

# CONDICIONES DE OPTIMIZACIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS CÁLCICES DE FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

*Elisa C. O'Relly-Arencibia\**, *Leonardo Fernández-Sosa*, *Margarita Núñez de Villavicencio*,  
*Ana S. Falco-Manso* y *José L. Rodríguez-Sánchez*  
*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3½,*  
*La Habana, C.P. 17100, Cuba. E-mail: elisa@iiaa.edu.cu*

*Recibido: 13-05-2022 / Revisado: 17-05-2022 / Aceptado: 19-05-2022 / Publicado: 22-05-2022*

## RESUMEN

Los extractos de cálices de Jamaica, por su alto contenido de antocianinas, representan una alternativa potencial para el reemplazo de colorantes sintéticos en la industria alimentaria. El objetivo del estudio fue determinar las condiciones óptimas de extracción de las antocianinas de los cálices de flor de Jamaica mediante un diseño factorial de tipo Box-Behnken con dos factores y tres niveles, considerando como variables independientes la relación masa-disolvente (1/10 a 1/20 m/v) y la concentración alcohólica (30 a 60 % v/v) y como variable de respuesta la masa total de antocianina extraída. Se determinó que la solución numérica del óptimo para las condiciones de extracción fue de 42 % de etanol y la relación masa-disolvente de 1/20 m/v, correspondiéndose con un valor pronosticado de 48 mg de antocianinas extraídas. Se confirmó la validez de la optimización realizando tres extracciones bajo las condiciones antes señaladas y se determinó que la concentración alcohólica influyó significativamente en el proceso de extracción.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, Cálices de Jamaica, extracto, antocianinas, optimización.

## ABSTRACT

### **Optimization conditions for the extraction of anthocyanins from the hibiscus flower calyces (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Due to their high content of anthocyanins, the extracts of Jamaican calyces represent a potential alternative for the replacement of synthetic dyes in the food industry. The objective of the study was to determine the optimal conditions for the extraction of anthocyanins from the hibiscus flower calyces through a factorial design of the Box-Behnken type with two factors and three levels, considering as independent variables the mass-solvent ratio (1/10 at 1/20 m/v) and alcohol concentration (30 to 60% v/v) and as a response variable the total mass of anthocyanin extracted. It was determined that the optimal numerical solution for the extraction conditions was 42% ethanol and the mass-solvent ratio equal to 1/20 m/v, which corresponds to a predicted value of 48 mg of extracted anthocyanins. The validity of the optimization was confirmed by performing three extractions under the aforementioned conditions and it was determined that the alcohol concentration significantly influenced the extraction process.

**Keywords:** *Hibiscus sabdariffa*, Jamaican calyces, extract, anthocyanins, optimization.

## INTRODUCCIÓN

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta medicinal herbácea anual que pertenece a la familia Malvaceae. El cáliz tiene importancia comercial en la industria alimentaria para la elaboración de bebidas y alimentos como té, mermeladas, jaleas y jarabes (1). Una característica destacada del extracto de flor de Jamaica es su alto contenido en antocianinas, principalmente la delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, delphinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido, compuestos responsables del color rojo-púrpura de la planta (2). Este color rojo intenso y los beneficios para la salud de las antocianinas han impulsado las investigaciones sobre esta planta, con la finalidad de obtener colorantes alimentarios naturales para diversas aplicaciones en la industria alimentaria, pues el color se considera una de las principales propiedades que determinan la aceptabilidad de los alimentos y bebidas (3, 4). En el proceso de obtención del extracto es necesario determinar las condiciones más adecuadas relacionadas con la extracción de las antocianinas, por lo que el empleo de la metodología de superficie de respuesta es una herramienta estadística poderosa para optimizar las respuestas experimentales. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de extracción de las antocianinas de los cálices de flor de Jamaica (relación material/disolvente y porcentaje de etanol) mediante un diseño factorial de tipo Box-Behnken.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los cálices de flor de Jamaica fueron recolectados y secados al sol en una finca de plantas medicinales ubicada en Güira de Melena. Estos se trituraron en un molino de martillo con un tamiz de malla 0,5 mm hasta obtener un polvo fino.

Las extracciones se hicieron en vasos de precipitados conteniendo 10 g de cálices en polvo y cantidad variable de disolvente. Las suspensiones se agitaron a 200 min<sup>-1</sup> con un agitador magnético. El tiempo de extracción fue 15 min. Transcurrido el tiempo seleccionado los extractos fueron centrifugados a 3 000 min<sup>-1</sup> durante 10 min y se separó el sobrenadante para la determinación del contenido de antocianinas.

Se utilizó un diseño factorial tipo Box-Behnken, con dos factores (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>) y tres niveles (5), considerando como variables independientes la relación masa-disolvente (1/10 a 1/20 m/v) y concentración alcohólica (30 a 60 % v/v) y como variable de respuesta la masa total de antocianina extraída, teniendo en consideración que en todos los ensayos experimentales se empleó la misma masa de cálices en polvo.

La Tabla 1 presenta la codificación de las variables independientes.

**Tabla 1. Codificación de las variables independientes y sus niveles en el diseño factorial**

Variables independientes	Factor	Niveles codificados		
		-1	0	+1
Porcentaje de etanol	X <sub>1</sub>	30	45	60
Relación sólido/líquido	X <sub>2</sub>	1/10	1/15	1/20

La concentración de antocianinas monoméricas de los extractos se determinó según el método oficial de pH diferencial, un método espectrofotométrico que implica la medición de la absorbancia a pH 1,0 y 4,5 (6). Brevemente, se prepararon soluciones tampón a pH 1,0 (cloruro de potasio 0,025 M) y a pH 4,5 (acetato de sodio 0,4 M). Cada muestra se diluyó con los tampones para dar una lectura de absorbancia entre 0,2 y 1,4 AU, la que se midió a 510 y 700 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV- 2600. El contenido total de antocianinas de los extractos (CTA<sub>extracto</sub>), expresado en mg /L de cianidina-3-glucósido, se calculó de acuerdo con la ec. 1.

$$CTA_{\text{extracto}} \text{ (mg/L)} = (\Delta A \times M \times FD \times 1000) / \varepsilon \times b \quad (\text{ec. 1})$$

Donde  $\Delta A = (A_{510} - A_{700})$  pH 1,0-  $(A_{510} - A_{700})$  pH 4,5; A: absorbancia del extracto; M: masa molar = 449,2 g/mol para la cianidina-3-glucósido; FD: factor de dilución;  $\varepsilon$ : coeficiente de absortividad molar de la cianidina-3-glucósido 26 900 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

La masa total de antocianinas extraídas (MTA) se estimó según la fórmula:

$$MTA \text{ (mg)} = [CTA_{\text{extracto}} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{extracto}} \text{ (L)}]$$

Donde: CTA<sub>extracto</sub>: contenido total de antocianinas del extracto calculado según la ec. 1; V<sub>extracto</sub>: Volumen del extracto.

En el diseño experimental factorial tipo Box-Behnken, la calidad del ajuste de los resultados al modelo desarrollado fue comprobado mediante el análisis del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), así como la prueba de falta de ajuste. Los datos generados por el modelo se emplearon para el gráfico de las superficies de respuestas y mediante la metodología de función de conveniencia se estimaron las condiciones óptimas para la extracción de las antocianinas. Todos los resultados fueron procesados estadísticamente empleando el software STATISTICA ver. 8.0 (7).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción sólido-líquido es un proceso de separación que involucra la transferencia de solutos desde una matriz sólida hacia un disolvente. Esta transferencia de masa involucra tanto la difusión que ocurre a escala molecular, como el transporte masivo debido al flujo por convección. En esta investigación, el diseño factorial tipo Box-Behnken fue utilizado para la optimización del proceso de extracción, ya que es escasa la literatura científica acerca de cómo influyen las variables de proceso en la obtención de colorante a partir de cálices de flor de Jamaica.

Se informan en la Tabla 2 los datos de las corridas experimentales de acuerdo con el diseño seleccionado.

**Tabla 2. Corridas experimentales para la optimización de la extracción de antocianinas**

Exp.	Factor 1 A: Masa/Disolvente	Factor 2 B: Grado alcohólico (%)	Respuesta Masa de antocianinas (mg)
1	15	45	44,29
2	20	45	49,23
3	15	30	46,60
4	15	60	42,40
5	10	45	44,73
6	15	45	45,45
7	15	45	46,61
8	10	30	46,50
9	20	60	43,83
10	20	60	44,68
11	10	60	35,28
12	20	30	46,08

Un polinomio cuadrático fue la solución matemática que involucra las variables seleccionadas con la masa total de antocianinas extraídas, según el análisis de varianza resumido en la Tabla 3.

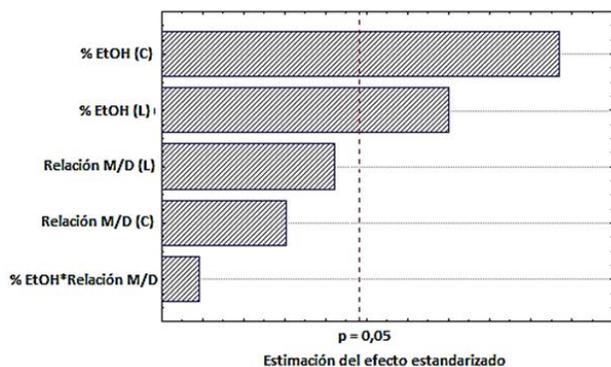
**Tabla 3. Resumen del análisis de varianza del modelo cuadrático de superficie de respuesta para la masa total de antocianinas extraídas**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Modelo cuadrático	117,39	5	23,48	12,80	0,004**
Residual	11,01	6	1,83	-	-
Error puro	3,05	3	1,02	-	-
Falta de ajuste	7,95	3	2,65	2,61	0,226
R <sup>2</sup>	0,91	-	-	-	-

\*\*Significativo para  $p \leq 0,05$ .

El elevado valor de F indica que la variación en las respuestas puede explicarse por la ecuación de regresión. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se calculó para verificar la suficiencia y la adecuación del modelo, cuyo valor fue superior a 0,9 por lo que el modelo cuadrático tiene una capacidad de predicción satisfactoria (7). Además, la prueba de falta de ajuste no resultó significativa, lo que confirma que el modelo polinómico cuadrático es adecuado para explicar la relación entre la variable de respuesta y los predictores, ya que la hipótesis nula ( $H_0$ ) de esta prueba es que el modelo ajusta satisfactoriamente los datos experimentales de las extracciones.

El diagrama estandarizado de Pareto (Fig. 1) completa la información del análisis de varianza, ya que muestra la magnitud relativa y la significación estadística de los efectos principales, cuadráticos y de interacción, colocándolos en orden de importancia decreciente. De la figura se observa que solo el porcentaje de etanol fue significativo, tanto el término lineal como el cuadrático, esto último indica que la relación entre esta variable independiente y la variable de respuesta sigue una línea curva.



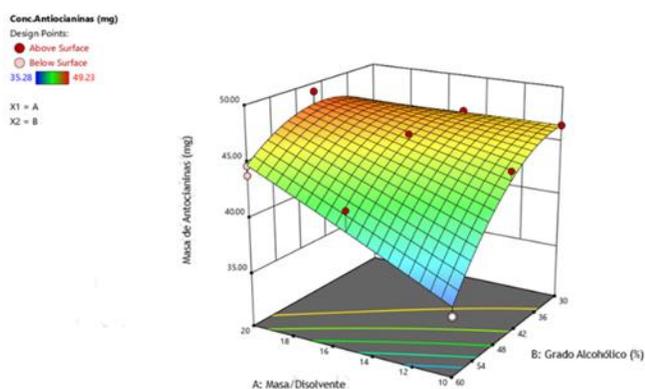
**Fig. 1. Diagrama estandarizado de Pareto de los términos con significación estadística en la extracción de las antocianinas de los cálices de flor de Jamaica. Las letras L y C simbolizan término lineal y término cuadrático, respectivamente.**

La ecuación final en función de las variables independientes codificadas se presenta a continuación:

$$\text{Masa total de antocianinas (g)} = 47,80 - 3,38X_1 + 1,67X_2 + 3,76X_1X_2 - 1,94X_1^2 - 0,54X_2^2$$

Donde  $X_1$  y  $X_2$  simbolizan las variables relación masa-disolvente y porcentaje de etanol, respectivamente.

El gráfico de la superficie de respuesta generado por el modelo empírico se presenta en la Fig. 2 y permite visualizar el efecto de ambas variables independientes en el proceso de extracción sólido líquido de las antocianinas.



**Fig. 2. Superficie de respuesta con la influencia de las variables grado alcohólico y relación masa-disolvente en el proceso de extracción de antocianinas.**

Se aprecia claramente que la disminución del grado alcohólico favorece la extracción de antocianinas no ocurriendo lo mismo con la variable relación masa/disolvente. La curvatura de esta superficie de respuesta se debe a la contribución de los términos cuadráticos.

La solución numérica del óptimo para las condiciones de la extracción fue: 42 % de etanol y la relación masa-disolvente igual a 1/20  $m/v$ , que se corresponden con un valor pronosticado de 48 mg de antocianinas extraídas (función de conveniencia igual a uno).

Para confirmar la validez de la optimización se realizaron tres extracciones bajo las condiciones antes señaladas, hallando que la masa de antocianinas extraídas fue de  $46 \pm 4$  mg, valor experimental razonablemente cercano al valor pronosticado por el modelo cuadrático (diferencia inferior al 6 %) lo que evidencia la validez del modelo predictivo y ratifica las condiciones óptimas señaladas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados experimentales, la concentración alcohólica resultó la variable que influyó significativamente en el proceso de extracción de antocianinas. Las condiciones óptimas fueron: como disolvente solución alcohólica al 42 %  $v/v$  y relación masa-disolvente 1/20  $m/v$ .

## REFERENCIAS

1. Cissé M, Dornier M, Sakho M, Ndiaye A, Reynes M, Sock O. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits* 2009; 64:179-93.
2. Borrás-Linares I, Fernández-Arroyo S, Arráez-Roman D, Palmeros-Suárez PA, Del Val-Díaz R, Andrade-González I, y otros. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Ind Crops Prod* 2015; 69:385-94.
3. Jabeura I, Pereira E, Barrosa L, Calhelha RC, Soković O, Ferreira I. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Res Int* 2017; 100:717-23.
4. Mohamed R, Gibriel A, Rasmy NM, Abu-Salem F. Extraction of anthocyanin pigments from *Hibiscus sabdariffa* L. and evaluation of their antioxidant activity. *Middle East J App Sci* 2016; 6(4):856-66.
5. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Design of experiments for fitting response surfaces I. En: *Response Surface Methodology: Process and Product*

- Optimization Using Designed Experiments, Hoboken, John Wiley & Sons, Inc; 2016, pp. 369-451.
6. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: collaborative study. *JAOAC Int* 2005; 88:1269-78.
  7. Dowdy S, Weardon S, Chilko D. Multiple Regression and Correlation. En: *Statistics for Research*, 3th Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey; 2004, pp. 431-508.
  8. Galicia-Flores LA, Salinas-Moreno Y, Espinosa-García BM, Sánchez-Feria C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2008; 14(2):121-9.
  9. Farombi EO; Fayoka A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(12):1120-8.
  10. Cissé M, Bohuon P, Sambe F, Kane C, Sakho M, Dornier M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *J Food Eng* 2012; 109:16-21.
  11. Cacade JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J Food Sci* 2003; 68(1):240-248.
  12. Castillo-Araúz RL. Efecto de uso del extracto de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) como colorante natural y fuente de antioxidantes en las características fisicoquímicas de yogur sabor a fresa (tesis de licenciatura). Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; 2017.
  13. Arriaga L. Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L. (rosa de Jamaica) como alternativa de consumo del colorante artificial rojo No.40 (tesis de licenciatura). Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; 2007.