

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE *HIBISCUS SABDARIFFA* L. Y SU CARACTERIZACIÓN CROMÁTICA

Isis Paez-Cartaya^{1,3*}, José L. Rodríguez-Sánchez² y Luis Cruz-Viera³

¹Grupo Empresarial LABIOFAM. Ave. Independencia, km 16 ½, C.P. 10800, La Habana, Cuba.

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carr. al Guatao, km 3½, C.P. 19200, La Habana, Cuba.

³Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Calle 114 No. 11901 e/ 119 y 129, C.P. 11500, La Habana, Cuba.

E-mail: isis.paez921007@gmail.com

RESUMEN

Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mediante el diseño D-óptimo y al extracto se le realizó la caracterización cromática. Las variables independientes seleccionadas fueron temperatura (40 a 60 °C), concentración alcohólica (0 a 80 % v/v) y relación sólido-disolvente (1:5 a 1:15 m/v) y como variable de respuesta rendimiento de extracción. Los resultados mostraron que solo la concentración alcohólica y la relación sólido-disolvente contribuyen significativamente en el rendimiento de extracción. Las condiciones óptimas para la extracción de los pigmentos fueron: temperatura 40 °C, disolvente agua y relación sólido-disolvente 1:5 m/v. El color del extracto expresado en las coordenadas cromáticas CIELAB fue: L* = 69,09; a* = 43,01 y b* = 23,83.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, extracción, optimización, antocianinas, colorante natural.

ABSTRACT

Optimization of extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. and its chromatic characterization

The optimal extraction conditions of anthocyanins from the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. were determined using the D-optimal design, and the chromatic characterization was performed on the obtained extract. The independent variables selected were: temperature (40-60 °C), alcohol concentration (0-80 % v/v) and solid-solvent ratio (1:5-1:15 m/v) and extraction yield as response variable. The results showed that only the alcohol concentration and solid-solvent ratio contribute significantly to the extraction yield. The optimal conditions for the extraction of the pigments were: temperature 40 °C, water as solvent and solid-solvent ratio 1:5 m/v. The color of the extract expressed in the CIELAB chromatic coordinates was: L* = 69,09; a* = 43,01 and b* = 23,83.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, extraction, optimization, anthocyanins, natural colorant.

INTRODUCCIÓN

Existe un interés creciente en el uso de colorantes de origen natural ya que no ocasionan perjuicio a la salud y no están sujetos a regulaciones sanitarias (1). Entre los pigmentos naturales se encuentran las antocianinas, que se hallan principalmente en flores y frutos, y que tienen como característica ser responsables de la gama de colores desde el rojo hasta el púrpura, además de ser hidrosolubles (2).

Los cálices de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se caracterizan por una elevada concentración de antocianinas (3), y por ello uno de sus usos está dirigido

***Isis Paez Cartaya:** Licenciada en Ciencias Alimentarias (IFAL, 2015). Labora en la Unidad de Desarrollo e Innovación del Grupo Empresarial Labiofam. Sus principales líneas de trabajo son la tecnología del yogur y la formulación de aromas y colorantes naturales para este producto a partir de la extracción de compuestos bioactivos de las plantas.

a la obtención de colorantes alimentarios, sin embargo, las investigaciones relacionadas con la optimización de la extracción son escasas en la literatura científica (4, 5). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mediante el diseño D-óptimo, y la caracterización cromática del extracto obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ensayos se realizaron con una muestra de 1 kg de cálices frescos de flor de Jamaica suministrada por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de Las Lajas, Mayabeque. La muestra consistió en una mezcla de las variedades Dogo, Benito, Anadelia y Ficarú 90, que allí se cultivan.

Los cálices se secaron en una estufa a 45 ± 1 °C hasta alcanzar una humedad inferior a 8 % $\frac{m}{m}$. La molienda se realizó en un molino de cuchillas de alta velocidad a $90\,000 \text{ min}^{-1}$ durante 5 s. Los cálices triturados se pasaron por un tamiz de malla 0,5 mm, obteniéndose un polvo fino.

Las extracciones se hicieron en frascos ámbar de 150 mL de capacidad con tapas, con 1,0 g de cálices pulverizados y un volumen de disolvente en correspondencia con la relación sólido-disolvente determinada por el diseño experimental. Los frascos fueron colocados en baño de agua con control de temperatura y agitación horizontal. El equipo operó a velocidad lineal de $6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. El tiempo de extracción fue 1 h. A continuación, los extractos fueron centrifugados a $3\,000 \text{ min}^{-1}$ durante 10 min, recogiendo el líquido sobrenadante para la determinación de la masa de antocianinas extraída.

Se realizó la extracción cuantitativa de las antocianinas de los cálices secos molidos con la finalidad de determinar el contenido de estos compuestos en el material experimental. Para ello, se pesó 1,0 g en un tubo de centrifuga, añadiendo 15 mL de etanol 50 % $\frac{v}{v}$ y realizando la extracción durante 1 min a $10\,000 \text{ min}^{-1}$ con un homogeneizador Ultra-Turrax T25. Se centrifugó a $3\,000 \text{ min}^{-1}$ durante 10 min. El sobrenadante se decantó a un volumétrico de 50 mL y el residuo sólido se sometió dos veces al mismo procedimiento de extracción. Finalmente, el volumétrico se enrasó con etanol 50 % $\frac{v}{v}$ y se cuantificó la masa de antocianinas extraída.

Se utilizó el diseño D-Óptimo de tres factores (X_1 , X_2 , X_3) y tres niveles (-1, 0, +1), considerando las variables independientes: temperatura (40, 50 y 60 °C), concentración alcohólica (0, 40 y 80 % $\frac{v}{v}$) y relación sólido-disolvente (1/5, 1/10 y 1/15 $\frac{m}{v}$). La variable de respuesta fue el rendimiento de extracción. El número de experimentos a realizar fue 14.

La concentración de antocianinas monoméricas de los extractos se determinó según el método oficial de pH diferencial de la AOAC (6). El contenido total de antocianinas de los extractos ($\text{CTA}_{\text{extracto}}$), expresado en mg de cianidina-3-glucósido/L, se calculó de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{CTA}_{\text{extracto}} \text{ (mg/L)} = (\Delta A \times M \times \text{FD} \times 1000) / \epsilon \times b \quad (1)$$

$$\text{Donde: } \Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

A: absorbancia del extracto

M: masa molar = 449,2 g/mol para la cianidina-3-glucósido

FD: factor de dilución

ϵ : coeficiente de absortividad molar = 26 900 L/mol.cm para la cianidina-3-glucósido

b: paso óptico de la cubeta en cm

El contenido total de antocianinas de los cálices secos ($\text{CTA}_{\text{cálices secos}}$), expresado en mg de cianidina-3-glucósido/g de sólido seco se estimó a partir del $\text{CTA}_{\text{extracto}}$ según la fórmula:

$$\text{CTA}_{\text{cálices secos}} \text{ (mg/g b.s.)} = [\text{CTA}_{\text{extracto}} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{extracto}}] / M$$

Donde: $\text{CTA}_{\text{extracto}}$: contenido total de antocianinas del extracto calculado mediante la ecuación 1

V_{extracto} : volumen del extracto (0,05 L)

M: masa de cálices secos empleada en la extracción (1,0 g)

El rendimiento se definió como la masa de antocianinas extraída en el experimento/masa de antocianinas contenida en 1 g de cálices secos y se calculó por la ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{masa de antocianinas extraída}}{\text{masa de antocianinas en el material}} \times 100$$

Donde:

$$\text{Masa de antocianinas extraída (mg)} = \text{CTA}_{\text{extracto}} \text{ (mg/L)} \times V_{\text{extracto}} \text{ (L)}$$

$$\text{Masa de antocianinas en el material (mg)} = \text{CTA}_{\text{cálculos}} \text{ (mg/g)} \times M_{\text{material}} \text{ (g)}$$

A partir de los resultados del diseño experimental, se determinaron las mejores condiciones de extracción.

La determinación de los parámetros de color se realizó a partir del espectro de absorción en la región de 400 a 700 nm del extracto obtenido, con un espectrofotómetro UV-visible y empleando agua como referencia. El registro de los valores de absorbancia permitió calcular los valores triestímulos X, Y, Z para su posterior conversión en unidades CIELAB (7). El valor L* representa la luminosidad, el valor a* representa el eje rojo/verde y el valor b* representa el eje amarillo/azul. El valor de iluminante empleado fue D₆₅ y un ángulo de observación de 10°.

Para el procesamiento de los resultados experimentales se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, versión 16.0.07.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados de los experimentos. Como elemento distintivo se observa que el rendimiento de antocianinas varía ampliamente entre 12,63 y 82,34 %.

La Tabla 2 resume el análisis de varianza del modelo empírico. Únicamente los términos lineales de los factores concentración alcohólica (X₂) y relación sólido-disolvente (X₃) fueron estadísticamente significativos. El valor del coeficiente de determinación indica que el modelo propuesto explica el 91,1 % de la variabilidad de los datos obtenidos. El estadístico de Durbin-Watson indica que no hay autocorrelación serial en los residuos (p = 0,05).

La interpretación de este resultado para X₂ está relacionado con la solubilidad de las antocianinas en disolventes polares como el agua, debido a la presencia de una carga formal positiva del ion flavilio (8).

El factor X₃ es una variable importante en los procesos de extracción sólido-líquido ya que determina la cantidad de disolvente a emplear, parámetro de importancia económica pues se relaciona con el costo por consumo y también con el costo de su eliminación (etapa de concentración del extracto obtenido).

La temperatura no resultó significativa, a pesar de su influencia positiva en este tipo de proceso debido a su efecto en la difusión efectiva de los compuestos a

Tabla 1. Rendimiento de extracción de los experimentos

Corrida	Temperatura (°C)	Concentración de etanol (% v/v)	Relación sólido-disolvente (m/v)	Rendimiento (%)
1	60	40	1/5	82,3 (5,7)
2	40	0	1/5	76,6 (3,8)
3	60	0	1/15	71,0 (9,6)
4	50	0	1/10	38,7 (4,4)
5	50	40	1/15	27,6 (3,1)
6	40	80	1/15	12,6 (1,1)
7	60	80	1/5	50,5 (7,0)
8	40	40	1/10	27,3 (5,0)
9	60	80	1/10	33,9 (8,3)
10	40	80	1/5	43,9 (4,2)
11	40	0	1/15	33,7 (1,9)
12	50	80	1/5	54,3 (4,4)
13	60	0	1/5	71,2 (5,8)
14	60	80	1/15	22,4 (4,3)

(): desviación estándar (n = 3)

Tabla 2. Análisis de varianza del modelo empírico de superficie de respuesta para el rendimiento total de pigmentos extraídos

Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: temperatura	739,544	1	739,544	5,26	0,0836
B: s/d	2500,67	1	2500,67	17,78	0,0135
C: % etanol	1917,73	1	1917,73	13,63	0,0210
AA	96,4156	1	96,4156	0,69	0,4542
AB	181,812	1	181,812	1,29	0,3191
AC	11,6847	1	11,6847	0,08	0,7875
BB	485,822	1	485,822	3,45	0,1366
BC	71,6494	1	71,6494	0,51	0,5148
CC	63,2284	1	63,2284	0,45	0,5393
Error total	562,619	4	140,655		
Total (corr.)	6323,42	13			
R ²	0,9110				
R ² ajustada	0,7108				
Estadístico Durbin-Watson	1,91022				0,5156

s/d relación sólido-disolvente; G.l. grados de libertad; Valor-P probabilidad; R² coeficiente de determinación; R²_{aj} coeficiente de determinación ajustado.

extraer, así como en su solubilidad, además de contribuir a la modificación de la estructura de la matriz sólida que facilitaría la migración de los solutos hacia el líquido (9). Este resultado puede ser consecuencia del tiempo seleccionado de 1 h, lo suficientemente prolongado para que no se manifestara su influencia.

La ecuación final del modelo empírico es la siguiente:

$$REA = 89,55 - 0,27 X_2 - 3,47 X_3$$

Donde: REA: rendimiento de extracción de antocianinas (%)

X₂: concentración de etanol X₃: relación sólido-disolvente

Se puede apreciar que hay una relación inversa de estas variables respecto al rendimiento, o sea, un aumento de la relación sólido-disolvente al igual que la concentración alcohólica disminuye la masa de antocianinas extraída, aunque la relación sólido-disolvente es la variable que más influye en el rendimiento de extracción. La Fig. 1 presenta el gráfico de los valores experimentales vs. valores pronosticados.

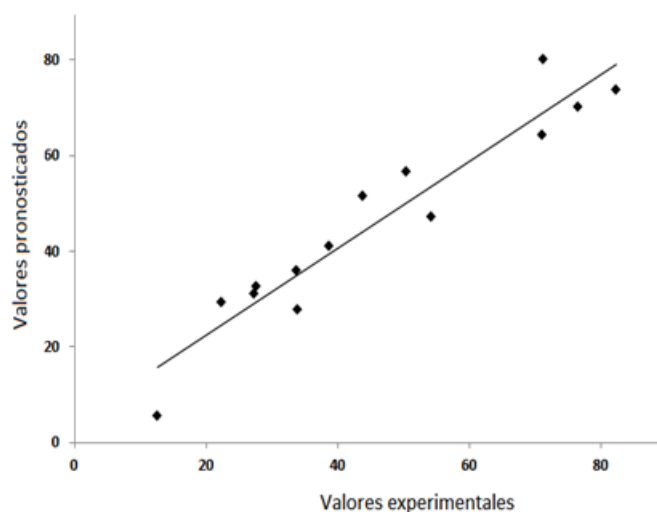


Fig. 1. Comparación entre los valores experimentales y los pronosticados por el modelo empírico.

La solución numérica dada por el programa sobre las condiciones óptimas de extracción fue: relación sólido-disolvente 1/5 m/v , agua como disolvente y 40 °C. En estas condiciones, se logra extraer el 80,0 % de las antocianinas presentes en los cálices. La concentración de antocianinas del extracto obtenido fue de 123,7 mg/L.

La caracterización cromática del extracto arrojó $L^* = 69,09$; $a^* = 43,01$ y $b^* = 23,83$. Se han informado para el extracto de flor de Jamaica valores de $L^* = 64,5 \pm 0,1$; $a^* = 31,03 \pm 0,2$ y $b^* = 5,8 \pm 0,1$; muy similares a los valores de L^* y a^* del extracto obtenido, en cambio el valor de b^* difiere marcadamente (10). Esta diferencia está dada por la presencia de polímeros de antocianinas, los cuales contribuyen al valor de b^* , pues este término es el que se relaciona con las tonalidades amarillas (+ b^*). Esto es corroborado con el espectro de absorción del extracto (Fig. 2), donde se observan valores de absorbancia superiores a 0,6 en la región entre 440 y 480 nm, lo que se corresponde con el color percibido entre amarillo y amarillo-verdoso (11). La presencia de antocianinas polimerizadas puede provenir del proceso de secado, siendo esta una etapa clave en el tratamiento de la materia prima.

REFERENCIAS

1. Menéndez WV. Obtención de colorante para su uso en yogurt a partir de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y del Mortiño (*Vaccinium myrtillus* L.) (tesis de grado). Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2008.
2. Roy K, Gullapalli S, Chaudhuri UR, Chakraborty R. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *Int J Food Sci Technol* 2004; 39:1087-91.
3. Cisse M, Dornier M, Sakho M, Ndiaye A, Reynes M, Sock O. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits* 2009; 64(3):179-93.
4. 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.
5. Gartaula G, Karki DB. Optimization of extraction of anthocyanins from roselle (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) in aqueous medium. *J Food Sci Technol Nepal* 2010; 6:69-72.
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(5):1269-78.
7. CIE 2004. Technical Report: Colorimetry. Washington DC: Commission internationale de l'Eclairage, CIE Central Bureau; 2004.
8. Clifford MN. Review: Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000; 80:1063-72.
9. Takeuchi TM, Pereira CG, Braga MEM, Maróstica JrMR, Leal PF, Meireles MAA. Low-Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assisted and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. En: Meireles MAA, Ed. *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2009. pp. 137-218.
10. Fernández-López JA, Angosto JM, Giménez PJ, León G. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum Nutr* 2013; 68:11-7.
11. Delgado-Vargas F, Paredes-López O. *The Color Phenomenon. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2003. pp. 13-26.

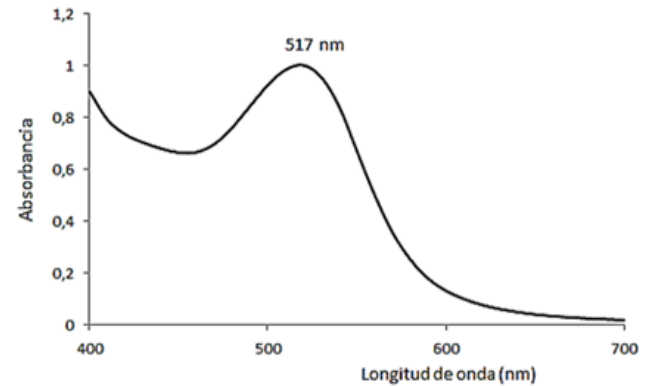


Fig. 2. Espectro de absorción del extracto.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados experimentales, las variables concentración alcohólica y relación sólido-disolvente fueron significativas en el proceso de extracción. Las condiciones óptimas halladas fueron relación sólido-disolvente 1/5 m/v , agua y 40 °C, con un tiempo de extracción de una hora. El color del extracto expresado en las coordenadas cromáticas CIELAB fue: $L^* = 69,09$; $a^* = 43,01$ y $b^* = 23,83$.