.; Oliveros, M. Spray-Dried natural orange juice encapsulants using maltodextrin and gum arabic. *Rev. Tec. la Fac. Ing. Univ. del Zulia* **2012**, 35 (1), 20–27.
- (103) Jiménez-Aguilar, D.; Ortega-Regules, A.; Lozada-Ramírez, J.; Pérez-Pérez, M.; Vernon-Carter, E.; Welti-Chanes, J. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, 24 (6), 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.012>.
- (104) Espinoza, C.; Choque, S.; Corilla, G.; Quispe, M. Extracción de antocianinas de flores de mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) y secado por atomización. *Agron. Colomb.* **2016**, 34, 641–644. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58493>.

- (105) López-Franco, Y.; Goycoolea, F.; Valdez, M.; Calderón de la Barca, A. Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial. *Interciencia* **2006**, *31* (3), 183–189.
- (106) Shahidi, F.; Naczk, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Ratón, 2003.
- (107) Nayak, C.; Rastogi, N. Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Dry. Technol.* **2010**, *28* (12), 1396–1404. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.482705>.
- (108) Beye, C.; Hiligsmann, S.; Tounkara, L.; Thonart, P. Anthocyanin content of two *Hibiscus sabdariffa* cultivars grown in senegal. *Agron. Africaine* **2017**, *29* (1), 63–68.
- (109) Paez-Cartaya, I.; Rodríguez-Sánchez, J.; Cruz-Viera, L. Optimización de la extracción de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. y su caracterización cromática. *Cienc. y Tecnol. Aliment.* **2018**, *28*, 17–21.
- (110) Salah, A.; Gathumbi, J.; Vierling, W. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (malvaceae) in rats. *Phyther. Res.* **2002**, *16* (3), 283–285. <https://doi.org/10.1002/ptr.846>.
- (111) Zapata, K.; Rojano, B.; Cortes, F. Efecto térmico del secado por aspersion sobre los metabolitos antioxidantes de la curuba larga (*Passiflora mollissima* Baley). *Inf. Technol.* **2015**, *26* (1), 77–84. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000100009>.
- (112) Al-Kahtaki, H.; Hassan, B. Spray drying of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *J. Food Sci.* **1990**, *55* (4), 1073–1076. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01601.x>.
- (113) Tonon, R.; Brabet, C.; Hubinger, M. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Res. Int.* **2010**, *43* (3), 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>.