

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES A PARTIR DE LAS FLORES DE *HIBISCUS ROSA-SINENSIS L.*

Jose A. Arencibia^{1,2}, Carmen L. García¹, Annia De León Morgan¹, Eva Salas-Olivet¹,
José A. García-Beltrán^{3,4} y Regla M. Casanova¹*

¹*Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222, La Habana
C.P. 13600, Cuba. E-mail: jarencibia1995@gmail.com*

²*Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, Ruiz Tagle 130,
9170232 Santiago, Estación Central, Región Metropolitana, Chile.*

³*Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera El Rocío,
km 3½, Calabazar, Boyeros, La Habana, Cuba.*

⁴*Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción,
Edmundo Larenas 234, Casilla 160 C – Correo 3, Concepción, Chile.*

Recibido: 02-05-2023 / Revisado: 05-08-2023 / Aceptado: 01-09-2023 / Publicado: 30-12-2023

RESUMEN

Las flores de *Hibiscus rosa sinensis* L. presentan diversos compuestos químicos con actividad terapéutica. El objetivo del trabajo fue la optimización del proceso de extracción de polifenoles y antocianinas. Se evaluó la influencia del porcentaje de etanol, tiempo de extracción, relación fármaco/disolvente y temperatura, así como una caracterización física, química y toxicológica del extracto óptimo obtenido. Las condiciones óptimas de extracción fueron: etanol 50 %, 24 h, relación fármaco/disolvente de 1 g:20 mL y 60 °C; influyendo significativamente, estos dos últimos en las variables de respuesta. El extracto hidroalcohólico optimizado presentó contenidos totales de antocianinas y polifenoles de 18 y 1297 mg/L, respectivamente; pH de 5,3; contenido total de sólidos de 2,42 % y densidad de 1,0227 g/mL. No mostró toxicidad oral aguda con dosis de 2 g/kg en animales de experimentación. El extracto obtenido puede ser utilizado en la preparación de nuevos fitofármacos y en la obtención de colorantes naturales en polvo.

Palabras clave: *Hibiscus rosa-sinensis*, antocianinas, polifenoles, extracción, optimización, toxicidad.

ABSTRACT

Optimization of the extraction process of anthocyanins and polyphenols from *Hibiscus rosa-sinensis* L. flowers.

Hibiscus rosa-sinensis L. flowers present several chemical compounds with therapeutic activity. The objective of this work was to optimize the extraction process of polyphenols and anthocyanins. The influence of ethanol percentage, extraction time, drug/solvent ratio and temperature. Besides this, physical, chemical and toxicological characterization of the optimum extract obtained were evaluated. The optimum extraction conditions were: 50 % ethanol, 24 h, drug/solvent ratio of 1 g:20 mL and 60 °C; these last two significantly influenced the response variables. The optimized hydroalcoholic extract showed total anthocyanin and polyphenol contents of 18 and 1297 mg/L respectively, pH of 5.3, total solids content of 2.42 % and density of 1.0227 g/mL. It did not show acute oral toxicity at doses of

2 g/kg in experimental animals. The extract obtained can be used in the preparation of new phytopharmaceuticals and in obtaining natural dyes in powder form.

Keywords: *Hibiscus rosa-sinensis*, anthocyanins, polyphenols, extraction, optimization, toxicity.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el enfoque en la investigación de las plantas ha aumentado a escala global. Las evidencias reunidas han mostrado su inmenso potencial en varios sistemas tradicionales por sus actividades biológicas y principios antioxidantes (1-3). Se ha revelado la presencia en frutas, vegetales y granos, de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran las antocianinas, las que son metabolitos secundarios (4). El interés por los pigmentos antocianos en investigaciones científicas ha ido en ascenso, debido no sólo al color que confieren a los productos que las contienen y a su gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos (5, 6), sino también a la reducción de diversas enfermedades (5, 7, 8).

Estos beneficios han fomentado la búsqueda de especies que puedan ser utilizadas para la extracción de estos compuestos (9). Dentro de estas especies se encuentra *Hibiscus rosa-sinensis* L. (HRS) conocido comúnmente en Cuba como mar pacífico, un arbusto nativo de la región oriental, específicamente de China (10); utilizado en muchas regiones del mundo como planta ornamental, cuyas flores poseen una gama amplia de fitoquímicos, lo que sugiere que podría actuar como base para la creación de nuevos agentes eficaces en varios trastornos. Teniendo en consideración lo expresado anteriormente, el presente estudio tuvo como objetivo optimizar el proceso de extracción de polifenoles totales y antocianinas a partir de las flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. Para optimizar este proceso fue necesario evaluar la influencia del porcentaje de etanol, tiempo de extracción, relación droga/disolvente y temperatura en el proceso de extracción hidroalcohólica de polifenoles y antocianinas. Además, se realizó la caracterización física, química y toxicológica del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó con flores de HRS recolectadas en enero y febrero de 2018 en el Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana. Para la selección del material vegetal se tuvo en cuenta su máximo florecimiento, asegurando calidad mediante tamaño y color uniformes, sin quemaduras solares, picaduras ni mordeduras de insectos y sin crecimiento fúngico. Posteriormente, las flores se secaron en estufa a 40 °C durante 3 d, se trituraron con un molinillo artesanal y se cernieron con un tamiz de 0,5 mm.

Para el diseño experimental de extractos hidroalcohólicos de HRS, se usó el programa Design Expert 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE. UU.), asegurando máximos contenidos de polifenoles totales y antocianinas. Se aplicó la optimización numérica mediante un diseño de superficie de respuesta IV Óptimo, generando un modelo matemático para las variables (A) porcentaje de etanol, (B) tiempo de extracción, (C) relación masa:disolvente y (D) temperatura. Las respuestas fueron el contenido de polifenoles totales (CPT) y antocianinas monoméricas totales (CAM). El programa definió 22 corridas con cuatro réplicas.

Los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron por maceración con agitación ocasional, con adición de 1 % de ácido cítrico en un recipiente cerrado con el objetivo de obtener una disolución hidroalcohólica acidificada (11). Al finalizar el tiempo de extracción de cada una de las corridas, la mezcla resultante se filtró y se desechó el residuo sólido.

La determinación cuantitativa de los polifenoles totales a los extractos de las flores se realizó de acuerdo con una metodología propuesta (12) basada en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción. El CPT se expresó como ácido gálico en mg/L de extracto según la curva de calibración realizada. Las mediciones se realizaron por triplicados y la absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh UV-1601, China).

El CAM se determinó según el método de pH diferencial y se expresó como cianidina-3-glucósido con un coeficiente de

extinción molar de 26 900 L cm⁻¹ mol⁻¹ y masa molar de 449,2 g/mol (15). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias a 510 y 700 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh UV-1601, China).

Se determinaron el CPT y CAM según las metodologías planteadas anteriormente. El pH se determinó con un potenciómetro (13). Los sólidos totales se evaluaron mediante termobalanza (Sartorius Mod. MA-40, Alemania) a 105 °C hasta masa constante. La densidad se midió usando un picnómetro de tubo capilar (14).

El color del extracto óptimo se determinó con un espectrofotómetro (Rayleigh UV-1601, China) basado en las recomendaciones de la Comisión Internacional de la Iluminación (15). Se obtuvo el espectro entre 400 y 700 nm, transformándolo al espacio CIE L* a* b*. Se calcularon la luminosidad (L*) y componentes del matiz (a*, b*, y C*) utilizando el iluminante D65 y un ángulo de 10° CIE L* a* b* (16).

Para realizar la evaluación del potencial tóxico agudo oral, el extracto optimizado fue sometido a un proceso de concentración, para ello el extracto se filtró a vacío (Mod. 2DSE4, Alemania) con papel de filtro Whatman cualitativo estándar grado 2 de filtración rápida y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio a 40 °C.

El potencial tóxico agudo oral del extracto óptimo se evaluó en el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del IFAL siguiendo las normativas (17, 18). Se usaron dos grupos de ratas Wistar hembras del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Mayabeque, Cuba, con pesos entre 180 y 200 g. Se les administró vía oral el extracto hidroalcohólico a 2000 mg/kg (19, 20). Después de 2 a 3 h, tuvieron acceso a agua y comida. Se observaron por 14 d, registrando comportamientos y signos de toxicidad retardada. Si no morían, el proceso se repetía con tres nuevas ratas y si había muertes, se reducía la dosis (19, 20). Al finalizar, las ratas se sacrificaron con pentobarbital (60 mg/kg), Se aplicaron las tres erres de la Toxicología Alternativa para experimentación

animal, minimizando el sufrimiento y cumpliendo con principios éticos (21, 22), revisando órganos y tomando muestras de tejidos anómalos para análisis histopatológico.

Se efectuó un análisis de varianza con el programa Statistics (ver. 7, 2004, StatSoft. Inc., Tulsa, EE. UU.) y se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar muestras. Se usó un nivel de significación de $p \leq 0,05$. Todas las mediciones experimentales se realizaron por triplicado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 presenta el diseño y resultados experimentales para cada una de las variables de respuesta. El CPT más alto se logró a 60 °C durante 24 h con 50 % de etanol en una relación de 1 g:20 mL (corrida 16), donde también se obtuvo el CAM más alto. Las réplicas 2, 3, 18 y 19 tuvieron diferencias significativas en los CAM y CPT, mientras que las réplicas 9 y 10 difirieron en el CPT, pero no en el CAM. Las réplicas 13 y 14 no mostraron diferencias significativas.

Tabla 1. Contenido de antocianinas y polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de la flor de *Hibiscus rosa-sinensis*

Corrida	Etanol (%)	Tiempo de extracción (h)	Relación masa:disolvente (m/v)	Temperatura (°C)	CAM (mg/L)	CPT (mg/L)
1	90	6	1	30	10,0 (0,5) hi	803,8 (63) k
2	50	12	1	30	10,1 (0,1) hi	602,6 (46) ghi
3	50	12	1	30	5,8 (0,7) cd	282,1 (51) ab
4	70	12	1	30	5,7 (0,2) cd	317,9 (48) bc
5	70	24	1	30	9,3 (0,7) h	779,5 (19) k
6	90	24	1	30	4,0 (0,5) a	189,7 (42) a
7	50	6	2	30	6,5 (0,1) de	564,1 (100) ghi
8	70	12	2	30	5,7 (0,4) cd	532,1 (46) fgh
9	90	12	2	30	5,7 (0,5) cd	409,0 (22) cde
10	90	12	2	30	7,6 (0,1) fg	425,6 (12) cdef
11	50	24	2	30	4,6 (0,1) ab	370,5 (22) bcd
12	50	6	1	60	5,4 (0,2) bc	446,2 (13) def
13	70	12	1	60	11,8 (0,4) k	1101,2 (19) l
14	70	12	1	60	11,5 (1,3) jk	1088,5 (37) l
15	90	12	1	60	10,8 (0,2) ij	805,1 (44) k
16	50	24	1	60	13,1 (0,3) l	1576,9 (204) m
17	90	6	2	60	8,3 (0,1) g	506,4 (18) efg
18	50	12	2	60	5,6 (0) cd	517,9 (35) efgh
19	50	12	2	60	7,0 (0,2) ef	733,3 (34) jk
20	70	12	2	60	7,3 (0,2) ef	664,1 (16) ij
21	70	24	2	60	6,5 (0,2) cde	356,4 (101) bcd
22	90	24	2	60	5,8 (0,5) cd	625,6 (58) hij

CAM: Contenido de antocianinas monoméricas

CPT: Contenido de polifenoles totales

Media (desviación estándar), n = 3. Letras diferentes (a-m) indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

La Tabla 2 presenta el análisis de varianza para cada modelo según las variables de respuesta. Los datos se ajustaron usando los parámetros F, p, R^2 y falta de ajuste. Tanto el CAM y el CPT fueron influenciados significativamente por los factores C y D. En el caso del CPT las interacciones que

resultaron significativas fueron: AB, BC, BD y CD. Mientras que el CAM solo fue afectado por las interacciones AB y BD. Los modelos explicaron más del 56,94 % de la variabilidad para el CAM y 57,51 % para el CPT según el estadígrafo R^2 ajustado.

Tabla 2. Análisis de varianza y significación de los coeficientes estimados para el contenido de antocianinas monoméricas y contenido de polifenoles totales

Fuente	CAM		CPT	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
Modelo	3,7765	0,0197	3,8419	0,0185
A	0,0169	0,8989	0,7889	0,3934
B	0,2267	0,6433	0,5225	0,4849
C	17,802	0,0014	10,8135	0,0072
D	10,676	0,0075	16,4775	0,0019
AB	8,6713	0,0133	5,3070	0,0418
AC	0,0282	0,8696	0,3735	0,5535
AD	1,1870	0,2992	0,0023	0,9626
BC	3,9550	0,0722	5,2828	0,0421
BD	4,8276	0,0503	6,5464	0,0266
CD	1,1315	0,3102	3,5027	0,0881
R^2	0,7744	-	0,7774	-
R^2 ajustado	0,5694	-	0,5751	-
Falta de ajuste	0,915	0,571	3,080	0,147

CAM: Contenido de antocianinas monoméricas

CPT: Contenido de polifenoles totales

Las respuestas obtenidas para cada una de las corridas se relacionaron con las cuatro independientes a través de ecuaciones matemáticas expresadas por el modelo matemático: 2F1 para ambos casos. El mejor ajuste de las variables a los modelos fue:

$$\text{CAM} = 7,72 + 0,059A - 0,24B - 1,58C + 1,23D - 1,74AB - 0,076AC + 0,49AD - 1,06BC + 1,18BD - 0,40CD \quad (\text{ecuación 1})$$

$$\text{CPT} = 636,62 - 49,56A + 45,57B - 152,22C + 187,91D - 168,39AB - 34,06AC + 2,67AD - 151,74BC + 168,92BD - 86,29CD \quad (\text{ecuación 2}).$$

Donde A: Etanol (%), B: Tiempo de extracción (min), C: Relación masa/disolvente, D: Temperatura (°C).

El análisis conjunto de la Tabla 2 y las ec. 1 y 2 muestra que los factores C y D son significativos y lineales. El aumento en C disminuye CAM y CPT, ya que los coeficientes son negativos en ambas ecuaciones. Por otro lado, un incremento

en D aumenta CAM y CPT durante la extracción. Las interacciones significativas para CAM son AB y BD, indicando un efecto negativo y sinérgico, respectivamente. Para CPT, AB, BC y BD son significativas, sugiriendo efectos negativos de las combinaciones A-B y B-C, pero un efecto sinérgico positivo para B-D, destacando la contribución positiva de D al CPT. La interacción BD implica un aumento sinérgico en CPT.

Las interacciones en un modelo son críticas porque pueden revelar cómo la combinación de factores afecta la respuesta (en este caso para el CAM y el CPT) de manera diferente a cuando los factores se consideran de forma aislada. En este contexto, es esencial tener en cuenta tanto las interacciones

significativas como los factores individuales al interpretar los resultados o al hacer predicciones basadas en el modelo.

En la Fig. 1 las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas fueron relación masa: disolvente 1 g:20 mL, 60 °C, con % de etanol entre 50 y 74 % (v/v) y tiempo de extracción de 21 a 24 h. Estas condiciones difieren de las utilizadas en otro estudio (23) en la extracción de antocianinas de cáscara de berenjena, donde la relación masa: disolvente fue 1 g:10 mL, la temperatura fue de 30 a 60 °C, el porcentaje de etanol entre 50 y 90 % (v/v), y el tiempo de extracción de 4 a 12 h. Aunque los porcentajes de etanol y la temperatura están en el mismo rango, las diferencias podrían atribuirse a la temperatura (variable significativa) en este estudio (24).

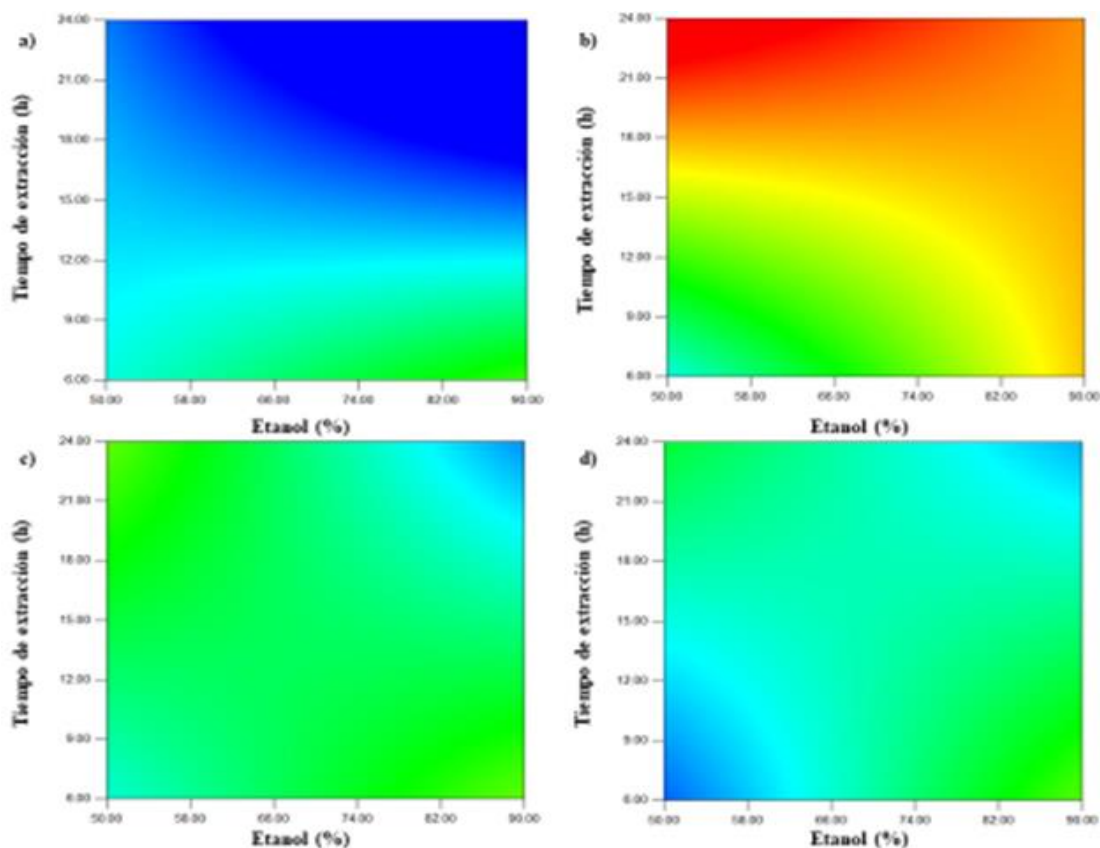


Fig. 1. Influencia del porcentaje de etanol, tiempo de extracción, relación droga/disolvente y temperatura sobre el CAM extraídas de las flores de HRS. a) 1 g:20 mL como relación droga/disolvente y 30 °C; b) 1 g:20 mL como relación droga/disolvente y 60 °C; c) 1 g:30 mL como relación droga/disolvente y 30 °C; d) 1 g:30 mL como relación droga/disolvente y 60 °C.

En una investigación sobre las condiciones de extracción de antocianinas presentes en batata morada (24) se trabajó con

las variables: temperatura de extracción (40 a 80 °C), tiempo (60 a 120 min) y relación sólido-líquido (1:15 a 1:30) y como

respuesta evaluaron el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura de extracción y la relación sólido-líquido influyeron en el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo no tuvo efecto significativo.

Como se aprecia en la Fig. 2, los valores superiores de rendimiento de extracción de polifenoles totales se alcanzaron a los 60 °C de temperatura para disoluciones hidroalcohólicas entre 50 y 66 % (v/v), con tiempos de extracción entre 21 y 24 h y una relación masa: disolvente de 1 g:20 mL.

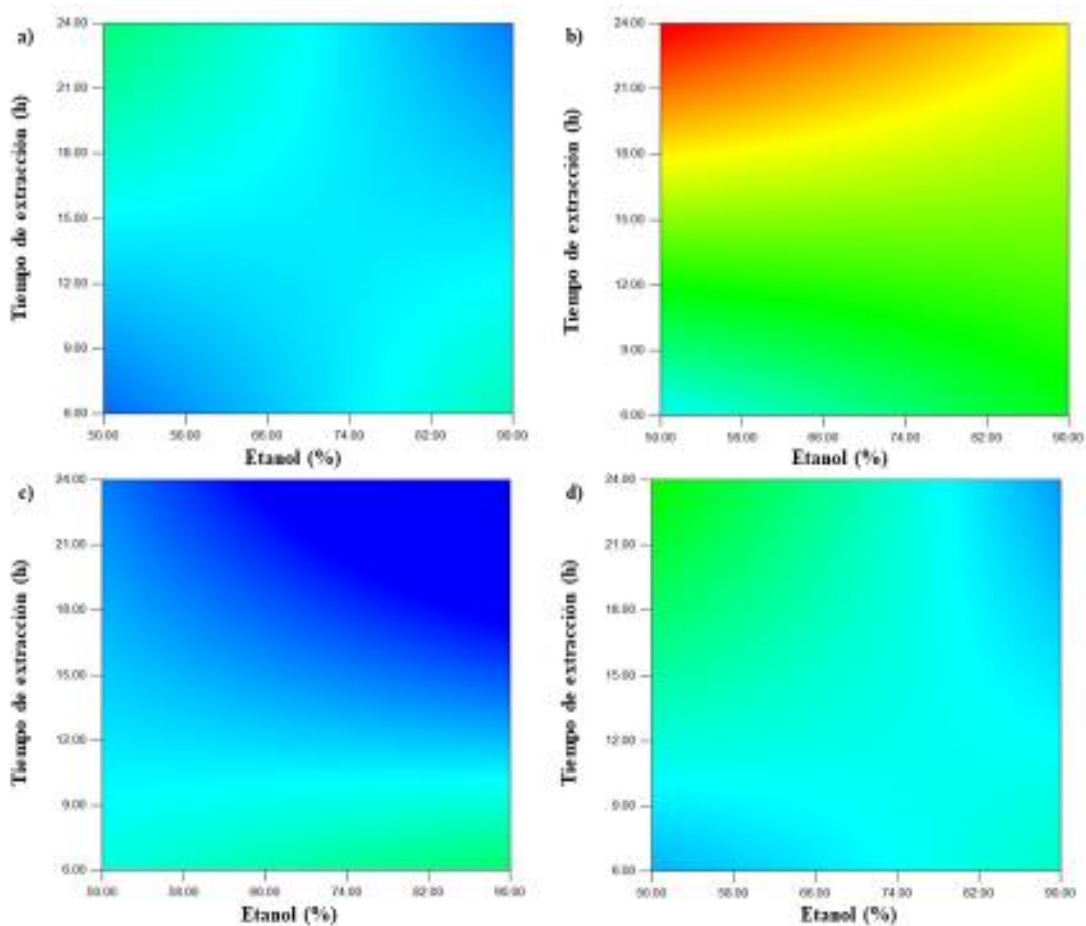


Fig. 2. Influencia del porcentaje de etanol, tiempo de extracción, relación droga/disolvente y temperatura sobre el CPT extraídos de las flores de HRS. a) 1 g:20 mL como relación droga/disolvente y 30 °C; b) 1 g:20 mL como relación droga/disolvente y 60 °C; c) 1 g:30 mL como relación droga/disolvente y 30 °C; d) 1 g:30 mL como relación droga/disolvente y 60 °C.

Según el análisis estadístico realizado a los modelos (Tabla 2), las ec. 1 y 2, y las Fig. 1 y 2 se definieron condiciones ideales para obtener un extracto etanólico acidificado de la flor de HRS, enriquecido en polifenoles y antocianinas, por lo que se optimizaron el CPT y CAM en el proceso de extracción. El extracto óptimo tuvo un CPT de 1297 mg/L y CAM de 18 mg/L, con un error relativo menor al 5 % en ambos.

De manera similar, en otro estudio (25) al optimizar el proceso de extracción de antocianinas y polifenoles a partir de extractos de la piel y la pulpa de la berenjena (*Solanum melongena* L.) sin incluir la relación masa: disolvente como factor determinante, donde las condiciones óptimas de extracción correspondieron a un porcentaje de etanol de 50 a 90 % v/v, una temperatura de extracción de 30 a 60 °C, aunque se correspondió con un tiempo de extracción de 4 a 12 h. Otros investigadores determinaron que las condiciones

método de extracción asistida por ultrasonidos eran porcentaje de etanol entre 50 y 70 % (v/v), temperatura de extracción de 60 °C, aunque el tiempo de extracción fue de 30 min y no tuvieron en cuenta la relación masa: disolvente como un factor determinante en el proceso (26).

En los casos anteriormente expuestos puede observarse que, aunque los rangos temperatura de extracción coinciden con la reportada en ambos proyectos, no ocurre de igual manera en los tiempos de extracción, que resultaron menores en estos estudios, por lo que las diferencias pueden relacionarse con esta variable, factor que resultó ser no significativo. Esto se justifica ya que, con el tiempo, la temperatura puede dejar de ser significativa en la extracción de antocianinas y polifenoles, según la ley de difusión de Fick (27).

La Tabla 3 presenta los resultados de indicadores físicos y químicos del extracto de HRS. El CPT optimizado fue de 127 mg/100 g de droga seca, superior a valores previos reportados en extractos etanólicos [50,66 mg/100 g (28) y 59,31 mg/100 g (29)] y metanólicos [24,29 mg/100 g (30) y 61,45 mg/100 g (29)]. Sin embargo, fue menor que el CPT de 301 mg/100 g (31) en otro extracto metanólico y 1077,9 mg/100 g (32) en uno acuoso. Otros autores (33) reportaron valores mayores de CAM en distintas extracciones. Las discrepancias en el CPT podrían deberse a interferencias de ácidos orgánicos y azúcares que conllevan a una sobrevaloración de estos compuestos (34). Algunos autores concluyen que un elevado CPT puede deberse a la abundancia de antocianinas en combinación con otros flavonoides (35).

El CAM del extracto optimizado fue de 1,78 mg/100 g de droga seca, más alto que el 0,93 mg/100 g reportado con el uso de metanol (36). No obstante, fue menor que los 228 mg/100 g (32) y 284 mg/100 g (31) obtenidos en extracciones acuosas y metanólicas respectivamente. Las variaciones en el CAM pueden deberse a interferencias de la matriz, diferencias en métodos de extracción y sus condiciones. La elección del solvente puede impactar

significativamente el CAM y la capacidad antioxidante de los extractos (37).

Tabla 3. Indicadores físicos y químicos del extracto optimizado de la flor de *Hibiscus rosa-sinensis*

Indicador	Media (desviación estándar)
Antocianinas totales (mg/L)	18,0 (0,7)
Polifenoles totales (mg/L)	1297 (8)
Densidad (g/mL)	1,02 (0,01)
pH	5,3 (0,02)
Sólidos totales (%)	2,42 (0,22)
Índice de refracción	1,583 (0,005)
L*	68,3 (0,3)
a*	40,2 (0,7)
b*	16,9 (0,6)
C*	43,6 (0,8)
h°	22,8 (0,6)

L*: Luminosidad, a*: componente rojo-verde, b*: componente amarillo-azul, C*: cromaticidad, h°: matiz. n = 3.

El pH del extracto (Tabla 4) fue superior al reportado por otros investigadores (38) de $4,12 \pm 0,129$ para la flor de HRS. Los sólidos totales difirieron significativamente de los valores informados anteriormente (33) de 6,7 % y 4,8 % con 80 % de etanol y etanol absoluto, respectivamente. La densidad del extracto fue mayor que la registrada antes (37) de 0,929 g/mL en un extracto de flor de majagua (*Talipariti elatum* SW). Estas disparidades podrían deberse a factores extrínsecos o intrínsecos, como el ecosistema, factores ontogénicos y estado fenológico, que influyen en el contenido de metabolitos y, por ende, en sólidos totales y pH (39-42).

En la Tabla 4, con la dosis límite de extracto de HRS de 2 g/kg, ninguna rata administrada murió ni mostró signos clínicos adversos en varios sistemas durante el período de 14 d. Ambos grupos de animales presentaron una tendencia al aumento de peso, indicando la ausencia de efectos tóxicos sistémicos. El extracto de la flor no afectó la ganancia de peso, sugiriendo una categoría 5 o sin clasificación según la OECD TG 423 (2001) (43). Otros autores también evaluaron la toxicidad aguda oral de un extracto metanólico de HRS

(44). En dosis de 100, 200, 400 y 800 mg/kg, no hubo cambios significativos en el comportamiento o efectos adversos. A 1600 mg/kg, hubo un 20 % de mortalidad, atribuido al disolvente, no al material vegetal.

Tabla 4. Variación de la masa corporal y la mortalidad de las ratas durante el ensayo de toxicidad aguda oral

Tiempo (d)	Masa de ratas (g)	Masa de ratas (g)
	Grupo 1	Grupo 2
1	205 (13)	196 (6)
7	217 (8)	220 (10)
14	223 (6)	226 (10)
Mortalidad	0,0	0,0

n = 3.

Media (desviación estándar)

CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico indicó la posible presencia de compuestos grasos, alcaloides, triterpenos, esteroides, azúcares reductores, compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides. Se demostró la influencia significativa del porcentaje de etanol y la temperatura en la extracción de antocianinas, así como como la influencia significativa de los factores tiempo de extracción y temperatura en la extracción de polifenoles. El extracto óptimo de mar pacifico no produjo toxicidad aguda oral en los animales de experimentación con el empleo de una dosis inicial de 2000 mg/kg de masa corporal. El extracto optimizado presentó un CAM de 18 mg/L, CPT de 1297 mg/L, contenido de sólidos totales de 2,42 % y pH de 5,3. Todo esto supone un gran aporte tanto para la industria de los alimentos como para la farmacéutica, al permitir la obtención de colorantes naturales en polvo, y además el empleo de nutraceúticos debido a la alta cantidad de compuestos químicos como las antocianinas y polifenoles; los cuales contribuyen al mejoramiento de la salud humana.

REFERENCIAS

1. Farombi EO. African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological

approach to the production of bioactive prophylactic agents. *Afr Biotech* 2003; 2:662-71.

- Gilani AH, Bashir S, Janbaz KH, Shah AJ. Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosa sinensis* in constipation and diarrhoea. *Ethnopharmacol* 2005; 102:94-289.
- Pan YM, Zhu ZR, Huang ZL, Wang HS, Liang Y, Wang K, Lei Q. Characterization and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds. *Food Chem* 2009; 112:909-13.
- Cacace JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J Food Sci* 2003; 68(1):240-8.
- Garzón GA. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biol Colomb* 2008; 13(3):27-36.
- Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH, Heo BG, Gorinstein S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind Crops Prod* 2012; 40:129-35.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* 2003; 64(5):923-33.
- Jadhav VM, Thorat RM, Kadam VJ, Sathe NS. Traditional medicinal uses of *Hibiscus rosa-sinensis*. *J Phar Res* 2009; 2(8):1220-2.
- Yang Z, Chen Z, Yuan S, Zhai W, Piao X, Piao X. Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays L.*). *Int J Food Sci Technol* 2009; 44(12):2485-92.
- Gilman EF. *Hibiscus rosa-sinensis*. Institute of Food and Agriculture Sciences; 1999.
- Arencibia JA. Optimización de la extracción de antocianinas a partir de Manzana Malaya (*Syzygium malaccense*). *Rev Cienc Farm Aliment* 2018; 4(1).
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vit* 1977; 28(1):49-55.

13. NC-ISO 1842. Productos de Frutas y vegetales. Determinación de pH. Cuba; 2001.
14. Alvarado J. Uso de parámetros reológicos como índices de control en procesos enzimáticos. En Proyecto Multinacional de Biotecnología y Alimentos Ambato; Organización de los Estados Americanos; Ambato Ecuador: Universidad Técnica de Ambato;1990.
15. CIE. Colorimetry: Official Recommendations of the International Commission on Illumination. En International Commission on Illumination; París: Bureau Central de la CIE; 1971.
16. CIE. Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. En Commission International de l'Eclairage. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15, Colorimetry; Paris, France: Bureau Central de la CIE; 1978.
17. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. En 8va ed. Ediciones UC. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
18. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A entre otros. Reporting animal research. ARRIVE guidelines 2.0. PloS Biol 2020; 18(7), e300004111. Disponible en [https:// doi: 10.1371/journal.pbio.3000411](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411). Acceso julio 2023.
19. Koeter HBWM. Guidance on the application of three alternative test methods for acute oral toxicity to OECD Test Guideline 401. Rapport Istisan 2002; (41):6-7.
20. OECD TG. Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method 2001; 423.
21. Parliament E. DIRECTIVE 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purpose. City 2010; 33-78.
22. De las Comunidades C. Directiva del Consejo 86/609 de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE). Disponible en <http://www.cnb.csic.es/~transimp/directiva86.pdf>. Acceso 26 March 2019.
23. Arrazola G, Herazo I, Alvis A. 2014. Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. Inf Tecnol 2014; 25(3):31-42.
24. Fan G, Han Y, Gu Z, Che D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). LWT-Food Sci Technol 2008; 41(1):155-60.
25. Heras I, Alvis A, Arrazola G. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). Inf Tecnol 2013; 24(5):93-102.
26. Tabaraki R, Heidarzadi E, Benvidi A. Optimization of ultrasonicassisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. Sep Pur Technol 2012; (98):16-23.
27. Askeland DR, Fulay PP, Wright WJ. Ciencia e Ingeniería de los Materiales. Cengage learning; 2017.
28. Pillai SS, Mini S. In vitro antioxidant activities of different solvent fractions from the ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* petals. Int J Pharm Sci Res 2014; 5(9):3879-85.
29. Khan ZA, Naqvi SA, Mukhtar A, Hussain Z, Shahzad SA, Mansha A, Ahmad, M. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus rosa sinensis* Linn flower extracts. Pak J Pharm Sci 2014; 27(3):469-74.
30. Sheth F, De S. Evaluation of comparative antioxidant potential of four cultivars of *Hibiscus rosa sinensis* L by HPLC-DPPH method. Free Rad Antioxid 2012; 2(4):73-8.
31. Wong SK, Lim YY, Chan EWC. Evaluation of antioxidant, anti-tyrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. Ethnobot Leaflets 2010;

- 2010(7):781-96. Disponible en <https://opensiuc.lib.siu.edu/ebl/vol2010/iss7/9>. Acceso febrero 2020.
32. Zapata L, Heredia AM, Quinteros CF, Malleret AD, Clemente G, Carcel JA. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 2014; 25(49):166-92.
33. Abd El-Moneim M R A, Hazem MMH. Free radical scavenging of three different flowers- *Hibiscus rosa-sinensis*, *Quisqualis indica* and *Senna surattensis*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(9): 71-7.
34. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Tech Metal* 2005; 40(3):255-60.
35. Vernieri P, Ferrante A, Serra G, Trivellini A. Physiological characterization of flower senescence in long life and ephemeral *hibiscus (Hibiscus rosa-sinensis L.)*. En: *International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals*; 2007; 755. pp 457-64.
36. Trivellini A, Gordillo B, Rodríguez-Pulido F J, Borghesi E, Ferrante A, Vernierin P, Quijada-Morín P. Effect of salt stress in the regulation of anthocyanins and color of *hibiscus* flowers. digital image analysis *J Agric Food Chem* 2014; 62(29):6966-74.
37. Fernández-Perez A, Iglesias-Guevara D, Cartaya-Quintero R, Arencibia-Sánchez J A. Obtención de un extracto rico en antocianinas a partir de flor de majagua (*Talipariti Elatum* SW). *Rev CENIC Cienc Biol* 2020; 51(2):122-30.
38. Kumari AAG, Palavesam A, Sunilson JAJ, Anandarajagopal K, Vignesh M, Parkavi J. Preliminary phytochemical and antiulcer studies of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. root extracts. *Int J Green Pharm* 2010; 4(1): 41-43. Disponible en <http://greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/view/17/160>. Acceso Marzo-abril 2021
39. García DE, Ojeda F, Montejo I. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y Forrajes* 2003; (26)4: 335-46. Disponible en <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=814>. Acceso 14 Julio 2021
40. Gershenzon J. Changes in the production of plants secondary metabolites under water and nutrient stress. New York: Plenum Press; 1984.
41. Cabrera-Carrión JL, Jaramillo-Jaramillo C, Dultán-Torres F, Cun-Carrión J, García PA, Rojas de Astudillo L. Variación del Contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam en función de su edad y altura. *Bioagro* 2017; 29(1):53-60.
42. Vankar PS, Shukla D. Natural dyeing with anthocyanins from *Hibiscus rosa sinensis* flowers. *J App Pol Sci* 2011; 122(5): 3361-3368.
43. OECD. Test Guideline 423. Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method; 2001.
44. Meena AK, Jain A, Pandey K, Singh RK. Acute toxicity and genotoxic activity of *Hibiscus rosa sinensis* flower extract. *Adv J Phytomed Clin Therap* 2014; 2(4):524-29.