

# 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 EXTRACTS OF JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) VARIETIES WITH CALYXES OF DIFFERENT COLORS

Alberto Reyes-Luengas<sup>1</sup>, Yolanda Salinas-Moreno<sup>2\*</sup>, Manuel E. Ovando-Cruz<sup>3</sup>,  
Ramón I. Arteaga-Garibay<sup>4</sup>, Marcos D. Martínez-Peña<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 56200. Km 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. Chapingo, México. <sup>2</sup>Laboratorio de Calidad de Cultivos para uso Humano y Pecuario. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 47600. Km 8, Carretera Tepatitlán-Lagos de Moreno. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. (yolasm@gmail.com). <sup>3</sup>Campo Experimental Valles Centrales. INIFAP. Melchor Ocampo No. 7, Colonia Agencia Municipal, Santo Domingo Barrio Bajo 7, Etlá, Oaxaca. <sup>4</sup>Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos. Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP. 47600. Boulevard de la biodiversidad No 400 Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

### RESUMEN

El creciente mercado de bebidas funcionales requiere la caracterización específica de las fuentes de bioactivos, para seleccionar aquellas con la mayor cantidad del compuesto necesario en la formulación. La composición de ácidos fenólicos y contenido de antocianinas y proantocianidinas, de extractos acuosos de tres variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), con rojo oscuro (Sudán), rojo claro (Criolla Nayarit) y blanco (Alma Blanca) en sus cálices, fueron evaluados mediante HPLC-DAD. Además, se determinó su actividad antioxidante. El diseño experimental fue completamente al azar y con tres repeticiones. El contenido mayor de ácidos fenólicos totales se detectó en Sudán y Alma Blanca ( $10.71 \pm 0.29$  y  $8.22 \pm 0.30$  mg EAG g<sup>-1</sup> MS). La fracción de ácidos fenólicos libres (AFL) fue abundante y con complejidad alta en los cálices de los tres colores. El ácido clorogénico y sus dos isómeros predominaron en las fracciones AFL y los ácidos fenólicos glucosilados (AFG) representaron entre 77.4 y 81.5 % del total de ácidos fenólicos en las tres variedades. Los cálices blancos tenían la cantidad mayor de ácido cafeico y derivados de protocatéquico. La actividad antioxidante mayor ( $p \leq 0.05$ ) se presentó en el extracto de Sudán ( $IC_{50} = 113.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). El color de los cálices puede ser un indicador del tipo predominante de fenoles en *H. sabdariffa* L. y ayudar en la selección de variedades para

### ABSTRACT

The growing market of functional beverages requires characterize specifically the sources of bio-actives to select those with the highest quantity of the compound needed in the formulation. The composition of phenolic acids and the content of anthocyanins and proanthocyanidins, from aqueous extracts of the calyces of three varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) were assessed using HPLC-DAD: dark red (Sudan), light red (Criolla Nayarit) and white (Alma Blanca). Antioxidant activity was also determined. The experimental design was completely randomized with three replications. The highest contents of total phenolic acids were detected in Sudan and Alma Blanca ( $10.71 \pm 0.29$  and  $8.22 \pm 0.30$  mg GAE g<sup>-1</sup> DM). The fraction of free phenolic acids (FPA) was abundant and was highly complex in the calyces of the three colors. Chlorogenic acid and its two isomers were predominant in the FPA, and the glycosylated phenolic acids (GPA) accounted for 77.4 to 81.5 % of the total phenolic acids in the three varieties. The white Alma Blanca calyces contained more caffeic and protocatechuic acid derivatives than the red calyces of the other varieties. The highest antioxidant activity ( $p \leq 0.05$ ) was found in the Sudan extract ( $CI_{50} = 113.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The color of the calyces can indicate the predominant type of phenols in *H. sabdariffa* L. and aid in the selection of varieties for formulations with particular nutraceutical properties.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2014. Aprobado: marzo, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 277-290. 2015.

**Key words:** *Hibiscus sabdariffa* L., phenols, calyx, color, antioxidant activity.

obtener formulaciones con propiedades nutraceuticas particulares.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa* L., fenoles, antocianinas, cálices, color, actividad antioxidante.

## INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), o flor de jamaica como se le conoce en México, es una planta anual cultivada en los climas tropicales y subtropicales del mundo. Sus cálices se aprovechan para elaborar bebidas frías o calientes, mermeladas, salsas, y aderezos. En la medicina tradicional, los extractos acuosos de la decocción de los cálices deshidratados de jamaica se utilizan para el control de la presión arterial, alteraciones hepáticas o fiebre (Ali *et al.*, 2005). Estos beneficios terapéuticos se atribuyen a la diversidad de los fitoquímicos de los cálices (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011; Hopkins *et al.*, 2013), en los que predominan los fenoles. Entre los fenoles más abundantes están las antocianinas (Tsai *et al.*, 2002), que son responsables del color rojo brillante de los extractos de los cálices y son estudiadas ampliamente (Galicia-Flores *et al.*, 2008; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los ácidos fenólicos son otro grupo importante de compuestos en los cálices de la jamaica y se encuentran en forma libre o conjugada. En frutas y hortalizas están principalmente en forma libre (Shahidi y Naczki, 2004), y en los cereales predominan en forma conjugada o ligada (Liu, 2007).

En extractos acuosos de jamaica se identificó el ácido clorogénico y sus isómeros I y II como los ácidos fenólicos principales (Fernández-Arroyo *et al.*, 2011; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011), junto con los derivados de los ácidos protocatequico y gálico (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011) y el ácido cafeico (Huang *et al.*, 2009). Otros fenoles del tipo flavonoide, como quercetina y sus glucósidos, y los glucósidos de miricetina (Fernández-Arroyo *et al.* 2011; Ramírez-Rodríguez *et al.* 2011) y proantocianidinas (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007), del tipo catequina, epigallocatequina y epigallocatequin-galato (Huang *et al.*, 2009) también están identificados en la flor de jamaica.

El color de los cálices de jamaica está asociado al contenido y tipo de fenoles. Los cálices oscuros

## INTRODUCTION

Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), or “flor de jamaica”, as it is known in Mexico, is an annual plant cultivated in tropical and subtropical climate worldwide. Its calyxes are used to make cold or hot beverages, jams, sauces and dressings. In traditional medicine, aqueous extracts obtained by decoction of the dehydrated calyxes are used to control blood pressure, hepatic disorders and fevers (Ali *et al.*, 2005). These therapeutic benefits are attributed to diverse phytochemicals present in the calyx (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011; Hopkins *et al.*, 2013), of which phenols are predominant. Anthocyanins are among the most abundant phenols (Tsai *et al.*, 2002), they are responsible for the bright red color of the extracts and are extensively studied (Galicia-Flores *et al.*, 2008; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011).

Phenolic acids are another important group of compounds in the jamaica calyxes. These compounds can be found in free or conjugated form. In fruits and vegetables they are mainly in free form (Shahidi and Naczki, 2004), whereas in cereals the conjugated or linked form predominates (Liu, 2007).

In aqueous extracts of jamaica, chlorogenic acid and its isomers I and II as the principal phenolic acids were identified (Fernández-Arroyo *et al.*, 2011; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011), together with derivatives of protocatechuic and gallic acids (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011) and caffeic acid (Huang *et al.*, 2009). Other flavonoid-type phenols, such as quercetin and its glycosides, and the glycosides of myricetin (Fernández-Arroyo *et al.*, 2011; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011) and proanthocyanidins (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007) of the catechin, epigallocatechin and epigallocatechin-galate types (Huang *et al.*, 2009) are also identified in jamaica flower calyxes.

The color of the jamaica calyxes is associated with the content and type of phenols. Dark calyxes have a higher content of anthocyanins than light-colored calyxes, whereas the white or green calyxes lack these flavonoids (Christian and Jackson, 2009) or have minimal quantities (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). Characterization of the phenolic acids from jamaica aqueous extracts is limited (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011) and have

tienen más antocianinas que los cálices claros, pero los blancos o verdes carecen de estos flavonoides (Christian y Jackson, 2009) o están en cantidades mínimas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). La caracterización de los ácidos fenólicos de extractos acuosos de jamaica es limitada (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011) y se ha realizado en variedades con cálices coloridos, por lo que se desconoce la composición de los blancos.

La actividad antioxidante asociada a las bebidas elaboradas a partir de la decocción acuosa de los cálices de jamaica (Prenesti *et al.*, 2007) se atribuye a los fenoles que contienen, y destacan las antocianinas (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007) y los ácidos fenólicos. De estos últimos, el ácido clorogénico y sus derivados son los más importantes (Fernández-Arroyo *et al.*, 2011).

El mercado creciente de las bebidas funcionales requiere caracterizar los fenoles de cada variante, para elegir la más adecuada para el diseño de bebidas con características nutraceuticas particulares.

Por lo tanto, los objetivos del presente estudio fueron: 1) analizar los ácidos fenólicos solubles (libres y conjugados) en los extractos acuosos de variedades de jamaica con color diferente de cálices mediante HPLC-DAD; 2) cuantificar flavonoides del tipo antocianinas y proantocianidinas; y, 3) determinar la actividad antioxidante de los extractos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Las variedades de jamaica Sudán, con cálices rojo oscuro, Criolla Nayarit con cálices rojo claro y Alma Blanca con cálices blancos fueron estudiadas. Sudán y Alma Blanca fueron cultivadas en Santa María Cortijo, Jamiltepec, estado de Oaxaca; la Criolla Nayarit, fue cultivada en Huajicori, estado de Nayarit.

### Preparación de los extractos acuosos

Los extractos se prepararon con 2.5 g de cálices secos y 100 mL de agua destilada. La mezcla hirvió 15 min, se separó el líquido de los cálices por decantación y la extracción se repitió en las mismas condiciones. Los extractos se juntaron, la solución se filtró con papel Whatman No. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada. Las siguientes variables se evaluaron en este extracto.

focused on colored calyces, and thus the composition of the white varieties is unknown.

The antioxidant activity associated with the beverages made from aqueous decoction of the jamaica calyces (Prenesti *et al.*, 2007) is attributed to the phenols they contain. Of these, anthocyanins (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007) and phenolic acids are outstanding. Of the latter, chlorogenic acid and its derivatives are the most important (Fernández-Arroyo *et al.*, 2011).

The growing market of functional beverages requires characterization of the phenols of each variant to select the most suitable for the design of beverages with particular nutraceutical characteristics.

Therefore, the objectives of this study were: 1) to analyze the soluble (free and conjugated) phenolic acids in the aqueous extracts of jamaica calyces of different colors using HPLC-DAD, 2) to quantify anthocyanin-type flavonoids and proanthocyanidins; and 3) to determine the antioxidant activity of the extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The jamaica varieties Sudan with dark red calyces, Criolla Nayarit with pink calyces and Alma Blanca with white calyces were studied. Sudan and Alma Blanca were cultivated in Santa María Cortijo, Jamiltepec, state of Oaxaca; Criolla Nayarit was cultivated in Huajicori, state of Nayarit.

### Preparation of aqueous extracts

Extracts were prepared with 2.5 g dry calyces and 100 mL distilled water. The mixture was boiled for 15 min and the liquid separated from the calyces by decantation. The extraction was repeated in the same conditions. The extracts were filtered together through Whatman No. 4 filter paper and gauged to 200 mL with distilled water. The following variables were determined with this extract.

### Phenolic acids

Free, glycosylated and esterified phenolic acids were determined by the method of Bakan *et al.* (2003). To determine free phenolic acids, two liquid-liquid extractions were carried out with 15 mL ethyl acetate 20 mL aqueous extract after adjusting pH to 2 with 2N HCl. The two organic phases were

### Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos libres, glucosilados y esterificados se determinaron con el método de Bakan *et al.* (2003). Para determinar los ácidos fenólicos libres se realizaron dos extracciones líquido-líquido con 15 mL de acetato de etilo a 20 mL del extracto acuoso, después de ajustar su pH a 2, con HCl 2N. Las dos fases orgánicas se juntaron y concentraron a sequedad en un rota-evaporador (Heidolph instruments, mod. Laborata 4010 digital, Germany). El residuo se resuspendió en 2 mL de metanol grado HPLC. Las muestras se mantuvieron en frascos ámbar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La fase acuosa restante se aforó a 20 mL con agua destilada y se dividió en dos volúmenes iguales.

Para la fracción de ácidos fenólicos glucosilados (AFG), a uno de los volúmenes se adicionaron 10 mL de HCl 2N y se colocó 1 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; el otro volumen se empleó para la fracción de ácidos fenólicos esterificados (AFE), al cual se añadieron 10 mL de NaOH 2N, se dejó reaccionar 3 h en oscuridad. Después se ajustó a 2 el pH de los extractos y se procesaron en la misma forma que los ácidos fenólicos libres. Los ácidos fenólicos totales en cada fracción se cuantificaron mediante la prueba Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). A  $100\text{ }\mu\text{L}$  del extracto acuoso se adicionaron  $125\text{ }\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agitó y se dejó reaccionar 6 min en oscuridad. La reacción se neutralizó con  $1250\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 19 % y se aforó a 3 mL con agua destilada. La muestra se agitó y quedó en oscuridad 90 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (PerkinElmer, Lambda 25 UV/Vis, USA) a 760 nm. Una curva estándar de ácido gálico ( $20\text{ a }100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) fue realizada, y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de MS ( $\text{mg EAG g}^{-1}\text{ MS}$ ).

#### **Análisis de ácidos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD)**

Los ácidos fenólicos se analizaron con un equipo PerkinElmer serie 200 (USA), integrado por bomba cuaternaria, degasificador, detector de UV/Vis con arreglo de diodos (DAD), con auto-muestreador y columna analítica Hypersil ODS.2 ( $250\times 46\text{ mm}$ ), con tamaño de partícula de  $5\text{ }\mu\text{m}$ . El método de Glowinski *et al.* (1996) fue usado, y como fase móvil se empleó una mezcla de metanol: ácido acético: agua (25:1:75 v/v/v). La velocidad de flujo fue  $1\text{ mL min}^{-1}$ , el tiempo de corrida 22 min y el volumen de inyección 10 mL. La detección se realizó a 254 nm (derivados de *p*-hidroxibenzoico) y 320 nm (derivados de hidroxicinámico). La temperatura de la columna se mantuvo en  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

put together and concentrated to dryness in a rotary evaporator (Heidolph Instruments, mod. Laborata 4010 digital, Germany). The residue was re-suspended in 2 mL HPLC grade methanol. The samples were kept in amber-colored recipients at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. The remaining aqueous phase was gauged to 20 mL with distilled water and divided into two equal volumes.

For the fraction of glycosylated phenolic acids (GPA), 10 mL 2N HCl was added to one of the volumes and left 1 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The other volume was used for the esterified phenolic acid fraction (EPA); 10 mL 2N NaOH were added to this volume and left to react for 3 h in darkness. Afterward, the pH of the extract was adjusted to 2 and processed in the same way as the free phenolic acids. Total phenolic acids were quantified in each fraction using the Folin Ciocalteu assay (Singleton and Rossi, 1965). To  $100\text{ }\mu\text{L}$  of the aqueous extract, 1N Folin-Ciocalteu reagent was added, shaken and left to react for 6 min in darkness. The reaction was neutralized with  $1250\text{ }\mu\text{L}$  19 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and gauged to 3 mL with distilled water. The sample was shaken and left in darkness for 90 min. Absorbance was measured in a spectrophotometer (PerkinElmer, Lambda 25 UV/Vis, USA) at 760 nm. A gallic acid standard curve ( $20\text{ to }100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) was constructed and the results were expressed in mg gallic acid equivalents per g of DM ( $\text{mg GAE g}^{-1}\text{ DM}$ ).

#### **Phenolic acid analysis by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD)**

Phenolic acids were analyzed with PerkinElmer series 200 (USA) equipment comprising a quaternary pump, degasifier, UV/Vis diode array detector (DAD), auto-sampler and a Hypersil ODS.2 analytical column ( $250\times 46\text{ mm}$ ) with particle size of  $5\text{ }\mu\text{m}$ . The method of Glowinski *et al.* (1996) was utilized, and a mixture of methanol: acetic acid: water (25:1:75 v/v/v) was used as the mobile phase. Flow rate was  $1\text{ mL min}^{-1}$ , running time was 22 min, and injection volume was  $10\text{ }\mu\text{L}$ . Detection was done at 254 nm (derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid) and 320 nm (derivatives of hydroxycinnamic acid). Column temperature was kept at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A diode array detector was used to obtain the UV spectrum of each of the peaks of the phenolic acid chromatogram. Identification was achieved by comparing retention times with commercial standards and their respective UV spectra. To determine which of the chromatogram peaks corresponded to chlorogenic acid, a pinch of commercial standard was added to the sample. Once the chlorogenic acid peak was located, the literature and a library of UV spectra of different phenolic acids reported for *Hibiscus sabdariffa* L. were consulted, and the derivatives of the acids were identified. For quantification, standard curves of

El detector con arreglo de diodos se usó para obtener el espectro de UV de cada pico del cromatograma de ácidos fenólicos. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con los estándares comerciales y sus respectivos espectros en UV. Para identificar cuál de los picos en el cromatograma correspondía al ácido clorogénico, se agregó a la muestra una pizca del estándar comercial. Una vez ubicado el pico correspondiente al ácido clorogénico, se usó la literatura y una librería de espectros de UV de los diferentes ácidos fenólicos reportados en *Hibiscus sabdariffa* L., y se identificaron los derivados de ácidos. Para la cuantificación se prepararon curvas patrón de los ácidos caféico, clorogénico, ferúlico, gálico, protocatéuico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico y síringico (Sigma, MN) en las mismas condiciones que las muestras.

#### Fenoles extractables totales y antocianinas totales

Para cuantificar los fenoles extractables totales (FET) se usó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Las antocianinas totales se determinaron al medir la absorbancia de los extractos acuosos en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, USA) de acuerdo con lo descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999), y las adaptaciones de Salinas-Moreno *et al.* (2005). Una curva patrón de cianidina 3-glucósido (Polyphenols, Nw) fue realizada y los resultados se expresaron en mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por g de MS (mg C3GE g<sup>-1</sup> MS).

#### Proantocianidinas

Las proantocianidinas se evaluaron con el método de Wallace y Giusti (2010). Una alícuota de 20  $\mu$ L de la muestra se hizo reaccionar con 2380  $\mu$ L de metanol y 100  $\mu$ L de solución de DMAC (4-dimetilamino cinamaldehído al 2 % en una mezcla 1:1 (v/v) de metanol y ácido sulfúrico 6 N). La reacción duró 25 min a temperatura ambiente, en oscuridad, y se leyó la absorbancia a 640 nm; la concentración fue calculada con una curva patrón de catequina (Sigma, MN). Los resultados se expresaron en  $\mu$ g equivalentes de catequina por mg de MS ( $\mu$ g EC mg<sup>-1</sup> de MS).

#### Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante se usó el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich Co<sup>®</sup>) descrito por Soler-Rivas *et al.* (2000) con una solución 100  $\mu$ M de DPPH en metanol al 80 %. En una cubeta de cuarzo se colocaron 100 mL de extracto y 2.9 mL de DPPH. La absorbancia se monitoreó cada 5 min por 30 min a una longitud de onda de 515 nm. La absorbancia de referencia ( $A_0$ ) fue obtenida al sustituir el volumen de extracto por metanol al 80 %.

caffaic, chlorogenic, ferulic, gallic, protocatechuic, *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic and syringic acids (Sigma, MN) were prepared under the same conditions as those of the samples.

#### Total extractable phenols and total anthocyanins

To quantify total extractable phenols (TEP), the method of Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) was used. Total anthocyanins were determined by measuring absorbance of the aqueous extracts in a spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis, USA) following the method described by Abdel-Aal and Hucl (1999), with adaptations by Salinas-Moreno *et al.* (2005). A standard curve for cyanidin 3-glucoside (Polyphenols, Nw) was constructed, and the results were expressed in mg cyanidin-3-glucoside equivalents per g of DM (mg C3GE g<sup>-1</sup> DM).

#### Proanthocyanidins

Protoanthocyanidins were assessed with the method of Wallace and Giusti (2010). A 20  $\mu$ L aliquot of the sample was made to react with 2380  $\mu$ L methanol and 100  $\mu$ L DMAC solution (2 % 4-dimethylaminocinnamaldehyde in a mixture (v/v) of methanol and 6 N sulfuric acid). The reaction lasted 25 min at room temperature in the dark. Absorbance was read at 640 nm. The concentration was calculated with a reference catechin curve (Sigma, MN). Results were expressed in  $\mu$ g catechin equivalents per mg of DM ( $\mu$ g CE mg<sup>-1</sup> DM).

#### Antioxidant activity

To evaluate antioxidant activity, the method used was the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich Co<sup>®</sup>) described by Soler-Rivas *et al.* (2000) with a 100  $\mu$ M solution of DPPH in 80 % methanol. In a quartz cell were placed 100 mL of extract and 2.9 mL DPPH. Absorbance was monitored every 5 min for 30 min at a wavelength of 515 nm. The reference absorbance ( $A_0$ ) was obtained by substituting the extract volume for 80 % methanol. The percentage of DPPH reduction was obtained with the equation  $DPPH (\%) = (A_0 - A_n) / A_0 \times 100$ , where  $A_0$  and  $A_n$  were the reference and sample absorbances, respectively. The data were used to determine the IC<sub>50</sub> parameter, which represents the concentration ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) of phenolic compounds required to reduce the DPPH free radicals by 50 % (Einbond *et al.*, 2004).

#### Experimental design and statistical analyses

The experimental design was completely randomized. With the data about phenolic composition, an ANOVA and

El porcentaje de reducción de DPPH se obtuvo de la expresión:  $DPPH (\%) = (A_0 - A_n)100 / A_0$ , donde  $A_0$  y  $A_n$  fueron las absorbancias de referencia y de la muestra, respectivamente. Los datos se usaron para determinar el parámetro  $IC_{50}$ , que representa la concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de compuestos fenólicos requerida para reducir 50 % del radical libre DPPH (Einbond *et al.*, 2004).

#### Diseño experimental y análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente al azar. Con los datos de composición fenólica se realizó un ANDEVA y pruebas de comparación de medias (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los análisis se efectuaron con SAS System versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ácidos fenólicos

El contenido de ácidos fenólicos totales (AFT) fue diferente entre las variedades analizadas. Sudán tuvo el contenido mayor ( $p \leq 0.05$ ) y Criolla Nayarit el menor ( $10.71 \pm 0.29$  y  $6.57 \pm 0.24$  mg EAG  $\text{g}^{-1}$  MS). Los cálculos blancos de Alma Blanca tuvieron contenido mayor ( $p \leq 0.05$ ) de AFT que los de Criolla Nayarit, coloreados y con antocianinas (Figura 1). La fracción más abundante de ácidos fenólicos en las variedades analizadas fue la de los ácidos fenólicos libres (AFL). Un patrón similar fue reportado para frutas y verduras (Shahidi y Naczsk, 2004). Los AFL en las variedades Sudán y Alma Blanca fueron similares ( $p > 0.05$ ), pero mayores que en Criolla Nayarit. El contenido mayor ( $p \leq 0.05$ ) de ácidos fenólicos glucosilados (AFG) correspondió a Sudán y el menor lo tuvieron Criolla Nayarit y Alma Blanca. La fracción AFE fue la menor de las tres, con el contenido mayor ( $p \leq 0.05$ ) en Sudán y el menor en Alma Blanca.

La fracción AFL mostró entre 12 y 13 picos de ácidos fenólicos o de sus derivados. La identidad de los derivados se obtuvo al comparar sus respectivos espectros en UV con los estándares comerciales y hubo coincidencia del espectro, pero no así del tiempo de retención (Figura 2).

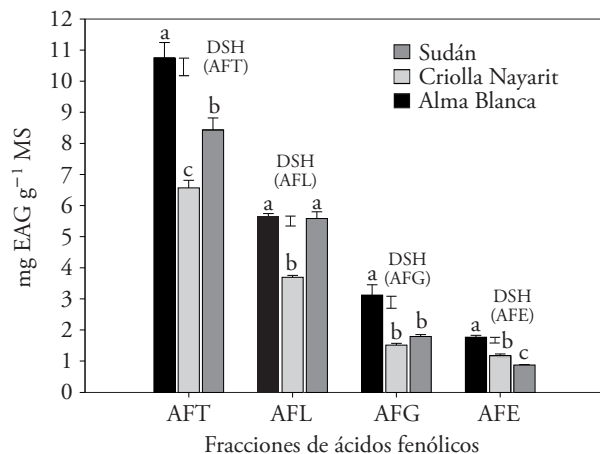
En la fracción de AFL el ácido clorogénico y sus isómeros I (ácido 5-cafeoil quínico) y II (ácido 4-cafeoil quínico) fueron los más abundantes, los siguió el cafeico y los derivados del ácido protocatequico

comparison of means were performed (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). All of the determinations were done in triplicate. The analyses were run in SAS system version 9.0 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phenolic acids

Total phenolic acids (TPA) content was different among the analyzed varieties. Sudan had the highest content ( $p \leq 0.05$ ) and Criolla Nayarit had the lowest ( $10.71 \pm 0.29$  and  $6.57 \pm 0.24$  mg GAE  $\text{g}^{-1}$  DM). White calyxes of Alma Blanca had higher content ( $p \leq 0.05$ ) of TPA than those of Criolla Nayarit, which are colored and have anthocyanins (Figure 1). The most abundant fraction of phenolic acids in the analyzed varieties was that of free phenolic acids (FPA). A similar pattern was reported for fruits and vegetables (Shahidi and Nacsck, 2004). FPA in the varieties Sudan and Alma Blanca were similar ( $p > 0.05$ ), but higher than in Criolla Nayarit. The highest content ( $p \leq 0.05$ ) of glycosylated phenolic acids (GPA) was found in Sudan and the lowest in Criolla Nayarit and Alma Blanca. The EPA fraction



**Figura 1.** Contenido de ácidos fenólicos totales (AFT) y sus fracciones libres (AFL), glucosilados (AFG) y esterificados (AFE) en extractos acuosos de tres variedades de jamaica. DSH: diferencia significativa honesta. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 1.** Content of total phenolic acids (AFT) and their free (AFL), glycosylated (AFG) and esterified (AFE) fractions in aqueous extract of three varieties of Jamaica. DSH: honest significant difference. Bars with different letters are statistically different (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

(Cuadro 1). Alma Blanca destacó por sus contenidos elevados de ácido caféico y derivados de protocaté- quico. Los contenidos de ácido clorogénico y sus isó- meros fueron menores que 1924, 2755 y 1041  $\mu\text{g g}^{-1}$  de clorogénico, isómero I e isómero II en extractos acuosos de cálices molidos de jamaica reportados por Fernández-Arroyo *et al.* (2011).

Las variedades de cálices coloridos tuvieron deri- vados de ácido gálico, ausentes en Alma Blanca, en cantidades más altas que los derivados del protoca- téquico. También hubo derivados de los ácidos *p*-cu- márico y ferúlico en cantidades pequeñas. El conte- nido de ácidos fenólicos totales fue parecido en Alma Blanca y Sudan y más alto que en Criolla Nayarit. Los valores obtenidos por HPLC fueron similares a los cuantificados con el método de Folin-Ciocalteu (Figura 1). Alma Blanca tuvo un contenido alto de derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico, respecto a las variedades con cálices color rojo.

El ácido clorogénico y sus isómeros (I y II) tam- bién predominaron en la fracción de AFG, similar a la fracción de AFL en la proporción mayor del clorogénico sobre sus isómeros. Además el conte- nido de estos ácidos tuvo el orden Sudán>Alma Blanca>Criolla Nayarit. El ácido cafeico fue el se- gundo más importante en la fracción AFG y las varie- dades tuvieron el mismo orden por su contenido en los AFL. La variedad Sudán mantuvo la presencia de derivados del ácido sirín- gico en esta fracción, como en la de AFL; las otras variedades no tuvieron deriva- dos de este ácido.

Los AFE representaron todos aquellos ácidos fe- nólicos no ligados a componentes de pared celular, pero poseen alguna molécula unida a su estructura mediante enlace éster (Liu, 2007). En las variedades analizadas destacó la cantidad de derivados de sirín- gico y *p*-hidroxibenzoico. Las variedades coloridas tuvieron cantidad alta de ácido cafeico, que podría provenir de la hidrólisis del ácido clorogénico, que es inestable al pH alcalino al que el extracto se some- te para su análisis. La variedad Criolla Nayarit tuvo un contenido alto de derivados de protocatéquico, Sudán tuvo un valor varias veces menor y en Alma Blanca no se detectó en la fracción AFE. La variedad Sudan tuvo derivados de ácido sirín- gico en las tres fracciones de ácidos fenólicos analizadas.

En la fracción AFL de las variedades analiza- das el ácido clorogénico representó 39.1, 43.9 y 37.1 % del total en Alma Blanca, Sudán y Criolla

was the lowest of the three, with the highest content ( $p \leq 0.05$ ) in Sudan and the lowest in Alma Blanca.

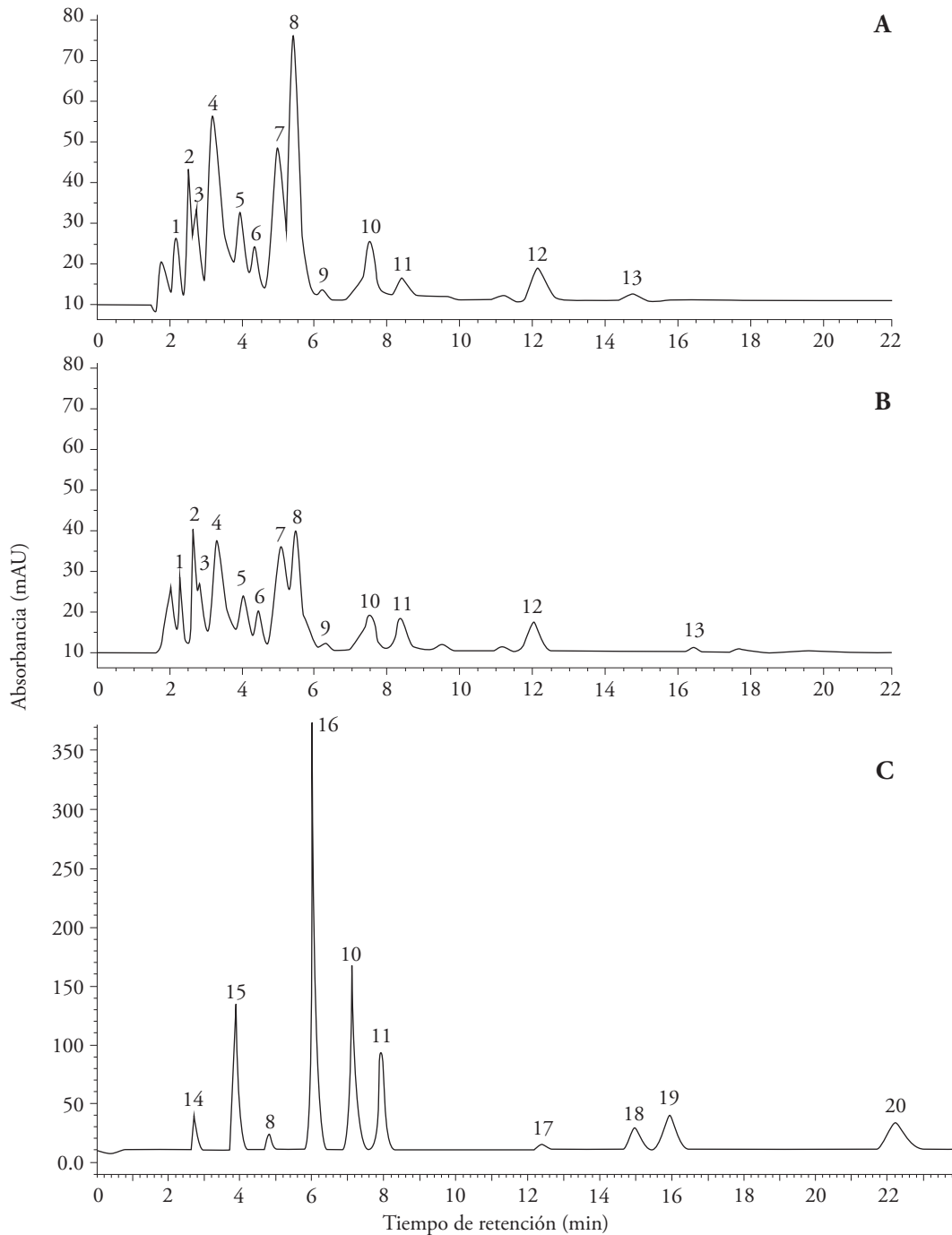
The FPA fraction showed 12 to 13 peaks of phenolic acids or their derivatives. The identity of the derivatives was obtained by comparing their respective UV spectra with commercial standards. There was coincidence in the spectrum but not in retention time. (Figure 2).

In the FPA fraction, chlorogenic acid and its isomers I (5-caffeoyl quinic acid) and II (4-caffeoyl quinic acid) were the most abundant, followed by caffeic acid and the derivatives of protocatechuic acid (Table 1). Alma Blanca was outstanding for its high content of caffeic acid and derivatives of protocatechuic acid. The contents of chlorogenic acid and its isomers were less than the 1924, 2755 and 1041  $\mu\text{g g}^{-1}$  chlorogenic, isomer I and isomer II in aqueous extracts of ground jamaica calyces reported by Fernández-Arroyo *et al.* (2011).

The jamaica varieties with colored calyces had larger quantities gallic acid derivatives, which were absent in Alma Blanca, than of protocatechuic derivatives. There were also small quantities of *p*-coumaric and ferulic acid derivatives. The total content of phenolic acids was similar in Alma Blanca and Sudan and higher in Criolla Nayarit. The values obtained by HPLC were similar to those quantified with the Folin-Ciocalteu method (Figure 1). Alma Blanca had a high content of *p*-hydroxybenzoic acid derivatives, relative to the varieties with red calyces.

Chlorogenic acid and its isomers (I and II) were also predominant in the GPA fraction, similar to the FPA fraction in that chlorogenic acid was present in a larger proportion than its isomers. Moreover, the content of these acids were in the order Sudán>Alma Blanca>Criolla Nayarit. Caffeic acid was the second in importance in the GFP fraction and had the same order as with FPA contents. The Sudan variety maintained the presence of syringic acid derivatives in the fraction, as in the FPA fraction. The other varieties did not have derivatives of this acid.

The EPA represented all of those phenolic acids not linked to components of the cell wall, but have some molecule joined to its structure by an ester bond (Liu, 2007). In the varieties analyzed, the quantities of syringic and *p*-hydroxybenzoic acid derivatives were outstanding. The colored varieties had a high quantity of caffeic acid. This acid could have originated from the hydrolysis of chlorogenic



**Figura 2.** Perfil cromatográfico a 254 nm de los ácidos fenólicos libres del extracto acuoso de los cálices de las variedades de jamaica Sudán (A), Criolla Nayarit (B) y la mezcla de estándares (C). La identidad de los picos es: 1) derivado del ácido gálico; 2) derivado de *p*-hidroxibenzoico; 3) derivado de siríngico; 4) ácido 3-cafeoil quinico (isómero I); 5) derivado de protocatequico; 6) derivado de *p*-cumárico; 7) ácido 4-cafeoil-quinico (isómero II); 8) ácido clorogénico; 9) no identificado; 10) ácido cafeico; 11) ácido siríngico; 12) derivado del ácido vanílico; 13) derivado del ácido ferúlico; 14) ácido gálico; 15) ácido protocatéquico; 16) ácido *p*-hidroxibenzoico; 17) ácido *p*-cumárico; 18) ácido ferúlico; 19) ácido sinápico; 20) ácido salisílico. Los picos con las letras a y b se identificaron como derivados del ácido cafeico.

**Figure 2.** Chromatographic profile, at 254 nm, of free phenolic acids from aqueous extract of the calyxes of the jamaica varieties Sudan (A), Criolla Nayarit (B) and the mixture of standards (C). Identity of the peaks: 1) derivative of gallic acid; 2) derivative of *p*-hydroxybenzoic; 3) derivative of syringic acid; 4) 3-caffeoyl quinic acid (isomer I); 5) derivative of protocatechuic; 6) derivative of *p*-coumaric; 7) 4-caffeoyl-quinic (isomer II); 8) chlorogenic acid; 9) not identified; 10) caffeic acid; 11) syringic acid; 12) derivative of vanillic acid; 13) derivative of ferulic acid; 14) gallic acid; 15) protocatechuic acid; 16) *p*-hydroxybenzoic acid; 17) *p*-coumaric acid; 18) ferulic acid; 19) synaptic acid; 20) salicylic acid. The peaks with letters a and b were identified as derivatives of caffeic acid.



**Cuadro 1. Ácidos fenólicos en las fracciones libres, glucosiladas y esterificadas de extractos acuosos de cálices de variedades de jamaica ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MS).  
Table 1. Phenolic acids in free, glycosylated, and esterified fractions of aqueous extracts from calyxes of different varieties of jamaica ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DM).**

Ácidos Fenólicos	DGal	Dp-H	D-Ptc	Srg	Clg	Clg-I	Clg-II	Caf	p-C	Dp-C	DF	Total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>Libres</b>												
AB	-	301.7	259.5	-	1879.3±24.3	746.4±9.1	1096.8±44.1	493.9±29.1	-	21.3	12	4810.9
Sudán	321.2	-	159.1	310.2	2147.8±278.2	1117.8±9.1	719.5±4.2	47.5±1.7	-	43.5	22	4888.6
CN	226.9	117.9	142.6	-	1171.3±14.7	735.4±57.2	659.4±9.1	106.9±14.2	-	-	-	3160.4
<b>Glicosilados</b>												
AB	-	-	58.7	-	685.3±0.6	437.7±2.5	507.1±4.6	91.7±4.9	-	4	-	1784.5
Sudán	-	58	-	82.2	1149.3±77.6	836.9±9.0	748.6±34.1	47.3±1.5	-	38	-	2960.3
CN	-	28.8	-	-	446.2±1.0	527.6±18.2	386.9±16.4	75.9±4.1	-	-	-	1465.4
<b>Esterificados</b>												
AB	-	294.5	-	433	-	-	-	47.3±0.9	59.3±1.0	-	-	869.1
Sudán	-	271.3	40	556.1	-	-	-	408.1±0.3	-	144.4	-	1419.9
CN	-	130.3	178.8	329.1	-	-	-	329.1±0.7	38±6.7	16	-	1021.3

AB: Alma blanca; CN: Criolla Nayarit; DGal: derivados de gálico; Dp-H: derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico; D-Ptc: derivados de protocatequico; Srg: ácido siríngico; Clg: ácido clorogénico; Clg-I: isómero de clorogénico I; Clg-II: isómero de clorogénico II; Caf: cafeico; p-C: *p*-cumárico; Dp-C: derivado de *p*-cumárico; DF: derivado de ferúlico ❖ AB: Alma blanca; CN: Criolla Nayarit; DGal: derivados de gallic acid; Dp-H: derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid; D-Ptc: derivatives of protocatechuic acid; Srg: syringic acid; Clg: chlorogenic acid; Clg-I: chlorogenic isomer I; Clg-II: chlorogenic isomer II; Caf: caffeic acid; p-C: *p*-coumaric acid; Dp-C: derivative of *p*-coumaric acid; DF: derivative of ferulic acid.

Nayarit. Al considerar los isómeros, la proporción creció hasta 77.4, 81.5 y 81.2 % en ellas. En Alma Blanca el ácido cafeico fue el cuarto en importancia (10.3 %), pero en las variedades coloridas los derivados del ácido gálico ocuparon esa posición. La predominancia del ácido clorogénico y sus isómeros en los extractos acuosos analizados coincidió con lo informado por Rodríguez-Medina *et al.* (2009) y Ramírez-Rodríguez *et al.* (2011), quienes obtuvieron el mismo resultado con técnicas de HPLC-MS. Pero este resultado contrastó con lo observado por Huang *et al.* (2009), ya que identificaron una fracción de *Hibiscus* spp rica en polifenoles, con ácidos protocatéuico (24.2 %) y cafeico (19.9 %) como los más abundantes. Las divergencias podrían deberse al disolvente usado para obtener los extractos, pues el etanol, en contraste con el agua, favorece la extracción del protocatéuico (Chao y Yin, 2009). Además, la genética de los materiales usados en cada caso puede ser diferente.

Entre los ácidos fenólicos en los cálices de jamaica, el protocatéuico es el más estudiado por sus efectos como antioxidante que puede proteger de la oxidación a las células hepáticas de ratas (Tseng *et al.*, 1996), e inducir apoptosis en células afectadas por leucemia en humanos (Tseng *et al.*, 2000). Además, el ácido clorogénico se ha relacionado con una reducción significativa de las presiones sistólica y diastólica (Watanabe *et al.*, 2006).

### **Fenoles extractables totales, antocianinas y proantocianidinas en los cálices de jamaica**

Los FET de una matriz vegetal o alimento son todos aquellos factibles de solubilizarse y ser extraídos con el disolvente usado (Saura-Calixto *et al.*, 2007). En el estudio presente el contenido de FET fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) entre las variedades analizadas. El contenido mayor correspondió a Sudán y el menor a Alma Blanca (Cuadro 2). El contenido de FET en los tres genotipos fue similar al reportado en variedades con colores de cálices semejantes (Christian y Jackson, 2009).

El contenido de antocianinas totales fue mayor en Sudán y menor en Alma Blanca ( $p \leq 0.05$ ). Las variedades con color diferente al blanco presentaron valores similares (3 a 25 mg EC3G g<sup>-1</sup> MS) a los obtenidos por Juliani *et al.* (2009) en variedades cultivadas en Senegal. En Alma Blanca el contenido

acid, which is unstable in the alkaline pH to which the extract was subjected for analysis. The variety Criolla Nayarit had a high content of protocatechuic acid derivatives, Sudan had a value several times lower, and it was not detected in the EPA fraction of Alma Blanca. The variety Sudan had derivatives of syringic acid in the three phenolic acid fractions analyzed.

In the FPA fraction of the analyzed varieties, chlorogenic acid accounted for 39.1, 43.9 and 37.1 % of the total, in Alma Blanca, Sudan and Criolla Nayarit. If the isomers are considered, the proportion increases to 77.4, 81.5 and 81.2 %, respectively. In Alma Blanca, caffeic acid was the fourth most important (10.3 %), but in the colored varieties, the derivatives of gallic acid occupied this position. The predominance of chlorogenic acid and its isomers in the aqueous extracts analyzed coincided with reports by Rodríguez-Medina *et al.* (2009) and Ramírez-Rodríguez *et al.* (2011), who found the same result with the HPLC-MS techniques. This result, however, contrasted with observations of Huang *et al.* (2009), who quantified a fraction of *Hibiscus* spp. rich in polyphenols, in which protocatechuic (24.2 %) and caffeic (19.9 %) acids were the most abundant. The divergences may be due to the solvent used to obtain the extracts since ethanol, unlike water, favors extraction of protocatechuic acid (Chao and Yin, 2009). Moreover, the genetics of the materials used may have been different in each case.

Among the phenolic acids in the calyxes of jamaica, protocatechuic acid is the most studied because of its effects as antioxidant, capable of protecting oxidation of the rat liver cells (Tseng *et al.*, 1996) and to induce apoptosis in cells affected by leukemia in humans (Tseng *et al.*, 2000). Moreover, chlorogenic acid has been associated with significant reduction of systolic and diastolic blood pressure (Watanabe *et al.*, 2006).

### **Total extractable phenols, anthocyanins and proanthocyanidins in jamaica calyxes**

Total extractable phenols (TEP) of a plant or food matrix are all of those that are feasibly soluble and extractable with a given solvent (Saura-Calixto *et al.*, 2007). In our study the TEP was statistically different ( $p \leq 0.05$ ) among the analyzed varieties.

**Cuadro 2. Contenido de polifenoles extractables en cálices secos de tres variedades de *Hibiscus sabdariffa* L.**  
**Table 2. Content of extractable polyphenols in dry calyxes of three *Hibiscus sabdariffa* L. varieties.**

	Sudán	Criolla Nayarit	Alma Blanca	DHS
Fenoles extractables totales <sup>†</sup>	36.5±1.25 a	15.5±0.10 b	13.5±0.32 c	1.123
Antocianinas <sup>‡</sup>	10.99±0.34 a	4.52±0.33 b	0.20±0.03 c	0.641
Proantocianidinas <sup>§</sup>	1.04±0.03 a	0.43±0.04 b	0.24±0.05 c	0.077

Valores por fila, seguidos de la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). DHS: diferencia honesta significativa. <sup>†</sup>mg EAG g<sup>-1</sup> MS; <sup>‡</sup>mg EC3G g<sup>-1</sup> MS; <sup>§</sup>mg EC g<sup>-1</sup> MS ❖ Values in a row followed by the same letter are not statistically different (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). DHS: honest significant difference. <sup>†</sup>mg GAE g<sup>-1</sup> DM; <sup>‡</sup>mg EC3G g<sup>-1</sup> DM; <sup>§</sup>mg EC g<sup>-1</sup> DM.

fue mayor que lo informado por Christian y Jackson, (2009). En las variedades con cálices rojos, la intensidad del color está relacionada con su contenido de antocianinas (Christian y Jackson, 2009; Salinas *et al.*, 2012). La variedad Sudán, con cálices oscuros, presentó 2.4 veces más antocianinas que Criolla Nayarit, con cálices claros. Las antocianinas en los FET en las variedades con cálices rojos representaron 30 %, y en la de cálices blancos 2 %. Según Sáyago-Ayerdi *et al.* (2007), cerca de 30 y 60 % de los FET en jamaica de cálices rojos, son antocianinas y ácidos fenólicos.

Las proantocianidinas (PAs) fueron los fenoles menos abundantes en los extractos analizados. El mayor contenido se observó en la variedad Sudán ( $p\leq 0.05$ ) y el menor en Alma Blanca. Su presencia en cálices de jamaica fue reportada por Obouayeba *et al.* (2014) al monitorear los fitoquímicos en extractos acuosos de jamaica. El método analítico utilizado (DMAC) detecta con mayor precisión monómeros de flavan-3-ols, y reacciona sólo con unidades terminales, sin discriminar monómeros, dímeros o trímeros (Hummer y Schreier, 2008). Así, las PAs en las jamaicas analizadas pueden ser de tipo flavanoles, porque Huang *et al.* (2009) reportaron presencia de catequina, epigalocatequina y epigalocatequin-galato en un extracto concentrado de jamaica. Las proantocianidinas se consideran fenoles con actividad antioxidante que ayudan en la prevención de problemas cardiovasculares, porque protegen el músculo cardíaco (Natella *et al.*, 2002).

### Actividad antioxidante

El IC<sub>50</sub> es la concentración del extracto que reduce 50 % del radical libre. Los valores bajos de IC<sub>50</sub> se asocian con el poder antioxidante mayor (Einbond

The highest content was found in Sudan and the lowest in Alma Blanca (Table 2). The TEP content in the three genotypes was alike to that reported for varieties with colored calyxes similar (Christian and Jackson, 2009).

The content of total anthocyanins was highest in Sudan and lowest in Alma Blanca ( $p\leq 0.05$ ). The varieties that were not white had values (3 to 25 mg EC3G g<sup>-1</sup> DM) similar to those obtained by Juliani *et al.* (2009) in varieties cultivated in Senegal. In Alma Blanca, the content was higher than that reported by Christian and Jackson (2009). In varieties with red calyxes, the intensity of the color is related with their anthocyanin content (Christian and Jackson, 2009; Salinas *et al.*, 2012). The Sudan variety, with dark red calyxes, had 2.4 times more anthocyanins than Criolla Nayarit, with light red calyxes. The anthocyanins in red calyxes accounted for 30 % of the TEP, and in white calyxes 2 %. According to Sáyago-Ayerdi *et al.* (2007), nearly 30 and 60 % of the TEP in red jamaica calyxes are anthocyanins and phenolic acids.

The proanthocyanidins (PAs) were the least abundant phenols in the analyzed extracts. Sudan was the variety with the highest content ( $p\leq 0.05$ ), and Alma Blanca had the lowest. Their presence in jamaica calyxes was reported by Obouayeba *et al.* (2014) when keeping track of phytochemicals in aqueous extracts of jamaica. The analytical method used (DMAC), detect flavan-3-ol monomers with greater precision and, reacting only with terminal units, it does not discriminate monomers, dimers or trimers (Hummer and Schreier, 2008). It is thus possible that the PAs in the jamaicas analyzed are flavanol types, as Huang *et al.* (2009) reported the presence of catechin, epigallocatechin and epigallocatechin-galate in a concentrated extract of

*et al.*, 2004). El patrón de la reducción del radical DPPH mostrado por Alma Blanca y Criolla Nayarit fue distinto al de Sudán (Figura 3).

La reducción por los extractos de Alma Blanca y Criolla Nayarit fue casi lineal, en tanto que la de Sudán fue exponencial. La variedad Sudán presentó  $IC_{50}$  menor que Alma Blanca y Criolla Nayarit, es decir, tiene poder antioxidante mayor, atribuido a su contenido alto de antocianinas, más que a sus ácidos fenólicos, que fueron similares a los de Alma Blanca. El  $IC_{50}$  de los extractos de Criolla Nayarit y Alma Blanca fue similar ( $p > 0.05$ ). La actividad antioxidante de Alma Blanca se atribuye a los ácidos fenólicos, pues prácticamente carece de antocianinas. La variabilidad entre métodos para medir la actividad antioxidante en extractos acuosos de jamaica y la forma de expresar los datos, dificulta la comparación de resultados. Según Pérez-Ramírez *et al.* (2015) el  $IC_{50}$  para una bebida de jamaica fue 13.6 mg de cálices secos  $mL^{-1}$  y los cálculos con la concentración de FET de la variedad Sudán dan un  $IC_{50}$  de 478.4  $\mu g mL^{-1}$ ; por lo tanto, con poder antioxidante mayor. Los resultados mostraron el potencial antioxidante (ácidos fenólicos) de las variedades de *Hibiscus* spp. de cálices blancos similar al de las variedades con cálices de otro color.

## CONCLUSIONES

Independientemente de su color, los cálices son fuente abundante de ácidos fenólicos y otros flavonoides con actividad antioxidante. El color de los cálices puede ser un indicador del tipo predominante de fenoles y ayudar a la selección de las variedades para obtener formulaciones con propiedades nutracéuticas particulares.

## LITERATURA CITADA

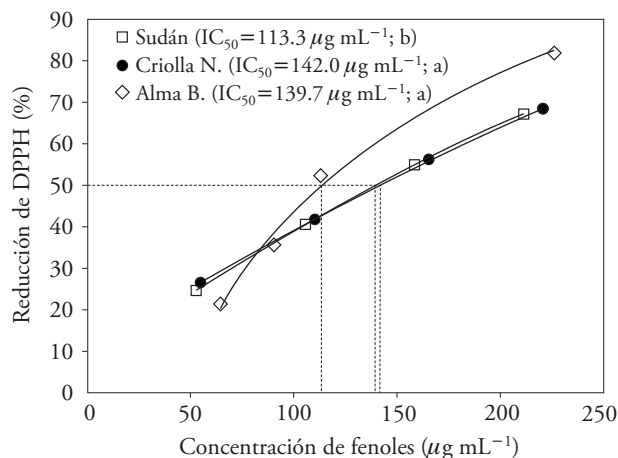
- Abdel-Aal, E.-S. M., and P. Hucl. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheat. *Cereal Chem.* 76: 350-354.
- Ali, B. H., N. A. Wabel, and G. Blunden. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytother. Res.* 19: 369-375.
- Bakan, B. A., C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, B. C. Regnault-Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2826-2831.

jamaica. Proanthocyanidins are considered phenols with antioxidant activity that aids in the prevention of cardiovascular problems by protecting the cardiac muscle (Natella *et al.*, 2002).

## Antioxidant activity

$IC_{50}$  is the concentration of an extract which reduces free radicals by 50 %. Low  $IC_{50}$  values are associated with greater antioxidant power (Einbond *et al.*, 2004). The pattern of reduction of the DPPH radical exhibited by Alma Blanca and Criolla Nayarit was different from that of Sudán (Figure 3).

Reduction by the Alma Blanca and Criolla Nayarit extracts was almost linear, whereas that of Sudán was exponential. The Sudán variety had a lower  $IC_{50}$  than Alma Blanca and Criolla Nayarit, meaning that it has greater antioxidant power, attributed to its high content of anthocyanins rather than its phenolic acids, which were similar to those found in Alma Blanca. The  $IC_{50}$  of the Criolla Nayarit and Alma Blanca varieties was similar ( $p > 0.05$ ). The antioxidant activity of Alma Blanca, which is similar to that of varieties of other colors, is attributed to the phenolic acids since it almost completely lacks anthocyanins. Differences in methods for measuring antioxidant activity in aqueous extracts of jamaica and how the data are expressed make it difficult to



**Figura 3. Actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) de extractos acuosos de variedades de *H. sabdariffa* L. con color diferente de cálices.**

**Figure 3. Antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) of aqueous extracts from varieties of *H. sabdariffa* L. with calyces of different colors.**

- Chao, Y.-C., and M.-C. Yin. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathog. Dis.* 6: 201-206.
- Christian, K. R., and J. C. Jackson. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *J. Food Compos. Anal.* 22: 663-667.
- Einbond, S. L., A. K. Reynertson, L. Xiao-Dong, J. M. Basile, and J. E. Kennelly. 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem.* 84: 23-28.
- Fernández-Arroyo, S., I. C. Rodríguez-Medina, R. Beltrán-Debón, F. Pasini, J. Joven, V. Micol, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez. 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Inter.* 44: 1490-1495.
- Galicia-Flores, L. A., Y. Salinas-Moreno, B. M. Espinosa-García, y C. Sánchez-Feria. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 14: 121-129.
- Głowniak, K., G. Zgórk, and M. Kozyra. 1996. Solid phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some Echinacea species. *J. Chromatogr. A* 730: 25-29.
- Hopkins, A. L., M. G. Lamm, J. L. Funk, and C. Ritenbaugh. 2013. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia* 85: 84-94.
- Huang, C. N., K. C. Chan, W. T. Lin, S. L. Su, C. J. Wang, and C. H. Peng. 2009. *Hibiscus sabdariffa* inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration induced by high glucose - A mechanism involves connective tissue growth factor signals. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3073-3079.
- Hummer, W., and P. Schreier. 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 1381-1398.
- Juliani, H. R., C. R. Welch, Q. Wu, B. Diouf, D. Malainy, and J. E. Simon. 2009. Chemistry and quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) for developing the natural product industry in Senegal. *J. Food Sci.* 74: S113-S121.
- Liu, H. R. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *J. Cereal Sci.* 46: 207-219.
- Natella, F., F. Belevi, V. Gentili, F. Ursini, and C. Scaccini, C. 2002. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7720-7725.
- OBouayeba, A. P., N. B. Djyh, S. Diabate, A. J. Djaman, J. D. N'guessan, M. Kone, and T. H. Kouakou. 2014. Phytochemical and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petal extracts. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 5: 1453-1465.
- Pérez-Ramírez, I. F., E. Castaño-Tostado, J. A. Ramírez-De León, N. E. Rocha-Guzmán, and R. Reynoso-Camacho. 2015. Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Food Chem.* 172: 885-892.
- Prenesti, E., S. Berto, P.G. Daniele, and S. Toso. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* 100: 433-438.
- compare results. For example, Pérez-Ramírez *et al.* (2015) reported that the IC<sub>50</sub> of a jamaica beverage was 13.6 mg dry calyxes mL<sup>-1</sup> water. For comparison, respective calculations performed from the TEP concentration in the variety Sudan, give an IC<sub>50</sub> value of 478.4 ug mL<sup>-1</sup>; therefore, its antioxidant power is lower. The results showed that the antioxidant potential (phenolic acids) of the varieties of white calyx *Hibiscus* spp. is similar to that of the varieties with calyxes of other colors.

## CONCLUSIONS

Regardless of their color, jamaica calyxes are a source of abundant phenolic acids and other flavonoids with antioxidant activity. The color of the calyxes may be an indicator of the predominating type of phenols and could aid in the selection of varieties for formulations with particular nutraceutical properties.

—End of the English version—



- Ramírez-Rodríguez, M. M., M. L. Plaza, A. Azeredo, M. O. Balaban, and M. R. Marshall. 2011. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.* 76, Nr. 3: 428-435.
- Rodríguez-Medina, I. C., R. Beltrán-Debón, V. Micol Molina, V., C. Alonso-Villaverde, J. Joven, J. A. Menéndez, A. Segura-Carretero, A., and A. Fernández-Gutiérrez. 2009. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *J. Separ. Sci.* 32: 3441-3448.
- Salinas-Moreno Y., G. Salas-Sánchez, D. Rubio-Hernández, and N. Ramos-Lobato. 2005. Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *J. Chromatogr. Sci.* 43: 483-487.
- Salinas-Moreno, Y., A. R. E. Zúñiga-Hernández, L. B. Jiménez-De la Torre, V. Serrano-Altamirano, y C. Sánchez-Feria. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características físico-químicas de sus extractos acuosos. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 18: 395-407.
- Saura-Calixto, F., J. Serrano, and I. Goñi. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101: 492-501.
- Sáyago-Ayerdi S. G., S. Arranz, J. Serrano, and I. Goñi. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*H. sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7786-7890.
- Shahidi, F., and M. Nacz. 2004. Phenolic compounds in fruits and vegetables. *In: Shahidi, F., and M. Nacz (eds). Phenolics in Foods and Nutraceuticals.* CRC Press. pp: 131-239.

- Singleton, V. L. and J. J. A. Rossi. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Viticul.* 16: 144-158.
- Soler-Rivas, C., J. C. Espín, and H. J. Wichers. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal.* 11: 330-338
- Tsai, Pi-Jen, J. Macintosh, P. Pearce, B. Camden, and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Inter.* 35: 351-356.
- Tseng, T-H., C-J. Wang, E-S. Kao, and H-Y. Chu. 1996. *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem-Biol. Interac.* 101: 137-148.
- Tseng, T-H., E-S. Kao, H-Y. Chu, F-P. Chow, W-L. Lin, and C-J. Wang. 2000. Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* 60: 307-315.
- Wallace, T. C., and M. M. Giusti. 2010. Evaluation of parameters that affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavonols and proanthocyanidins. *J. Food Sci.* 75: 619-625.
- Watanabe, T. Y. Arai, Y. Mitsui, T. Yusara, W. Okawa, and Y. Kajihara. 2006. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clin.Exp. Hypertens.* 28: 439-49.