UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *HIBISCUS SABDARIFFA* L., PARA LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE.

JARAMILLO GUANUCHE LUIS HERNAN
INGENIERO EN ALIMENTOS

VALAREZO CRUZ KRISTELL PAULETTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *HIBISCUS SABDARIFFA* L., PARA LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE.

JARAMILLO GUANUCHE LUIS HERNAN
INGENIERO EN ALIMENTOS

VALAREZO CRUZ KRISTELL PAULETTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *HIBISCUS SABDARIFFA* L., PARA LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE.

JARAMILLO GUANUCHE LUIS HERNAN
INGENIERO EN ALIMENTOS

VALAREZO CRUZ KRISTELL PAULETTE
INGENIERA EN ALIMENTOS

MATUTE CASTRO NUBIA LISBETH

MACHALA, 17 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA
2020

TRABAJO DE TITULACIÓN FINAL

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	2%	0%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	6%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 2%
Excluir bibliografía	Activo		

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, JARAMILLO GUANUCHE LUIS HERNAN y VALAREZO CRUZ KRISTELL PAULETTE, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HIBISCUS SABDARIFFA L., PARA LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 17 de diciembre de 2020

JARAMILLO GUANUCHE LUIS HERNAN
0706727963

VALAREZO CRUZ KRISTELL PAULETTE
0706346384

DEDICATORIA

A Dios, a nuestros padres y abuelitas, por ser nuestro pilar fundamental en nuestra formación profesional, por habernos acompañado, apoyado y motivado a seguir siempre adelante, y no desistir de alcanzar esta gran meta.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a nuestros padres por el gran apoyo que nos brindaron a lo largo de todo este camino.

A nuestra tutora, Ing. Nubia Matute, y cotutora Lcda. Mercedes Campo por su apoyo, dedicación y tiempo a nuestro trabajo.

RESUMEN

Los cálices de jamaica son muy utilizados en la elaboración tradicional de bebidas refrescantes, convirtiéndose en una fuente rica en compuestos bioactivos con potenciales efectos favorables en la salud. Actualmente, en la industria alimentaria existe un gran interés en los extractos obtenidos de sus cálices, debido a los compuestos y propiedades que poseen. En virtud de ello, la extracción asistida por ultrasonido, surge como una técnica rápida con ciertas ventajas para la recuperación de compuestos bioactivos.

En este contexto, el objetivo de la presente investigación es evaluar dos métodos de extracción de compuestos fenólicos en *Hibiscus sabdariffa* L., para la formulación de una bebida antioxidante. Se ensayaron dos métodos extracción a partir de los cálices secos y molidos, utilizando dos niveles de temperatura y tiempo, extracción asistida por ultrasonido (EAU) (30°C durante 30 y 60 minutos) y extracción por calor (EC) (100°C durante 15 y 30 minutos), planteándose 4 tratamientos.

En los extractos obtenidos, se cuantificó; el contenido fenólico total por el método Folin Ciocalteu, antocianinas monoméricas totales por pH diferencial y capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los ensayos de DPPH y FRAP; además, se analizó la cinética de captura de radicales libres por DPPH.

Se escogió la EAU para la obtención de la bebida y se plantearon 4 formulaciones, considerando como variables de estudio la concentración de cálices secos por volumen de agua (1.5 y 2 g/100 mL) y el porcentaje de inclusión de estevia (0,4 y 0,5%). Posteriormente, se realizó una evaluación sensorial con 29 jueces semientrenados para valorar la aceptación sensorial de las bebidas formuladas.

Como resultado del análisis químico, los tratamientos A (30°C/30 minutos EAU) y B (30°C/60 minutos EAU) obtuvieron el contenido fenólico total más alto, con valores de 96,65 ± 3,80 y 97,88 ± 1,88 mg EAG/g de extracto seco respectivamente, sin encontrarse diferencias

significativas (p>0,05) entre ellos. En cuanto a las antocianinas monoméricas totales, el tratamiento A logró el contenido más alto con un valor de 13,47 ± 0,34 mg ECG/L. La determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP mostró que el tratamiento A alcanzó el mayor poder reductor con 144,29 ± 4,82 mg TEAC/g extracto seco; en cambio, en el método DPPH el tratamiento B fue el que obtuvo el valor más alto con 57,24 ± 0,68 mg TEAC/g de extracto seco. En cuanto a la cinética de captura de radicales libres, todos los extractos mostraron un comportamiento de cinética intermedia, siendo los tratamientos A y B los que alcanzaron mayor porcentaje de captura.

Con respecto a los resultados del análisis sensorial de la bebida, las formulaciones de mayor preferencia fueron B05 (1,5 g/100 mL jamaica/0,5% estevia) y D08 (2 g/100 mL jamaica/0,5% estevia) al no existir diferencia significativa (p>0,05); consecuentemente se escogió D08 por ser la formulación de mayor concentración de cálices. Por tanto, se concluyó que el método de EAU, bajo las condiciones de estudio, consigue una mayor recuperación de compuestos bioactivos de interés en comparación al método de extracción por calor.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa* L., extracción asistida por ultrasonido, extracción por calor, antocianinas, DPPH, FRAP.

ABSTRACT

Jamaica's calyxes are widely used in the traditional elaboration of soft drinks, becoming a rich source of bioactive compounds with potential favorable effects on health. Currently, in the food industry there is great interest in the extracts obtained from its calyxes, due to the compounds and properties they possess. By virtue of this, the extraction assisted by ultrasound, arises as a fast technique with certain advantages for the recovery of bioactive compounds.

In this context, the objective of the present research is to evaluate two methods of extraction of phenolic compounds in *Hibiscus sabdariffa* L., for the formulation of an antioxidant drink. Two extraction methods were tested from the dried and ground calyxes, using two levels of temperature and time, ultrasound assisted extraction (UAE) (30°C for 30 and 60 minutes) and heat extraction (HE) (100°C for 15 and 30 minutes), considering 4 treatments.

In the obtained extracts, it was quantified; total phenolic content by Folin Ciocalteu method, total monomeric anthocyanins by differential pH and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), using DPPH and FRAP assays; besides, it was analyzed the kinetics of free radicals capture by DPPH.

It was chosen the UAE to obtain the drink and there were proposed 4 formulations, considering as study variables the concentration of dry calyxes by volume of water (1.5 and 2 g/100 mL) and the percentage of stevia inclusion (0.4 and 0.5%). Afterwards, it was carried out a sensory evaluation with 29 semi-trained judges to assess the sensory acceptance of the formulated drinks.

As a result of the chemical analysis, treatments A (30°C/30 minutes UAE) and B (30°C/60 minutes UAE) obtained the highest total phenolic content, with values of 96.65 ± 3.80 and 97.88 ± 1.88 mg GSD/g of dry extract respectively, without finding significant differences ($p>0.05$) among them. As regards total monomeric anthocyanins, treatment A achieved the highest content with a value of 13.47 ± 0.34 mg ECG/L. The determination of antioxidant

capacity by FRAP method showed that treatment A reached the highest reducing power with 144.29 ± 4.82 mg TEAC/g dry extract; on the contrary, in DPPH method, treatment B was the one that obtained the highest value with 57.24 ± 0.68 mg TEAC/g dry extract. Regarding the kinetics of free radicals capture, all the extracts showed a behavior of intermediate kinetics, being the A and B treatments the ones that reached the highest percentage of capture.

Regarding the results of the drink's sensory analysis, the formulations of greater preference were B05 (1.5 g/100 mL hibiscus/0.5% stevia) and D08 (2 g/100 mL hibiscus/0.5% stevia), since there was no significant difference ($p>0.05$); consequently, D08 was chosen for being the formulation with higher concentration of calyxes. Therefore, it was concluded that the UAE method, under the study conditions, achieves a higher recovery of bioactive compounds of interest in comparison to the heat extraction method.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., ultrasound assisted extraction, heat extraction anthocyanins, DPPH, FRAP.

INDICE

INTRODUCCIÓN 10

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 12

JUSTIFICACIÓN 13

OBJETIVOS 14

Objetivo general 14

Objetivos específicos 14

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO 15

1.1 *Hibiscus sabdariffa* L. 15

1.1.1 Generalidades 15

1.1.2 Taxonomía 15

1.1.3 Descripción botánica 16

1.1.4 Composición nutricional 16

1.1.5 Propiedades farmacológicas 16

1.1.6 Composición química 17

1.2 Métodos de extracción 18

1.2.1 Extracción asistida por ultrasonido 18

1.2.2 Extracción por calor 19

1.3 Bebidas de *H. sabdariffa* 20

1.4 Métodos de determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante 22

1.4.1 Método de Folin-Ciocalteu 22

1.4.2 Método DPPH (2.2-difenil-1-picril-hidrazilo) 22

1.4.3 Método FRAP (Poder antioxidante de la reducción férrica) 23

1.4.4 Método de pH diferencial 23

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 24

2.1 Ubicación de investigación 24

2.2 Materia prima 24

2.3 Preparación de la muestra 24

2.4 Determinación de algunos parámetros de calidad en los cálices secos 24

2.4.1 Determinación de humedad residual 24

2.4.2 Determinación de cenizas 25

2.4.3 Preparación de extracto seco 25

2.5 Análisis químico de los extractos 26

2.5.1 Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu 26

2.5.2 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH-TEAC). 27

2.5.3 Determinación del poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP-TEAC)31

2.5.4 Determinación de antocianinas monomérica totales por el método de pH diferencial 32

2.6 Formulación de la bebida. 33

2.7 Proceso de elaboración de la bebida 35

2.8 Evaluación sensorial de la bebida 35

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37

3.1 Parámetros de calidad en los cálices secos 37

3.2 Determinación de fenoles totales 38

3.3 Determinación de capacidad antioxidante 40

3.4 Determinación de antocianinas monoméricas totales 44

3.5 Formulación de la bebida 48

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES 52

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES 53

BIBLIOGRAFÍAS 54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *H. sabdariffa* 15
Tabla 2: Tratamientos de extracción..... 25
Tabla 3: Formulación de la bebida 34
Tabla 4: Diseño experimental de la bebida..... 34
Tabla 5: Composición física del cáliz de flor de jamaica 37
Tabla 6: Cuantificación de fenoles totales en los extractos acuosos de *H. sabdariffa*. 38
Tabla 7: Cuantificación de capacidad antioxidante 41
Tabla 8: Cuantificación de antocianinas monoméricas totales..... 45
Tabla 9: Codificación para la evaluación sensorial de la bebida 50
Tabla 10: Análisis de varianza (ANOVA) de las diferentes formulaciones..... 50
Tabla 11: Prueba LSD al 95% de confianza para las formulaciones..... 50
Tabla 12: Pruebas de múltiples rangos para puntuación por formulación..... 51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales 27
Figura 2: Curva de calibración para la cuantificación de capacidad antioxidante para ensayo DPPH. 29
Figura 3: Curva de calibración. Absorbancia vs DPPH (mM) 30
Figura 4: Curva de calibración de la capacidad antioxidante para ensayo FRAP 32
Figura 5: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida 35
Figura 6: Hoja de evaluación sensorial..... 36
Figura 7: Cinética de la captura de radicales libres de los extractos de *H. sabdariffa*. 43

INTRODUCCIÓN

El aumento de pruebas que relacionan la dieta con enfermedades crónicas como la obesidad, hipertensión, diabetes, cáncer, entre otras, han hecho de la inclusión de aditivos alimentarios de origen natural una de las tendencias de mayor trascendencia en la industria de alimentos. Por tanto, se han estudiado ampliamente los compuestos fenólicos, demostrando características bioactivas, entre las cuales están, sus capacidades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales y anti obesidad (Pimentel-Moral et al., 2018).

Según Cid & Guerrero, (2012) no se ha demostrado mediante estudios, los posibles efectos beneficiosos de productos hechos a partir de flor de jamaica y de sus extractos, salvo en las bebidas refrescantes. En este sentido, nuevos estudios mostrarían que los extractos acuosos y etanólicos de jamaica actuarían como antioxidantes, contribuyendo a combatir el cáncer, así como también, actuarían en favor de la disminución de afecciones crónicas como la diabetes mellitus, dislipidemias y la hipertensión (Cid & Guerrero, 2012). Los efectos positivos estarían relacionados con la concentración mayoritaria de antocianinas en los cálices de jamaica, así como de otros metabolitos de naturaleza fenólica como los flavonoides (Morales-Luna et al., 2019).

En su estudio sobre propiedades de la flor de jamaica, (Pacheco-Coello et al., 2019) concluyen, que actualmente *H. sabdariff*a es una de las opciones más accesibles para el tratamiento y prevención de varias enfermedades gracias a las múltiples propiedades que posee, y que su uso para la obtención de bebidas, la han convertido en una gran fuente de antioxidantes, destacándose sus efectos hipoglicemiantes, cardiovasculares e hipolipemiantes.

Los consumidores que han dado importancia a la salud, consecuentemente han promovido una tendencia en favor de la creación de nuevas bebidas utilizando componentes naturales que ayuden en la prevención de enfermedades como la obesidad o la diabetes (Flores-Aguilar &

Flores-Rivera, 2018); sin embargo, los métodos de extracción que emplean altas temperaturas o ciertos disolventes podrían no ser los adecuados (Pérez-Loredo et al., 2017).

La extracción por calor es uno de los métodos más usados en el obtención de extractos. La decocción y las infusiones de los cálices de jamaica, han sido métodos comunmente usados para la extracción de sus compuestos y la obtención de bebidas; sin embargo, este proceso de extracción implica el uso de temperaturas elevadas.

Si bien, desde un punto de vista de conservación, es convenientemente usado el tratamiento térmico, este puede causar efectos desfavorables en la estabilidad de los compuestos antociánicos, que al ser expuestos a temperaturas elevadas se deterioran (Maciel et al., 2018); de igual manera, se daría la pérdida de propiedades nutricionales y sensoriales, así como la disminución en el contenido de ácido ascórbico, carotenoides y compuestos fenólicos, influyendo en su bioactividad (Wu et al., 2018).

La extracción por sonicación o ultrasonido se ha empleado con éxito en la extracción de polifenoles, carotenoides, aromas y polisacáridos de matrices vegetales, tanto en plantas enteras como subproductos (Kumar et al., 2020). Es un tipo especial de onda sonora que provoca fenómenos físicos y químicos; la mejoría de la extracción obtenida mediante el uso de ultrasonidos es atribuida principalmente al efecto cavitacional, producido por el paso de ondas de ultrasonido en el disolvente (Anaya-Esparza et al., 2018).

Por todo lo antes mencionado, resulta importante aplicar un método para la obtención de sustancias bioactivas de interés, con el cual se logre una mayor extracción, pero a la vez, conservando sus propiedades bioactivas, en especial su efecto antioxidante. Considerando lo descrito anteriormente, esta investigación tiene como objetivo, evaluar dos métodos de extracción compuestos fenólicos a partir de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., para la formulación de una bebida con efecto antioxidante.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de los cálices de jamaica se obtienen extractos acuosos que, a su vez, son usados en la preparación de bebidas, donde para su elaboración se usan métodos como la decocción e infusión, que involucran el uso de altas temperaturas. Sin embargo, este procedimiento podría incidir en la pérdida de compuestos termolábiles presentes en los cálices, precisamente compuestos bioactivos de interés como las antocianinas. Esto significa que, si bien se lograría la obtención de una bebida, presumiblemente la concentración de dichos compuestos se vería afectada y, por lo tanto, la actividad biológica de los mismos dentro de la bebida sería menor.

Debido al procesamiento de los alimentos, se disminuiría en gran medida la concentración de los antioxidantes hallados naturalmente en ellos (Flores-Martínez et al., 2016). Considerando esto, en la elaboración de bebidas con características funcionales, el procesamiento sería un factor que puede afectar las cualidades de las sustancias bioactivas presentes y provocar su disminución. Por lo tanto, resulta importante evaluar otros métodos de extracción, como la asistida por ultrasonido frente al método tradicional de extracción por calor, a fin de determinar el que logra una mayor obtención de compuestos bioactivos, para la formulación de una bebida con características antioxidantes.

JUSTIFICACIÓN

Entre las aplicaciones de la flor de jamaica, la elaboración de bebidas refrescantes a partir de sus extractos acuosos es una de las más frecuentes. Referente a esto existen estudios donde se ha evaluado distintas variedades de jamaica (roja obscura, roja, amarilla), aportes nutrimentales, proceso de elaboración y los compuestos bioactivos, principalmente antocianinas (Cid & Guerrero, 2012).

La aplicación de los extractos concentrados de jamaica en la industria alimentaria y farmacéutica, ha permitido que los cálices deshidratados de donde se obtienen, tengan un gran valor comercial como materia prima. (Galicia-Flores et al., 2008).

Así mismo, la jamaica tiene un gran potencial en la industria alimentaria, debido a característica como su coloración rojo brillante y su leve sabor ácido. Estos atributos obedecen a lo demandado y aceptado por los consumidores en productos que, aparte de poseer un sabor agradable, también brinden beneficios a la salud (Galicia-Flores et al., 2008).

En el proceso para la obtención de compuestos bioactivos de frutas y vegetales, la extracción es el paso más importante (Yang et al., 2011). En tal sentido, evaluar métodos de extracción con el que se puedan recuperar la mayor cantidad de metabolitos de interés, como compuestos fenólicos y antocianinas presentes en los cálices de jamaica, sería primordial para la obtención de una bebida.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar dos métodos de extracción de compuestos fenólicos en *Hibiscus sabdariffa* L, para la formulación de una bebida antioxidante.

Objetivos específicos

- Determinar las mejores condiciones para la extracción de compuesto fenólicos a partir de los cálices secos de *H. sabdariffa*.
- Formular una bebida de *H. sabdariffa*, con inclusión de estevia, que posea capacidad antioxidante.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 *Hibiscus sabdariffa* L.

1.1.1 Generalidades

La jamaica también conocida como roselle, acedera roja o karkade, es una planta o arbusto tropical correspondiente a la familia *Malvaceae* (Borrás-Linares et al., 2015). Es una planta que se ha cultivado con fines alimentarios y médicos en Asia, África y en varias regiones de América del Sur (Mojica et al., 2012). Entre las diversas variedades *de Hibiscus,* se distinguen, *Hibiscus* de la variedad *altissima* e *Hibiscus* variedad *sabdariffa,* por ser las mayormente introducidas (Singh et al., 2017).

Sus cálices son la parte más aprovechada de la planta. En países como México, los cálices son usados en la preparación de productos tradicionales como bebidas refrescantes, mermeladas, licores, jaleas, harinas para galletas, entre otros (Cid & Guerrero, 2015). Sin embargo, su uso más común es en la elaboración de té, bebidas calientes o frías y bebidas fermentadas, siendo tal vez, el motivo por el cual sus extractos acuosos son principalmente estudiados (Izquierdo-Vega et al., 2020).

1.1.2 Taxonomía

Tabla 1: *Clasificación taxonómica de H. sabdariffa*

Clasificación científica	
Reino	*Plantae*
Subreino	*Viridiplantae*
División	*Tracheophyta*
Clase	*Magnoliopsida*
Orden	*Malvales*
Familia	*Malvaceae*
Género	*Hibiscus L.*
Especie	*Hibiscus sabdariffa* L.

Fuente: (*ITIS*) *Integrated Taxonomic Information System*

1.1.3 Descripción botánica

La planta crece a una altura aproximada de 3,5 m y su raíz es axonomorfa penetrante. Su tallo es cilíndrico liso o semi liso, comúnmente de tono verdoso oscuro a rojo. Sus hojas miden entre 7,5 y 12,5 cm de largo y son alternadas, de coloración verde con venaciones rojizas y pecíolos largos o pequeños (Shruthi et al., 2017).

A medida que las flores maduran, el cáliz de color rojo, que consta de cinco sépalos con un collar o calículo, crece y encierra una cápsula aterciopelada (Nadlene et al., 2016). La cápsula es ovoide, puntiaguda y de abundante vellosidad, con aproximadamente 30 a 40 semillas (Islam, 2019). Eventualmente, la cápsula se vuelve de color marrón y se abre (Nadlene et al., 2016).

Tanto el cáliz y el calículo son carnosos y quebradizos, con una coloración que va desde rojo brillante a violeta oscuro, siendo más claro en la parte interna de la base (Castañeda & Cáceres, 2014).

1.1.4 Composición nutricional

Nutricionalmente los cálices frescos difieren en su composición a causa de factores como la variedad genética, condiciones ambientales de cultivo y prácticas postcosecha (DaCosta-Rocha et al., 2014). No obstante, tanto las hojas como los cálices, son fuente importante de compuestos nutricionales, tales como fibra, lípidos, proteínas, carbohidratos, minerales y aminoácidos (Ariza Flores et al., 2017; Balarabe, 2019).

1.1.5 Propiedades farmacológicas

Varios estudios han confirmado que los cálices de *H. sabdariffa* poseen gran variedad de compuestos. Las antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos orgánicos, son los compuestos bioactivos principales y a los que comúnmente se les atribuye efectos terapéuticos (Ojulari et al., 2019). En este aspecto, se han reportado propiedades antioxidantes,

hipocolesterolemiantes, antihipertensivas, anticancerígenas, antidiabéticas, antimicrobianas y antiinflamatorias (Riaz & Chopra, 2018).

Owoade et al., (2019) concluyeron que, la mayoría de propiedades farmacológicas de *H. sabdariffa* son producto de la cantidad de fitoquímicos que posee y que, por lo tanto, complementar la alimentación con sus extractos tendría beneficios en la reducción del riego a desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, así como padecimientos neurológicos.

1.1.6 Composición química

Se ha comprobado por diferentes investigaciones que los cálices de jamaica son una fuente rica en flavonoides, particularmente antocianinas; ácidos fenólicos y ácidos orgánicos (Izquierdo-Vega et al., 2020).

Compuestos fenólicos

Entre los ácidos fenólicos encontrados en extractos de *H. sabdariffa*, el principal es el ácido clorogénico y sus isómeros I y II (Beltrán-Debón et al., 2010), además, otros ácidos como el ácido cafeico, ferúlico (Oboh et al., 2018; Owoade et al., 2016), ácido-3-cafeoilquínico, ácido-4-cafeoilquínico, ácido-5-cafeoilquínico, ácido-3-p-cumaroilquínico, ácido-5-p-cumaroilquínico, ácido-5-O-cafeoilshikímico (Piovesana et al., 2018; Piovesana & Noreña, 2019).

Entre los flavonoides encontrados en los cálices, están: quercetina, rutina, naringenina (Owoade et al., 2016), miricetina-3-sambubiósido, quercetina-3-sambubiósido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido (Piovesana et al., 2018). catequinas, epigalocatquina, galato epigalocatequina, quercitrina (Oboh et al., 2018).

Se ha reportado la presencia de antocianinas en extractos acuosos de *H. sabdariffa*, donde las de mayor concentración son, delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido, y las de menor concentración, delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido (Ifie et al., 2016).

Estudios previos también han referido que las antocianinas de mayor proporción en cálices de jamaica, son delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido (Wong et al., 2002).

Ácidos Orgánicos

Existe una gran variedad de ácidos orgánicos en los extractos acuosos de *H. sabdariffa*, siendo los ácidos hidroxicítrico e hibisco los de mayor concentración, seguido de otros como, ácido cítrico, ácido málico y ácido tartárico (DaCosta-Rocha et al., 2014). Otros estudios, sin embargo, han identificado y cuantificado en los cálices, ácido cítrico, succínico, tartárico y málico; siendo este último el de mayor concentración (Jabeur et al., 2017).

En infusiones hechas a partir de cálices secos de *H. sabdariffa* L., de diferentes zonas geográficas, se encontraron como ácidos predominantes los ácidos oxálico, tartárico y cítrico; mientras que los ácidos succínico y málico, se hallaron en concentraciones bajas de aproximadamente 10 mg/L o incluso menores (Juhari et al., 2018).

1.2 Métodos de extracción

A parte de la fabricación de fármacos, la extracción es una etapa importante al desarrollar alimentos funcionales de origen natural, así como para dar valor a residuos, subproductos, y mejorar la calidad a lo largo de distintos procesos de manufactura (Fu et al., 2019).

1.2.1 Extracción asistida por ultrasonido

Esta tecnología ha tenido un crecimiento continuo llegando a considerarse como prometedora, innovadora y ecológica, pudiendo reemplazar o mejorar los procesos clásicos de fabricación de alimentos (Fu et al., 2019).

La EAU ha sido empleada muy seguido en el campo de la extracción, siendo una tecnología potencial emergente capaz de acelerar la transferencia de masa y calor. Las ondas de ultrasonido luego de interaccionar con la matriz vegetal son capaces de alterar sus propiedades fisicoquímicas; además, facilitan la liberación de componentes extraíbles y mejoran la transferencia de masa al destruir las paredes celulares vegetales a causa del

efecto de cavitación (Chemat et al., 2017). Este fenómeno de cavitación, es debido a la formación, expansión e implosión de burbujas (Azmir et al., 2013).

Se han reportado buenos resultados de esta técnica de extracción en matrices vegetales con gran contenido de pigmentos y compuestos fenólicos (Caldas et al., 2018; González-de-Peredo et al., 2020), así como en subproductos (Zafra-Rojas et al., 2016).

Dzah et al., (2020) concluyen que, entre los motivos principales por los cuales se elige la EAU como método de extracción de compuestos bioactivos, están su versatilidad, ser un método de extracción de naturaleza física, menor uso de disolventes orgánicos o incluso prescindir de ellos, su simplicidad de operación, una extracción eficiente en un menor tiempo, la capacidad de conservar la actividad biológica de los compuestos y su potencial aplicación a nivel industrial, entre otros.

1.2.2 Extracción por calor

El aprovechamiento del calor por medio del procesamiento térmico, es el proceso más usado en la industria, para la producción y conservación de alimentos (Pereira & Vicente, 2010).

La maceración y la extracción soxhlet, son los métodos convencionales principales para extraer compuestos antioxidantes a partir de matrices vegetales (Xu et al., 2015).

No obstante, existen otros métodos como la decocción y la infusión, que se usan para obtener extractos acuosos a partir de diferentes hierbas. Estos métodos de extracción al ser métodos sencillos, son ampliamente empleados para la obtención de bebidas herbales (Martins et al., 2015). Tradicionalmente se utiliza la decocción para elaborar bebidas llamadas “Bisapp” a partir de los cáices de *H. sabdariffa* L. (Vidot et al., 2016).

Varios trabajos han indicado la aplicación de calor en extracciones acuosas a partir de cálices de jamaica, con parámetros de tiempo entre 15 a 60 minutos y temperaturas entre 90 y 100°C (Galicia-Flores et al., 2008; Salinas-Moreno et al., 2012).

1.3 Bebidas de *H. sabdariffa*

Los cálices de jamaica han sido consumidos de manera tradicional en bebidas, siendo una fuente de compuestos bioactivos que han mostrado tener características de promover la salud (Preciado-Saldaña et al., 2019). Las bebidas de jamaica son consumidas tradicionalmente en África, donde elaboran una bebida no alcohólica a partir del extracto acuoso de los cálices secos, conocida como "soborodo" (Ningrum et al., 2019). Además, en zonas del Caribe y Oriente Medio, también se elabora una bebida refrescante típica, caliente o fría, llamada "Karkadeh", a partir de los cálices de jamaica y con la adición de azúcar para mejorar su sabor (Rasheed et al., 2018).

Cid Ortega et al., (2010) formularon una bebida a partir del extracto de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L de la variedad criollo, incorporando distintos edulcorantes no calóricos y azúcar. Los cálices se sometieron a extracción con agua destilada a 60°C, en un ratio cáliz/solvente de 1:7, por 20 minutos. Los resultados de la extracción mostraron rendimientos del 95 ± 3% de K, Ca, Mg, Fe, Co, Mn y Zn como 64 ± 2% de Na y Cu. Los análisis químicos evidenciaron que el contenido total de antocianinas era de aproximadamente 5 mg en 500 mL de bebida. Según Biruete Guzmán et al., (2009) se estima que 23 mg es el valor medio de ingesta diaria de flavonoides (especialmente la quercetina); por lo tanto, la bebida a partir de cálices de jamaica, representaría alrededor del 22% de la ingesta diaria recomendada de antioxidantes.

En su estudio Sáyago-Ayerdi et al., (2007) demostraron la presencia de fibra dietética en una concentración de 0,66 g/L y que un 66% de los compuestos de compuestos fenólicos extraíbles contenidos en la flor de jamaica, pasaron a la bebida (66 mg/100 mL de compuestos fenólicos) obtenida por decocción de los cálices de *H. sabdariffa* L, mostrando una capacidad antioxidante medida por ABTS de 335 μmol TEAC/100 ml de bebida.

Bolade et al., (2009) en su estudio sobre optimización de la extracción para la producción de una bebida de jamaica, indicaron que el tiempo de extracción a una temperatura constante de

100°C ± 2°C y una proporción de 1:62 (p/v) de cálices secos y agua es de 30 minutos, mientras que, el dulzor óptimo, determinado mediante evaluación sensorial era 13% de azúcar. estos parámetros serían los óptimos para la producción comercial de la bebida.

Mashkour et al., (2013) en los resultados de su estudio de optimización en la formulación de una bebida de jamaica usando metodología de superficie de respuesta, indicaron que las mejores condiciones de extracción acuosa fue de 85°C por 10 minutos, con las cuales se alcanzaron los mejores valores de antocianinas y vitamina C; así mismo; determinando que la mejor formulación de la bebida incluía 1% estevia, 0,08g/L goma arábiga, 95% de extracto y 0,9% de azúcar.

Los extractos de *H. sabdariffa* L., también se han utilizado para realizar mezclas con otras fuentes vegetales, así como con diferentes frutas. Ogundele et al., (2016) desarrollaron una bebida funcional a partir de la mezcla de extractos de *H. sabdariffa* L. y jugos de frutas (piña, zanahoria, naranja) para optimizar sus propiedades antioxidantes, determinando que la mezcla óptima, hallada mediante metodología de superficie de respuesta era de 40% de piña, 16,5% zanahoria, 17,2% naranja y 26,3% extracto de *H. sabdariffa* L; además, evidenciaron que el poder antioxidante de las formulaciones se mejoró principalmente gracias a la incorporación de niveles más altos de extracto. Así mismo, Kilima et al., (2014) al evaluar las propiedades antioxidantes en la mezcla del extracto de *H. sabdariffa* L. con zumos de frutas tropicales (mango, papaya, guaba), determinaron que, a medida que la concentración de jamaica aumentaba en todas las mezclas, también aumentaba significativamente las antocianinas monoméricas totales y el contenido fenólico total.

Hani et al., (2019) analizaron las propiedades fisicoquímicas y la aceptación sensorial de una bebida formulada a partir de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y col morada (*Brassica olearacea* L. var. *capitata f. rubra*) concluyendo que, la formulación de mayor aceptación era de 40% de col morada y 10% de extracto de jamaica. Además, reportaron que

la incorporación de extracto de jamaica influía significativamente en valores de pH más bajos, así como en un contenido mayor de acidez titulable y antocianinas.

Preciado-Saldaña et al., (2019) desarrollaron una bebida funcional optimizada mediante metodología de superficie de respuesta, a partir de cálices de jamaica (*H. sabdariffa* L.) y hojas de té verde (*Camellia sinensis* L.). Las condiciones óptimas de infusión para obtener bebidas optimizadas tanto de jamaica como de té verde fueron 4,9 g/100 mL de agua, a 26°C durante 291 minutos de extracción. Además, determinaron mediante una evaluación sensorial con panelistas no entrenados, que la proporción de jamaica y té verde mayormente aceptada era de 7:3 (v/v) respectivamente. Bajo estas condiciones obtuvieron una bebida con un contenido fenólico total de 34,07 ± 0,71 mg EAG/100 mL de bebida, y valores de capacidad antioxidante medida por DPPH y FRAP de 175,33 ± 6,14 y 169,74 ± 4,43 ET/100 mL respectivamente.

1.4 Métodos de determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

1.4.1 Método de Folin-Ciocalteu

Este método ha sido utilizado para determinar el contenido fenólico total de distintos productos naturales, a lo largo de muchos años. Sin embargo, su mecanismo es una reacción de oxido/reducción que involucra tanto compuestos fenólicos como no fenólicos (Magalhães et al., 2010). Se basa en la reacción de oxidación entre compuestos fenólicos de fácil oxidación o compuestos aromáticos hidroxilados con el ácido fosfotúngstico y fosfomolíbdico del reactivo Folin-Ciocalteu, que da como resultado un cambio de color (Zhang et al., 2006).

1.4.2 Método DPPH (2.2-difenil-1-picril-hidrazilo)

Este método se fundamenta en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical DPPH. Esta capacidad puede ser evaluada por resonancia espín-electrón o por medio de espectrofotometría (Prior et al., 2005).

El DPPH es un radical orgánico de estructura nitrogenada, el cual no requiere ser generado previamente, es de color púrpura fuerte y muy estable (Rodríguez Aguirre et al., 2015). Este

radical libre puede reaccionar fácilmente al mezclarse con compuestos antioxidantes, por medio de la cesión de un átomo de hidrógeno proveniente del antioxidante (Guija-Poma et al., 2015), dando como resultado una solución en estado reducido y la degradación del color púrpura (Kedare & Singh, 2011).

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ha sido el radical mayormente usado en los estudios cinéticos, debido a ventajas como su estabilidad, su disponibilidad comercial y una fuerte absorción en el espectro UV-visible a 520 nm (Foti et al., 2011), alta reproductibilidad de resultados, selectividad hacia los antioxidantes antirradicales, alta sensibilidad y disponibilidad del equipo necesario (Volkov & Misin, 2015).

1.4.3 Método FRAP (Poder antioxidante de la reducción férrica)

Este método se fundamenta en la capacidad reductora a un pH bajo, de un complejo incoloro del ion férrico + TPTZ (Fe^3 + tripiridiltriazina) a un complejo azulado de ion ferroso + TPTZ (Fe^2 + tripiridiltriazina), a causa de la cesión de electrones por parte de antioxidantes. Esta reducción se controla con la medición del cambio de absorbancia en las mezclas de prueba con antioxidantes, a una longitud de onda de 593 nm (Dudonné et al., 2009).

1.4.4 Método de pH diferencial

Los pigmentos antociánicos pueden sufrir transformaciones reversibles en su estructura al cambiar su pH, evidenciándose en espectros de absorbancia de gran diferencia. Al estar en un pH 1.0 predomina la forma oxonio coloreada y a un pH 4.5 se presenta la forma hemicetal incolora. En esta reacción se basa el método de pH diferencial, permitiendo alcanzar una medición precisa y rápida de las antocianinas totales, aún en presencia de pigmentos degradados, polimerizados y otros compuestos interferentes (Giusti & Wrolstad, 2005).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación de investigación

Esta investigación se realizó conjuntamente en el laboratorio de investigación de la carrera de Ingeniería en Alimentos y el laboratorio de Fitoquímica de la carrera de Bioquímica y Farmacia, en la Universidad Técnica de Machala.

2.2 Materia prima

Los cálices frescos de flor de jamaica, fueron obtenidos de los cultivos ubicados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, de la Provincia de El Oro.

2.3 Preparación de la muestra

Los cálices frescos fueron sometidos a un lavado y desinfección con una solución desinfectante para frutas y hortalizas (STAR-BAC), se eliminó el agua en exceso y se realizó la separación de las semillas. Una vez listos los cálices, fueron llevados a un proceso de secado a una temperatura de 45 ± 2°C en una estufa (MEMMERT UF 55, Alemania), con circulación de aire forzado del 100% y trampilla abierta (100%), por un tiempo aproximado de 48 horas. Posteriormente, los cálices deshidratados fueron molidos en un molino de cuchillas semi industrial de fabricación nacional (MAGRICO) con una malla de 1 mm de diámetro; la harina obtenida fue tamizada a través de una malla de 425 micrones y finalmente envasada en bolsas plásticas de cierre hermético, almacenándose a temperatura ambiente protegidas de la luz.

2.4 Determinación de algunos parámetros de calidad en los cálices secos

La determinación de humedad y cenizas se realizó directamente en la muestra seca.

2.4.1 Determinación de humedad residual

El contenido de humedad residual se determinó en una balanza con fuente de calentamiento halógeno (Ohaus, modelo MB90, USA). Se pesaron aproximadamente 0,55 g de muestra directamente en el equipo y se llevó a cabo la determinación de forma automática a una

temperatura de 105°C hasta que la muestra alcanzó un peso constante. El análisis se lo realizó por triplicado.

2.4.2 Determinación de cenizas

El análisis de residuo de materia orgánica se realizó por el método gravimétrico según la AOAC. 923.03. Se pesaron 3 g de muestra en un crisol previamente secado hasta peso constante, luego se realizó un precalcinado en una plancha calefactora y posteriormente, se llevó a mufla a una temperatura de 550 ± 25°C hasta obtener cenizas blancas o grisáceas. Los resultados se determinaron por diferencia de peso.

2.4.3 Preparación de extracto seco

Para el proceso de obtención del extracto, se plantearon cuatro tratamientos, utilizando en todos los casos agua como disolvente. Las condiciones de extracción para cada tratamiento se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: *Tratamientos de extracción*

Tratamientos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Método de extracción
A	30	30	EAU
B	30	60	EAU
C	100	15	EC
D	100	30	EC

EAU: Extracción asistida por ultrasonido; EC: Extracción por calor

En todos los tratamientos se utilizó una concentración de 2% de cálices. Para los tratamientos A y B, se pesaron 2 g de cálices secos y molidos y se colocaron en un matraz de Erlenmeyer, luego se añadió 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 15 minutos hasta lograr humedecer la muestra. Seguidamente, se adicionaron 90 mL de agua destilada y se llevó a baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific).

En cuanto a los tratamientos C y D, se llevaron a ebullición 200 mL de agua destilada en un vaso de precipitación y luego se agregó la muestra previamente pesada.

Los extractos obtenidos se filtraron y colocaron en balones de 500 mL, para ser concentrados en un rotoevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001), acoplado a un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8) y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania). Estos extractos concentrados, fueron trasvasados a cajas de Petri y finalmente se secaron en una estufa (MEMMERT UF 55, Alemania) con circulación de aire del 100% y trampilla abierta (100%). Los extractos secos (ES) fueron almacenados a temperatura ambiente y protegidos de la luz, hasta ser evaluados posteriormente.

2.5 Análisis químico de los extractos

2.5.1 Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu

Preparación de muestra: Se pesó 0,07 g de extracto seco en un vaso de precipitación de 50 mL, se llevó a sonicación hasta solubilizar la muestra completamente, luego se trasvasó a un balón volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua destilada.

Preparación de reactivos:

Solución de Folin-Ciocalteu (10%): Se tomó 10 mL del reactivo y se diluyó con 100 mL de agua destilada.

Solución de carbonato de sodio (7,5%): Se pesó 7,5 g de Na_2CO_3 anhidro y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

Ensayo: Se trabajó con el reactivo Folin-Ciocalteu con la metodología expuesta por Singleton et al., (1999) con algunas modificaciones.

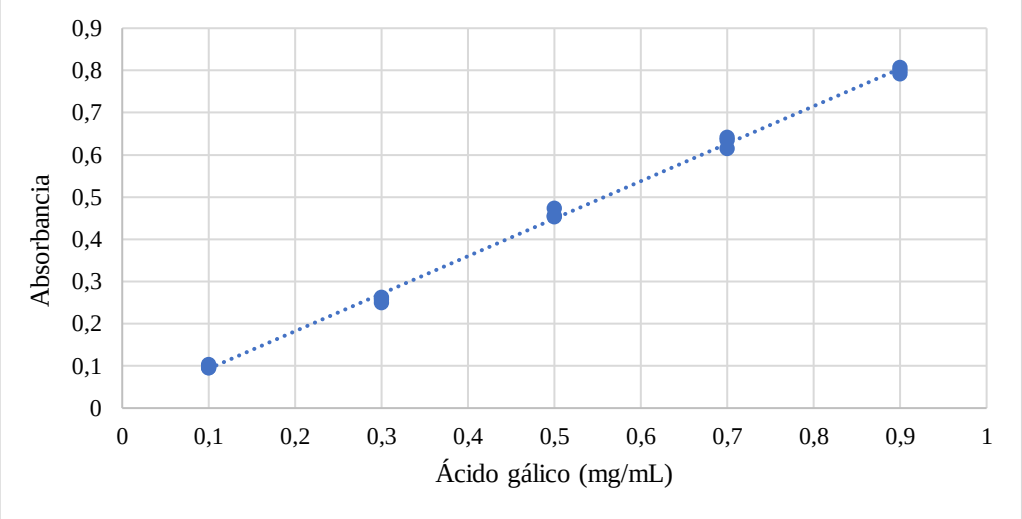
En tubos de aproximadamente 10 mL se adicionó: 50 µL de la muestra preparada (ensayo), agua destilada (blanco) o de ácido gálico (patrón), luego se añadió 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) al 10% y 450 µL de agua destilada. Se agitaron todos los tubos por medio de un vortex (Thermo Scientific, USA) y se dejaron en reposo por 5 minutos. Seguidamente, se adicionó 2 mL de Na_2CO_3 al 7,5% y se agitó de nuevo (vortex) para dejar reposar durante 2 horas, hasta realizar la lectura. Se utilizaron microceldas de 2 mL y se midió

la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 765 nm.

Para la cuantificación de contenido fenólico total, se realizó una curva de calibración de una disolución patrón de ácido gálico 10 mg/mL (Sigma Aldrich) en concentraciones de: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/mL.

El contenido fenólico total se determinó partiendo de la curva de calibración por medio de un análisis de regresión lineal, obteniendo la siguiente ecuación: $\text{Absorbancia} = 0{,}00446667 + 0{,}888667 * \text{concentración}(\text{mg/mL})$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9978.

Figura 1: *Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales*



2.5.2 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-picrilhidrazilo (DPPH-TEAC).

Preparación de muestra: Se pesó 0,07 g de extracto seco en un vaso de precipitación de 50 mL, se llevó a cabo una sonicación hasta solubilizar la muestra completamente, luego se trasvasó a un balón volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua destilada. Por efectos de concentración y con el fin de que las lecturas de absorbancia de la muestra se ajustaran a la curva de calibración; se realizó una dilución colocando en un tubo de ensayo 1 mL de la

solución de extracto seco (concentración: 7 mg/mL) y 3 mL de agua destilada. A partir de esta dilución se realizó el ensayo.

Preparación de disolución del DPPH a 0,1 mM: Se pesó 0,0039 g de reactivo 2,2-difenil-picrilhidrazil y se llevó a un balón volumétrico de 100 mL aforando con metanol (80%).

Ensayo: Para la determinación se aplicó el método de Brand-Williams et al., (1995) con algunas modificaciones. Se tomaron 100 µL de solución madre (por cada tratamiento) y se le añadieron 3,9 mL de la disolución DPPH al 0,1 mM (A_1) por separado. Posteriormente, para preparar la solución correctora de color, se tomó 100 µL de cada solución madre y se adicionaron 3,9 mL de metanol (A_2). El control de DPPH se preparó mezclando 100 µL de metanol y 3,9 mL de DPPH (A_0). Las disoluciones preparadas se sometieron a agitación en vortex (Thermo Scientific, USA) e inmediatamente se guardaron protegidas de la luz y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Las lecturas se realizaron en microceldas de 2 mL empleando metanol como blanco, en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 517 nm.

El porcentaje de secuestro del DPPH después de 30 minutos calculó con la fórmula siguiente:

$$\%Secuestro\ de\ DPPH = [(1 - (A_1 - A_2)/A_0)] * 100$$

Donde:

- $A_0 =$ Absorbancia de solución DPPH + metanol
- $A_1 =$ Absorbancia de DPPH + extracto
- $A_2 =$ Absorbancia de extracto + metanol

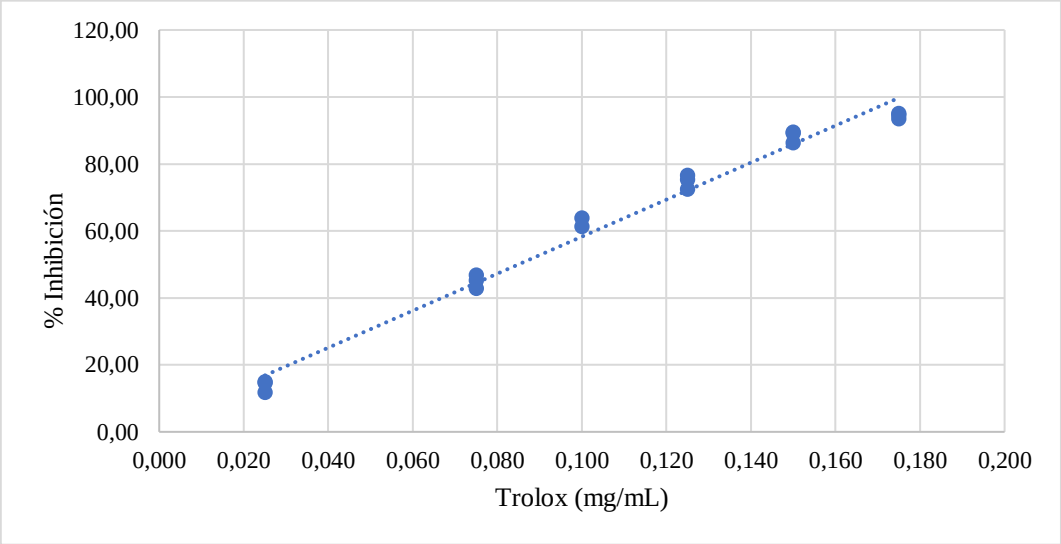
Para determinar la capacidad antioxidante, se realizó mediante una curva de calibración de la solución patrón de Trolox (0,2 mg/mL) en concentraciones de: 0,025; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 mg/mL.

La cuantificación de la capacidad antioxidante expresada en miligramos equivalentes a Trolox, se obtuvo a partir de la ecuación obtenida del análisis de regresión lineal de la curva de calibración.

$$\%\text{Inh} = 3{,}02463 + 552{,}693 * \text{concentración(mg/mL)}$$

coeficiente de correlación (R^2) de 0,9836.

Figura 2: *Curva de calibración para la cuantificación de capacidad antioxidante para ensayo DPPH.*



Se realizó la cinética de captura de radicales libres en cada uno de los tratamientos, desarrollando el método descrito por Barrón et al., (2011) con modificaciones.

Preparación de la muestra: Se pesó 0,02 g de extracto seco por cada tratamiento de extracción, en un vaso de precipitación; se sometió a sonicación hasta solubilizar la muestra completamente, luego se trasvasó a un balón volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua destilada

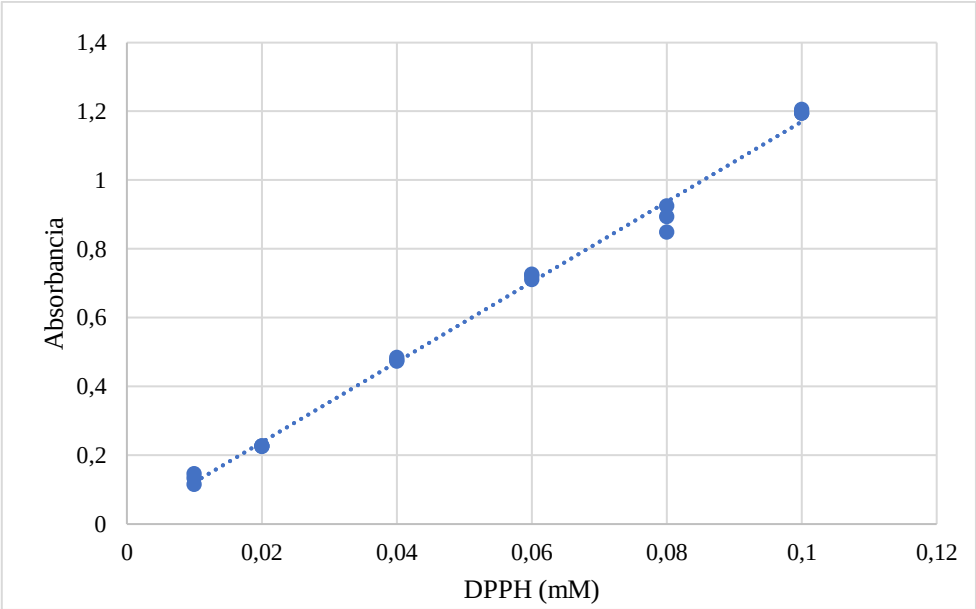
Para los estándares de quercetina y ácido ascórbico utilizados en el ensayo, se preparó una disolución a una concentración de 0,3 mg/mL.

La determinación de la cinética se realizó mediante una curva de calibración de una solución patrón de DPPH (0,1 mM). A partir de esta solución madre se prepararon diluciones con metanol, en concentraciones de 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 y 0,08 mM, a las cuales, incluyendo la

solución madre, se les midió la absorbancia a 517 nm en microceldas de 2 mL. Se uso metanol como blanco y cada lectura se realizó por triplicado.

Se obtuvo la siguiente ecuación: $\text{Absorbancia} = -0{,}00290476 + 7{,}00476 * \text{concentración}(\text{mg/mL})$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9971.

Figura 3: *Curva de calibración. Absorbancia vs DPPH (mM)*



Ensayo: Se tomaron 100 µL (0,1 mL) de cada disolución de extracto seco y de los estándares, y se pusieron a reaccionar con 3,9 mL de DPPH (0,1 mM). A continuación, se midieron las absorbancias de cada muestra y de los patrones con intervalos de 60 segundos, desde un tiempo cero ($DPPH_{t=0}$) hasta concluir 30 minutos ($DPPH_{rem}$), en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) usando microceldas de 2 mL y a una longitud de onda de 517 nm. Cada lectura se realizó por triplicado, y como blanco se usó la disolución de DPPH.

Los datos obtenidos sirvieron para calcular el porcentaje de DPPH remanente, el cual se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\%\text{DPPH}_{\text{rem}} = 100 \text{ x } \text{DPPH}_{\text{rem}}/\text{DPPH}_{\text{t=0}}$$

2.5.3 Determinación del poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP-TEAC)

Preparación de muestra: Se pesó 0,02 g de extracto seco en un vaso de precipitación de 50 mL, se sometió a sonicación hasta solubilizar la muestra completamente, luego se trasvasó a un balón volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua destilada. Por efectos de concentración y con el fin de que las lecturas de absorbancia de la muestra se ajustaran a la curva de calibración; se realizó una dilución, colocando en un tubo de ensayo 1 mL de la solución de extracto seco ($concentración$: 2 mg/mL) y 5 mL de agua destilada. A partir de esta dilución se realizó el ensayo.

Preparación de reactivos:

Solución buffer de acetato 300 mM (pH 3,6): Se pesó 3,1 g de acetato de sodio trihidratado ($CH_3COONa3H_2O$) y se disolvió en agua. Luego se adicionó 16 mL de ácido acético glacial y completamos el volumen hasta un litro con agua destilada.

Solución de HCl 40 mM: Se añadió aproximadamente 3,3 mL de HCl concentrado para 1 L de agua destilada.

Solución 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripyridyl – s-triazine) en HCl 40 mM: Se pesó 3,12 g de TPTZ para 1 L de HCl 40 mM.

Solución de $FeCl_3$ 20mM: Se pesaron 0,324 g de FeCl3 anhidro y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

Solución de reactivo FRAP: Se preparó mezclando en un vaso de precipitación 25 mL de solución buffer de acetato (pH: 3,6) 2,5 mL de solución TPTZ 10 mM y por último con 2,5 mL de solución $FeCl_3$ 20 mM. La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos.

Ensayo: Se desarrolló de acuerdo a los métodos descritos por Benzie & Straint, (1996).

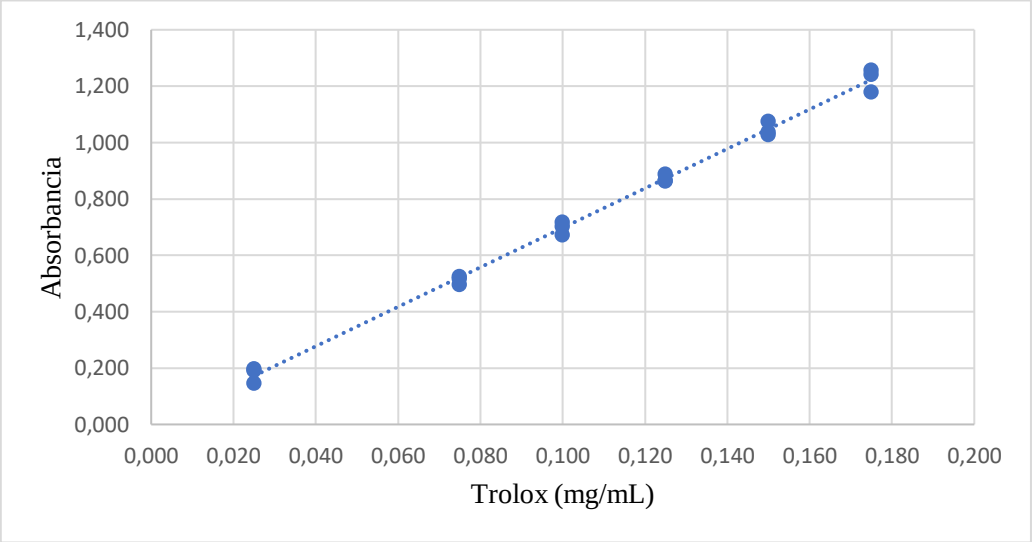
En tubos de ensayo de 10 mL se colocaron 50 µL de la muestra preparada, luego se añadieron 1,5 mL del reactivo FRAP, se realizó agitación en vortex y se esperó 5 minutos; posteriormente se dio lectura usando microceldas de 2 mL en un espectrofotómetro (UV-Visible

SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 593 nm. Se utilizó como blanco la disolución FRAP.

Se preparó una solución patrón de Trolox (0,2 mg/mL), y a partir de esta se prepararon soluciones con concentraciones de 0,025; 0.075; 0,1; 0,125; 0,150; 0,175 mg/mL. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

El poder antioxidante se determinó a partir de la curva de calibración que se realizó para la solución patrón de Trolox por medio de un análisis de regresión lineal, obteniendo la siguiente ecuación: $\text{Absorbancia} = -0{,}00290476 + 7{,}00476 * \text{concentración}(\text{mg/mL})$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,996.

Figura 4: *Curva de calibración de la capacidad antioxidante para ensayo FRAP*



2.5.4 Determinación de antocianinas monomérica totales por el método de pH diferencial

Preparación de la muestra: Se pesó 0,0063 g de extracto seco y se sometió a sonicación hasta solubilizar la muestra completamente, luego se llevó a un balón volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua destilada (concentración: 6,3 mg/mL).

Preparación de reactivos: Se prepararon soluciones tampón de cloruro de potasio (0,025 M a pH 1) y de acetato de sodio (0,4 M, pH 4,5).

Ensayo: La determinación se realizó conforme al método reportado por (Giusti & Wrolstad, 2005) triplicando el ensayo en cada muestra.

De cada muestra preparada, se tomó 0,4 mL (concentración: 6,3 mg/mL) y se le agregó 1,6 mL de cada solución tampón por separado. Las muestras se dejaron reposar por 15 minutos y se efectuó la lectura en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA), en microceldas de 2 mL, a longitudes de onda de 510 nm y 700 nm. Para la lectura del blanco, se utilizó agua destilada.

La absorbancia de cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

La concentración del pigmento de antocianina monomérica de cada muestra se calculó en función del pigmento cianidina-3-glucósido, con la fórmula siguiente:

$$\textbf{Antocianina monomérica (mg/L)} = (A \times PM \times FD \times 1000) / (\varepsilon \times 1)$$

Dónde:

- $\boldsymbol{A} =$ Absorbancia calculada
- $\boldsymbol{PM} =$ Peso molecular de cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol)
- $\boldsymbol{FD} =$ Factor de dilución: 5
- $\boldsymbol{\varepsilon} =$ Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (26900 L $mol^{-1}cm^{-1}$)

2.6 Formulación de la bebida.

Para la formulación de la bebida se planteó un diseño factorial 2^2, considerando como factores del diseño la cantidad (g/100mL) de material vegetal seco y molido (cálices de jamaica) y el porcentaje de inclusión de estevia, tal como puede verse en la tabla 3.

Las bebidas se prepararon siguiendo el tratamiento de extracción seleccionado. La selección de la mejor formulación se hizo con base a la aceptación sensorial de 29 jueces semientrenados.

Tabla 3: *Formulación de la bebida*

Materia prima	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
Cáliz de jamaica (g/100mL)	1,5	1,5	2	2
Estevia (%)	0,4	0,5	0,4	0,5

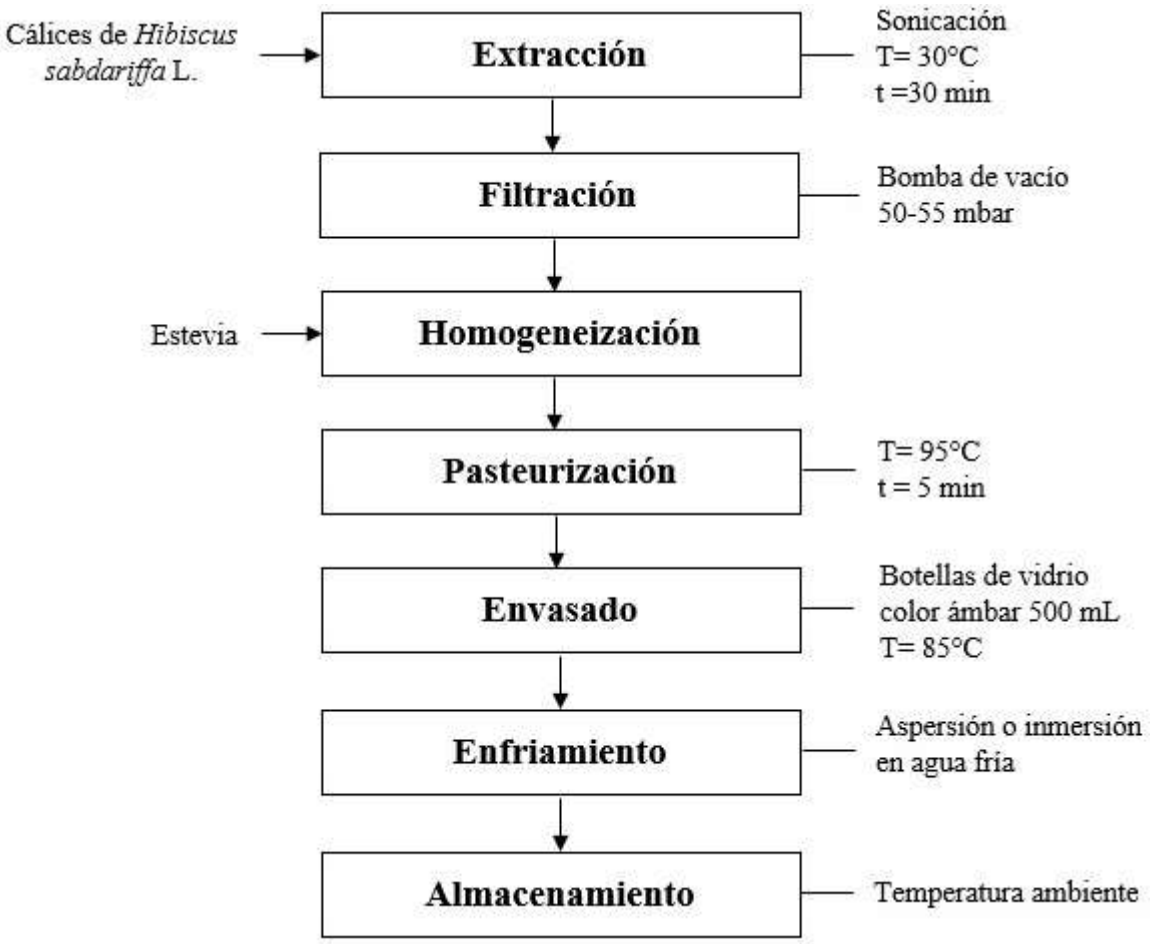
Se realizó un diseño experimental con los parámetros previamente establecidos, teniendo como resultado las siguientes corridas experimentales.

Tabla 4: *Diseño experimental de la bebida*

Bloque	% Cáliz de jamaica	% Estevia
1	1,5	0,5
1	1,5	0,4
1	2	0,5
1	2	0,4

2.7 Proceso de elaboración de la bebida

Figura 5: *Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida*



2.8 Evaluación sensorial de la bebida

Para el análisis sensorial, se utilizó como herramienta de evaluación una prueba de ordenamiento. Se presentaron cuatro formulaciones, las cuales fueron codificadas con números aleatorios y presentadas a 29 jueces semi entrenados. La prueba de ordenamiento se estructuró en un orden de preferencia ascendente de 1 a 4, siendo el número 1 la puntuación para la muestra de menor agrado y 4 para la muestra de mayor agrado, tal como se muestra en la figura 6. Entre la degustación de una formulación y otra, cada juez debía ingerir agua purificada de marca comercial, para enjuagar su paladar.

Figura 6: *Hoja de evaluación sensorial*

NOMBRE: **FECHA:**

Género: Hombre ____ Mujer _____ Edad ____

Frente a usted. hay 4 muestras codificadas de bebida a base de flor de jamaica. Por favor pruebe las 4 muestras, enjuagando su paladar entre muestra y muestra y asigne un orden de preferencia ascendente a las mismas. De modo tal que, en la celda de orden de preferencia se coloque junto al número **1** a la muestra de **menor agrado** y 4 junto a la muestra de **mayor agrado.**

1 = Menor agrado

4 = Mayor agrado

ORDEN DE PREFERENCIA	MUESTRA
4	
3	
2	
1	

COMENTARIOS:
……
……

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros de calidad en los cálices secos

En la tabla 5 se registran los datos obtenidos de la valoración de humedad residual y cenizas totales de los cálices de *H. sabdariffa* L.

Tabla 5: *Composición física del cáliz de flor de jamaica*

Parámetros	Resultados
Humedad Residual (%)	3,28 ± 0,04
Cenizas (%)	6,38 ± 0,02

Resultados promedio n=3. ± Desviación estándar
Valores reportados en base seca

La humedad residual de este material vegetal alcanzó el 3,28%, valor que presenta diferencia con los descritos por Ahmed et al., (2019) y Abou-Arab et al., (2011) de 5,37% y 12,81% respectivamente. Estas diferencias estarían influenciadas básicamente por el método de secado utilizado; sin embargo, este resultado está dentro del límite establecido en términos de humedad (<12%) para este material vegetal, según la NTE INEN 2392, (2017) para hierbas aromáticas. Con este bajo porcentaje de humedad residual en los cálices, se pudo asegurar una mejor conservación, considerando que este material vegetal sería utilizado posteriormente para los diferentes análisis.

Por otro lado, el valor de cenizas totales de los cálices deshidratados y molidos fue de 6,38 %, similar a lo reportado por Babalola et al., (2001) (6,8%), pero diferente a los valores presentados por Balarabe, (2019), Singh et al., (2011) y Ahmed et al., (2019). Estas diferencias pueden estar influenciadas por factores como la variedad de jamaica, la composición y tipo de suelo, la zona geográfica de cultivo y el tratamiento postcosecha (Cid & Guerrero, 2012; Moreno & Oyola, 2016).

3.2 Determinación de fenoles totales

Para la determinación del contenido fenólico en el extracto seco, se empleó el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados de la cuantificación de fenoles totales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: *Cuantificación de fenoles totales en los extractos acuosos de H. sabdariffa.*

Tratamientos	**Contenido fenólico total** mg EAG /g de ES
A	96,65 ±3,80$_a$
B	97,88 ±1,88$_a$
C	90,05 ±2,41$_b$
D	70,12 ±2,77$_c$

Resultados promedio n=3. ± Desviación estándar
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p<0.05$)
EAG: Equivalente a ácido gálico

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) determinaron que los tratamientos de EAU no presentaron diferencias estadísticamente significativas (valor $p>0.05$) con un nivel de confianza del 95%; obteniendo los valores más altos de contenido fenólico total. En el caso del tratamiento D, el contenido fenólico resultó menor, siendo estadísticamente significativa la diferencia (valor $p<0.05$) con el resto de tratamientos. Por tanto, en términos de extracción de compuestos fenólicos se evidenció que los mejores tratamientos fueron A y B, no pudiéndose comprobar diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$); Sin embargo, el tratamiento A, logró extraer cantidades similares de compuestos fenólicos en un tiempo menor de exposición a sonicación, lo que supone un ahorro energético y menor exposición del material vegetal al proceso como tal.

Peredo Pozos et al., (2020) evidenciaron durante la extracción asistida por ultrasonido en cálices de *H. sabdariffa* L., que los compuestos polifenólicos se incrementaban cuando el tiempo de exposición era de 20 o 40 minutos a 32°C; mientras que, a un mayor tiempo los valores se mantienen constantes.

Khan et al., (2019) reportaron el efecto de la sonicación en el perfil fenólico de una mezcla de jugos de frutas, encontrando que las muestras sometidas al tratamiento de sonicación tenían un

mayor contenido fenólico en comparación a las muestras tratadas por pasteurización (91°C durante 1 minuto). Además, mencionan que estos aumentos significativos de compuestos fenólicos, serían probablemente por el efecto causado por la sonicación, que ejercería un daño en la pared celular y daría lugar a una mejor extracción de compuestos polifenólicos del interior de las células

Aadil et al., (2013) también comentan que la liberación del contenido fenólico total de forma ligada, aumentaría probablemente al rompimiento de la pared celular, producto de la presión de cavitación ejercida durante la sonicación.

Por otro lado, al comparar los tratamientos de EC, se observó que D, alcanzó un contenido fenólico mucho menor que C, lo que podría atribuirse al tiempo de extracción. No obstante, la temperatura sería un factor que afecta de manera desfavorable la estabilidad de los compuestos fenólicos presentes en los extractos (Rojas et al., 2019).

Los resultados obtenidos en los cuatro tratamientos evidenciarían que la aplicación de temperaturas elevadas por un tiempo prolongado, tendrían un efecto de detrimento de los compuestos fenólicos. La influencia de estos dos factores se determinó mediante un ANOVA multifactorial, cuyo resultado mostró un efecto significativo ($p<0,05$). En cambio, la aplicación de sonicación presentaría un efecto favorable en el contenido fenólico de los extractos.

Preciado-Saldaña et al., (2019), conforme a los resultados obtenidos en su investigación, sugieren que los compuestos fenólicos de los cálices de jamaica se extraen mejor a bajas temperaturas, propiciando a la conservación de la capacidad antioxidante. Esto probablemente se debería a que los cambios químicos inducidos por la temperatura (formación de chalconas) se reducen al mínimo. Además, de la temperatura, los tiempos prolongados de extracción inducirían otros cambios químicos (Preciado-Saldaña et al., 2019).

Dong et al., (2010) evaluaron el efecto del tiempo y la temperatura en la EAU de ácido salvianólico B., de la raíz de *Salvia miltiorrhiza*, a una temperatura de 30°C, 60% agua:etanol

y empleando la relación líquido:sólido de 20:1. Los autores mostraron que el ácido salvianólico B., incrementaba con el tiempo de extracción. El rendimiento de extracción aumentó rápidamente durante los primeros 25 minutos alcanzando un resultado de extracción óptimo; sin embargo, después de 25 min, el rendimiento de la extracción aumentó lentamente, siendo prácticamente constantes hasta el minuto 40, a una temperatura de 30°C.

En un trabajo reciente, Rojas et al., (2019) determinaron que 40 minutos de sonicación a 25°C, con un 50% v/v de etanol, eran las condiciones con las que se obtuvo un mayor rendimiento de polifenoles totales en la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*).

(Rodríguez & López, 2014) en su estudio de EAU de los polifenoles de la fruta del *Púnica granatum* (granada), determinaron que el tiempo óptimo de extracción de polifenoles era de 60 minutos teniendo como menstruo una mezcla hidroalcohólica del 50% (v/v) y que a partir de este tiempo los valores de contenido polifenólico se mantenían constantes.

Almahy et al., (2017) identificaron mediante CLAE (Cromatografía líquida de alta eficiencia), una gran variedad de compuestos fenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de *H. sabdariffa* L., obtenidos por EAU (30°C/20 minutos/80%EtOH:20%H_2O), y mencionan que los ácidos fenólicos representarían el 11% del contenido total de compuestos fenólicos y los flavonoides el 89% restante, siendo los que mayormente predominan.

Por lo anteriormente citado, y tomando en cuenta que entre A y B no existe diferencia significativa (valor $p>0.05$). Aplicar un tiempo de sonicación superior a 30°C no indicaría una mayor extracción de compuestos fenólicos totales, por lo que se considera que el tratamiento A ofrece las mejores condiciones para la extracción de compuestos fenólicos.

3.3 Determinación de capacidad antioxidante

En este estudio se utilizaron dos métodos de evaluación de la capacidad antioxidante en los extractos secos. Se empleó el método FRAP, que mide la capacidad de un antioxidante para llevar el complejo de tripiridiltriazina férrico a su estado reducido de tripiridiltriazina ferroso

en condiciones de pH bajo, donde la formación de color será la capacidad reductora de la muestra (S. Singh & Singh, 2008).

El otro método que se usó fue el de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH). Este radical estable inicialmente presentará una coloración violeta intenso, posteriormente de ser mezclado con agentes antioxidantes, se dará la captación por el antioxidante hacia radical libre y consecuentemente disminuirá la absorbancia inicial del DPPH, dando como resultado la disminución del color violeta. La capacidad antioxidante se determinó por la diferencia de absorbancias (Jiménez et al., 2012).

Los resultados de la determinación de capacidad antioxidante se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: *Cuantificación de capacidad antioxidante*

Tratamientos	**FRAP** mg TEAC /g de extracto seco	**DPPH** mg TEAC /g de extracto seco
A	144,29 ±4,82$_a$	54,97 ±1,69$_b$
B	131,14 ±2,63$_b$	57,24 ±0,68$_a$
C	102,58 ±2,78$_d$	55,00 ±0,42$_b$
D	112,08 ±3,55$_c$	43,56 ±0,24$_c$

Resultados promedio n=3. ± Desviación estándar
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p<0.05$)
TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Mediante el análisis estadístico de varianza (ANOVA) a los valores de capacidad antioxidante, obtenidos por el método FRAP, se comprobó que, existen diferencias significativas entre todos los tratamientos (valor $p<0.05$). Los valores obtenidos por este método muestran que el tratamiento C posee una menor capacidad antioxidante con un valor de 102,58 ± 2,78 mg TEAC/g de extracto seco; mientras que, el tratamiento con mayor capacidad antioxidante fue A con un valor de 144,29 ± 4,82 mg TEAC/g de extracto seco.

En cuanto a los resultados de capacidad antioxidante por el método DPPH, se logró identificar que el tratamiento B (30°C/60 minutos) tuvo una mayor actividad antioxidante, con un valor de 57,24 ± 0,68 mg TEAC/g de extracto seco. Peredo Pozos et al., (2020) reportaron que,

aplicando sonicación durante 60 minutos a 32°C, se logró la mayor capacidad antioxidante por DPPH en extractos hidroalcohólicos de *H. sabdariffa* L.

Por el contrario, el tratamiento D presentó la menor capacidad antioxidante al comparar los cuatro tratamientos, con un valor de 43,56 ± 0,24 mg TEAC/g de extracto seco. El análisis estadístico de los resultados del método DPPH, determinó que, no existen diferencias significativas (valor $p>0.05$) entre los tratamientos A y C.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos químicos, se observó que los tratamientos con los mayores valores de capacidad antioxidante son, A por el método FRAP y B por DPPH. Esta diferencia de resultados se debería a los diferentes mecanismos en los cuales se fundamentan estos dos métodos, lo que generaría una variabilidad para la medición de la capacidad antioxidante en los extractos acuosos, dificultando la comparación de resultados (Reyes-Luengas et al., 2015). Sin embargo, aunque estos métodos se basan en diferentes mecanismos de reacción, ambos se complementan para comparar y validar la capacidad antioxidante en los extractos (Medina-Carrillo et al., 2013).

Medina-Carrillo et al., (2013) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos de *H. sabdariffa* L., por el método de DPPH y FRAP, y reportaron que el comportamiento respecto a la capacidad de reducir el ion férrico a ion ferroso, mostraba una similitud con la capacidad de capturar el radical DPPH, evidenciando que los extractos, mientras más antocianinas contenían, mayor era su actividad antioxidante.

Fernández-Arroyo et al., (2011) reportan un elevado poder antioxidante evaluado mediante FRAP en extractos acuosos de *H. sabdariffa* L., siendo el doble que en extractos de hoja de olivo. Este alto valor de FRAP podría ser atribuido a la gran capacidad reductora que tendría el ácido clorogénico (Wu, 2007). El ácido clorogénico y sus derivados, así como las antocianinas, delfinidina 3-sambubiósido y cianidina 3-sambubiósido, son de los compuestos

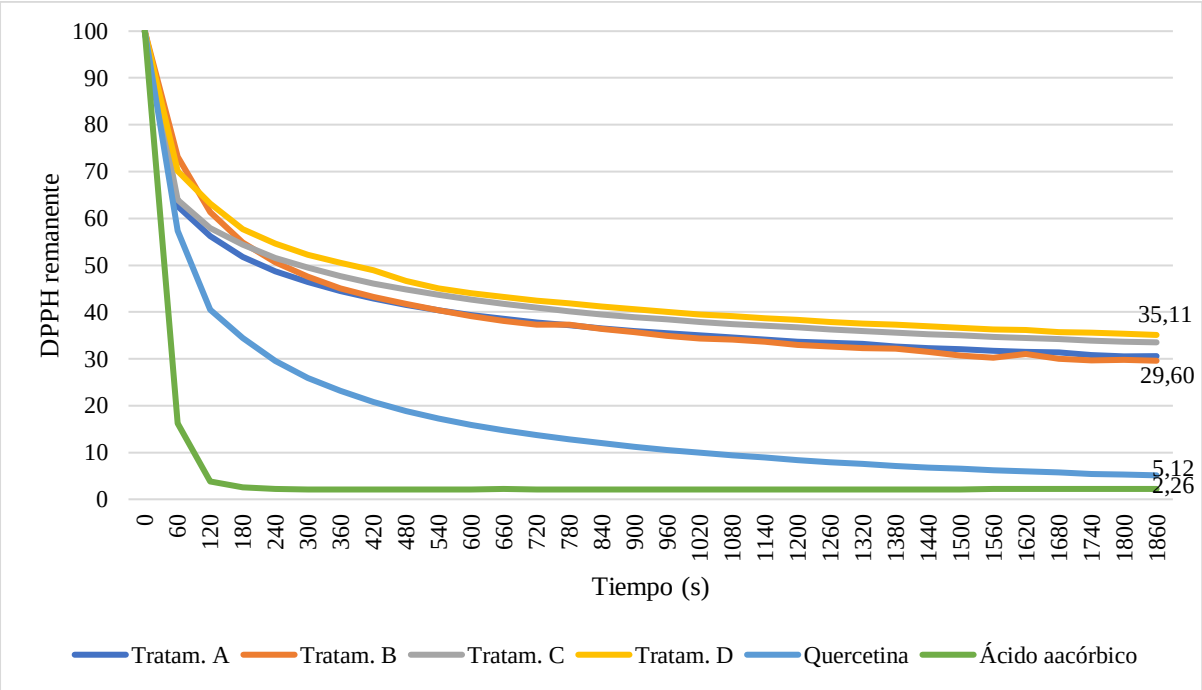
antioxidantes mayormente encontrados en los extractos acuosos de *H. sabdariffa* (Fernández-Arroyo et al., 2011).

Oloumi et al., (2016) evaluaron la correlación entre los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante en cálices de *H. sabdariffa* L., determinando que, tanto el contenido fenólico total como la capacidad de captación de radicales libres (DPPH), se correlacionan con la cantidad de flavonoides presentes en los extractos. En cambio, el poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) se correlaciona con el contenido de antocianinas.

A su vez, se ha reportado que el 51% de la capacidad antioxidante evaluada por FRAP es atribuida al contenido total de antocianinas presentes en el extracto de los cálices y que el resto de su actividad la comprenden compuestos fenólicos en un 24% (Tsai et al., 2002).

Por otra parte, se determinó el comportamiento cinético de los extractos frente al radical DPPH. Los resultados de la cinética de la capacidad antioxidante se muestran a continuación.

Figura 7: *Cinética de la captura de radicales libres de los extractos de H. sabdariffa.*



El perfil cinético de los cuatro tratamientos mostró que el porcentaje de DPPH remanente disminuyó por la actividad antirradicalaria que poseen los extractos. En primera instancia, se observó que durante el primer minuto los extractos presentaron una reacción rápida frente al

DPPH, similar al comportamiento inicial del ácido ascórbico; en este punto, el porcentaje de DPPH remante en los extractos llegó hasta aproximadamente un 50%, sin embargo, después de este tiempo, la reacción se tornó más lenta, observándose como las curvas de los 4 tratamientos seguían un comportamiento más estable, con variaciones mínimas del porcentaje de DPPH, hasta el final de la reacción.

Si bien, la captura de radicales por parte de los extractos fue más pausada, mostró similitud con el patrón de captura por parte de la quercetina, tal como se observa en la figura 7. Al final de la reacción el porcentaje alcanzado de DPPH remanente en los cuatro extractos analizados fue entre 25 y 35%, siendo los tratamientos A y B los que lograron un mayor secuestro.

En cuanto al tipo de cinética que siguen los extractos, autores como Brand-Williams et al., (1995) clasifican el comportamiento de varias sustancias de acuerdo con su estudio de la cinética de reacción, indicando que, una cinética rápida alcanza un estado estable en menos de 1 min, una cinética intermedia entre 5 y 30 min y una cinética lenta entre 1 y 6 horas. Por otra parte, Sánchez-Moreno et al., (1998) definieron el comportamiento cinético de la capacidad antioxidante de diferentes sustancias, como: cinética rápida, menor a 5 min; cinética intermedia, entre 5 y 30 min; y una cinética lenta, mayor a 30 min.

Por lo tanto, al analizar las curvas obtenidas en la figura 7, se observó que la captura de radicales libres tiende a estabilizarse aproximadamente a partir de los 15 minutos, hasta el minuto 30 que duró la reacción; de modo que, el comportamiento de los extractos parecería tratarse de una cinética intermedia.

3.4 Determinación de antocianinas monoméricas totales

Las antocianinas son bioflavonoides con múltiples beneficios para la salud y son capaces de dar una protección contra ciertas enfermedades. Por ende, resulta importante la cuantificación de antocianinas en *H. sabdariffa*, de manera que, se pueda asegurar sus potenciales beneficios

terapéuticos al igual que la calidad de los productos que afirman tener en su composición antocianinas para beneficio del consumidor (Choong et al., 2019).

El método ampliamente usado para su cuantificación es el pH diferencial, que se basa en un comportamiento propio de las antocianinas, que involucra el cambio de sus estructuras y coloración ante ciertos valores de pH. En esta técnica, la concentración de antocianinas monoméricas totales corresponderá a las diferencias entre las absorbancias a pH 1 y pH 4,5 (Cosavalente Burgos et al., 2016).

Los resultados de antocianinas monomérica totales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: *Cuantificación de antocianinas monoméricas totales*

Tratamientos	Contenido de antocianinas monoméricas totales (mg ECG/L)
A	$13,47 \pm 0,34_a$
B	$10,89 \pm 0,29_c$
C	$12,33 \pm 0,50_b$
D	$10,52 \pm 0,59_c$

Resultados promedio n=3. ± Desviación estándar
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p<0.05$)
ECG: Equivalente a Cianidina-3-Glucósido

Los resultados de la cuantificación de antocianinas monoméricas totales muestran que los valores obtenidos en los cuatro tratamientos fluctuaron entre 10,52 y 13,47 mg ECG/L.

A través del análisis estadístico, se determinó que existen diferencias significativas (valor $p<0.05$) entre todos los tratamientos a excepción de los tratamientos B y D que no presentaron diferencia significativa alguna (valor $p>0.05$).

Se evidenció que los tratamientos por ultrasonido A y B, serían significativamente diferentes, observándose que A obtuvo una mayor extracción de antocianinas. Este resultado parecería indicar que el tiempo de extracción tendría un efecto en la cantidad de antocianinas extraídas por este método. En tal sentido, Ravanfar et al., (2015) explica que, una disminución en el rendimiento de antocianinas por el aumento del tiempo de sonicación, podría considerarse

como resultado de la destrucción de compuestos fenólicos y la degradación de las antocianinas a causa del efecto destructivo de las ondas ultrasónicas. Así mismo, en presencia de una potencia elevada, gran parte de la energía sonora se transformaría en calor, provocando la degradación de antocianinas. En consecuencia, la exposición de matrices vegetales ricas en antocianinas, a altas temperaturas, disminuiría el rendimiento de estos metabolitos cuando el tiempo de extracción es muy largo.

Según Silva *et al.*, (2007, citado en Heras et al., 2013) el factor tiempo sería un parámetro importante en la extracción de antocianinas; sin embargo, si se prolonga demasiado, la extracción estos metabolitos no sería significativa, puesto que, luego de un tiempo de extracción se dará un equilibrio entre los solutos de la matriz vegetal y el disolvente, según lo expresado por la segunda ley de difusión de Fick.

Por otro lado, al realizar el análisis multifactorial de tiempo y temperatura, se determinó que ambos factores tienen un efecto significativo (valor $p<0,05$) sobre el contenido de antocianinas monoméricas totales, con un 95% de nivel de confianza. Consecuentemente con estos resultados, el tratamiento D (30 minutos x 100°C) fue el que obtuvo el menor contenido de antocianinas, evidenciando como la temperatura influiría negativamente en la extracción de estos metabolitos. Pragalyaashree et al., (2018) mencionan que a medida que se aumenta el tiempo y temperatura, se disminuye el porcentaje de retención de antocianinas en los extractos de *H. sabdariffa*.

Por último, el tratamiento A (30 minutos x 30°C) presentó el contenido más alto de antocianinas monoméricas entre todos los tratamientos. Estos resultados mostrarían el efecto positivo de la extracción asistida por ultrasonido en la recuperación de antocianinas.

En un estudio reciente, Ferarsa et al., (2018) determinaron que, 30 minutos de sonicación en la piel de berenjena logró extraer un mayor contenido de antocianinas. Además, mediante microscopía electrónica de barrido, encontraron evidencia del daño celular en el lado externo

de la cáscara de berenjena morada (*Solanum melongena* L.), luego de haberle aplicado ultrasonido por 30 minutos; concluyendo que este fenómeno sería una explicación del aumento del contenido de las antocianinas extraídas.

Pinela et al., (2018), en su investigación compararon los métodos de extracción asistida por ultrasonido y calor, para la recuperación de antocianinas de cálices de *H. sabdariffa*, evidenciando que la extracción asistida por ultrasonido era mucho más eficiente. Concluyeron que un tiempo de 26,1 min a 25°C y una relación de 39,1:60,9 etanol:agua, eran condiciones óptimas de extracción ultrasónica con las cuales se logró el mayor rendimiento en el contenido de antocianinas (51,76 ± 3,70 mg de antocianinas totales/ g de extracto).

Ravanfar et al., (2015) optimizaron la extracción asistida por ultrasonido de antocianinas de col morada (*Brassica oleracea*) y concluyeron que el tiempo, temperatura y potencia, son los factores que más contribuyen en una eficiente extracción, logrando extraer 20.9 mg/L de antocianinas bajo condiciones óptimas (30 minutos, 15°C y 100W).

Medina-Carrillo et al., (2013) en su investigación concluyeron que, existe una relación mayoritaria entre la concentración de antocianinas monoméricas totales y la actividad antioxidante de los extractos de *H. sabdariffa* L., y en menor medida con el contenido fenólico total, por lo cual, mientras la cantidad de antocianinas es mayor en los extractos, la actividad antioxidante aumentaría.

Entre las antocianinas encontradas en los cálices de jamaica, se ha identificado la presencia de delfinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido en extractos acuosos obtenidos por extracción convencional, en una concentración de 0,70 mg/mL y 0,46 mg/mL, respectivamente (Sinela et al., 2017).

Paraíso et al., (2019) y Almahy et al., (2017) reportaron la presencia de delfinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido en extractos hidroalcohólicos de *H. sabdariffa*,

obtenidos mediante extracción ultrasónica. Tsai et al., (2002) refieren que la delfinidina 3-sambubiósido representa el 85% del total de antocianinas.

3.5 Formulación de la bebida

Las antocianinas son compuestos fenólicos, específicamente flavonoides solubles en agua. Son las responsables del color rojo, azul y púrpura, en plantas, especialmente en flores, frutas y tubérculos (Khoo et al., 2017), siendo precisamente estos compuestos los de mayor interés en los cálices de *H. sabdariffa* L., al encontrarse en mayor proporción. Por lo tanto, considerando la naturaleza hidrofílica de estos compuestos, se escogió el agua como disolvente para la extracción. Además, teniendo como punto central en la investigación, el análisis de dos métodos de extracción para su aplicación en la obtención de una bebida con efecto antioxidante, resultó tecnológicamente conveniente el uso de agua como disolvente.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron del análisis químico de los extractos, aplicar ultrasonidos durante 30 minutos a una temperatura de 30°C (tratamiento A), logra extraer la mayor cantidad de antocianinas, además, de presentar la mayor reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) presente en el reactivo de FRAP hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) por la presencia de antioxidantes; en cambio, la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH fue mayor a medida que se incrementó el tiempo de sonicación. Sin embargo, en cuanto al contenido de compuestos fenólicos, el factor determinante en la extracción parecería ser el método de extracción ultrasónica mas no el tiempo de exposición. Considerando la relación entre compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante, así como la reducción de tiempo de proceso de sonicación, el tratamiento A resultó ser el mejor para la extracción de compuestos bioactivos en *H. sabdariffa*.

Uno de sus usos más conocidos de los cálices de jamaica, es la preparación de bebidas a partir de sus extractos acuosos. (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2015). Por lo tanto, la aceptación sensorial de una bebida es un factor muy importante a tomar en cuenta, puesto que, aparte de

que cuente con características químicas y nutricionales beneficiosas, también se deberá asegurar que las características sensoriales sean aquellas que logren su aceptabilidad y por lo tanto su consumo.

Bechoff et al., (2014) estudiaron la relación entre las antocianinas y otros compuestos con la aceptabilidad sensorial de bebidas de *Hibiscus sabdariffa,* y reportaron que la aceptación de aquellos consumidores que gustaban de una bebida obtenida mediante infusión, se relacionaba con componentes químicos como polifenoles, especialmente antocianinas. Los autores concluyeron que los diferentes componentes químicos tienen una correlación con los atributos sensoriales.

Juhari et al., (2018) como parte de estudio, caracterizaron fisicoquímicamente tés de jamaica de diferentes zonas de origen, y reportaron que los ácidos orgánicos serían los que principalmente otorguen las características gustativas en los tés de jamaica.

Torres et al., (2019) consiguieron desarrollar una bebida a base de flor de jamaica endulzada con estevia y enriquecida con cristales de *Aloe vera*, en la cual, utilizaron la sonicación como método de extracción, y evaluaron su efecto en el color de la bebida obtenida y la aceptabilidad sensorial de 3 formulaciones con diferente concentración de estevia como endulzante (0,3;0,4;0,5%). Los autores determinaron que la formulación de mayor aceptación sensorial fue aquella con porcentaje de estevia de 0,3%, y que el pretratamiento de sonicación, con parámetros de 30°C por 10 minutos, mejoró la extracción, obteniendo un mejor color en la bebida.

La formulación de la bebida se realizó considerando una prueba preliminar, mediante la cual se decidió descartar el uso de ácido cítrico debido a la acidez que aportan los cálices; además de, incluir como edulcorante la estevia. Se evaluaron dos variables independientes (concentración de *H. sabdariffa*. y la cantidad de estevia empleada como endulzante), en ambos

casos se probaron dos niveles (concentración de cálices 1,5 y 2 g/100 mL; y cantidad de estevia 0,4 y 0,5%) y se aplicó un diseño experimental del cual se obtuvieron 4 formulaciones.

Tabla 9: *Codificación para la evaluación sensorial de la bebida*

Codificación	Cáliz de jamaica (g/100 mL)	% Estevia
A06	1,5	0,4
B05	1,5	0,5
C03	2	0,4
D08	2	0,5

Las formulaciones fueron evaluadas sensorialmente, para identificar cuál de ellas era la de mayor aceptación sensorial. De dicha evaluación se obtuvieron resultados que fueron procesados a través de un análisis de varianza simple, tal como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: *Análisis de varianza (ANOVA) de las diferentes formulaciones*

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor P
Entre grupos	68,3631	3	22,7877	88,84	0,0000
Intra grupos	20,2634	79	0,256499		
Total (Corr.)	88,6265	82			

Los resultados del ANOVA, determinaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones de la bebida ($p<0,05$). Consecuentemente, al existir dicha significancia estadística, se procedió a realizar una prueba de múltiples rangos para determinar que medias son significativamente diferentes de otras. (tabla 11)

Tabla 11: *Prueba LSD al 95% de confianza para las formulaciones*

Formulación	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C03	25	1,48	X
A06	17	2,52941	X
D08	21	3,47619	X
B05	20	3,65	X

Tabla 12: *Pruebas de múltiples rangos para puntuación por formulación*

Contraste	***Sig.***	***Diferencia***	***+/- Límites***
A06 - B05	*	-1,12059	0,332549
A06 - C03	*	1,04941	0,316902
A06 - D08	*	-0,946779	0,328891
B05 - C03	*	2,17	0,302424
B05 - D08		0,17381	0,314965
C03 - D08	*	-1,99619	0,298397

* indica una diferencia significativa.

Los datos obtenidos mostraron que, las formulaciones A06 y C03 si presentan diferencias significativas ($p<0,05$) entre sí y con el resto de formulaciones. En cuanto a B05 y D08 no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$). Por lo cual, ambas pudieron ser elegidas como formulación final para la obtención de la bebida, sin embargo, considerando que durante la obtención de los extractos se utilizó una concentración de 2% de cálices, D08 sería la opción recomendable.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

- De los cuatro tratamientos evaluados, A y B fueron los que mostraron mejores resultados.
- El mejor método de extracción en los cálices de *H. sabdariffa*, fue la EAU empleando una temperatura de 30°C por un tiempo de 30 minutos. Bajo estas condiciones, se obtuvo la mayor cantidad de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante en los extractos.
- El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en la evaluación sensorial indicó que, las formulaciones B05 (1,5 g/100 mL jamaica y 0,5% estevia) y D08 (2 g/100 mL jamaica y 0,5% estevia) no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre sí, siendo ambas las de mayor preferencia por los evaluadores; sin embargo, se escogió D08 como la mejor formulación, ya que incluyó la misma concentración utilizada en la preparación de los extractos acuosos.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de estabilidad de la bebida a través del tiempo, por medio de la evaluación del contenido fenólico total, antocianinas monoméricas totales y capacidad antioxidante por DPPH y FRAP.
- Realizar un análisis por colorimetría en los extractos obtenidos por ambos métodos de extracción, y evaluar el color de la bebida a través del tiempo.

BIBLIOGRAFÍAS

Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., & Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, *141*(3), 3201–3206. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008

Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M., & Abou-Arab, E. A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (Hibiscus subdariffa). *Journal of American Science*, *7*(7), 445–456. https://doi.org/10.7537/marsjas070711.67

Ahmed, F. A. M., Satti, N. M. E., & Eltahir, S. E. H. (2019). a Comparative Study on Some Major Constituents of Karkade (Hibiscus Sabdariffa L. – Roselle Plant). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2019.9.1.l1-12

Almahy, H., Abdel-Razik, H. H., EL-Badry, Y., & Ibrahim, A. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanin Pigments from Hibiscus sabdariffa (Rosella) and its Phytochemical Activity at Kingdom of Saudi. *International Journal of Chemical Sciences Research*, *15*(4), 196. https://www.tsijournals.com/articles/ultrasoundassisted-extraction-of-anthocyanin-pigments-from-hibiscus-sabdariffa-rosella-and-its-phytochemical-activity-at-kingdom-o-13532.html

Anaya-Esparza, L. M., Ramos-Aguirre, D., Zamora-Gasga, V. M., Yahia, E., & Montalvo-González, E. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from Justicia spicigera leaves. *Food Science and Biotechnology*, *27*, 1093–1102. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0350-0

Ariza Flores, R., Serrano Altamirano, V., Michel Aceves, A. C., Barrios Ayala, A., Otero Sánchez, M. A., Avendaño Arrazate, C. H., & Noriega Cantú, D. H. (2017). Características bioquímicas y calidad nutracéutica de cinco variedades de jamaica cultivadas en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *8*(2), 269–280. https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.49

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Babalola, S. O., Babalola, A. ., & Aworh, O. C. (2001). Compositional Attributes of the Calyces of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). In *Journal of Food Technology in Africa* (Vol. 6, Issue 4, pp. 133–134). https://doi.org/10.4314/jfta.v6i4.19306

Balarabe, M. A. (2019). Nutritional Analysis of Hibiscus sabdariffa L. (Roselle) Leaves and Calyces. *Plant*, *7*(4), 62–65. https://doi.org/10.11648/j.plant.20190704.11

Barrón-Yánez, R. M., del Rosario García-Mateos, M., Soto-Hernández, M. R., Colinas-León, T., & Kite, G. (2011). Flavonoids and antioxidant activity of Calia secundilfora (Ort.) Yakovlev. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *34*(3), 151–157. www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000300005&lng=es&tlng=es.

Bechoff, A., Cissé, M., Fliedel, G., Declemy, A. L., Ayessou, N., Akissoe, N., Touré, C., Bennett, B., Pintado, M., Pallet, D., & Tomlins, K. I. (2014). Relationships between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of Hibiscus drinks. *Food Chemistry*, *148*, 112–119. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.132

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. (2010). The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, *17*(3–4), 186–191. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.08.006

Benzie, I. F. F., & Straint, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The Frap Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Biruete Guzmán, A., Juárez Hernández, E., Sieiro Ortega, E., Romero Viruegas, R., & Silencio Barrita, J. (2009). Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*, *76*(3), 136–145.

Bolade, M. K., Oluwalana, I. B., & Ojo, O. (2009). Commercial practice of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) beverage production: Optimization of hot water extraction and sweetness level. *World Journal of Agricultural Sciences*, *5*(1), 126–131. http://idosi.org/wjas/wjas5(1)/20.pdf

Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-

Díaz, R., Andrade-Gonzáles, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (Hibiscus sabdariffa). *Industrial Crops and Products*, *69*, 385–394. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *111*(August 2017), 86–91. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012

Castañeda, R., & Cáceres, A. (2014). Compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas de los cálices de rosa de jamaica (Hibiscus sabdariffa Linn). *Revista Científica*, *24*(1), 7–24. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5069949

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *41*, 357–377. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016

Choong, Y.-K., Mohd Yousof, N. S. A., Jamal, J. A., & Isa Wasiman, M. (2019). Determination of anthocyanin content in two varieties of Hibiscus Sabdariffa from Selangor, Malaysia using a combination of chromatography and spectroscopy. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, *3*(2), 067–075. https://doi.org/10.29328/journal.jpsp.1001034

Cid-Ortega, S., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Roselle calyces (Hibiscus sabdariffa), an alternative to the food and beverages industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(11), 6859–6869. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9

Cid Ortega, S., Navarro Frómeta, A. E., Rostango, M. A., López Méndez, E. M., & Monterrosas Fuentes, A. (2010). Sugar-Free Hibiscus Water Production: Process Desing And Economic Evalation S. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia En Ingeniería Química AMIDIQ*, *1*, 4947–4952.

Cid, S., & Guerrero, J. A. (2012). Propiedades Funcionales De La Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *6*(2), 47–63.

Cosavalente Burgos, K. S., Ruiz Reyes, S. G., & Ganoza Yupanqui, M. L. (2016). Antocianinas totales y capacidad antioxidante in vitro de extractos de diferente grado etanólico del fruto de Vaccinium corymbosum "Arándano." *UCV-Scientia*, *8*(1), 44–48. https://doi.org/10.18050/revucv-scientia.v8n1a5

DaCosta-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, *165*, 424–443. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002

Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., & Wang, W. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza root. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(1), 61–65. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.05.006

Dudonné et al. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). *J. Agric. Food Chem*, *57*(5), 1768–1774. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf803011r

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, *35*, 100547. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547

Ferarsa, S., Zhang, W., Moulai-Mostefa, N., Ding, L., Jaffrin, M. Y., & Grimi, N. (2018). Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, *109*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.006

Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of Hibiscus sabdariffa aqueous extract. *Food Research International*, *44*(5), 1490–1495. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040

Flores-Aguilar, E., & Flores-Rivera, E. del P. (2018). Estabilidad de Antocianinas, Fenoles

totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (Zea mays L.) y Uña de Gato (Uncaria tomentosa sp). *Informacion Tecnologica*, *29*(2), 175–184. https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000200017

Flores-Martínez, H., León-Campos, C., Estarrón-Espinosa, M., & Orozco-Ávila, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano Mexicano (Lippia graveolens HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, *15*(3), 773–785. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=620/62048168009

Foti, M. C., Daquino, C., Dilabio, G. A., & Ingold, K. U. (2011). Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph •). *Organic Letters*, *13*(18), 4826–4829. https://doi.org/10.1021/ol2019086

Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G., & Luo, Z. (2019). Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrasonics Sonochemistry*, *60*(1), 104726. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726

Galicia-Flores, L. A., Slinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B. M., & Sánchez-Feria, C. (2008). Caracterización Fisicoquímica y Actividad Antioxidante de Extractos de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) Nacional e Importada. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, *14*(2), 121–129. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60911556003

Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, *2–2*, 19–31. https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18

González-de-Peredo, A. V., Vázquez-Espinosa, M., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Álvarez, J. Á., Barbero, G. F., & Ayuso, J. (2020). Optimization of analytical ultrasound-assisted methods for the extraction of total phenolic compounds and anthocyanins from sloes (Prunus spinosa L.). *Agronomy*, *10*(7), 966. https://doi.org/10.3390/agronomy10070966

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, *15*(1), 57–60. https://doi.org/10.24265/horizmed.2015.v15n1.08

Hani, M. N. F., Zaiton, H., Faridah, H., & Norlelawati, A. (2019). Physico-chemical properties and sensory acceptance of mixed drinks of red cabbage (Brassica oleracea L.) and roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts. *International Food Research Journal*, *26*(2), 671–677. http://www.ifrj.upm.edu.my/26 (02) 2019/(33).pdf

Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Informacion Tecnologica*, *24*(5), 93–102. https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011

Ifie, I., Marshall, L. J., Ho, P., & Williamson, G. (2016). Hibiscus sabdariffa (Roselle) Extracts and Wine: Phytochemical Profile, Physicochemical Properties, and Carbohydrase Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(24), 4921–4931. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01246

Islam, M. (2019). Varietal Advances of Jute, Kenaf and Mesta Crops in Bangladesh: A Review. *International Journal of Bioorganic Chemistry*, *4*(1), 24. https://doi.org/10.11648/j.ijbc.20190401.15

ITIS: Hibiscus sabdariffa. (n.d.). Retrieved October 31, 2020, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503001#null

Izquierdo-Vega, J. A., Arteaga-Badillo, D. A., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J. A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Delgado-Olivares, L., Madrigal-Bujaidar, E., & Madrigal-Santillán, E. (2020). Organic acids from Roselle (Hibiscus sabdariffa L.)-A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*, *8*(5), 100. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8050100

Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Soković, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Hibiscus sabdariffa L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International*, *100*, 717–723. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073

Jiménez, A. M., Sánchez, M., & Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales de Veterinaria de Murcia*, *28*(0), 67–78. https://doi.org/10.6018/j/188731

Juhari, N. H., Bredie, W. L. P., Toldam-Andersen, T. B., & Petersen, M. A. (2018). Characterization of Roselle calyx from different geographical origins. *Food Research International*, *112*, 378–389. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.049

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(4), 412–422. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1

Khan, M. K., Asif, M. N., Ahmad, M. H., Imran, M., Arshad, M. S., Hassan, S., Khan, M. I., Nisa, M. U., Iqbal, M. M., & Muhammad, N. (2019). Ultrasound-Assisted Optimal Development and Characterization of Stevia-Sweetened Functional Beverage. *Journal of Food Quality*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/5916097

Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2020). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *70*, 105325. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325

Maciel, L. G., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Daguer, H., Molognoni, L., de Almeida, M. M., Granato, D., & Rosso, N. D. (2018). Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, *113*, 187–197. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.053

Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, *83*(2), 441–447. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry*, *167*, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094

Mashkour, M., Maghsoudlou, Y., & Shahraki, M. H. (2013). Optimization of roselle beverage formulation using response surface methodology. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, *5*(2), 119–129. https://doi.org/10.3920/qas2012.0137

Medina-Carrillo, R. E., Sumaya-Martínez, M. T., Machuca-Sánchez, M. L., Sánchez-herrera, L. M., Balois-Morales, R., & Jiménez-Ruiz, E. I. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (hibiscus sabdariffa l.) en

función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, *22*, 41–44. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2071-00542013000500006&script=sci_arttext&tlng=pt

Mgaya-Kilima, B., Remberg, S. F., Chove, B. E., & Wicklund, T. (2014). Physio-chemical, mineral composition and antioxidant properties of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract blended with tropical fruit juices. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *14*(3), 8963–8978. https://www.ajol.info/index.php/ajfand/article/view/104812

Mojica, L., Rui, L., & Gonzalez De Mejia, E. (2012). Hibiscus sabdariffa L.: Phytochemical composition and nutraceutical properties. *ACS Symposium Series*, *1109*, 279–305. https://doi.org/10.1021/bk-2012-1109.ch017

Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I. F., Salgado, L. M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). The main beneficial effect of roselle (Hibiscus sabdariffa) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 596–605. https://doi.org/10.1002/jsfa.9220

Moreno, B. L., & Oyola, Y. A. D. (2016). Caracterización de parámetros fisicoquímicos en frutos de mora (Rubus alpinus Macfad). *Acta Agronomica*, *65*(2), 130–136. https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.45587

Nadlene, R., Sapuan, S. M., Jawaid, M., Ishak, M. R., & Yusriah, L. (2016). A Review on Roselle Fiber and Its Composites. *Journal of Natural Fibers*, *13*(1), 10–41. https://doi.org/10.1080/15440478.2014.984052

Ningrum, A., Schreiner, M., Luna, P., Khoerunnisa, F., & Tienkink, E. (2019). Free volatile compounds in red and purple roselle (Hibiscus sabdariffa) pomace from Indonesia. *Food Research*, *3*(6), 749–754. https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).133

NTE INEN 2392. (2017). *Hierbas Aromáticas. Requisitos-segunda revisión*. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2392-2.pdf

Oboh, G., Adewuni, T. M., Ademiluyi, A. O., Olasehinde, T. A., & Ademosun, A. O. (2018). Phenolic Constituents and Inhibitory Effects of Hibiscus sabdariffa L. (Sorrel) Calyx on Cholinergic, Monoaminergic, and Purinergic Enzyme Activities. *Journal of Dietary Supplements*, *15*(6), 910–922. https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1406426

Ogundele, O. M. A., Awolu, O. O., Badejo, A. A., Nwachukwu, I. D., & Fagbemi, T. N. (2016). Development of functional beverages from blends of Hibiscus sabdariffa extract and selected fruit juices for optimal antioxidant properties. *Food Science and Nutrition*, *4*(5), 679–685. https://doi.org/10.1002/fsn3.331

Ojulari, O. V., Lee, S. G., & Nam, J. O. (2019). Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from Hibiscus sabdariffa L. On obesity. *Molecules*, *24*(1), 210. https://doi.org/10.3390/molecules24010210

Oloumi, H., Shakeri, S., & Behzadi, M. (2016). Antioxidant activities, polyphenolic composition and their correlation analysis on Hibiscus sabdarifa L. (sabdariffa) calices. *Journal of Herbal Drugs*, *7*(2), 89–96. http://jhd.iaushk.ac.ir/article_650008.html

Owoade, A. O., Adetutu, A., & Olorunnisola, O. S. (2016). Identification of Phenolic Compounds in Hibiscus sabdariffa Polyphenolic Rich Extract (HPE) by Chromatography Techniques. *British Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(4), 1–12. https://doi.org/10.9734/bjpr/2016/26955

Owoade, A. O., Adetutu, A., & Olorunnisola, O. S. (2019). A review of chemical constituents and pharmacological properties of Hibiscus sabdariffa L. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, *6*(4), 42–51. https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2019.604.006

Pacheco-Coello, F., Ramirez-Azuaje, D., Pinto-Catari, I., Peraza-Marrero, M., & Orosco-Vargas, C. (2019). Propiedades de la flor de jamaica(Hibiscus sabdariffa L.), rica fuente de polifenoles. *Saber, Universidad de Oriente*, *31*, 240–247.

Paraíso, C. M., dos Santos, S. S., Correa, V. G., Magon, T., Peralta, R. M., Visentainer, J. V., & Madrona, G. S. (2019). Ultrasound assisted extraction of hibiscus (Hibiscus sabdariffa L.) bioactive compounds for application as potential functional ingredient. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(10), 4667–4677. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03919-y

Peredo Pozos, G. I., Ruiz-López, M. A., Zamora Nátera, J. F., Álvarez Moya, C., Barrientos Ramírez, L., Reynoso Silva, M., Rodríguez Macías, R., García-López, P. M., González Cruz, R., Salcedo Pérez, E., & Vargas Radillo, J. J. (2020). Antioxidant capacity and antigenotoxic effect of Hibiscus sabdariffa L. extracts obtained with ultrasound-assisted extraction process. *Applied Sciences*, *10*(2), 560. https://doi.org/10.3390/app10020560

Pereira, R. N., & Vicente, A. A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, *43*, 1936–1943. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.013

Pérez-Loredo, M., Hernández-De Jesús, L., & Barragán-Huerta, B. (2017). Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (Stenocereus stellatus) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Agrociencia*, *51*(2), 135–151. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000200135

Pimentel-Moral, S., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Arráez-Román, D., Martínez-Férez, A., & Segura-Carretero, A. (2018). Supercritical CO 2 extraction of bioactive compounds from Hibiscus sabdariffa. *Journal of Supercritical Fluids*, *147*, 213–221. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.11.005

Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa calyces for natural food colorants. *Food Chemistry*, *275*, 309–321. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118

Piovesana, A., & Noreña, C. P. Z. (2019). Study of Acidified Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyces. *The Open Food Science Journal*, *11*(1), 25–34. https://doi.org/10.2174/1874256401911010025

Piovesana, A., Rodrigues, E., & Noreña, C. P. Z. (2018). Composition analysis of carotenoids and phenolic compounds and antioxidant activity from hibiscus calyces (Hibiscus sabdariffa L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, *30*(2), 208–217. https://doi.org/10.1002/pca.2806

Pragalyaashree, M. M., Tiroutchelvame, D., & Sashikumar, S. (2018). Degradation kinetics of anthocyanin extracted from roselle calyces (Hibiscus sabdariffa). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(11), 057–063. https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.81108

Preciado-Saldaña, A. M., Domínguez-Avila, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Villegas-Ochoa, M. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Wall-Medrano, A., González-Córdova, A. F., & González-Aguilar, G. A. (2019). Formulation and characterization of an optimized functional beverage from hibiscus (Hibiscus sabdariffa L.) and green tea (Camellia sinensis L.). *Food Science and Technology International*, *25*(7), 547–561. https://doi.org/10.1177/1082013219840463

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290–4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

Rasheed, D. M., Porzel, A., Frolov, A., El Seedi, H. R., Wessjohann, L. A., & Farag, M. A. (2018). Comparative analysis of Hibiscus sabdariffa (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α-glucosidase inhibition. *Food Chemistry*, *250*, 236–244. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.020

Ravanfar, R., Tamadon, A. M., & Niakousari, M. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from red cabbage using Taguchi design method. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 8140–8147. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1880-6

Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I., & Martínez-Peña, M. D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) con cálices de colores diversos analysis of phenolic acids and antioxidant activity of aqueous. *Agrociencia*, *49*(3), 277–290.

Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *102*(1), 575–586. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023

Rodríguez Aguirre, O. E., Andrade Barreiro, W. A., & Diaz López, F. E. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de Bocconia frutescens L . (Papaveraceae) Antioxidant activity of extracts from leaves of Bocconia. *Revista de Tecnología*, *14*(2), 21–36. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041492

Rodríguez, J. E., & López, M. (2014). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from Punica granatum (Grenada) fruit. *Revista Cubana de Farmacia*, *48*(2), 469–476. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75152014000300012&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Rojas, T., Fuentes, M., Contreras, E., Gómez, S., & Muñóz, A. M. (2019). Compuestos Fenólicos De La Cáscara De Sanky Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds of the Peel of Sanky. *Revista Sociedad Quimica Perú*, *85*(2), 258–267. https://doi.org/https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i2.82

Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Torre, L. B. J. D. La, Serrano-Altamirano, V., & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, *18*(3), 395–407. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.08.038

Sánchez-Moreno, C., A Larrauri, J., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture. *J Sci Food Agric*, *76*(2), 270–276. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2%3C270::AID-JSFA945%3E3.0.CO;2-9

Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (Hibiscus sabdariffa L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7886–7890. https://doi.org/10.1021/jf070485b

Shruthi, V. H., Ramachandra, C. T., Nidoni, U., Hiregoudar, S., Naik, N., & Kurubar, A. R. (2017). Physico-Chemical, Nutritional and Functional Properties of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(12), 2976–2982. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.347

Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, *214*, 234–241. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071

Singh, P., Khan, M., & Hailemariam, H. (2017). Nutritional and Health Importance of Hibiscus Sabdariffa: A Review and Indication for Research Needs. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, *6*(5), 125–128. https://doi.org/10.15406/jnhfe.2017.06.00212

Singh, S., & Singh, R. . (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, *24*(4), 392–415. https://doi.org/10.1080/87559120802304269

Singh, Shrawan, Singh, D. R., Salim, K. M., Srivastava, A., Singh, L. B., & Srivastava, R. C. (2011). Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *62*(7), 765–773. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.585961

Singleton, V. L., Rudolf, O., & Lamuela-Raventíos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*(1974), 152–178. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Torres, N., Gélvez, V., & Ayala, M. (2019). Elaboración de una bebida de flor de jamaica con pretratamiento de sonicación (Hibiscus sabdariffa) endulzada con estevia (stevia rebaudiana b .) Y enriquecida con aloe vera. *Revista Infometric@*, *2*(1), 13–20. http://infometrica.org/index.php/syh/article/view/62

Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., & Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract. *Food Research International*, *35*(4), 351–356. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00129-6

Vidot, K., Achir, N., Mertz, C., Sinela, A., Rawat, N., Prades, A., Dangles, O., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2016). Effect of Temperature on Acidity and Hydration Equilibrium Constants of Delphinidin-3-O- and Cyanidin-3-O-sambubioside Calculated from Uni- and Multiwavelength Spectroscopic Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(20), 4139–4145. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00701

Volkov, V. A., & Misin, V. M. (2015). Kinetics of reactions of antioxidants from some food and medicinal plants with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Kinetics and Catalysis*, *56*(1), 43–48. https://doi.org/10.1134/S0023158415010139

Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Che Man, Y. B. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (Hibiscus sabdariffa L.). *Nutrition & Food Science*, *32*(2), 68–73. https://doi.org/10.1108/00346650210416994

Wu, H.-Y., Yang, K.-M., & Chiang, P.-Y. (2018). Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules*, *23*(6), 1357. https://doi.org/10.3390/molecules23061357

Wu, L. (2007). Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts. *Journal of Zhejiang University. Science. B.*, *8*(9), 673–679. https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0673

Xu, D.-P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A.-N., & Li, H.-B. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of jatropha

integerrima by response surface methodology. *Molecules*, *21*(1), 18. https://doi.org/10.3390/molecules21010018

Yang, B., Jiang, Y., Shi, J., Chen, F., & Ashraf, M. (2011). Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (Dimocarpus longan Lour.) fruit - A review. *Food Research International*, *44*(7), 1837–1842. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.019

Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N. S., Quintero-Lira, A., Gómez-Aldapa, C. A., Alanís-García, E., Cervantes-Elizarrarás, A., Güemes-Vera, N., & Ramírez-Moreno, E. (2016). Application of ultrasound in a closed system: Optimum condition for antioxidants extraction of blackberry (Rubus fructicosus) residues. *Molecules*, *21*(7), 950. https://doi.org/10.3390/molecules21070950

Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A., & Barrow, C. J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, *18*(3–5), 445–450. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9048-4