

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN
LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)
MEDIANTE LAS TÉCNICAS FRAP Y DPPH**

**FRAP AND DPPH ANALYSES OF THE ANTIOXIDANT
ACTIVITY IN ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

¹Jessica Batalla-Mayoral, ²Miriam Vega-Hernández, ²Angel Silveti-Loeza

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Complejo Regional Mixteca, Campus Izúcar
de Matamoros, 74570, Puebla.

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, 72000,
Puebla.

jessk1980@gmail.com, ing.miriamvegah@gmail.com

angelsilveti@yahoo.com.mx

Resumen

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta rica en compuestos bioactivos, tales como polifenoles, flavonoides, vitaminas, fibra y antocianinas, y su actividad antioxidante es directamente proporcional a la concentración de los compuestos mencionados. Se ha reportado que la presencia de estos compuestos bioactivos confiere a los extractos acuosos de jamaica efectos benéficos para la salud, tales como actividad antioxidante, antihipertensiva, antihiperlipidémica, antiinflamatoria, antibacteriana, efecto citotóxico selectivo, entre otros. Por otro lado, su comercialización es amplia mediante los cálices de jamaica para hacer agua de jamaica y la industrialización de mermeladas, jugos y licores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar diferentes metodologías usadas para medir la actividad antioxidante en extractos acuosos de cálices de jamaica, enfocándonos principalmente en dos de ellos: el método de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma, por sus siglas en inglés) y el método de DPPH (Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo). Los resultados reportados por

diversos investigadores muestran una variabilidad debido a diferentes factores, por ejemplo, la variedad de la jamaica utilizada, el uso de diferentes solventes para elaborar extractos de jamaica y algunas variaciones en los métodos de FRAP y DPPH, respectivamente. Las técnicas de FRAP y DPPH muestran resultados contundentes para evaluar la capacidad antioxidante de la jamaica. Además, en este trabajo, se presentan las metodologías para medir la capacidad antioxidante de extractos acuosos de jamaica mediante FRAP y DPPH.

Palabras clave: Jamaica, *Hibiscus sabdariffa L.*, actividad antioxidante, compuestos fenólicos

Abstract

Roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) is a plant rich in bioactive compounds, such as polyphenols, flavonoids, vitamins, fiber, and anthocyanins. In addition, its antioxidant activity is directly proportional to the concentration of these compounds. It has been reported that the presence of these bioactive compounds in the aqueous extracts of roselle reveals health benefits, such as antioxidant, antihypertensive, antihyperlipidemic, anti-inflammatory, and antibacterial activities, selective cytotoxic effects, and so forth. On the other hand, it is widely traded in the form of roselle calyces, which are used to prepare a roselle beverage, and industrially manufactured as jam, juice and liqueur. Therefore, the purpose of this paper is to analyze the different methodologies used to measure the antioxidant activity in aqueous extracts of roselle calyces, focusing mainly on the FRAP method (Ferric Reducing Ability of Plasma) and the DPPH method (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Results reported by several researchers show a variability due to different factors, such as the variety of roselle, the use of different solvents to prepare roselle extracts, and some variations in the FRAP and DPPH methods. The FRAP and DPPH techniques show convincing results to evaluate roselle's antioxidant capacity. Furthermore, this paper presents the methodologies used to measure the antioxidant capacity of roselle's aqueous extracts by FRAP and DPPH.

Keywords: Roselle, *Hibiscus sabdariffa L.*, antioxidant activity, phenolic compounds

Introducción

El interés por extraer antioxidantes naturales de plantas ha aumentado recientemente, particularmente antioxidantes bioactivos como polifenoles y flavonoides. Las antocianinas son un subgrupo de los flavonoides y se encuentran en plantas principalmente en forma glicosilada como las antocianidinas (Sindi *et al.*, 2014).

Los polifenoles contenidos en plantas alimenticias frecuentemente están asociados con la fibra dietética, y distintos autores han evaluado el contenido fenólico y la actividad antioxidante en este material (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007).

Por lo general, en los sistemas biológicos, hay cuatro fuentes de antioxidantes (Prior *et al.*, 2005):

1. Enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.

2. Moléculas grandes como albúmina, ceruloplasmina, ferritina y otras proteínas.
3. Moléculas pequeñas como ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferoles, carotenoides, polifenoles, entre otros.
4. Algunas hormonas como estrógenos, angiotensina, melatonina, entre otras.

Además, existen múltiples radicales libres y fuentes oxidantes, por ejemplo, $O_2^{\bullet-}$, O_2 , HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^{\bullet-}$, $HOCl$, $RO(O)^{\bullet}$, $LO(O)$, entre otros, y tanto antioxidantes como oxidantes tienen diferentes características químicas (Prior *et al.*, 2005).

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) es una importante fuente de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, como ácidos orgánicos, fitoesteroles y polifenoles, algunos de ellos con propiedades antioxidantes (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007).

Se han reportado diferentes antocianinas en la jamaica como cianidina 3-rutinósido, delphinidina 3-sambubiosido, cianidina 3-sambubiosido, cianidina 3-glucósido y delphinidina 3-glucósido (Sindi *et al.*, 2014).

Debido a que la jamaica contiene una gran cantidad de antioxidantes, varios investigadores se han enfocado en analizar extractos acuosos de *Hibiscus sabdariffa*, mientras que otros han empleado solventes orgánicos y diferentes técnicas de extracción, lo cual dificulta la comparación de ambos estudios. Asimismo, se han usado diferentes variedades de *Hibiscus sabdariffa* (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007) y se ha examinado la actividad antioxidante con diferentes métodos de análisis (Sindi *et al.*, 2014).

Por otra parte, los métodos para determinar la capacidad antioxidante se clasifican en métodos HAT (Hydrogen Atom Transfer por sus siglas en inglés) y SET (Single Electron Transfer por sus siglas en inglés). No obstante, el resultado es el mismo

independientemente del mecanismo. Ambos mecanismos pueden ocurrir en paralelo, y el mecanismo dominante en un sistema dado estará determinado por la estructura de los antioxidantes y sus propiedades, como solubilidad y coeficiente de partición, así como por el solvente del sistema. La energía de ionización y el potencial de ionización son los factores más relevantes para determinar el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes (Prior *et al.*, 2005).

Se necesita un protocolo que abarque mediciones de más de una propiedad, ya que los polifenoles tienen múltiples actividades antioxidantes, y la actividad antioxidante dominante depende del medio y del sustrato de prueba (Prior *et al.*, 2005).

Los métodos HAT miden la capacidad clásica que tiene un antioxidante para apagar los radicales libres por una transferencia de hidrógeno. Las reacciones HAT se llevan a cabo independientemente del solvente y del pH, y típicamente se completan en segundos o en minutos, por lo

cual se conocen como rápidas. Sin embargo, en estas reacciones la presencia de agentes reductores, como los metales, puede contribuir a que se observe una actividad antioxidante alta y errónea (Prior *et al.*, 2005).

Los métodos SET detectan la capacidad que tiene un antioxidante potencial para transferir un electrón y así reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. Estas reacciones son normalmente lentas y pueden requerir largos períodos de tiempo para que se completen, por lo que los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de disminución del producto en lugar de la cinética. Los componentes traza y los contaminantes (particularmente metales) pueden generar una variabilidad alta, una reproducibilidad pobre e inconsistencias en los resultados (Prior *et al.*, 2005).

Se han desarrollado diferentes metodologías de mecanismos HAT para la detección de la actividad específica de antioxidantes y la actividad en

general, entre los cuáles están: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, por sus siglas en inglés), TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter, por sus siglas en inglés), TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity), CL (Chemiluminescence Assay, por sus siglas en inglés), PCL (Photochemiluminescence Assay, por sus siglas en inglés), ensayo Croton o β -caroteno blanqueado por LOO \cdot y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Prior *et al.*, 2005).

Dentro de las metodologías SET se encuentran FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, por sus siglas en inglés) y CUPRAC (Copper Reduction Assay, por sus siglas en inglés) (Prior *et al.*, 2005).

También existen métodos que utilizan ambos mecanismos HAT y SET como ensayo TEAC o ABTS (Absorbance of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, por sus siglas en inglés) y ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) (Prior *et al.*, 2005).

El método FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ al complejo ferroso de color azul intenso $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ en medio ácido. Este método mide la potencia reductora en plasma, pero actualmente ha sido adaptado y usado para ensayo de antioxidantes en alimentos (Gülcin *et al.*, 2012).

De esta manera, se observa que un antioxidante puede reducir efectivamente a un pro-oxidante, pero puede ser incapaz de reducir eficientemente al Fe^{3+} (Gülcin *et al.*, 2012). Asimismo, se puede observar que todos los antioxidantes son agentes reductores, pero no todos los agentes reductores son antioxidantes.

Por lo anterior, podemos mencionar que una sustancia química se reduce debido a que gana electrones, mientras que cuando se oxida pierde electrones. Un agente reductor es una sustancia que transfiere electrones y un agente oxidante es una sustancia que acepta electrones.

Un agente reductor y un agente oxidante son términos químicos, mientras que un antioxidante y un pro-oxidante, respectivamente, significan lo mismo en un contexto biológico (Gülcin *et al.*, 2012).

Por otro lado, el método DPPH también mide la capacidad antioxidante. El radical DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables que presenta un color morado oscuro. Este ensayo se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes hacia el DPPH. La capacidad puede ser evaluada mediante EPR (Electron Spin Resonance, por sus siglas en inglés) o por medición de la disminución de su absorbancia. El ensayo se basa en la medición de la pérdida de color del DPPH a 515 nm después de reaccionar con los compuestos de prueba, y la reacción es observada por un espectrofotómetro (Prior *et al.*, 2005).

El porcentaje de DPPH sobrante es proporcional a la concentración de antioxidantes (Prior *et al.*, 2005). Por consiguiente, en esta investigación

elegimos dos técnicas, FRAP y DPPH, para determinar la capacidad antioxidante en extractos acuosos de jamaica y enseguida se muestra la metodología.

Metodología

La capacidad antioxidante por método FRAP se determinó según la metodología de Quiroz (2016). Se realiza una curva de calibración de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 carboxílico) con soluciones estándar de 25-1000 μM , partiendo de una solución madre de 1000 μM . Se prepararan las siguientes soluciones: a) Solución de buffer acetato (pH cercano a 3.6), b) Solución TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (10 μM), c) Solución de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y d) Solución FRAP.

Se toma una alícuota de 150 μL de extracto diluido (1000 ppm) y a cada estándar se les agregan 2850 μL de la solución FRAP. Las mezclas se agitan por unos segundos y se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos.

Posteriormente, se lee la absorbancia de la muestra y de los estándares en un espectrofotómetro a 593 nm de longitud de onda.

La actividad antioxidante por método DPPH se determina según la metodología de Tahir *et al.* (2016) con modificaciones y se realiza por duplicado. Se preparan soluciones de 100 y 400 ppm de ácido ascórbico, las cuales son el control positivo. Asimismo, se realizan diluciones de 100 y 400 ppm del extracto acuoso concentrado de jamaica. Se prepara una solución de DPPH (0.02 mg/mL), la cual es el control negativo (CN).

Se colocan 2 mL de cada concentración del extracto en tubos de vidrio, control positivo y solución DPPH (CN). Después, se añade 1 mL de la solución DPPH a los extractos y al control positivo, mientras que a la solución de CN se le añaden 5 mL de metanol. Como blanco se utilizan 2 mL de extracto diluido más 1 mL de agua.

Posteriormente, todos los tubos se agitan vigorosamente por unos segundos y se incuban a

temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos. Luego, se mide la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 517 nm de longitud de onda. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición.

Finalmente, los resultados obtenidos por diferentes autores que han medido la capacidad antioxidante mediante FRAP y DPPH para extractos acuosos de jamaica se concentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Capacidad antioxidante en <i>Hibiscus sabdariffa</i> mediante FRAP y DPPH según diferentes reportes			
Origen de la jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Técnica usada	Capacidad antioxidante	Referencias
Chiautla de Tapia, Puebla	FRAP	6,630 ± 1,120 µM TE / 100 g	Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> , 2016
Chiautla de Tapia, Puebla	FRAP	8,035 ± 220 µM TE / 100 g	Salazar-González <i>et al.</i> , 2009
Sudán	FRAP	1000 µM TE / 100 g	Ramirez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2011
Chiautla de Tapia, Puebla	DPPH	80.9 ± 1.5%	Cid-Ortega <i>et al.</i> , 2012
Nigeria	DPPH	69 ± 0.46%	Anokwuru <i>et al.</i> , 2011
Sudán	DPPH	71.98 ± 5.77%	Sindi <i>et al.</i> , 2014
Sudán	DPPH	70.49-74.11%	Tahir <i>et al.</i> , 2016
Taiwán	DPPH	20-60%	Wu <i>et al.</i> , 2018

*TE= Equivalentes de Trolox

Resultados

La capacidad reductora de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* indica la presencia de antioxidantes que actúan como agentes reductores. Gong *et al.* (2012) realizaron investigaciones con la planta de cempasúchil, que se usa como hierba medicinal y cuyas propiedades son importantes en la dermatología y la cosmética obteniendo 880 μM TE / 100 g. El resultado obtenido en *Hibiscus sabdariffa* es 8 veces mayor.

Peschel *et al.* (2007) realizaron estudios con residuos de hierba pastel (*Isatis Tinctoria*), que se usa como planta medicinal y se cultiva para producir el tinte azul índigo (Nguyen *et al.*, 2017), obteniendo un porcentaje de inhibición de 6.88 ± 1.12 , en comparación con el encontrado en *Hibiscus sabdariffa*, donde éste es 80% mayor.

La actividad antioxidante está relacionada con algunos ácidos orgánicos, como el protocatéquico y el p-hidrobenzoico (Msagati, 2012), ambos presentes en *Hibiscus sabdariffa* (Balasundram *et al.*, 2006).

Conclusión

Existe una relación positiva entre el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de un extracto, y más del 95% de la capacidad antioxidante de los extractos se debe a sus compuestos fenólicos (Wu *et al.*, 2018).

Hemos observado que los ensayos FRAP y DPPH se utilizan ampliamente para medir la capacidad antioxidante, principalmente en alimentos y bebidas. Además, una vez que estas metodologías son implementadas, éstas pueden mostrar resultados reproducibles y confiables.

Referencias

Balasundram, N.; Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

Cid-Ortega, S. y Guerrero-Beltrán, J. A. (2012). Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6-2, 47-63.

Gong, Y.; Liu, X.; He, W. H.; Xu, H. G.; Yuan, F. y Gao, Y. X. (2012). Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residues. *Fitoterapia*, 83(3), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.013>

Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>

Msagati, T. A. (2012). Antioxidants and Radical Scavengers. *Chemistry of Food Additives and Preservatives*.

Nguyen, T. K. O.; Jamali, A.; Grand, E.; Morreel, K.; Marcelo, P.; Gontier, E. y Dauwe, R. (2017). Phenylpropanoid profiling reveals a class of hydroxycinnamoyl glucaric acid conjugates in *Isatis tinctoria* leaves. *Phytochemistry*, 144, 127-140. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.007>

Peschel, W.; Dieckmann, W.; Sonnenschein, M. y Plescher, A. (2007). High antioxidant potential of pressing residues from evening primrose in comparison to other oilseed cakes and plant antioxidants. *Industrial Crops and Products*, 25(1), 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.07.002>

Prior, L. Ronald; Xianli, Wu y Schaich, Karen (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in

Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 53, 4290-4302.

Quiroz Reyes, C. N. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos con actividad antioxidante de grano de cacao (*Theobroma cacao* L.). IPN.

Ramirez-Rodrigues, M. M.; Plaza, M. L.; Azeredo, A.; Balaban, M. O. y Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76(3), 429-435. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091>

Salazar-González, C.; Vergara-Balderas, F. T. y Guerrero-Beltrán, J. A. (2009). Evaluación de agentes antioxidantes de un extracto de flor de jamaica microencapsulado. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

Sáyago-Ayerdi, S. G.; Arranz, S.; Serrano, J. y Goñi, I. (2007). Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7886-7890. <https://doi.org/10.1021/jf070485b>

Sindi, H. A.; Marshall, L. J. y Morgan, M. R. A. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*, 164, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>

Tahir, H. E.; Xiaobo, Z.; Jiyong, S.; Mariod, A. A. y Wiliam, T. (2016). Rapid Determination of Antioxidant Compounds and Antioxidant Activity of Sudanese Karkade (*Hibiscus sabdariffa* L.) Using Near Infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 9(5), 1228-1236. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0299-z>

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