

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY®**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE FLOR DE JAMAICA
(*Hibiscus sabdariffa*) CONTRA LA OXIDACIÓN *in vitro* DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA
DENSIDAD (LDL)**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

POR:

GABRIELA DEL CARMEN ANGEL MORALES

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE, 2005

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA**

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por la Ing. Gabriela del Carmen Angel Morales, sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Comité de Tesis:

Carmen Hernández Brenes, Ph.D.
Asesora

Sergio Serna Saldívar, Ph.D.
Sinodal

Elsa María Guajardo Touché, Ph.D.
Sinodal

Aprobado:

Federico Viramontes Brown Ph. D.
Director del Programa de Graduados en Ingeniería

Diciembre, 2005

RESUMEN

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos entre ellos se encuentran los nutraceuticos que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Los polifenoles son compuestos nutraceuticos que generan beneficios importantes a la salud; están presentes en productos como el té verde, vino tinto, chocolate, fresas, cerezas, entre otros (Rice-Evan *et al.*, 2003). Este proyecto tuvo como objetivo evaluar la capacidad antioxidante y la capacidad de inhibición de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de los diferentes compuestos fenólicos de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y comparar sus propiedades antioxidantes con otras fuentes naturales mexicanas de gran importancia económica en la industria y en la agricultura como el maíz azul (*Zea mays*), frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y chile poblano (*Capsicum annuum*).

En el primer estudio se realizó un fraccionamiento de los compuestos fenólicos presentes en el Extracto Crudo Hidrosoluble de la flor de jamaica basado en su afinidad por la columna C₁₈ y su solubilidad en diferentes solventes. El contenido de fenólicos totales fue cuantificado para los extractos crudos y sus fracciones. El ensayo de la capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés) fue realizado para estimar la capacidad antioxidante en los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica. De igual manera se determinó la capacidad de inhibición de oxidación *in vitro* sobre las LDL de sus extractos crudos y fracciones. Finalmente se realizó una caracterización y cuantificación química tentativa de los extractos y fracciones de flor de jamaica por HPLC-PDA y cromatografía bidimensional en papel, con el objetivo de identificar el grupo de compuestos potencialmente responsables de dicha bioactividad.

Los resultados indican que la flor de jamaica posee un alto contenido de fenólicos totales (1414 mg/100g BS). El fraccionamiento de dichos compuestos tuvo un rendimiento del 79.3%, y se observó que los extractos crudos poseen una mayor capacidad antioxidante en comparación con las fracciones. Resulto interesante observar que a pesar del bajo valor ORAC contenido en las fracciones acuosas, su valor ORAC específico es mayor en comparación al extracto crudo esto puede ser debido a la presencia de otros compuestos no fenólicos como ácidos orgánicos (ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido ascórbico) entre otros compuestos como las saponinas. De igual manera se demostró que la capacidad antioxidante de la flor de jamaica (valor ORAC) está correlacionada con su contenido de fenólicos totales ($r^2=0.98$).

En el ensayo de la capacidad de inhibición de oxidación *in vitro* sobre las LDL se observó una mayor bioactividad en las fracciones metanólicas y de acetato de etilo, lo cual puede ser atribuido a sus compuestos fenólicos principalmente a las antocianinas delphinidina y cianidina presentes en la Fracción-MeOH (IC50= 4 μ M EAG) y a compuestos como kaempferol, miricetina, quercetina entre otros flavonoles presentes en la Fracción EtOAc (IC50= 3.8 μ M EAG).

El segundo capítulo tuvo la finalidad de comparar la capacidad antioxidante (valor ORAC) de la flor de jamaica con el frijol negro, maíz azul y chile poblano. Los resultados mostraron a la flor de jamaica como el producto con la de mayor capacidad antioxidante (338 μ mol Trolox/ g BS) seguida del frijol negro (169 μ mol Trolox/ g BS), chile poblano (44 μ mol Trolox/ g BS) y por último el maíz azul (8.8 μ mol Trolox/ g BS).

DEDICATORIAS

A Dios

Por bendecirme en cada momento de mi vida.

A mis padres

Agradezco enormemente su amor y apoyo incondicional. Gracias por ser mi ejemplo a seguir y por motivarme a ser mejor cada día.

A mis hermanos

Quienes siempre estuvieron animándome en aquellos momentos difíciles, gracias por ser mis cómplices.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Carmen Hernández Brenes, por sus consejos, asesoramiento científico y estímulo para seguir con mis estudios.

Al Dr. Sergio Serna Saldívar por brindarme su apoyo para la culminación de este proyecto.

A la Dra. Elsa Guajardo por su por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos por su apoyo, consejos y palabras de aliento en el desarrollo de este proyecto, gracias por ser mi familia regia Janet, Judith, Irasema, Mayra, Densee, Bertha, Lore, Tanhya, Armando, Jorge, Alex y Dany, y a mis amigos chiapanecos.

A todos mis compañeros del laboratorio por su compañía y por hacer del laboratorio un lugar agradable.

A la química Isabel por su apoyo y amistad.

A todos los doctores del Centro de Biotecnología por sus conocimientos y consejos de vida.

LISTA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	I
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
LISTA DE CONTENIDO.....	V
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 COLESTEROL.....	1
1.1.1 Estructura.....	y 1
Propiedades.....	
1.1.2 Metabolismo del Colesterol y de Lípidos.....	2
1.1.3 Síntesis de Colesterol y Lípidos en el Organismo.....	3
1.1.4 Lipoproteínas.....	4
1.1.4.1 Quilomicrones.....	5
1.1.4.2 Lipoproteínas de Baja Densidad.....	5
1.1.4.3 Lipoproteínas de Alta Densidad.....	6
1.1.5 Relación de los Lípidos Sanguíneos con Enfermedades Cardiovasculares.....	6
1.2 FLAVONOIDES Y ACIDOS FENÓLICOS.....	7
1.2.1 Clasificación y Estructura Química.....	7
1.2.2 Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	11
1.2.3 Usos e Importancia de la Flor de Jamaica.....	12
1.2.4 Ocurrencia de Flavonoides y Ácidos Fenólicos en la Flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	12
1.2.5 Métodos de Análisis y Características Espectrales de los Compuestos Fenólicos.....	13
1.3 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE FLAVONOIDES Y COMPUESTOS FENOLICOS....	17
1.3.1 Ensayo de Capacidad de Absorber Radicales de Oxígeno <i>in vitro</i> (ORAC por sus siglas en inglés).....	17
1.3.2 Flavonoides que Inhiben la Oxidación de LDL.....	19
CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA FLOR DE JAMAICA.....	21

2.1 Introducción	21
2.2 Materiales y Métodos	23
2.2.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos de la Flor de Jamaica.....	23
2.2.2 Caracterización Espectrofotométrica de Extractos Fenólicos.....	26
2.2.1.1 Fenólicos Totales.....	26
2.2.1.2 Antocianinas Monoméricas totales.....	26
2.2.3 Propiedades Antioxidantes de Flavonoides y Compuestos Fenólicos.....	26
2.2.3.1 Bioensayo de Absorber de Radicales Oxígeno (ORAC).....	26
2.2.3.2 Efecto de los Flavonoides sobre la Oxidación de LDL.....	27
2.2.3.2.1 Aislamiento de LDL del plasma humano.....	27
2.2.3.2.2 Determinación de contenido proteico	28
2.2.3.2.3 Oxidación de LDL.....	28
2.2.3.2.4 Bioensayo de inhibición de la oxidación <i>in vitro</i> de LDL aisladas de plasma humano.....	28
2.2.4 Caracterización Química de los Extractos y Fracciones de la Flor de Jamaica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-PDA).....	29
2.2.4.1 Cuantificación de Antocianinas por HPLC-PDA.....	29
2.2.4.2 Cuantificación de Fenólicos Totales por HPLC-PDA.....	29
2.2.4.3 Procedimiento de Interpretación de Espectros UV-Visible.....	30
2.2.5 Determinación de los Valores de RF de los Flavonoides y Compuestos Fenólicos Presentes en la Flor de Jamaica.....	30
2.2.5.1 Preparación y Purificación del Extracto Crudo de la Flor de Jamaica.....	30
2.2.5.2 Reacciones Coloridas.....	31
2.2.5.3 Cromatografía en Capa Delgada (TLC).....	31
2.2.5.4 Cromatografía Bidimensional en Papel.....	32
2.2.6 Análisis Estadístico.....	32
2.3 Resultados y Discusión de resultados	32
2.3.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos de la Flor de Jamaica.....	33
2.3.2 Propiedades Antioxidantes de los Extractos Crudos y Fracciones.....	35
2.3.3 Efecto de los Flavonoides sobre la Oxidación <i>in vitro</i> de LDL aisladas de plasma humano.....	37
2.3.4 Caracterización Química de los Extractos y Fracciones de la Flor de Jamaica por HPLC-PDA y Cromatografía Bidimensional en Papel.....	41
2.3.4.1 Caracterización por Cromatografía Bidimensional en papel y HPLC-PDA.....	43

2.3.4.2 Cuantificación de Flavonoides por HPLC-PDA.....	49
2.3.4 Conclusiones.....	53
CAPITULO 3: Evaluación Comparativa de la Capacidad Antioxidante y Composición Química de Extractos de la Flor de Jamaica con Otros Extractos de Fuentes Naturales Producidas en México (Frijol Negro, Maíz Azul, Chile Poblano).....	55
3.1 Introducción.....	55
3.2 Materiales y Métodos.....	56
3.2.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos del Frijol negro, Maíz azul y Chile poblano.....	57
3.2.2 Caracterización Espectrofotométrica de Extractos Fenólicos.....	58
3.2.2.1 Fenólicos Totales.....	58
3.2.2.2 Antocianinas Monoméricas Totales.....	58
3.2.3 Propiedades Antioxidantes de Flavonoides y Compuestos Fenólicos.....	58
3.2.4 Análisis Estadístico.....	59
3.3 Resultados y Discusión de Resultados.....	59
3.3.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos del Frijol negro, Maíz azul y Chile poblano.....	59
3.3.2 Determinación de Fenólicos Totales y Antocianinas Monoméricas Totales.....	61
3.3.3 Capacidad Antioxidante de los Extractos Crudos y Fracciones.....	63
3.4 Conclusiones.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	73
VITA.....	77

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Colesterol

El colesterol es una sustancia química de estructura cíclica, que pertenece al grupo de los lípidos. Se trata de una sustancia soluble en disolventes orgánicos como el éter, alcohol y cloroformo, pero insoluble en el agua. El colesterol forma parte de los componentes básicos de la materia orgánica animal y humana, en cuyos tejidos se encuentra como constituyente normal, en cantidades variables (Voet y Voet, 2004). El colesterol es un esteroide requerido para la vida, principalmente para la producción de sales biliares (emulsificación y absorción de lípidos), de hormonas, membranas celulares de animales, mielina y lipoproteínas (involucradas en el transporte de lípidos) (Carey, 2000).

1.1.1 Estructura y Propiedades del Colesterol

Los esteroides son compuestos derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, molécula compuesta por un sistema de anillos como se muestra en la Figura 1.1a. El colesterol pertenece a la categoría de los esteroides, siendo el más importante de ellos (Carey, 2000). Es un componente principal de las membranas plasmáticas de los animales, además sirve como intermediario en la biosíntesis de todos los esteroides del cuerpo (Solomons y Gram, 2000). Tiene en su esqueleto principal un grupo hidroxilo en la posición C-3, un doble enlace entre los carbonos C-5 y C-6, grupos metilo en las posiciones C-10 y C-13 y una cadena de C₈H₁₇ situada en el C-17 (Figura 1.1b).

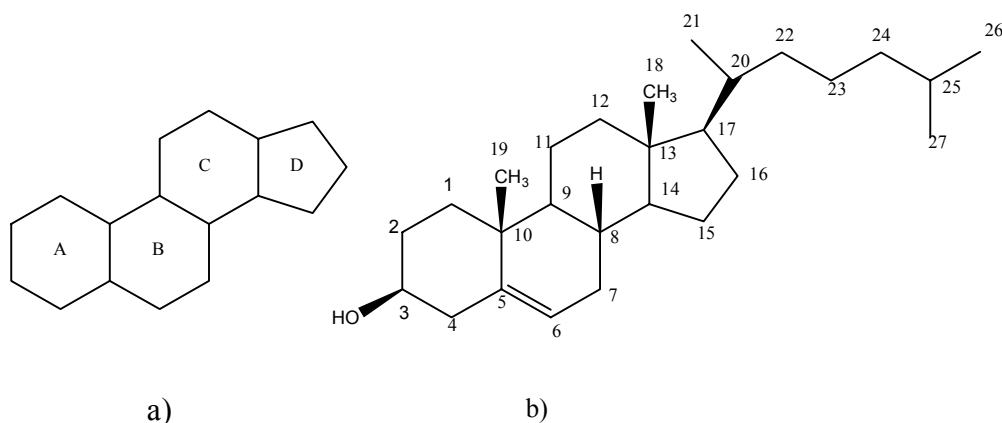


Figura 1.1. Estructura química de los esteroides. Núcleo esteroidal (a) y Estructura del colesterol (b) (Solomons y Gram, 2000).

1.1.2 Metabolismo y Funciones del Colesterol en el Organismo

El colesterol se sintetiza en el hígado para posteriormente ser transportado a través del cuerpo y regresar al hígado donde sirve como precursor de otros esteroides. Todos los átomos de carbono del colesterol se derivan del acetato (malonato) (Figura 1.2a), el cual, por observación de Konrad Bloch (ganador del premio Nobel en 1964), se convierte primeramente en unidades con estructura similar al "isopreno" (Figura 1.2b) (Carey, 2000).



Figura 1.2. Estructuras químicas de los precursores del colesterol. Acetato (a) y Unidad de isopreno (b) (Carey, 2000).

El colesterol es un precursor metabólico de ácidos biliares y de hormonas esteroideas, regula una gran variedad de funciones fisiológicas incluyendo el desarrollo sexual y el metabolismo de los carbohidratos. Estas hormonas pertenecen a 5 categorías: las progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos. Por su parte, los ácidos biliares principales, ácido cólico y ácido quenodeoxicólico (3,7-dihidroxicólico) son sintetizados en el hígado y secretados como conjugados de glicina o de taurina a la vesícula biliar (Figura 1.3). De ahí son secretados al intestino delgado donde actúan como agentes emulsificantes en la digestión y en la absorción de grasas y vitaminas liposolubles.

Aunque la mayoría de los ácidos biliares se reciclan, una pequeña cantidad de ellos (<1g/día) se metaboliza por microorganismos en el intestino grueso para posteriormente excretarse, lo cual constituye la única ruta del cuerpo para eliminar el colesterol (Voet y Voet, 2004).

1.1.3 Síntesis de Colesterol y Lípidos en el Organismo

El colesterol está presente en todas las células animales, es consumido en la dieta y además es sintetizado en cantidades adecuadas en el cuerpo. Su biosíntesis tiene lugar en el citoplasma y el compuesto principal para su síntesis es la acetil coenzima A (AcCoA). De tres moléculas de AcCoA se produce una hidroximetilglutaril- CoA (HMG-CoA). Después sigue el paso que controla la síntesis del colesterol, que es la reducción del HMG-CoA al ácido mavelónico bajo la influencia de la HMG-CoA reductasa, la actividad de esta enzima es modulada de acuerdo a la necesidad de la síntesis de colesterol.

Posteriormente hay conversiones de los derivados hidrofóbicos del isopreno, vía escualeno, hasta llegar al colesterol (Solomons y Gram, 2000).

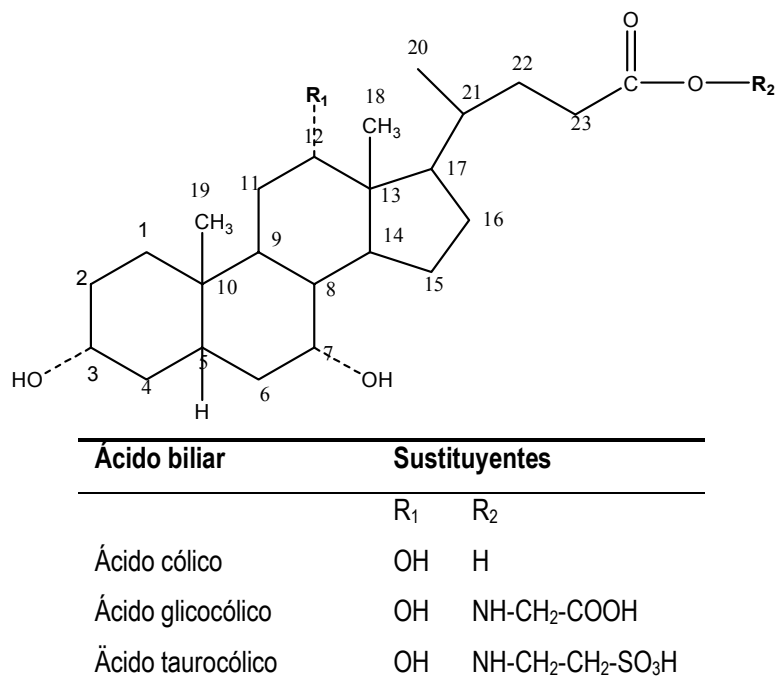


Figura 1.3. Estructura química de los ácidos biliares y sus conjugados de glicina y taurina (Solomons y Gram, 2000).

Otra enzima importante en la síntesis del colesterol es la Acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), cuya función más importante es actuar en conjunto con la HMG-CoA reductasa y el sistema de receptores LDL para minimizar las fluctuaciones en la concentración de colesterol libre en las membranas intracelulares. Cuando el ingreso del colesterol a las células aumenta, la actividad de la reductasa disminuye, la actividad del receptor LDL disminuye y la actividad de la ACAT se incrementa. El efecto neto de esos cambios coordinados es reducir el ingreso del colesterol y aumentar el flujo al compartimiento virtual de ésteres de colesterol del citoplasma. A pesar de que el colesterol puede ser sintetizado por todos los tejidos del cuerpo, la síntesis en el hígado, tracto intestinal y piel, contribuyen el 97% de la síntesis total. La ruta catabólica principal del colesterol, es su excreción principalmente en sales biliares, aunque también como esteroles libres (Solomons y Gram, 2000).

1.1.4 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son compuestos que contienen lípidos asociados a su estructura proteica de manera no covalente. Su función en el plasma sanguíneo es la de actuar como vehículos de transporte de triacilgliceroles y colesterol. Dentro del plasma, las lipoproteínas forman partículas similares a las micelas, (Figura 1.4a) formadas por un centro no polar de ésteres de colesteril (Figura 1.4b) y triacilgliceroles (Figura 1.5c) rodeados por una capa anfipática de proteínas, glicerofosfolípidos (Figura 1.4d) y colesterol (Solomons y Gram, 2000).

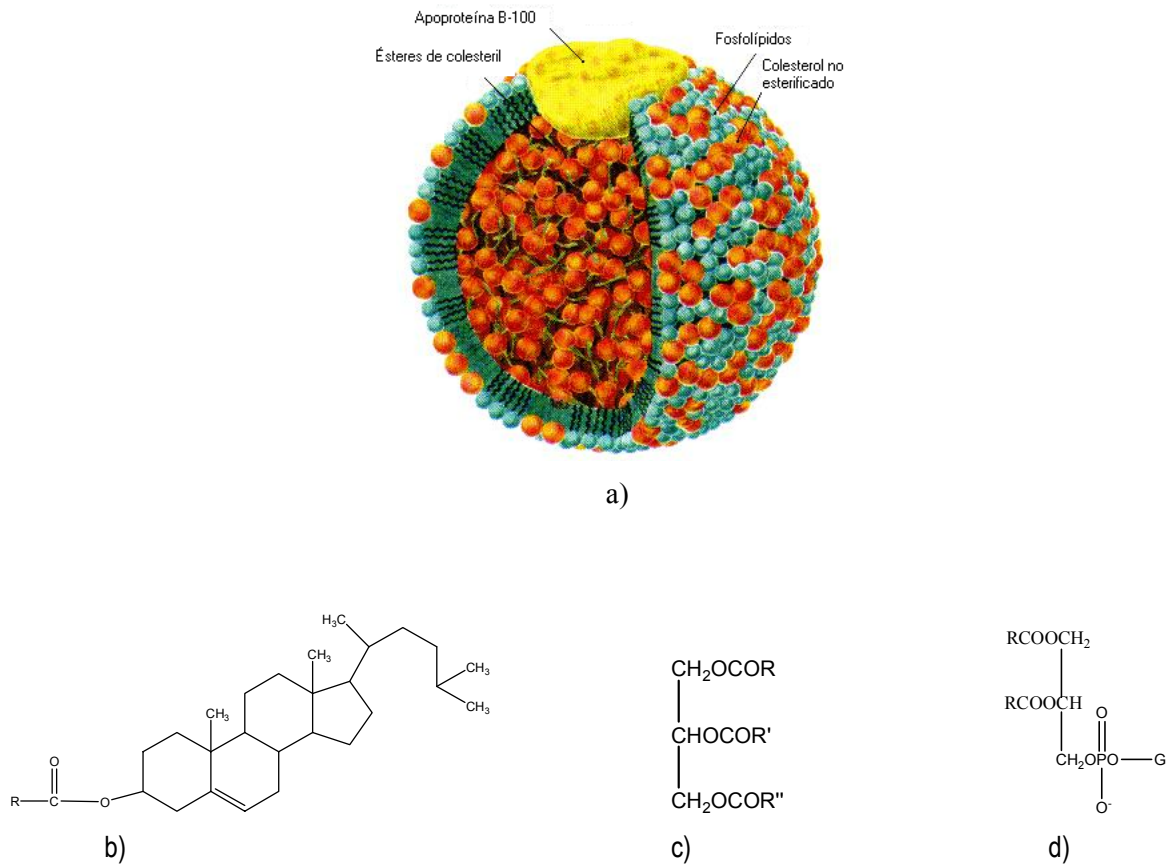


Figura 1.4. Estructura micelar de una lipoproteína (a) y sus principales componentes: Ésteres de colesterol (b), Triacilgliceroles (c) y Glicerofosfolípidos (d) (Solomons y Gram, 2000).

Las lipoproteínas se clasifican en cinco categorías de acuerdo a sus propiedades físicas y composición química, mostradas en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características de las principales clases de lipoproteínas del plasma humano (Solomons y Gram, 2000).

Tipo de lipoproteína ¹	Lípidos mayoritarios	Densidad (g/cm ³)	Diámetro de partícula (Å)
Quilomicrones	Triacilgliceroles de la dieta	< 0.95	800 - 5000
VLDL	Triacilgliceroles endógenos, ésteres de colesterol, colesterol	0.95 – 1.006	300 - 800
IDL	Ésteres de colesterol, colesterol, triacilgliceroles	1.006-1.019	250-350
LDL	Ésteres de colesterol, colesterol, triacilgliceroles	1.019-1.063	180 - 280
HDL	Ésteres de colesterol, colesterol	1.063 – 1.210	50 - 120

¹VLDL= Lipoproteínas de muy baja densidad; IDL= Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL= Lipoproteínas de baja densidad, HDL = Lipoproteínas de alta densidad

1.1.4.1 Quilomicrones

Son las lipoproteínas de mayor tamaño (0.5-1.0 μm de diámetro) y más baja densidad, encargadas de almacenar y transportar a los lípidos de la dieta. Son producidos en el retículo endoplasmático y complejo de Golgi de las células epiteliales del intestino y distribuidas a todo el cuerpo mediante su transporte primeramente a través del sistema linfático y posteriormente del torrente sanguíneo. Están compuestas de 70-90% de triglicéridos, 4-8% fosfolípidos, 3% de colesterol, 4% de ésteres de colesterol, y 2% de proteína. Una vez en el torrente sanguíneo las células remueven a sus lípidos de tal manera que los quilomicrones se van haciendo gradualmente más pequeños (Whitney y Rolfes, 2004).

1.1.4.2 Lipoproteínas de Baja Densidad

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL por su siglas en inglés) son las responsables de llevar el colesterol (aproximadamente un 40% de la masa total de su partícula es colesterol) desde el hígado hasta los tejidos (Rubies, 1993). Las LDL en el plasma humano se definen como la población total de lipoproteínas en el plasma humano con un rango de densidad de 1.019-1.063 g/mL (Myant, 1990).

1.1.4.3 Lipoproteínas de Alta Densidad.

Las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL por sus siglas en inglés) transportan colesterol endógeno de regreso desde los tejidos hasta el hígado, es decir, tienen esencialmente la función opuesta a las LDL. Las HDL se forman en el plasma a partir de componentes obtenidos a través de la degradación de otras

lipoproteínas. Las HDL en circulación adquieren el colesterol extrayéndolo de la superficie celular y lo convierten a ésteres de colesterol por acción enzimática.

1.1.5 Relación de los Lípidos Sanguíneos con Enfermedades Cardiovasculares

Al colesterol alto se le conoce como una enfermedad silenciosa debido a que es asintomática hasta que se manifiestan los problemas asociados con la aterosclerosis. La aterosclerosis es debida a la alta concentración de colesterol que se acumula y deposita en las paredes de las arterias, disminuyendo su elasticidad; además disminuye el flujo sanguíneo a través de los vasos afectados y por lo tanto la irrigación que llega a los órganos (Whitney y Rolfes, 2004). Una alta concentración en las LDL parece favorecer el desarrollo de la arterosclerosis, mientras que una alta concentración de HDL se considera un factor protectorio (Whitney y Rolfes, 2004). Niveles de colesterol total por encima de 250 mg/dl y una concentración de triglicéridos por encima de 180 mg/dl son considerados riesgosos para desarrollar enfermedades cardiovasculares. La Figura 1.5 muestra las principales causas de mortalidad hospitalaria en México, como se puede observar las enfermedades del corazón son la segunda causa, según los datos obtenidos por la Secretaría de Salud en el 2001.

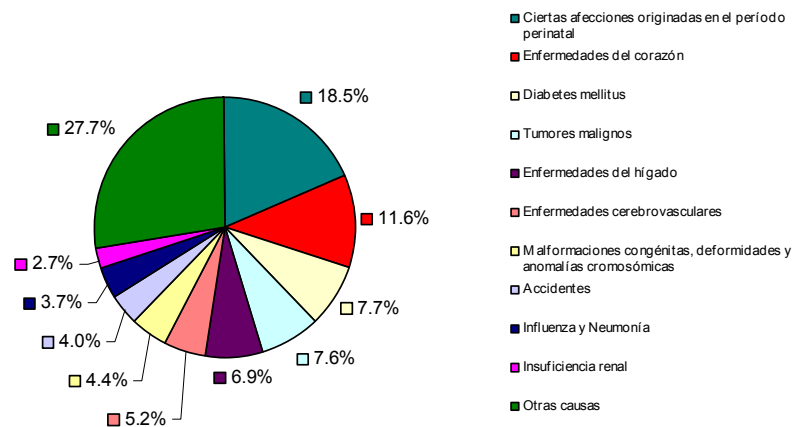


Figura 1.5. Principales causas de mortalidad hospitalaria (Secretaría de Salud, 2001).

FLAVONOIDES Y ACIDOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de fitoquímicos que se encuentran ampliamente distribuidos de forma natural principalmente en las frutas y vegetales. Están caracterizados por tener un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, los cuales pueden adquirir formas de flavonoides y glicósidos dependiendo del número y tipo de sustituciones que tengan en dicho anillo. Los flavonoides, son glicósidos formados por una aglicona, que en muchos casos deriva de la 2-fenilbenzopirona; entre las principales agliconas se encuentra el flavonol y la flavona, además de la isoflavona, flavanona, el flavanonol, las chalconas y los biflavonilos. Los azúcares sustituyentes más importantes son la glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa, y en ocasiones también se encuentran la apiosa y rutinosa; éstos se unen a la aglicona por medio de los carbonos 7, 5 y 4', principalmente (Badui, 1997).

1.2.1 Clasificación y Estructura Química

Harborne y Simmonds (1964) clasificaron los compuestos fenólicos en quince grandes grupos, sin embargo por conveniencia Walter (1975) los clasificó en dos grupos:

➤ Grupo 1: Los ácidos fenólicos y cumarinas (Figura 1.6), son compuestos que tienen estructuras C₆-C₁ y C₆-C₃, dentro de los cuales podemos encontrar ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, escopoletina, etc. Ambos tipos de ácidos fenólicos también se pueden encontrar de forma conjugada o esterificada. Los ácidos benzoicos encontrados de manera extensa en la naturaleza son, ácido vanílico, ácido sirínico, *p*-hidroxibenzoico y ácido gálico el cual es encontrado como un constituyente de taninos o como dímero del ácido elágico. Por otro lado los ácidos cinámicos encontrados en la naturaleza son el ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido sinápico.

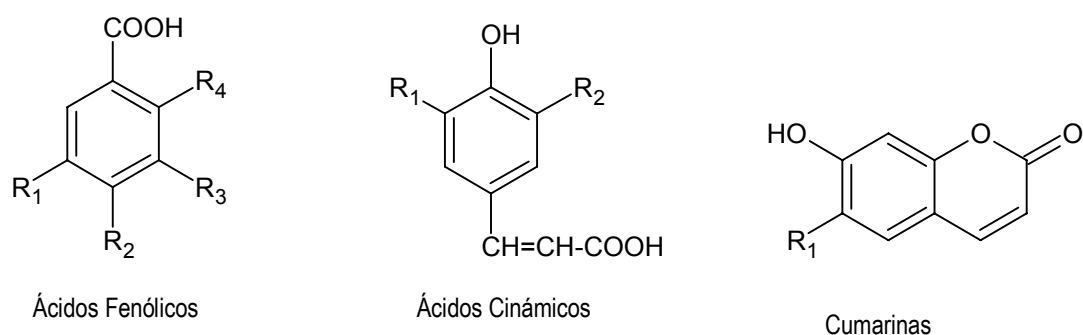


Figura 1.6. Estructura química general de diversos compuestos fenólicos.

➤ Grupo II: Está formado por flavonoides y antocianinas (Figura 1.7) los cuales son compuestos con estructura C6-C3-C6, dentro de los cuales podemos encontrar antocianidinas, flavonoles, flavonas, chalconas, etc.

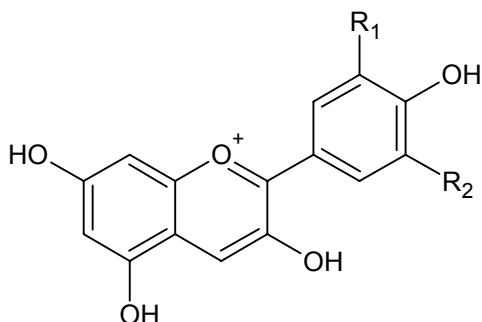


Figura 1.7. Estructura química general de antocianinas.

Estos compuestos de forma general tienen una gran diversidad y presentan una amplia actividad biológica, que les confiere propiedades multifuncionales que van desde agentes antimicrobianos, antioxidantes naturales hasta inhibidores enzimáticos dependiendo de su estructura, grado de polimerización, diferencias estereoisoméricas, concentraciones, etc. Por otra parte la clasificación de los flavonoides se realiza tomando varios aspectos en consideración como el tipo de sustitución que tenga en su anillo C, el estado de oxidación o su forma heterocíclica y de la posición que tenga el anillo B. En este subgrupo se encuentran las flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonoides y antocianinas. A continuación se mencionan algunos datos relevantes de cada uno de estos subgrupos y sus estructuras químicas generales.

➤ Chalconas: Son isómeros de las flavanonas por apertura del núcleo central (Figura 1.8). Dentro del grupo cabe mencionar el glucósido de la fletina (florizina), ampliamente distribuido en la corteza de los frutos de varias rosáceas (Badaui, 1997).

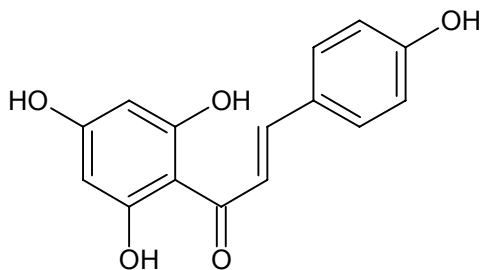


Figura 1.8. Estructura general de las chalconas.

➤ Flavonas: Son compuestos responsables de los colores amarillos de las flores de muchas plantas (Figura 1.9). Este tipo de compuestos producen colores más permanentes, pero algo más pálidos de aquellos que son producidos por los flavonoles. Dentro de las flavonas podemos citar la apigenina y luteolina.

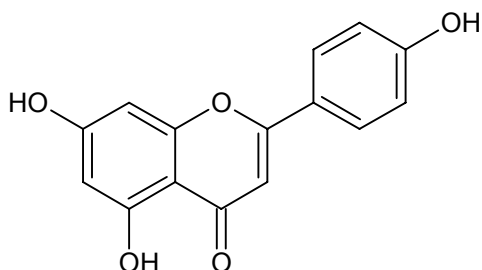


Figura 1.9. Estructura general de las flavonas.

➤ Flavonoles: Son compuestos responsables de dar una coloración amarilla en las hojas de muchas plantas, tienden a degradarse bajo la acción de luz intensa. Los más comunes son la quercetina, mirecetina, fisetina. Dada su capacidad de capturar radicales libres y de crear complejos con iones metálicos, tienen una actividad antioxidante muy alta; sin embargo, el hecho de que sean poco solubles en agua los hace poco adecuados para aplicaciones comerciales. Presentan una gran similitud con la estructura de las antocianidinas y antocianinas, la diferencia radica en que los flavonoides tienen un grupo cetona en el carbono 4 en el anillo C (Figura 1.10).

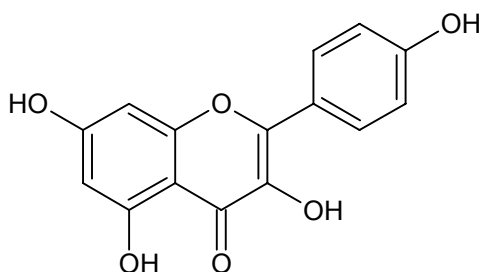


Figura 1.10. Estructura general de los flavonoles.

➤ Flavanona: Las flavanonas de origen natural presentan casi siempre la configuración 2S, que dispone el anillo B ecuatorial (Figura 1.11). Pueden presentarse como O- y C-glicósidos (hesperidina y aervanona), también pueden tener O- y C-metilaciones o alquilaciones superiores (prenilaciones). Las agliconas más representativas son hesperetina y naringenina.

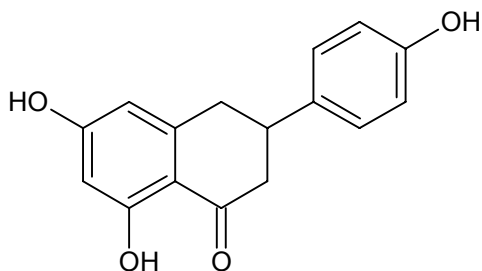


Figura 1.11. Estructura general de las flavanonas.

➤ Isoflavonoides: Son compuestos distribuidos en pocas familias (alrededor de 20), principalmente en las leguminosas (Figura 1.12). Estructuralmente se les puede dividir en varias clases: isoflavonas, isoflavonoles, etc. Por su parte, las isoflavonas tienen actividad estrogénica, es decir, imitación de hormonas femeninas, sobre todo la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, que se encuentran como glicósidos en la soya, alfalfa, etc.

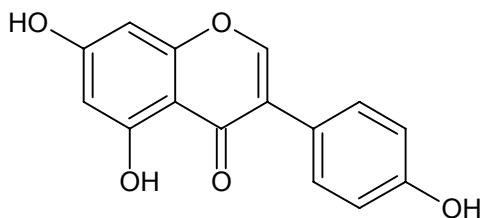


Figura 1.12. Estructura general de los isoflavonoides.

➤ Antocianinas: Las antocianinas como parte del grupo de los compuestos fenólicos poseen la característica estructura C6-C3-C6 en su esqueleto. Son pigmentos hidrosolubles, se encuentran primordialmente glucosidados en la naturaleza; están constituidos por una molécula de antocianidina, que es una aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio que consta de dos grupos aromáticos, un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); por su posición trivalente del oxígeno, el flavilio normalmente funciona como un catión. Los azúcares que comúnmente se encuentran asociados son glucosa y ramnosa, seguidos de galactosa, xilosa, arabinosa y, ocasionalmente, gentiobiosa, rutinosa, soforosa; todos ellos se unen a la antocianidina principalmente por medio del hidroxilo de la posición 3, y en segundo término, en la posición 5 ó 7 (Badui, 1997).

De las 20 antocianidinas que actualmente se conocen, las más importantes son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 450 antocianinas que abundan en la naturaleza. En la Tabla 1.2 se

muestran las características estructurales y espectrales de las diferentes antocianidinas dependiendo del tipo de sustitución que presentan.

Tabla 1.2. Características estructurales y espectrales de las antocianinas dependiendo de los sustituyentes que contengan (Harborne, 1989).

Aglicona	Sustituyentes		Espectro visible
	R1	R2	(nm)
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azulado-rojo)
Peonidina	OMe	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OMe	OH	508 (azulado-rojo)
Malvidina	OMe	OMe	510 (azulado-rojo)

1.2.2 Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se caracteriza por ser un arbusto anual que produce una flor roja fibrosa de un sabor y color único. El origen exacto de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se desconoce, algunos autores citan que es originaria de la costa este de Malasia (Wong *et al.*, 2002), otros autores citan que es originaria de África (García, 1995). Se introdujo en México en la época colonial y desde entonces se ha cultivado en regiones cálidas y semicálidas de nuestro país, siendo los estados de Guerrero, Oaxaca, Colima y Campeche, los principales productores de la flor de jamaica (García, 1995). A ésta planta también se le conoce como rosa jamaica, serent, aleluya, agria de jamaica, roselle, vinagreira, sorrel, karkadé, arándano de Florida, Asam y Kumbang (García, 1995; Yagoub *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2002).

Su clasificación taxonómica según Cronquist (1968) es del reino vegetal, orden de las malvales, de la familia malvaceae, género *Hibiscus*, especie *sabdariffa*.

1.2.3 Usos e Importancia de la Flor de Jamaica

Se puede aprovechar casi toda la planta de jamaica, su importancia reside fundamentalmente en la utilidad o beneficio que de ellas se obtiene. En países como la India, África, Filipinas e Indonesia ha sido utilizada en la industria alimentaria en la preparación de jaleas, mermeladas, té, bebidas y vinos (Wong *et al.*, 2002).

El extracto acuoso de la flor de jamaica ha sido usado ampliamente por la medicina folklórica, se le atribuyen propiedades, antiparasitarias, diuréticas e hipocolesterolémicas (Herrera-Arellano *et al.*, 2004; García, 1995). Actualmente en México el cáliz seco de la flor de jamaica tiene gran valor comercial ya que se ha utilizado como aditivo alimentario, aprovechándola como colorante natural pero principalmente como bebida por sus propiedades antihipertensivas (Herrera-Arellano *et al.*, 2004).

Existen reportes sobre las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de la flor de jamaica (Lee *et al.*, 2002). Así mismo se le atribuye al ácido protocateico aislado de la flor de jamaica, la propiedad de inhibir la oxidación de las LDL siendo está mayor que la inhibición de la vitamina E (Lee *et al.*, 2002). Adicionalmente, al extracto acuoso de la flor de jamaica demostró la capacidad de inhibir tumores de piel en ratas de laboratorio (Tseng *et al.*, 1999). En estudios recientes se ha demostrado en modelos experimentales con conejos hipercolesterolémicos el efecto hipolipidémico y anti-aterioesclerótico del extracto acuoso de la flor de jamaica, así como su efecto de inhibición de oxidación de LDL *in vitro* aislado del plasma humano (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Comparativamente las antocianinas presentes en la flor de jamaica juegan un papel muy importante en la prevención del daño oxidativo del hígado y en el tratamiento de problemas de hipertensión (Wang *et al.*, 2000). De igual forma se ha encontrado que las antocianinas aisladas de la flor de jamaica poseen mayor capacidad antioxidante sobre el plasma que antioxidantes comunes tales como el ascorbato (Tsai *et al.*, 2001).

1.2.4 Ocurrencia de Flavonoides y Ácidos Fenólicos en la Flor de Jamaica

La flor de jamaica es conocida por su alto contenido de antocianinas, que le proveen su color característico, entre las antocianinas reportadas en literatura se encuentran cianidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido, algunos flavonoides como gospetina, hibiscetina, miricetina, quercetina y sus respectivos glicósidos. Así también se ha reportado que la flor de jamaica contiene algunos ácidos fenólicos como el ácido protocateico, ácido pelargonídico, eugenol, catequina, ácido caféico, rutina, ácido gálico y algunos esteroides como el β -sitosterol, y ergosterol (Salah *et al.*, 2002, Tsai, *et al.*, 2002).

Wong *et al.*, (2002) reportaron el contenido de algunos fitoquímicos de la flor de jamaica, entre ellos, ácido ascórbico (141.09 mg/100g), β -caroteno (1.88mg/100g), compuestos fenólicos (296mg/100 g) y antocianinas (25.3 mg/100 g). Así como el contenido de algunos ácidos orgánicos como ácidos succínico (0.51 mg/100 g), oxálico (0.43 mg/100 g), tartárico (0.17 mg/100 g) y málico (0.12 mg/100 g).

1.2.5 Métodos de Análisis y Características Espectrales de los Compuestos Fenólicos

Existen distintos métodos para caracterizar compuestos fenólicos, entre ellos están las reacciones de coloración las cuales permiten conocer a que tipo de familia corresponde el compuesto de interés. Las reacciones de coloración más utilizadas son Shinoda, Liebermann y Antrona para el caso de flavonoides, esteroides y azúcares, respectivamente. La prueba de Shinoda es positiva para flavonoides si se observan la gama de colores que muestra la Tabla 1.3. La reacción para esteroides es positiva si aparece un color verde-azul, aunque también se puede observar distintas coloraciones dependiendo del tipo de esteroide (Tabla 1.4). Por último la prueba de azúcares es positiva si se observa un anillo verde-azul en la interfase de la muestra (Mabry *et al.*, 1991; Janoszka *et al.*, 2003).

Tabla 1.3. Clasificación de flavonoides de acuerdo a las reacciones de coloración presentadas en la prueba de Shinoda (Mabry *et al.*, 1991).

Tipo de flavonoide	Color en la prueba de Shinoda
Isoflavonas	Amarillo rojizo
Flavanonas	Azul, magenta, violeta, rojo
Flavononoles	Rojo a magenta
Flavonas y Flavonoles	Amarillo a rojo
Chalconas, auronas e isoflavanonas	No hay coloración

Tabla 1.4. Clasificación de esteroides según las coloraciones presentadas en la prueba de Liebermann-Buchard (Janoszka *et al.*, 2003).

Esteroides	Color en la prueba de Liebermann-Buchard	
	UV 366nm	Visible
<u>Oxicolesteroles</u>		
Triol	Rosa-violeta	-
7 β -OH	Café	Azul
7-ceto	Azul	-
5,6 α -EP y 5,6 β -EP	Rosa	-
25-OH	Salmón	-
Colesterol	Violeta	Azul
<u>Hormonas esferoidales</u>		
Progesterona	Amarillo-café	Verde-gris
Estriol	Amarillo	Violeta
Hidrocortisona	Amarillo	Gris
Corticosterona	Amarillo-verdoso	Gris
17 β -Estradiol	Naranja-café	Carmín
Testosterona	Amarillo	Verde-gris
Androstendiona	Violeta	Violeta-gris

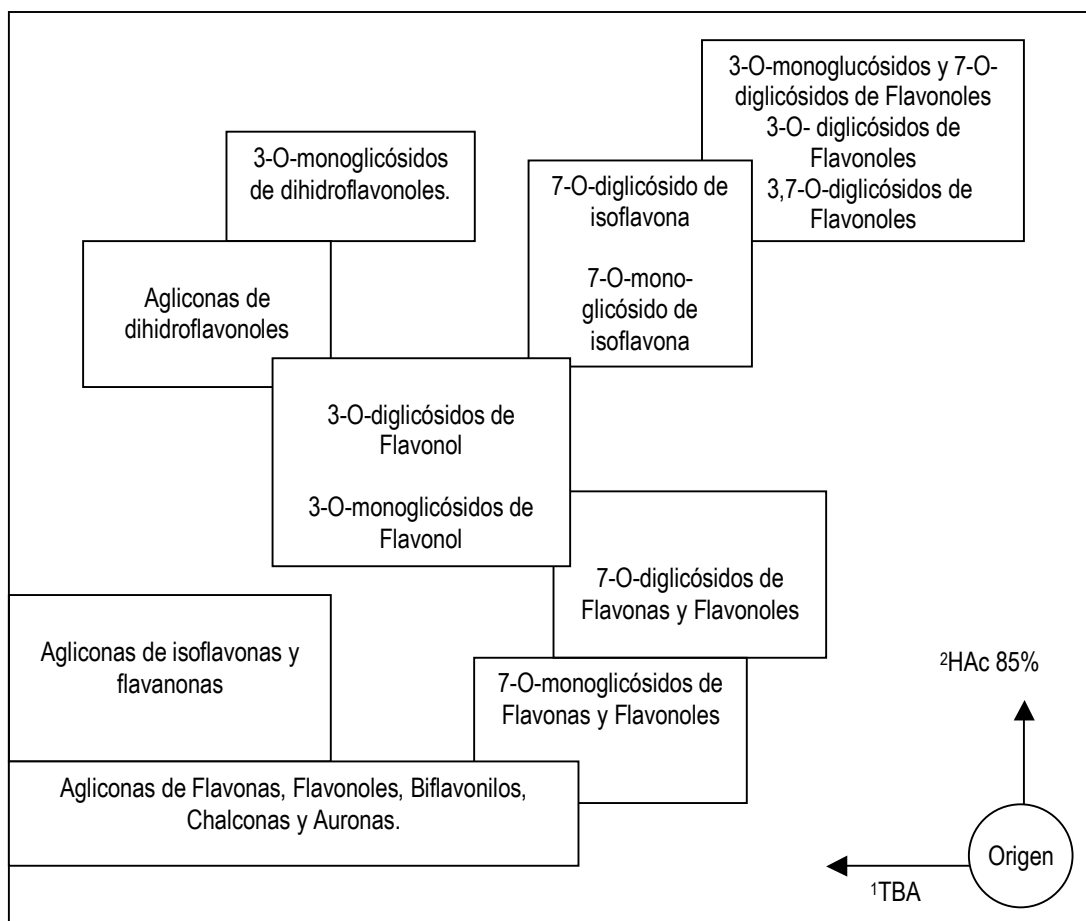
Existen métodos cromatográficos para la separación e identificación más detallada de los compuestos fenólicos; entre ellos la cromatografía en papel, cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía en columna y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La cromatografía en papel es el método cromatográfico más antiguo para separar mezclas complejas de componentes polares, tales como los glicósidos de flavonoides, siendo además un método muy atractivo debido a su bajo costo y efectividad. En esta técnica se utilizan hojas de papel Whatman como fase estacionaria y la fase móvil es una mezcla de solventes de diferentes polaridades, el analito es identificado al obtener el valor de referencia frontal (R_f), el cual es la razón de la distancia que recorre el analito en la fase estacionaria entre la distancia que recorre el solvente en la fase estacionaria. Mabry *et al.*; (1991) sugiere utilizar el método de análisis cromatográfico de dos dimensiones para la separación e identificación de flavonoides (Figura 1.13).

TLC es también un método sencillo que permite realizar análisis rápidos a mezclas parcialmente purificadas derivadas de cromatografía en papel o de columna. Las placas de TLC cuentan con absorbentes como poliamida, sílica o material de fase reversa como C8 ó C18, dependiendo el tipo de flavonoides que se quieran separar, ya sean glicósidos, agliconas polares (polihidroxiladas) o no polares (altamente metiladas). Adicionalmente la cromatografía en columna a presión atmosférica es muy útil para separar grandes cantidades de flavonoides de manera individual. Para empacar las columnas se utilizan principalmente la celulosa (microcristalina) con el fin de separar agliconas y mono-, di- y tri-glicósidos, utilizando un solvente polar e incrementando la cantidad del compuesto no polar en la mezcla de solventes. Se utiliza la sílica (con un tamaño de partícula de 0.06-0.3 mm) para separar especialmente flavonas no polares y agliconas de flavonol y la poliamida para separar flavonas y flavonoles debido a que tiene una alta capacidad absorbente (Mabry *et al.*, 1991).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación mas utilizada en la actualidad por su sensibilidad y fácil adaptabilidad a las determinaciones cuantitativas. Esta técnica es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles, como lo son muchas de las sustancias que tienen interés primordial en la industria y en muchos campos de la ciencia. El HPLC es una herramienta que se utiliza ampliamente para reconocer la presencia o ausencia de componentes en mezclas.

Es posible la identificación de un compuesto comparando el cromatograma obtenido de la mezcla, con el cromatograma de un estándar. También es posible realizar la cuantificación basando la comparación en la altura o en el área del pico del analito con la de uno o más estándares.

Hay diferentes sistemas de solventes y empaques de columnas para separar compuestos fenólicos por HPLC. En general se utilizan dos procedimientos principales, la cromatografía de fenólicos no polares en columnas de sílica con elusión isocrática y la cromatografía de fenólicos polares en fase reversa químicamente embonada a una columna de sílica con una elusión en gradiente (Harborne *et al.*, 2000).



¹ Ácido terbutílico: ácido acético: agua (3:1:1); ² ácido acético: agua (85:15)

Figura 1.13. Distribución de flavonoides en cromatografía en papel de dos dimensiones (Mabry *et al.*, 1991).

La detección de compuestos polifenólicos es usualmente basada en la absorción en el rango ultravioleta, ó a varias longitudes de onda del rango visible las cuales son características de ciertas clases de compuestos fenólicos. (Tabla 1.5). La mayoría de los compuestos fenólicos exhiben dos bandas principales de absorción; la Banda I en la región de 320-385 nm que representa la absorción del anillo B y la Banda II en la región de 250-285 que representa la absorción el anillo A (Robards *et al.*, 1999). Los cambios hacia la longitud de onda del rojo son debidos a un incremento en el número de grupos hidroxilo, por ejemplo, 367 nm en kaempferol, a 371 nm, en quercetina, y 374 nm en miricetina. Por esta razón la banda I en las flavonas absorbe usualmente a una longitud de onda mas corta, por 20 a 30 nm que en los flavonoles equivalentes (Robards *et al.*, 1999).

Tabla 1.5. Espectro de absorción de varias clases de compuestos polifenólicos (Robards *et al.*, 1999).

Tipo de compuesto	Banda UV II ^a	Banda UV I ^a	Visible ^a
Ácidos benzóicos	270-280		
Ácidos cinámicos	(290-300) ^b	305-330	
Antocianinas	240-280	(315-325) ^c	450-560
Flavonoles	250-270	(300) ^b	350-380
Flavanoles	270-280		
Coumarinas	220-230	310-350	
Flavonas	250-270	330-350	
Flavanonas, Flavanoles	270-295	(300-330) ^b	
Chalconas	220-270	(300-320) ^b	340-370
Auronas	240-270		340-370
Isoflavonas	245-270	300-340	

^aEl solvente usual es metanol, excepto para antocianinas que es metanol-HCl. ^bHombro; ^cEn el caso de acilación por ácidos cinámicos

1.3 Propiedades Antioxidantes de Flavonoides y Compuestos Fenólicos.

Con el paso del tiempo una serie de ensayos *in vitro* se han desarrollado para medir la capacidad antioxidante de sustancias puras, extractos alimentarios, bebidas, etc. Dentro de los bioensayos más comúnmente utilizados se encuentran, la capacidad antioxidante expresada como equivalentes de trolox (TEAC por sus siglas en inglés) y la capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés).

Dichos ensayos son importantes en el desarrollo de productos alimenticios ya que se pueden utilizar para comparar la capacidad antioxidante de ingredientes manufacturados con alimentos funcionales, frutas y vegetales. El grado de capacidad antioxidante de una muestra se da por la acción inhibitoria ante la acción de un oxidante a través del tiempo.

1.3.1 Ensayo de Capacidad de Absorber Radicales Oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés).

El ensayo de ORAC mide el grado en que una muestra inhibe la acción de un agente oxidante y el tiempo en que tarda en inhibirlo. Este ensayo provee una medición precisa y reproducible de un compuesto antioxidante. El ensayo ORAC combina un marcador químico que flúorese con la muestra y un agente oxidante, como los radicales peróxido, radicales hidroxipéroxidos y iones metálicos (Cao *et al.*, 1996).

El ensayo utiliza la sensibilidad de los radicales libres de una proteína fluorescente como indicador para monitorear la efectividad de varios antioxidantes que protegen a la proteína del daño oxidativo en fluidos biológicos como el suero humano, en tejidos, y en extractos de alimentos. Se cuantifica midiendo el área bajo la curva con respecto a la reacción del blanco (sin el compuesto antioxidante). El área bajo la curva es proporcional a la capacidad antioxidante de todos los antioxidantes presentes en la muestra. Cada curva se calibra utilizando un estándar conocido como el Trolox, el cual es un análogo de la vitamina E, y el resultado del ensayo se reporta en la concentración micromolar equivalentes de Trolox (Cao *et al.*, 1996).

El ensayo ORAC mide el decremento de fluorescencia de la proteína indicadora (fluoresceína) como resultado del daño oxidativo, un mol de la proteína fluoresceína reacciona con radicales oxígeno cien veces más despacio que la mayoría de antioxidantes biológicos tales como el ascorbato. Sin embargo la proteína fluoresceína es sesenta veces más reactiva que otras proteínas no antioxidantes. Así pues, todos los compuestos antioxidantes son completamente oxidados antes de que la proteína comience a oxidarse, permitiendo así medir la capacidad antioxidante de la muestra (Cao *et al.*, 1996; DeLang *et al.*, 1989).

La Tabla 1.6 muestra una comparación de actividades antioxidantes reportadas en literatura para algunas frutas y vegetales de consumo regular con los bioensayos TEAC y ORAC (Proteggente *et al.*, 2002).

Tabla 1.6. Capacidad antioxidante de frutas y vegetales.¹

Frutas/Vegetales	Capacidad Antioxidante	
	TEAC ² (μM de Trolox/g BS ²)	ORAC ² (μM Trolox/g BS ²)
Fresa	3212±68	2448±95
Frambuesa	2203±10	2206±232
Naranja	979±25	2195±259
Brócoli	715±25	1474±62
Cebolla	601±29	1116±30
Uva verde	738±72	1083±48
Espinaca	828±54	1811±115

¹Proteggente *et al.*, 2002.²Base seca. ² Capacidad antioxidante equivalentes de Trolox

Tabla 1.6. (Continuación). Capacidad antioxidante de frutas y vegetales.¹

Frutas/Vegetales	Capacidad Antioxidante	
	TEAC ² (μM de Trolox/g BS ²)	ORAC ² (μM Trolox/g BS ²)
Pera	337 \pm 19	701 \pm 50
Manzana	396 \pm 13	646 \pm 18
Durazno	275 \pm 9	860 \pm 49
Banana	696 \pm 39	1273 \pm 59
Tomate	269 \pm 14	443 \pm 39

¹Proteggente *et al.*, 2002.²Base seca. ² Capacidad antioxidante equivalentes de Trolox

1.3.2 Flavonoides que Inhiben la Oxidación de LDL

Como se ha mencionado en las secciones anteriores, las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en muchos países del mundo, incluyendo a México. Se cree que las LDL, pueden oxidarse dando paso a la formación de células espumosas, proceso que marca el comienzo de la aterosclerosis, importante enfermedad inflamatoria que obstruye el paso sanguíneo por las arterias, causando problemas cardiovasculares (Lee *et al.*, 2002).

La oxidación de LDL envuelve el ataque de radicales libres sobre los compuestos de las lipoproteínas, los cuales están compuestas de colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos, y apolipoproteína B-100. La oxidación de LDL resulta primeramente en el consumo de sus antioxidantes (principalmente vitamina E y carotenoides) seguida de una substancial pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y de colesterol, el cual se convierte en oxisterol. Los primeros productos de oxidación formados son hidroperóxidos y posteriormente hidróxidos y aldehídos. Los productos de la peroxidación lípida tales como cadenas cortas de aldehídos, pueden llegar a formar aductos estables con residuos de aminoácidos en las apolipoproteínas, lo cual puede causar una agregación de partículas de lipoproteínas en las paredes de las arterias provocando así la arteriosclerosis (Rice-Evans y Packer, 2003).

Numerosos estudios epidemiológicos revelan un significativo decremento en las enfermedades cardiovasculares en personas que tienen el hábito de consumir moderadamente vino tinto, (Soleas *et al.*, 1997, German y Walzem, 2000). Un ejemplo de eso es la “paradoja francesa” la cual destaca la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, a pesar del consumo de una dieta elevada en grasa saturada

factor que se ha asociado al consumo regular de vino tinto en el sur de Francia. Su efecto benéfico contra enfermedades cardiovasculares se le atribuye a la elevada actividad antioxidante de los polifenoles de la uva entre ellos, quercetina (6-14 mg/L), miricetina (10-20 mg/L), catequina (270 mg/L), ácido gálico (95mg/L), taninos condensados (polímeros de catequina y epicatequina (2,500 mg/L)) y antocianidinas poliméricas.

Existen reportes previos en los cuales se comparó la capacidad inhibitoria de los polifenoles del vino tinto y vino blanco contra la oxidación de LDL inducida *in vitro* 2 hrs después de consumir el vino en el plasma de los sujetos experimentales. El bioensayo con vino tinto inhibió significativamente la oxidación de LDL en un 60% en comparación con los resultados obtenidos con el vino blanco (Serafin *et al.*, 1998; Fuhrman, *et al.*, 1996, Vinson *et al.*, 1995).

De igual manera los flavonoides del té verde y negro han presentado actividad antioxidante contra la oxidación de las LDL en ratas hipercolesterolémicas prolongando la fase lag en la formación de dienos conjugados en un 13 y 15%, para ambos téis respectivamente (Tijburg, *et al.*, 1997). Así también se han reportado las concentraciones de flavonoides aislados que inhiben el 50% de oxidación de LDL *in vitro* (IC50) entre las cuales se encuentran la quercetina (0.222 μ M), kaemperol (1.22 μ M), ácido clorogénico (0.296 μ M) y catequina (0.187 μ M) (Vinson, *et al.*, 1995). De igual manera se ha reportado en literatura que la planta licorice (*Glycyrrhiza glabra*) la cual contiene en su mayoría flavonoides (principalmente la isoflavona glabridina), presenta propiedades antioxidantes contra la oxidación *ex vivo* de LDL. En sus estudios la oxidación de LDL se indujo mediante iones cobre o por un generador de radicales libres como el 2,2 ázobis(2-amidinopropano) dihidróclorido (AAPH) dando como resultado una inhibición del 44% y 36% con iones cobre y con AAPH, respectivamente en comparación con un control negativo (Fuhrman, *et al.*, 2002).

CAPITULO II

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EN LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

2.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son consideradas entre las causas más importantes de mortalidad en el mundo, ocupando el primer lugar en el listado de causas de muerte en personas mayores de 45 años en muchos países del mundo y el segundo lugar en México (Secretaría de Salud, 2001). Se estima que en México 18 millones de personas presentan problemas de hipertensión arterial y gran parte de ellos padecen enfermedades cardiovasculares. Un factor de riesgo importante en estos padecimientos es el aumento en los niveles de colesterol y LDL en la sangre.

Diversos medicamentos se han empleado para el tratamiento de la hipercolesterolemia, sin embargo, en su gran mayoría poseen acción moderada, además el costo del medicamento en sí los hace poco accesibles, y en ocasiones los efectos colaterales son significativos. Por las razones mencionadas, la disminución de peso corporal, ejercicio y una dieta balanceada son componentes esenciales en el manejo de la hipercolesterolemia. El consumo de una dieta rica en frutas y vegetales, así como granos se ha asociado a la disminución en el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, diabetes, enfermedad de Alzheimers y enfermedades cardiovasculares debido a que contienen compuestos nutraceuticos que combaten el estrés oxidativo en el cuerpo. Los nutraceuticos son sustancias químicas no nutritivas primordialmente presentes en el reino vegetal, las cuales presentan actividad biológica benéfica para la salud. Entre los nutraceuticos de mayor importancia se incluyen los ácidos fenólicos, terpenoides, flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonoides y antocianinas), derivados cumarínicos y otros antioxidantes naturales como la vitamina A, C y E (Andlauer y Fürst, 1998).

En la actualidad la flor de jamaica tiene un gran valor comercial en México, el estado de Guerrero es el primer productor de jamaica a nivel comercial, en donde se cosecharon en la última década un promedio de doce mil hectáreas con una producción mayor a la de tres mil toneladas de cálices secos por ciclo de cultivo y se obtuvo una derrama económica bruta superior a los \$7,500 millones de pesos en beneficio en aproximadamente seis mil familias Guerrerenses (INIFAP, 2002). Conforme a los datos proporcionados por el Sistema Agropecuario de Consultas (2004), el precio medio rural de la flor de jamaica por tonelada ha aumentado 54 veces en comparación con el reportado en el año de 1994, debido a su gran importancia

como aditivo alimentario, aprovechándola como colorante natural pero principalmente como bebida por sus propiedades antihipertensivas (Herrera-Arellano *et al.*, 2004).

Estudios recientes han evidenciado que la flor de jamaica contiene un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, en su mayoría antocianinas, las cuales proveen su color característico (Hong y Wrolstad, 1990). El extracto acuoso de la flor de jamaica ha sido usado ampliamente por la medicina folklórica, por sus propiedades antiparasitarias, diuréticas e hipercolesterolemias (Herrera-Arellano, 2004; García, 1995). Además existen reportes científicos sobre las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de la flor de jamaica (Lee *et al.*, 2002). En particular se le atribuye al ácido protocateico aislado de la flor de jamaica la propiedad de inhibir la oxidación de las LDL, siendo dicha inhibición más acentuada que la de la vitamina E (Lee *et al.*, 2002). Otros estudios reportaron el efecto inhibitorio del extracto crudo de la flor de jamaica sobre la generación de tumores de piel en ratas de laboratorio (Tseng *et al.*, 1997) y el efecto protector de las antocianinas de la flor de jamaica contra la toxicidad hepática inducida por un generador de radicales peróxidos en un estudio *in vivo* con ratas (Wang *et al.*, 2000). De igual manera al extracto crudo de la flor de jamaica se ha estudiado para el tratamiento de problemas de hipertensión (Onyenekwe *et al.*, 1999). En estudios recientes de Chen *et al.*, (2003) se demostró en un estudio *in vivo* realizado con conejos que el extracto acuoso de flor de jamaica disminuye las concentraciones de colesterol total y triglicéridos en suero, así como también presentó una disminución de aterosclerosis en la arteria aorta. Los autores atribuyeron sus observaciones a la inhibición de la oxidación de LDL de un extracto crudo de flor de jamaica, sin embargo no concluyeron que tipo de compuestos son los responsables de dicha bioactividad, además que es muy probable que algunos de los compuestos presentes en la flor de jamaica (principalmente antocianinas) se hayan degradado por efecto de la alta temperatura (100°C) utilizada en sus extracciones.

A partir de dichos estudios que evidencian las propiedades de la flor de jamaica en la disminución de colesterol total y LDL, surge la inquietud de conocer los posibles grupos de compuestos que le proporcionan dicha bioactividad. En el presente trabajo se planteó como hipótesis que los compuestos que le proporcionan la capacidad antioxidante y de la oxidación *in vitro* de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH son primordialmente, las antocianinas presentes en la flor de jamaica. A partir de esa hipótesis se generó el objetivo principal de esta investigación el cual fue identificar tentativamente el grupo de compuestos que le atribuyen a la flor de jamaica sus propiedades antioxidantes y evaluar el porcentaje de contribución de los mismos a la inhibición de la oxidación *in vitro* de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH.

La estrategia experimental que se siguió para el cumplimiento del objetivo general se dividió en tres estudios. Primeramente la obtención de los extractos crudos de la flor de jamaica y el fraccionamiento de los diferentes grupos de compuestos con base en su afinidad por columnas C₁₈ y a su solubilidad en diferentes solventes de elusión. Posteriormente se evaluó la capacidad antioxidante y de inhibición de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica, sobre la oxidación *in vitro* de LDL. Por último, se realizó una caracterización y cuantificación química tentativa de los extractos y fracciones de flor de jamaica por HPLC-PDA y cromatografía bidimensional en papel, con el objetivo de identificar el grupo de compuestos potencialmente responsables de dicha bioactividad.

2.2 MATERIALES Y METODOS

La extracción y fraccionamiento de los compuestos fenólicos de la flor de jamaica, se realizó con un mismo lote de producto obtenido a granel en un supermercado de la zona. Los estándares de ácido gálico y reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO., EUA.). El metanol grado reactivo, acetato de etilo, éter etílico, acetona grado reactivo utilizados en los protocolos de extracción y fraccionamiento se obtuvieron de Fisher Scientific International (Winnipeg, MB., Canadá) y de Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V, (Monterrey, NL., México). La mezcla de estándares de antocianinas se obtuvo de Polyphenols Laboratories AS. (Sandnes, Noruega). Las columnas cromatográficas de purificación con capacidad de 20 mL y 5 g de adsorbente C-18 Sep-Pak® se obtuvieron de Waters Co. (Milford, MA., EUA.). Para la purificación de las LDL se utilizaron tubos ultra-limpios para ultracentrífuga Beckman (Beckman Instruments, Mountain View, CA.) reactivo de Bradford, albúmina de suero bovino (BSA), ácido tiobarbitúrico (TBA) y ácido tricloroacético (TCA) adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO. USA). El plasma humano, cloruro de sodio, y 2,2 ázobis(2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH) se adquirieron de la compañía Fisher Biotech (Fair Lawn, N.J, USA).

2.2.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos de la Flor de Jamaica

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó con base a una modificación del protocolo descrito por Oszmianski *et al.*, (1988) para el fraccionamiento de polifenoles del vino tinto. La flor de jamaica deshidratada se molió en una licuadora Osterizer (Oster Company, Tlalnepantla, México, México) y se extrajo la muestra (30 g) con una solución de acetona acuosa al 70 % (v/v), en una relación 1:10 (p/v). La solución se homogenizó con el producto durante 5 min con un homegenizador Ika - Werke modelo Ultra turrax T 25 basic (Wilmintong, N.C., EU.) y posteriormente se almacenó a 4°C en oscuridad durante 24 hr.

Terminada la extracción los sólidos de los extractos de la flor de jamaica se separaron mediante filtración al vacío. El líquido recuperado se almacenó a -85°C y los sólidos se pusieron nuevamente en solución acetónica. El procedimiento antes descrito se repitió hasta que el líquido filtrado no presentará ninguna coloración. Una vez finalizada la extracción, todo el líquido se juntó y la acetona se evaporó al vacío en un rotavapor (Büchi, Scientific Glass Apparatus, Inc., Bloomfield, N.J., EU.) a una temperatura menor de 40°C .

El extracto acuoso obtenido de la evaporación se aforó a un volumen constante (200 mL, y se etiquetó como Extracto Crudo), posteriormente se tomó una sub-muestra (50 mL) del mismo para continuar con la extracción. Se separaron los compuestos liposolubles de la sub-muestra mediante dos extracciones consecutivas con éter etílico en una relación 1:1 (v/v). El Extracto Crudo con el éter etílico se agitó durante 15 min y se dejó reposar 15 min en embudos de separación para conseguir la separación de las fases, posteriormente, se recuperó el Extracto Crudo Hidrosoluble el cual se utilizó como punto de partida para fraccionamientos posteriores. Se tomó una alícuota del Extracto Crudo Hidrosoluble (15 mL) y se ligó en la fase sólida C_{18} Sep-Pak para fraccionar los compuestos presentes en el extracto acuoso de la flor de jamaica utilizando el protocolo descrito en detalle en la Figura 2.1. Todos los extractos y fracciones se almacenaron a -85°C .

Para realizar el fraccionamiento (Figura 2.1) todas los Sep-Pak C_{18} fueron previamente preacondicionadas con metanol y agua bidestilada pH 3.5 (20 mL). El Extracto Acuoso Hidrosoluble a pH 3.5 (15 mL) se alimentó al Sep-Pak #1 (20 cc), y se obtuvo el eluyente acuoso (compuestos no ligados al Sep-Pak a pH 3.5) el cual se ajustó a pH 2.5 y se ligó a un segundo Sep-Pak #2, de la cual se eluyó con metanol y se etiquetó como Fracción-acuosa no ligada. Subsiguientemente se reacondicionó el Sep-Pak #1 con agua bidestilada (pH 3.5, 20 mL) y HCl 0.01 M (20 mL) ambos lavados se unieron, y se recuperaron los compuestos no adheridos al Sep-Pak #1 a pH 2.5 (eluyente acuoso pH 2.5). Para recuperar los ácidos fenólicos del eluyente acuoso pH 2.5 se alimentó a un tercer Sep-Pak pH 3.5 y se eluyó con metanol (15 mL), en el cual se obtuvieron los ácidos fenólicos ligados al Sep-Pak pH 3.5, (se etiquetó como Fracción-acuosa ligada). Posteriormente se eluyeron los flavonoides del Sep-Pak #1 pH 2.5 al lavar con acetato de etilo (15 mL; Fracción-EtOAc) y finalmente las procianidinas, catequinas y antocianinas monoméricas con metanol (15 mL; Fracción-MeOH). Todas las fracciones se evaporaron a sequedad en un rotavapor a una temperatura menor de 40°C . Las fracciones evaporadas se resuspendieron en metanol (15 mL) y se almacenarán a -85°C para su análisis posterior.

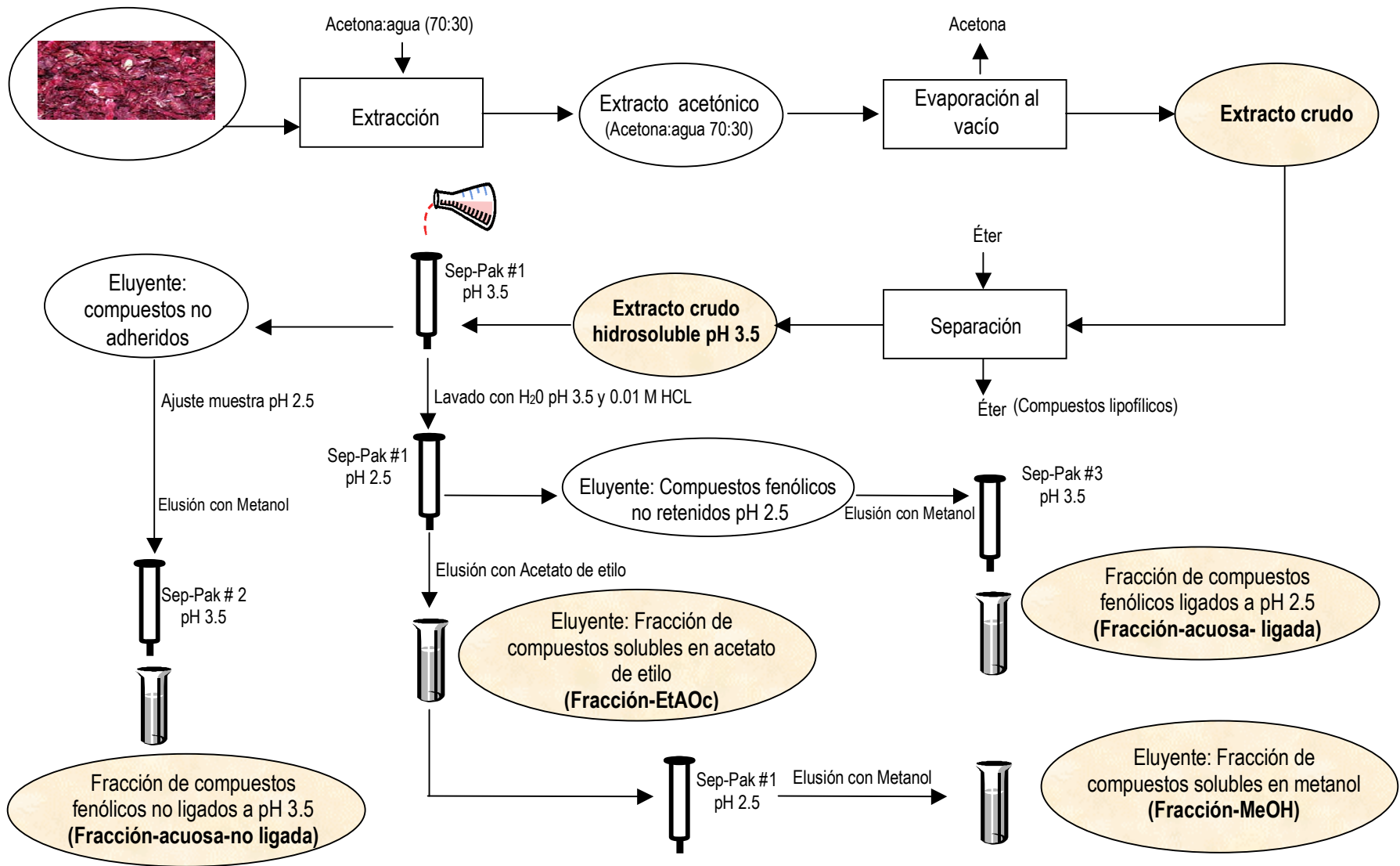


Figura 2.1 Esquema del fraccionamiento utilizado para la separación de diferentes compuestos fenólicos basados en su afinidad a la columna C₁₈ y a su solubilidad en diferentes solventes. Los extractos y fracciones sombreadas se utilizaron en los bioensayos y caracterizaciones químicas

2.2.2 Caracterización Espectrofotométrica de Extractos Fenólicos

2.2.2.1 Fenólicos Totales

La concentración de fenólicos totales solubles en los extractos y fracciones de la flor de jamaica se determinó mediante la modificación reportada por Abelson y Simon (2001) del método de Folin-Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959). Siguiendo dicho método se adicionó a la muestra (100 μ L), el reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N diluido 1:9 con agua (1000 μ L), se agitó y se dejó reaccionar durante 20-25 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las lecturas espectrofotométricas a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU® 650 (Fullerton, CA., EUA.). La concentración de fenólicos totales (ppm) se expresó en equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.2.2.2 Antocianinas Monoméricas Totales

La concentración de antocianinas monoméricas totales presentes en los extractos y fracciones de la flor de jamaica se determinó utilizando el método del pH diferencial descrito por Wrolstad (1976). El método se basa en la reacción de la muestra (0.5mL) con una solución amortiguadora de buffer de cloruro de potasio pH 1 (4.5 mL) y en una solución amortiguadora de buffer de acetato de sodio pH 4.5 (4.5 mL) con un tiempo de equilibrio de reacción de 15 min, a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron una serie de barridos espectrales en el espectrofotómetro con el fin de obtener la absorbancia máxima en el rango visible (400-800 nm) para los extractos y fracciones así como la absorbancia a 700 nm para la corrección por turbidez de las muestras a ambos valores de pH. La concentración de antocianinas totales se expresó en equivalentes de delfinidina 3-glucósido (coeficiente de extinción de 795 y peso molecular de 465.2 gr/mol).

2.2.3 Propiedades Antioxidantes de Flavonoides y Compuestos Fenólicos

2.2.3.1 Bioensayo de Capacidad de Absorber Radicales Oxígeno (ORAC)

La capacidad antioxidante del extracto acuoso y de las fracciones de la flor de jamaica se determinó mediante el método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). La metodología fue adaptada de Prior *et al.*, (2003), se utilizó fluoresceína como proteína fluorescente y 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) como generador de radicales peroxilo. Se preparó una solución de buffer de fosfatos a pH 7.4 (PBS, 2 L). Posteriormente se preparó la solución generadora de radicales disolviendo AAPH (0.86 g) en buffer de fosfatos pH 7.4 (10 mL), la cual se preparó antes de cada ensayo y se incubó a 40°C durante 45 min antes de usarse. También fue necesario preparar una solución stock de fluoresceína (FL #1) disolviendo 0.225 g de fluoresceína en

PBS pH 7.4 (50 mL). Una segunda solución stock de fluoresceína (FL #2) se preparó diluyendo 50 uL de la solución FL#1 en PBS pH 7.4 (10 mL). Finalmente una tercera solución stock de fluoresceína (FL #3) se preparó diluyendo 2400 uL de la solución FL#2 en PBS pH 7.4 (25 mL). El protocolo de ORAC se optimizó para utilizarlo con un lector de microplatos Bio-Tek (Bio-Tek Synergy HT, Winooski, Vermont, USA), se utilizó la mitad del microplato en cada corrida (celdas A1-H6 ó A7 a H12), se dejó la primera línea (A) vacía y en la segunda línea se adicionó el blanco (PBS). Se colocaron 25 µL de muestra, estándar o blanco en las celdas. Después de ser incubadas las soluciones FL#3 y AAPH fueron incubadas y se colocaron en el inyector 1 e inyector 2, respectivamente. Se programaron los inyectores para dispensar 200 µL del inyector 1 y 75 µL del inyector 2. Las lecturas de fluorescencias se tomaron a 485/20 nm de excitación y 528/20 nm de emisión. Los valores de fluorescencia ($f_n = F_n / F_0$, para $n = 0$ a 32) fueron calculados para cada celda, se utilizó la regla del trapecioide para estimar el área bajo la curva (Área = $[1/2 + (f_1+f_2+\dots+f_{30} + f_{31}) + f_{32}/2]$ *tiempo de lectura por muestra). El área neta bajo la curva (ANBC) se calculó como área de la muestra menos el área del blanco. La curva estándar fue calculada con concentraciones de 0 a 100 µM de Trolox en PBS pH7. La ecuación de la línea se usó para estimar las muestras en concentraciones equivalentes de Trolox.

2.2.3.2 Efecto de los Flavonoides sobre la Oxidación de LDL

2.2.3.2.1 Aislamiento de las LDL

El aislamiento de LDL se llevó a cabo de acuerdo con el método de Schonfeld (1982). La fracción de LDL se separó por ultracentrifugación de densidad secuencial, a 15°C en una ultracentrífuga Beckman L-870-H (Beckman Instruments, Mountain View, CA.) se utilizó un rotor Beckman tipo 50.4Ti (no. de serie 553). Los tubos ultra-limpios para ultracentrífuga Beckman (número de parte 344088), se adicionaron con plasma (2 mL) (Fisher Scientific Int. Winnipeg, MB., Canadá), 1.5% de ácido ditionitrobenzoico (30 µL, Sigma Chemical, St. Louis, MO) seguido de 4 mL de una solución NaCl (1.0063 gr/L), la densidad se midió con un densitómetro 30 PX (Mettler-Toledo Intl.Inc, Columbus, OH, USA). Se separó el sobrenadante de las VLDL (2 mL) a una velocidad de 40,000 rpm durante 18 hrs a una temperatura de 15°C, y se le adicionó a la muestra 2 mL de una solución NaCl/Br (1.1416 gr/L) para aislar a las LDL utilizando las mismas condiciones de separación. La fracción de LDL se almacenó a 4°C bajo N₂ hasta su uso. Las LDL se utilizaron en un período menor a una semana posterior a su aislamiento y se almacenaron por separado para evitar contaminación. Se realizó una diálisis para remover el EDTA y cambiar el solvente de la fracción de LDL utilizando una membrana con

un corte de peso molecular (MWCO) de 3,500 g/mol (Spectrum Laboratories, Inc, Ft. Lauderdale, FL) y se dializó en oscuridad a 4°C con PBS pH 7.4 durante 24 hrs en un volumen final de 16 L.

2.2.3.2.2 Determinación de Contenido Proteico

La determinación del contenido proteico en la fracción purificada de LDL se realizó de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomó una muestra (50 µL) a la cual se le añadió el reactivo de Bradford (1500 µL) y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman. La curva estándar se elaboró con un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 0 a 1.4 mg/mL. La ecuación lineal se usó para calcular la concentración de proteína total (mg/mL) equivalentes de BSA.

2.2.3.2.3 Oxidación de LDL

La fracción de LDL (75 µg/mL) se diluyó con PBS pH 7.4, se incubó a 37°C durante 6 hrs en presencia y ausencia del extracto antioxidante (1-20 µM) y del reactivo oxidante AAPH (5mM). La concentración de AAPH se seleccionó con base en ensayos previos utilizando concentraciones en el rango de 1 a 50 mM.

2.2.3.2.4 Bioensayo de Inhibición de la Oxidación *In vitro* de LDL Aisladas de Plasma Humano

El bioensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realizó de acuerdo con el método descrito por Lee *et al.*, (2002) con la modificación de utilizar AAPH en lugar de sulfato de cobre. A cada tubo con LDL previamente incubadas (0.55 mL, 37°C por 6 hr) en presencia de AAPH (5 mM) se le adicionó una solución al 25% (w/v) de ácido tricloroacético (0.5 mL, TCA) para desnaturalizar a las proteínas, posteriormente las muestras se centrifugaron (10,000 rpm) durante 30 minutos. Al sobrenadante se le adicionó ácido tiobarbitúrico (TBA al 1%, 0.5 mL) preparado en 0.3% NaOH y los tubos se calentaron a 90-95 °C en un bloque de calentamiento para tubos de ensayo (Fisher Isotemp* Fisher Scientific Int. Winnipeg, MB., Canadá) durante 40 minutos y se colocaron en un baño de agua fría para reducir turbidez. Después de completar las reacciones, las muestras se detectaron a 532 nm de excitación y 600 nm de emisión en un lector de fluorescencia para microplatos Synergy HT 96 (Bio-Tek® Instruments Winooski, Vermont, USA).

2.2.4 Caracterización Química Detallada de los Extractos y Fracciones de la For de Jamaica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-PDA).

2.2.4.1 Cuantificación de Antocianinas por HPLC-PDA

El contenido de antocianinas presentes en el extracto y fracciones de la flor de jamaica se determinó utilizando el método descrito por Mazza *et al.*, (1999). Anterior al análisis por HPLC-PDA, a las muestras y a los estándares se les realizó una hidrólisis ácida para identificar y cuantificar las moléculas de antocianidinas. Cada muestra (0.5 mL) se mezcló con metanol (0.5 mL) y HCl 6 M (0.5 mL) y se calentaron en un baño de agua a 95°C durante 1 hr. Finalmente las muestras hidrolizadas (0.5 mL) se adicionaron con agua grado HPLC acidificada con ácido fórmico (0.5 mL, 5% v/v) y se filtraron a través de un filtro PTFE (0.45µm) marca Gelman (Ann Arbor, MI., E.U.A.).

Para la cuantificación de las antocianidinas presentes en la flor de jamaica, se utilizó un sistema de separación y detección HPLC-PDA (Waters Co. Milford, MA., USA.) equipado con detector de fotodiodos Waters 2996 y automuestreador Waters 717 plus. La separación se llevó a cabo en fase reversa con una columna Supelcosil LC-18 de 25 cm x 2.1 mm i.d. (Supelco, Inc., Bellefonte, PA) a 25°C. La separación se logró utilizando un sistema de gradientes con ácido fórmico 5% (solvente A) y metanol (solvente B). Se siguió el siguiente programa de elusión de solvente B, 0-5 min, 5%; 5-55 min, 65%; 55-58 min, 100%; 58-60 min, 5%; and 60-64 min, 5%. Las antocianidinas individuales fueron separadas, cuantificadas e identificadas después de la hidrólisis ácida utilizando una mezcla de estándares de las seis antocianinas glucosidadas más comúnmente encontradas en la naturaleza (Polyphenols Laboratories AS, Sandnes, Noruega).

2.2.4.2 Cuantificación de Fenólicos Totales por HPLC-PDA

Para la caracterización de los extractos fenólicos presentes en la flor de jamaica, se utilizó el mismo cromatógrafo Waters HPLC-PDA descrito en la sección anterior. Como preparación de la muestra para el análisis, se tomaron 0.5 mL de extracto y se adicionaron con una solución HCl 1.2 M (0.5 mL) en metanol puro grado HPLC, quedando la solución final, aproximadamente en 75% metanol y 0.6 M de HCl; posteriormente dicha solución se pasó a través de filtros de PTFE de 0.45 µm marca Gelman (Ann Arbor, MI., E.U.A.). La operación del equipo se realizó empleando las condiciones cromatográficas reportadas por Del Pozo-Insfran, *et al.* (2003).

En este método se emplearon dos fases móviles consistentes de agua (fase A) y metanol 60% (fase B) ambas ajustadas a pH 3.5 con ácido ortofosfórico. La columna empleada fue una columna en fase reversa Symmetry C₁₈ Waters Co. (Milford, MA., E.U.A.) de 4.6 mm x 250 mm, 5µm, equipada con un guarda columnas Novapak C₁₈ de 5µm Waters Co. (Milford, MA., E.U.A.). El programa de elusión con gradiente con el cual se eluyeron los compuestos se detalla en la Tabla 2.1. El flujo se estableció a 0.8 mL/min a lo largo de toda la corrida.

Tabla 2.1 Programa de elusión por gradiente para separación cromatografica de flavonoides por HPLC-PDA¹.

Tiempo (min.)	Fase A (%)	Fase B (%)
0 a 3	100-70	0-30
3 a 8	70-50	30-50
8 a 25	50-30	50-70
25 a 30	30-20	70-80
30 a 35	20-0	80-100
35 a 45	0	100
45 a 60	100	0

¹(Del Pozo-Insfran *et al.*, 2003)

2.2.4.3 Procedimiento de Interpretación de Espectros UV-Visible

La identificación tentativa de los componentes de las muestras analizadas, se realizó por cinco métodos, el primero de ellos fue la comparación directa con los espectros de la biblioteca de estándares de fenólicos puros creada para este estudio en el HPLC-PDA (método A), por comparación de espectros UV-VIS de cada compuesto, con los espectros reportados en bibliografía (método B), por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA (método C), el cuarto método consistió en la comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas (método D) y por último la comparación de estándares y valores bibliográficos con los valores de *Rf* obtenidos por medio de cromatografía bidimensional en papel (método E). Los cromatogramas de HPLC-PDA obtenidos se detectaron a 3 longitudes de onda seleccionadas de acuerdo al tipo de compuestos de interés, 280 nm para ácidos fenólicos, 335 para flavonas y 380 para flavonoles.

2.2.5. Determinación de los Valores de *Rf* de los Flavonoides y Compuestos Fenólicos Presentes en la Flor de Jamaica.

2.2.5.1 Preparación y Purificación del Extracto Crudo de la Flor de Jamaica

Con la finalidad de obtener un parámetro adicional de identificación, además de los obtenidos por HPLC-PDA, se determinaron los valores de *Rf* de los flavonoides y compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica. El extracto crudo de la flor de jamaica (50 mL) se evaporó a sequedad en un liofilizador 2KBTXL-75 marca Virtis (Gardiner, NY, USA). El material seco (5 gr) se mezcló con sílica gel Kieselgel 60 con un tamaño de poro de 0.04 a 0.063 nm de 230 a 400 mesh ASTM (E. Merck, Darmstadt, Germany) y se colocó dentro de una columna de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 60 cm de

longitud. La fase móvil que se utilizó fue una serie de solventes con diferente polaridad para arrastrar los diferentes tipos de compuestos. Se utilizó un volumen de 250 mL para cada solvente, y se inició la elusión con hexano, seguido de hexano-cloruro de metileno (1:1), cloruro de metileno, acetona, acetato de etilo, metanol y por último agua. Cada una de las fracciones se concentraron en un rotavapor a una temperatura no mayor a 50°C y se almacenaron a -80°C hasta realizar las reacciones coloridas para su identificación y las pruebas de cromatografía bidimensional en papel para obtener los valores de *R_f*.

2.2.5.2 Reacciones Coloridas

Los diferentes tipos de compuestos se identificaron mediante reacciones coloridas de acuerdo con el método descrito por Mabry (1976) como la prueba de Shinoda, prueba de Antrona y prueba de Liebermann para detectar la presencia de flavonoides, carbohidratos, y esteroides, respectivamente. La prueba de Shinoda consiste en colocar 1 mL del extracto alcohólico de un vegetal, al cual se le añaden limaduras de magnesio y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado, si la reacción presenta una coloración naranja, roja, ó violeta son indicios de la presencia de flavonoides, por lo que la prueba es positiva. La prueba de Antrona consiste en agregar a la muestra una solución concentrada de Antrona disuelta en ácido clorhídrico si la reacción presenta un anillo verde-azul en la interfase, la prueba de Antrona es positiva. La reacción para esteroides es positiva si aparece un color verde-azul después de agregarle a la muestra de interés unas gotas del reactivo de Liebermann el cual se preparó con 2 ml de anhídrido acético, 20 ml de MeOH y 2 ml de H₂SO₄ concentrado.

Las fracciones que resultaron positivos para flavonoides se sometieron a cromatografía en capa delgada y cromatografía bidimensional en papel para obtener los valores *R_f*, compararlos con los reportados en bibliografía y así obtener un parámetro más de identificación.

2.2.5.3 Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

Para la separación por cromatografía en capa delgada de los compuestos presentes en la flor de jamaica, se preparó una solución de sílica (15 gr) en agua bidestilada (50 mL) y se vertió la solución sobre placas de vidrio previamente lavadas. Las placas se colocaron dentro de una cámara de madera con un foco de 60 watts para su secado. Se realizó la cromatografía en capa fina y las placas de TLC se revelaron con una solución de cloruro de cobalto (revelador universal) y con vapores de amoníaco, como revelador específico para flavonoides. Las fracciones que dieron un color característico de flavonoides fueron sometidas a cromatografía bidimensional en papel para obtener una mejor separación y obtención de valores de *R_f*.

2.2.5.4 Cromatografía Bidimensional en Papel

El análisis por cromatografía bidimensional en papel se realizó de acuerdo a lo reportado por Mabry *et al.*, (1991). La muestra de interés se colocó en la esquina superior derecha del papel Whatman #16. El papel se colocó dentro de un cromato-tanque de vidrio de 15 cm de ancho x 30 cm de largo, previamente saturado de alcohol terbutílico: ácido acético glacial: agua (TBA, 3:1:1) como fase móvil. Después el papel se colocó en dirección contraria en otro cromato-tanque previamente saturado de ácido acético: agua como fase móvil (HOAc 15:85) como fase móvil. Una vez eluidas las muestras a través de la fase estacionaria se observaron bajo una lámpara de luz UV antes y después de su revelación con vapores de amoníaco. Todas las manchas encontradas fueron delineadas con un lápiz para obtener su valor *R_f* y compararlas contra lo reportado en bibliografía.

2.2.6 Análisis Estadístico

El diseño experimental incluyó la evaluación de dos extractos crudos y cuatro subfracciones como tratamientos y la capacidad antioxidante por el bioensayo ORAC y el de inhibición de la oxidación de LDL *in vitro* como las variables de respuesta relacionadas con su bioactividad. Los valores IC₅₀ se obtuvieron mediante la modelación matemática utilizando la ecuación de asociación exponencial unidimensional por el programa Grap Pad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego CA., USA). Adicionalmente se llevó a cabo la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos y fracciones de la flor de jamaica.

El análisis de varianza (ANOVA) de los resultados se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico JMP® versión 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC., EUA.) y la separación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba de LSD ($p < 0.05$). Todos los tratamientos y análisis se llevaron a cabo por triplicado.

2.3 Resultados y Discusión de Resultados

2.3.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos de la Flor de Jamaica

El esquema de extracción y fraccionamiento utilizado en este proyecto fue seleccionado con el propósito de separar los grupos de compuestos contenidos en la flor de jamaica con base en su solubilidad en diferentes solventes y su afinidad por la columna de C₁₈. Siguiendo el protocolo de extracción inicial descrito en la Figura 2.1 se obtuvieron el Extracto Crudo Inicial y el Extracto Crudo Hidrosoluble, este último se introdujo en la columna C₁₈ para obtener cuatro sub-fracciones (Fracción-acuosa no ligada, Fracción-acuosa ligada, Fracción-EtOAc, Fracción-MeOH,) las cuales se utilizaron en

los bioensayos ORAC, inhibición de la oxidación de LDL *in vitro* y en las caracterizaciones químicas posteriores.

Dentro de los inconvenientes o dificultades que se presentaron en la realización del fraccionamiento de los compuestos presentes en la flor de jamaica se encontró el desconocimiento de la cantidad adecuada a utilizar en la extracción. Inicialmente se utilizaron 5 gr de jamaica y columnas C₁₈ de 3 gr de absorbente, pero una vez terminado el fraccionamiento se obtuvieron concentraciones muy bajas de las fracciones de interés, por lo que se optó por trabajar con 30 gr de jamaica y se usaron columnas de mayor capacidad (5 gr). También se determinó la necesidad de ablandar el tejido con agua para facilitar las sub-secuente extracción de los compuestos de la flor de jamaica con solventes orgánicos. Durante la extracción se adicionó primero el agua (30% v/v), se esperó 10 min aproximadamente, después se adicionó la acetona (70% v/v) y posteriormente se homogenizó la mezcla. Otra observación experimental relevante es la de asegurar la completa evaporación del éter etílico, debido a que puede provocar una disminución en la capacidad de adsorción de las columnas C₁₈. Por tal motivo después de la evaporación con éter etílico fue necesario evaporar con nitrógeno y someter las muestras a vacío antes de iniciar el fraccionamiento.

El contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos crudos y fracciones se encuentra reportado en la Tabla 2.2. Los resultados indican que el procedimiento del fraccionamiento es repetible y se logró la separación de diferentes compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica. Se realizó un balance de masa partiendo del Extracto Crudo Hidrosoluble (compuestos no solubles en éter) como flujo de entrada y como salida las diferentes fracciones obtenidas del mismo. Los resultados mostraron una separación consistente y un porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos presentes en el flujo de entrada de un 79.3 %. Las pérdidas obtenidas en la realización del fraccionamiento pueden ser atribuidas a la afinidad que tienen dichos compuestos por la resina C₁₈ y a las limitaciones analíticas de detección debido a las bajas concentraciones de compuestos fenólicos. Es importante hacer mención de que el balance de materia se llevó a cabo utilizando el contenido de fenólicos totales, obtenido con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Abelson y Simon 2001), el cual puede presentar interferencias por presencia de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácido ascórbico y otros compuestos presentes. Sin embargo el porcentaje de recuperación es similar al reportado por otros autores (Jaworski y Lee 1987; Oszmianski, *et al.*, 1988). Cabe mencionar que los rendimientos de dichos autores fueron evaluados con mezclas de compuestos fenólicos puros y el uso de distintos solventes.

Tabla 2.2. Contenido de fenólicos totales y antocianinas monoméricas presentes en el extracto crudo y en cada una de las fracciones de la flor de jamaica.

Extracto ¹	Fenólicos Totales (mg ácido gálico/100 gr peso seco)		Antocianinas Monoméricas Totales (g /100 gr peso seco)	
Extracto Crudo	1414	a ³	6.24	b
Extracto Crudo Hidrosoluble	821	b	7.26	a
Fracción-EtOAc	136	c	ND ⁴	--
Fracción-MeOH	494	b	5.22	c
Fracción-acuosa no ligada	5.8	c	ND	--
Fracción-acuosa ligada	11	c	ND	--

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Calculado por el método de pH diferencial y expresado en equivalentes de delphinidina 3-glucósido. ³Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05). ⁴ ND= No detectable.

Los resultados mostrados en la Tabla 2.2 indican que el extracto crudo de la flor de jamaica tiene un contenido de fenólicos totales (1414 mg EAG/100g BS) menor al publicado por Tsaia *et al.*, (2001) quienes reportaron 2300 mg EAG/100g BS en un extracto acuoso de flor de jamaica. Las diferencias en resultados pueden deberse a la variabilidad de las condiciones ambientales durante el cultivo de la flor de jamaica y procedimiento de extracción y análisis. A manera de referencia con otras fuentes naturales, la cereza contiene 1956 mg EAG/100g BS, siendo sus niveles de fenólicos totales similares a los encontrados en la flor de jamaica (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2003).

El protocolo de Oszmianski, *et al.*, (1988) se utilizó con el propósito de fraccionar los compuestos fenólicos en una fracción rica en flavonoides (Fracción-EtOAc), fracción rica en antocianinas (Fracción-MeOH) y dos fracciones ricas en ácidos fenólicos (Fracción-acuosa-no ligada y Fracción-acuosa-ligada) y su composición específica se discutirá con mayor detalle en secciones posteriores de análisis por HPLC-PDA. Sin embargo los resultados espectrofotométricos de las fracciones también mostrados en la Tabla 2.2 indican que la Fracción-MeOH y la Fracción-EtOAc tienen una mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con las demás fracciones. Es importante mencionar que aunque el presente estudio se enfocó en los compuestos fenólicos existen otros tipos de compuestos químicos presentes en los extractos y fracciones, como el ácido ascórbico y ácidos orgánicos (Wong, 2002).

La Fracción-MeOH representa el 60.1% de los compuestos fenólicos presentes en el Extracto Crudo Hidrosoluble y la Fracción-EtOAc representa el 16.6 %. En general las fracciones se pueden ordenar de manera descendiente con base a su contenido de fenólicos totales como Fracción-MeOH> Fracción-EtOAc> Fracción-acuosa-ligada >Fracción-acuosa-no ligada.

Con la determinación espectrofotométrica se confirmó la presencia de antocianinas monoméricas en los extractos y fracciones de la flor de jamaica por el método de pH diferencial de Wrolstad *et al.*, (1976) (Tabla 2.2). Como se esperaba las antocianinas se fraccionaron preferentemente en la Fracción-MeOH, la cual constituye el 72% de antocianinas monoméricas totales en comparación con el Extracto Crudo Hidrosoluble. Las pérdidas obtenidas pueden ser atribuidas a la presencia de trazas de antocianinas en las demás fracciones, sin embargo por ser tan pequeña su concentración no fue posible cuantificarlas con el método espectrofotométrico utilizado.

Los resultados indican que la flor de jamaica tiene un contenido de antocianinas monoméricas de 6.24 gr expresado en equivalentes de delfinidina-3-glucósido /100 g BS, el cual es elevado en comparación con lo reportado por Wong *et al.*, (2002) quienes reportaron 2.53 gr equivalentes de delfinidina 3-glucósido /100 g BS en un extracto acuoso de flor de jamaica. Dicha diferencia puede deberse a que en el presente estudio la extracción inicial fue acetónica, además de que se realizaron extracciones múltiples hasta dejar la muestra de jamaica incolora. En comparación con otras fuentes ricas en antocianinas como las cebollas rojas (0.070 g equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g BS) y moras (0.154 g equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g BS) su contenido de antocianinas monoméricas totales es mucho mas elevado (Mazza y Miniati 1993, Siriwoharn y Wrolstad, 2004).

2.3.2 Capacidad Antioxidante de los Extractos Crudos y Fracciones

Los resultados del bioensayo ORAC para los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica se muestran en la Tabla 2.3. Los resultados obtenidos para el Extracto Crudo de la flor de jamaica (338 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en BS) son bastante altos y comparables con lo reportado para fresas, cerezas, espinacas y moras (Prior y Cao, 2000). En comparación con los valores de ORAC de otras fuentes naturales como el ajo, cebollas, tomate y lechuga (20 a 60 $\mu\text{mol Trolox/g}$, Prior y Cao, 2000), el valor de ORAC del extracto de la flor de jamaica se puede considerar elevado. Valores de ORAC > 100 $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra en BS indican una alta capacidad antioxidante.

Las fracciones que mostraron los valores de ORAC mas elevadas fueron la Fracción-MeOH y la Fracción-EtOAc (51 y 88 $\mu\text{mol Trolox/g}$ muestra en BS, respectivamente). Con base en sus valores ORAC las fracciones se pueden ordenar decrecientemente como se indica a continuación, Fracción-MeOH > Fracción-EtOAc > Fracción-acuosa ligada > Fracción-acuosa-no ligada. La Fracción-MeOH y la Fracción-EtOAc representan el 42 y 24%, de la capacidad antioxidante de la flor de jamaica, respectivamente, en comparación con el Extracto Crudo Hidrosoluble. Observando los valores de antocianinas monoméricas totales (Tabla 2.2) y por confirmación de los análisis de HPLC-PDA se sabe

que la Fracción-MeOH es rica en las mismas por lo cual se asume que la capacidad antioxidante de la flor de jamaica mostrada en el bioensayo ORAC se debe primordialmente a las antocianinas, más que a los flavonoides presentes en la Fracción-EtOAc, aunque también dichos compuestos contribuyen a la capacidad antioxidante total. En estudios previos Zheng y Wang (2003) reportaron que las antocianinas y el ácido clorogénico de las moras azules contribuyen en 56.3% y 20% de su valor ORAC, respectivamente. En el presente estudio al calcular el valor de ORAC como la suma de las fracciones (157 $\mu\text{mol Trólox / g}$) y compararlo con el valor ORAC experimental del Extracto Crudo Hidrosoluble (209 $\mu\text{mol Trólox / g}$) los resultados sugieren que la combinación de los compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides tienden a potenciar la capacidad antioxidante de la flor de jamaica. Sin embargo la diferencia entre el valor ORAC como la suma de las fracciones y el valor ORAC experimental del Extracto Crudo Hidrosoluble puede ser atribuida a las pérdidas de compuestos fenólicos que tuvieron lugar durante la realización del fraccionamiento de dichos compuestos (Figura 2.1).

La Figura 2.2 muestra la correlación lineal observada entre el valor ORAC y el contenido total de los extractos y fracciones de la flor de jamaica ($r^2 \sim 0.98$), lo cual confirma que los compuestos fenólicos y compuestos que reaccionan en el ensayo de Folin-Ciocalteu parecen ser los responsables de la capacidad antioxidante.

Tabla 2.3. Capacidad antioxidante determinada con el bioensayo ORAC de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica expresados en base seca (BS).

Extracto ¹	Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol Trólox / g BS}$)	Capacidad Antioxidante Especifica ($\mu\text{mol Trólox / mg fenólicos EAG}$)
Extracto Crudo	338 a ²	23.9 c
Extracto Crudo Hidrosoluble	209 b	25.5 c
Fracción-EtOAc	51 c	37.2 b
Fracción-MeOH	88 c	17.8 c
Fracción-acuosa no ligada	8.9 d	154.5 a
Fracción-acuosa ligada	9.7 d	90.2 a
Suma de las fracciones	157.6	-

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05).

La capacidad antioxidante específica ó valor ORAC específico es una relación de la capacidad antioxidante entre el contenido de fenólicos totales para cada fracción y para los extractos crudos. Los valores de la capacidad antioxidante específica se muestran en la Tabla 2.3 e indican que la Fracción-MeOH tiene un valor ORAC específico menor en comparación con el de las otras fracciones, aunque dicha fracción posee mayor contenido de fenólicos totales. Por otro lado las fracciones acuosas ligada y

no ligada tienen una capacidad antioxidante específica mayor, indicando que sus compuestos fenólicos aunque presentes en bajas concentraciones presentan valores de ORAC relevantes. Los valores ORAC específicos para las fracciones acuosas también pueden deberse a la presencia de compuestos químicos de naturaleza no fenólica los cuales poseen capacidad antioxidante.

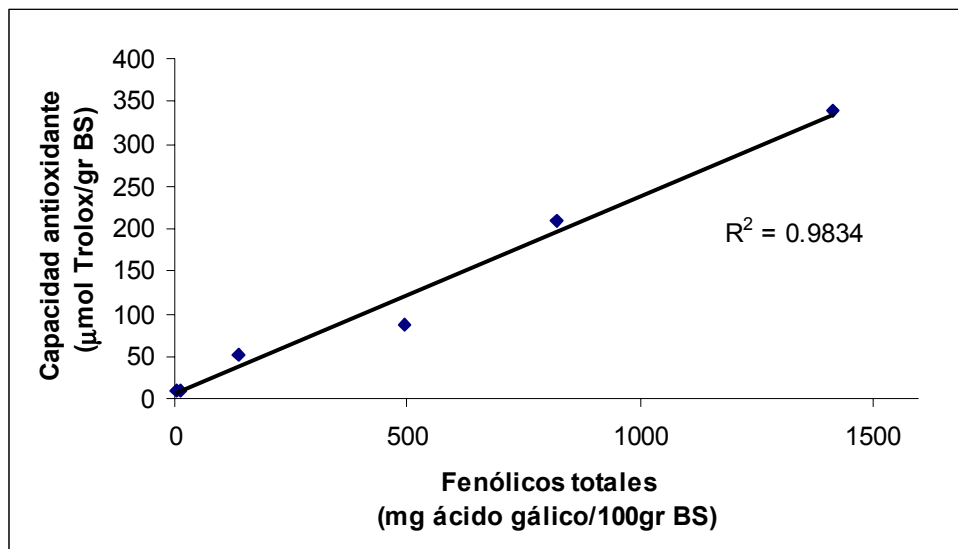


Figura 2.2. Correlación de la capacidad antioxidante (valor ORAC) con el contenido de fenólicos totales presentes en los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica.

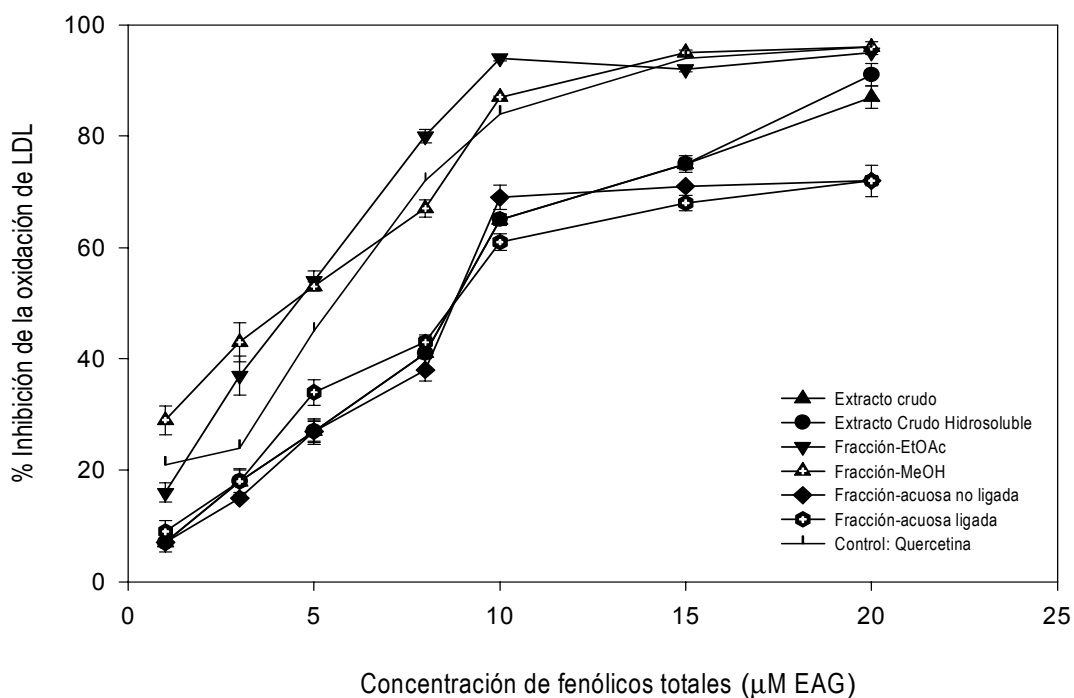
2.3.3 Efecto de los Flavonoides sobre la Inhibición de la oxidación *in vitro* de LDL aisladas de plasma humano

El bioensayo para medir la capacidad de inhibición de la flor de jamaica sobre la oxidación *in vitro* de LDL se llevó a cabo mediante la medición de los compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de los productos finales de oxidación de los lípidos. Durante la oxidación de las lipoproteínas se forman peróxidos, subsecuentemente se forman radicales peroxil seguidos de una fase de descomposición a aldehídos tales como hexanal, malonaldehído y 4-hidroxinonenal (Fennema, 1996).

Los resultados de este bioensayo (Figura 2.3) indican que los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica poseen la capacidad de reducir el daño oxidativo de las LDL *in vitro* causado por el generador de radicales peroxilo del AAPH. La inhibición de los extractos y fracciones de la flor de jamaica se observó en el rango de 1-20 µM de fenólicos totales expresados en EAG y los datos indican que el ensayo *in vitro* es sensible y reproducible para medir la capacidad de inhibir la oxidación de las LDL aisladas de plasma humano.

En estudios recientes de Chen *et al.*, (2004) se reportó el efecto inhibitorio de extractos de flor de jamaica sobre la oxidación de LDL *in vitro*. Sin embargo sus resultados difieren de los estudiados en el presente estudio en el rango de concentraciones en el cual se observó su actividad inhibitoria (45 μM a 180 μM EAG), dichas diferencias en el rango de concentraciones pueden atribuirse a que en los estudios de Chen *et al.*, (2004) la extracción de la flor de jamaica fue acuosa y realizada a altas temperaturas (100°C) durante 2 hr. De acuerdo con lo reportado en literatura algunos compuestos fenólicos como antocianinas y flavonoides (kaempferol) son degradados por tratamientos térmicos superiores de 50 °C (Romero y Bakker, 1999, Markakis, 1982; Mazza y Brouillard, 1987).

El método más adecuado para poder comparar las propiedades de diversas muestras es el cálculo de la concentración a la cual se inhibe el 50% de la oxidación, valor generalmente denominado como IC50, aunque no siempre es reportado por el laborioso trabajo involucrado.



¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5.

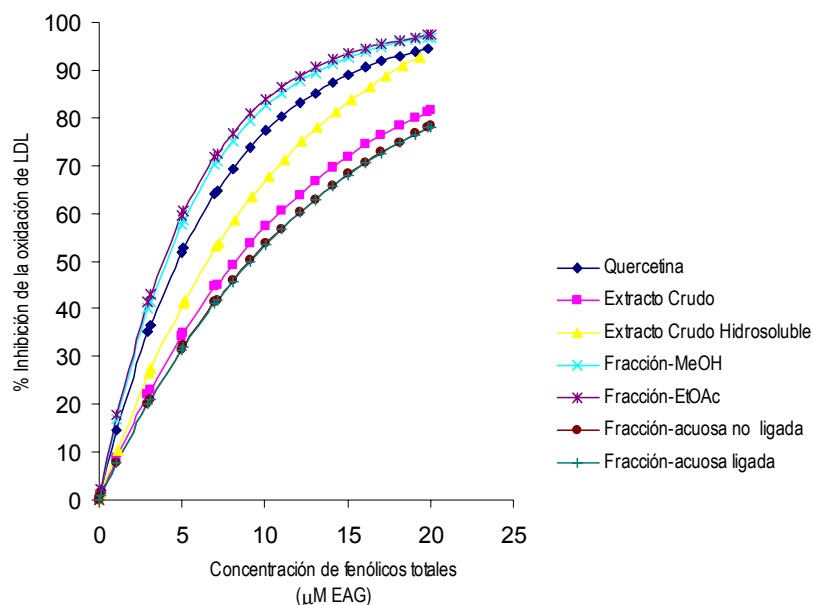
Figura 2.3. Determinación de la capacidad de inhibición de extractos de flor de jamaica y sus fracciones ante la oxidación de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH.

Los valores IC50 se pueden obtener de manera no exacta de forma gráfica a partir de la Figura 2.3, sin embargo se consideró interesante encontrar un modelo matemático que describiera el

comportamiento de los datos, el cual permitió obtener los valores IC50 para las diferentes repeticiones experimentales y realizar comparaciones estadísticas de las mismas. El modelo matemático fue seleccionado debido a que los valores de Y (% Inhibición) están en función de los valores de X (concentración del extracto) y la tendencia de los datos presenta un comportamiento no lineal. Se manipularon los datos con la ecuación de asociación exponencial unidimensional, la cual es ampliamente utilizada en modelos biológicos en donde se estudia la vida media de un fármaco. El modelo utilizado fue $Y = Y_{\max}(1 - e^{-k \cdot x})$ en el cual se sustituyeron los valores experimentales de concentración de fenólicos e inhibición. Se propone un valor máximo de Y_{\max} , el cual es 100 % de inhibición, con base en los valores experimentales el modelo calcula los nuevos valores de modelación Y' a una pendiente (k) constante, el valor IC50 se obtuvo cuando los valores X' son iguales a $0.5 Y_{\max}$.

Una explicación más detallada del modelo matemático se describe en el Anexo 1. El comportamiento de los datos descrito por el modelo matemático se puede observar en la Figura 2.4. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante la modelación matemática utilizando el programa Graph Pad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego CA., USA). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. Los valores del IC50 generados con su respectiva comparación estadística y R^2 se encuentran reportados en la Tabla 2.4, es importante recordar que un valor de IC50 menor es indicador de una mejor propiedad inhibitoria ejercida por los compuestos presentes en el extracto.

Los resultados sugieren que los valores de IC50 de las fracciones de la flor de jamaica sobre la formación de productos terminales de oxidación se puede ordenar ascendentemente de la siguiente manera, Fracción-EtOAc > Fracción-MeOH > Extracto Crudo Hidrosoluble > Extracto Crudo > Fracción-acuosa-ligada > Fracción-acuosa-no ligada. Estos resultados difieren de lo observado con los valores de ORAC, en los cuales la mayor actividad se observó en los extractos crudos no en las fracciones. Sin embargo cabe mencionar que los valores de la Fracción-MeOH y Fracción-EtOAc no son significativamente diferentes entre ellas en ambos bioensayos.



¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5.

Figura 2.4. Línea de tendencia según la ecuación de asociación exponencial unidimensional de los compuestos antioxidantes de extractos de flor de jamaica y fracciones ante la oxidación de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH.

Tabla 2.4. Valores IC₅₀ del extracto crudo y de las fracciones de la flor de jamaica evaluados por medio de la oxidación *in vitro* de las LDL aisladas de plasma humano.

Extracto ¹	Capacidad de Inhibición de oxidación <i>in vitro</i> de LDL (IC ₅₀ µM Fenólicos EAG)	R ²
Quercetina	4.7 d ²	0.94
Extracto Crudo	8.3 b	0.96
Extracto Crudo Hidrosoluble	6.2 c	0.98
Fracción-EtOAc	3.8 d	0.97
Fracción-MeOH	4.0 d	0.93
Fracción-acuosa no ligada	9.1 a	0.90
Fracción-acuosa ligada	9.0 a	0.97

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con diferentes letras entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes. (LSD prueba, P<0.05).

El efecto inhibitorio de oxidación de las LDL fue más pronunciado en las fracciones EtOAc y MeOH con valores de IC₅₀ de 3.8 μM EAG y 4 μM EAG, respectivamente, los cuales representan una inhibición más fuerte que la observada por el estándar de quercetina (IC₅₀= 4.7μM EAG). De igual manera la Fracción-EtOAc y la Fracción-MeOH presentaron efectos inhibitorios superiores en comparación con el resto de las fracciones y de los extractos crudos, lo cual se sugiere que pudiera existir un leve efecto antagonista al encontrarse los compuestos mezclados en el Extracto Crudo (IC₅₀ de 8.3 μM EAG). Estos resultados sugieren que la capacidad inhibitoria de la oxidación de LDL de la flor de jamaica mejora cuando con las antocianinas y flavonoides se encuentran aisladas del Extracto Crudo, lo cual concuerda con lo reportado por Ghiselli *et al.*, (1998) quienes demostraron que la actividad inhibitoria sobre la oxidación de LDL de las procianidinas aisladas del vino tinto fue mejor (IC₅₀=3.4 μM) en comparación con la muestra de vino tinto (IC₅₀= 20 μM).

2.3.4 Caracterización Química de los Extractos y Fracciones de la Flor de Jamaica por HPLC-PDA y Cromatografía Bidimensional en Papel

La capacidad antioxidante y el efecto inhibitorio de los flavonoides y compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica sobre la oxidación de LDL fueron observados en este estudio y permitieron confirmar las observaciones de trabajos previos (Chen *et al.*, 2004). Con el fin de conocer mejor los compuestos responsables de dicha bioactividad se llevó a cabo la caracterización química detallada por medio de HPLC-PDA y de cromatografía bidimensional en papel como parámetros de identificación.

Se logró cuantificar e identificar de forma individual las antocianidinas (forma hidrolizada) presentes en la flor de jamaica, debido a que no fue posible separar las formas glicosidadas en su totalidad (Tabla 2.5). Entre las antocianidinas presentes en la flor de jamaica se identificaron la delphinidina y cianidina (74% y 26%, respectivamente), encontrándose la delphinidina en mayor cantidad lo cual ha hecho que se le atribuya a la misma el color rojo característico de la flor de jamaica (Tsai, 2001). Los resultados concuerdan con los reportado por Tsai *et al.*, (2001) quienes reportaron la presencia de delphinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido (73 y 13 %, respectivamente) como las principales antocianinas del extracto acuoso de la flor de jamaica. Otros autores también confirman la presencia de las mismas antocianidinas con diversos glucósidos como sambubiosido, 3-O-soforósido (Wang, 2000; Hong y Wrolstad 1990). La Figura 2.5 muestra el cromatograma del HPLC-PDA y los espectros UV-VIS de dichas antocianidinas lo cual confirma su presencia en la flor de jamaica. Las antocianinas presentes en la Fracción-MeOH dieron como resultado una inhibición

significativa en la oxidación de las LDL (IC50= 4 μ M EAG) resultados que son comparables con lo reportado por Tsai *et al.*, (2001) quienes reportaron que las antocianinas aisladas del extracto acuoso de la flor de jamaica muestran una mayor actividad antioxidante (51%) sobre plasma humano en comparación del extracto crudo (24%).

Mediante los análisis cromatográficos por HPLC-PDA se comprobó que el fraccionamiento utilizado separó de manera efectiva las antocianinas presentes en el Extracto Crudo Hidrosoluble de la flor de jamaica, debido a que el contenido de antocianinas se concentró primordialmente en la Fracción-MeOH (Tabla 2.5). La Fracción- EtOAc y las Fracciones acuosas (ligada y no ligada) no eluyeron dichos compuestos. Solamente se observó una ligera tonalidad rosa en algunas de las fracciones, sin embargo fue tan baja su concentración que fue imposible su cuantificación.

Tabla 2.5. Caracterización y cuantificación de las antocianinas de la flor de jamaica presentes en los extractos crudos y fracciones. ¹

Fracción ²	Delfinidina (mg/g)	Cianidina (mg/g)	Petunidina (mg/g)	Pelargonidina (mg/g)	Malvidina (mg/g)	Antocianinas Totales (mg/g)
Extracto Crudo	1.235 a	0.439 a	nd ³	--	nd	1.674 a
Extracto Crudo Hidrosoluble	0.804 a	0.344 a	nd	--	nd	1.148 a
Fracción-MeOH	0.725 a	0.3162 a	nd	--	nd	1.042 a

¹Calculados a partir de una mezcla de estándares hidrolizados. ² Extracto crudo hidrosoluble=Compuestos no solubles en éter, Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. ³ND= Compuestos no detectados. ⁴Valores con diferentes letras entre una misma columna indican que los valores del extracto crudo y de las fracciones son significativamente diferentes. (LSD prueba, P<0.05).

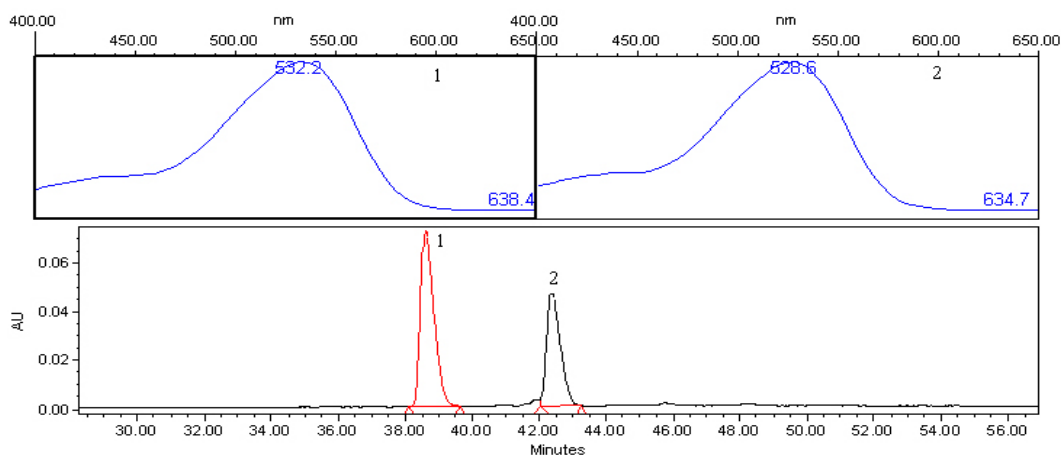


Figura 2.5 Cromatograma HPLC-PDA de antocianinas presentes en la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*.) a 520 nm. El espectro UV-Visible de cada pico se muestra en la parte superior del cromatograma, confirma su identidad química. Identificación de picos: (1) delfinidina, (2) cianidina.

2.3.4.1 Caracterización por Cromatografía bidimensional en papel y HPLC-PDA

La caracterización química detallada de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica se realizó con el análisis de cromatografía bidimensional en papel y HPLC-PDA. Para detectar la presencia de flavonoides, carbohidratos, esteroides en cada una de los extractos aislados según el procedimiento descrito en la sección 2.2.5.1, se realizaron reacciones coloridas de Shinoda, Antrona y Liebermann-Buchard respectivamente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Resultados de las reacciones coloridas (Mabry, *et al.*, 1991).

Fracción	Reacciones Coloridas		
	Shinoda	Antrona	Liebermann- Buchard
Hexano	Negativa	Negativa	Positiva
Hexano:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	Negativa	Negativa	Positiva
CH ₂ Cl ₂	Negativa	Negativa	Positiva
Acetona	Positiva	Positiva	Negativa
Acetato de etilo	Positiva	Positiva	Negativa
Metanol	Positiva	Positiva	Negativa
Agua	Positiva	Positiva	Negativa

En el análisis de los compuestos aislados por HPLC se utilizó un detector de arreglo de diodos cuya principal ventaja radica en la posibilidad de obtener un barrido de longitudes de onda de cada pico, además de las lecturas de absorbancia contra tiempo para su cuantificación. Para la identificación de los picos cromatográficos y asignación de identidad química tentativa se emplearon cinco métodos (Tabla 2.7 y Figura 2.6), el primero de ellos fue la comparación directa con los espectros de la biblioteca de estándares de fenólicos puros creada para este estudio en el HPLC-PDA (método A), por comparación de espectros UV-VIS de cada pico, con los espectros reportados en bibliografía (método B), por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA (método C), el cuarto método consistió en la comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas (método D) y por último la comparación de estándares y valores bibliográficos de las *R_f* realizada con el análisis de cromatografía bidimensional en papel (método E).

La coincidencia en los cinco métodos de identificación, incrementa la certeza de la identidad tentativa reportada en las tablas de identificación subsiguientes (Figura 2.6 y Tabla 2.7). La Figura 2.6 muestra el cromatograma del Extracto Crudo de la flor de jamaica a las tres diferentes longitudes de onda mencionadas y enumera los diferentes picos observados.

Cabe mencionar que la identificación de todos los componentes de las fracciones no fue posible debido a que algunos de los picos presentan sobreposición en sus espectros de absorción, indicando que se trataba de más de un compuesto co-eluyendo al mismo tiempo de retención, lo cual no permitió identificar los máximos de absorbancia para los compuestos individuales de manera confiable.

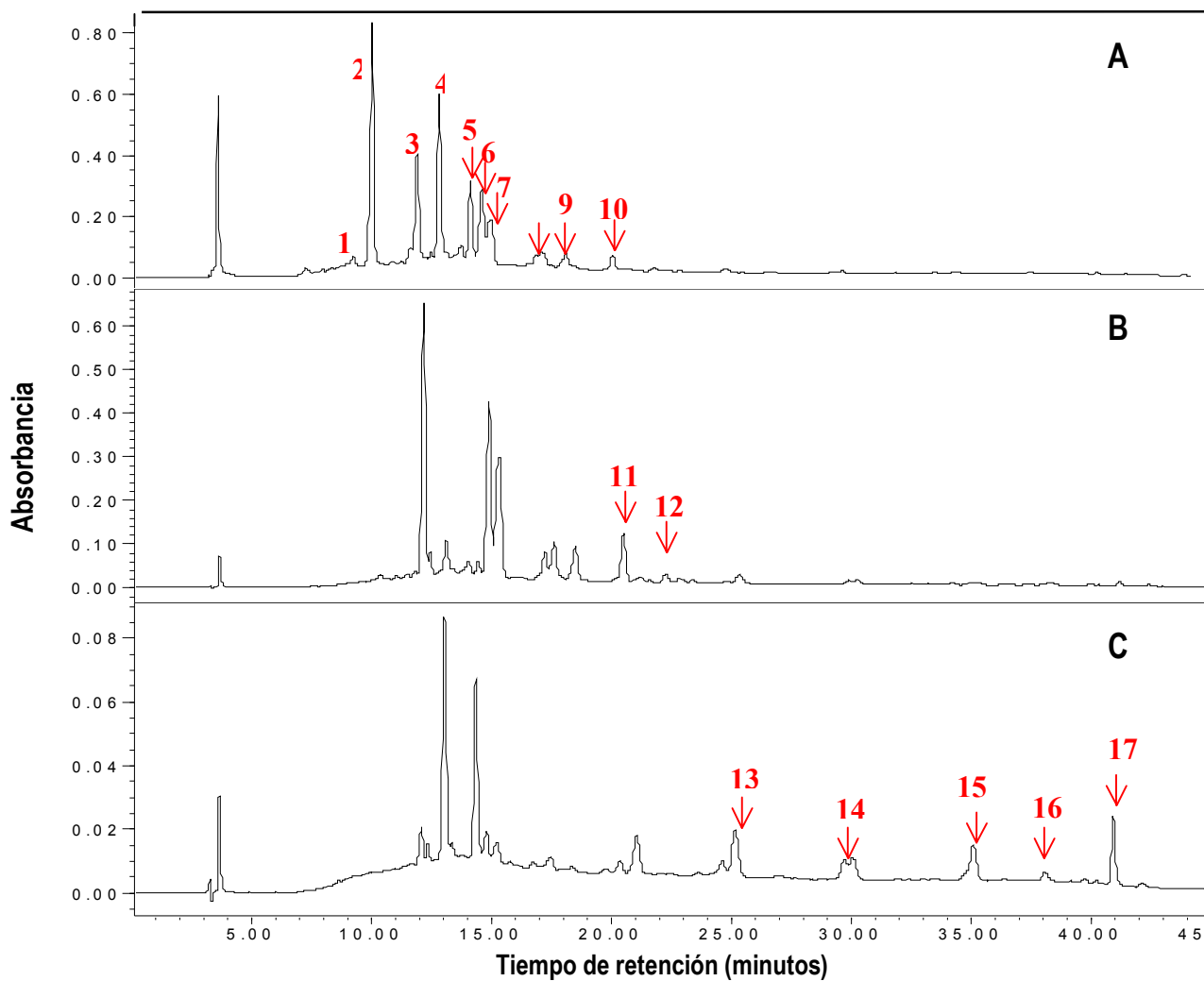
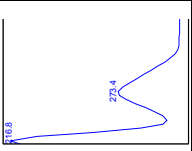
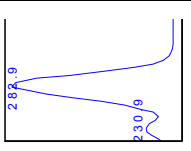
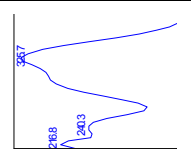
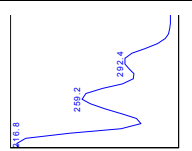


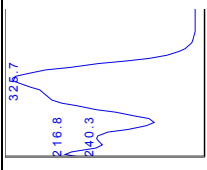
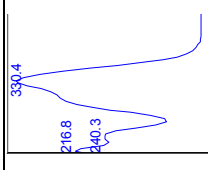
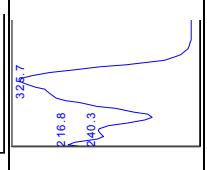
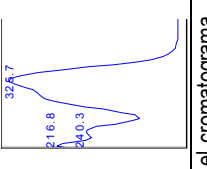
Figura 2.6. Cromatograma HPLC-PDA del Extracto Crudo de la flor de jamaica detectados a tres longitudes de onda. (A) 280 nm; (B) 335 nm; (C) 380 nm.

Tabla 2.7. Identificación tentativa por HPLC-PDA y cromatografía en papel bidimensional y por de los picos detectados en extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica.

Tipo de Extracto y, Número de pico	Tiempo de retención (min) ¹	λ_{max} bandas de absorción ²	Identificación preliminar	Método de identificación ³	Rf TBA	Rf HOAc	PDA
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	1 9.7	216.8, 273.4	Ácido gálico	A, B, C, D, E	0.85	0.15	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc Fracción-acuosa ligada	2 10.32	231, 282.9	Posible flavona	B, D	ND	ND	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc Fracción-acuosa ligada	3 11.9	216.8, 235 h, 297h, 325.7	Ácido caféico	A, B, C, D, E	0.79	0.32	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	4 12.7	216.8, 259.2, 292.4	Ac. protocateico	A, B, C, D, E	0.95	0.56	

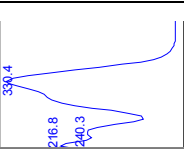
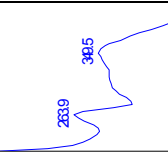
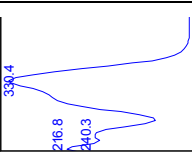
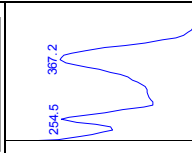
¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 2.6). ²Tomadas a partir del espectro de absorción de cada pico en el cromatograma, h=hombro. ³Método empleado para determinar la identidad de cada pico: (A) Identificación por comparación directa del espectro de absorción UV-Visible del pico con los estándares auténticos de la biblioteca de espectros; (B) Identificación por comparación de espectros UV-VIS de cada pico, con los espectros reportados en bibliografía (Mabry *et al.*, 1991; Harborne, 1989), (C) Identificación por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA, (D) Identificación por comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas, (E) Identificación por comparación de estándares y valores bibliográficos de las Rf realizada con el análisis de cromatografía bidimensional en papel.

Tabla 2.7. (continuación). Identificación tentativa por HPLC-PDA y cromatografía en papel bidimensional y por de los picos detectados en extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica.

Fracción, (Número de pico)	Tiempo de retención (min) ¹	λ_{\max} bandas de absorción	Identificación preliminar ²	Método de identificación ³	Rf TBA	Rf HOAc	PDA
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc 5	14.78	216.8, 240h, 326	Posible coelusión de ácido caféico	A,B,D	0.79	0.32	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc 6	15.10	216.8, 240h, 300h 330.4	Posible coelusión de ácido clorogénico	A,B	ND	ND	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc 7	(17.2)	216.8, 240h, 300h, 326	Posible coelusión de ácido caféico	A,B	0.79	0.32	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc 8	(18.3)	216.8, 240h, 300h, 326	Posible coelusión de ácido caféico	A, B	ND	ND	

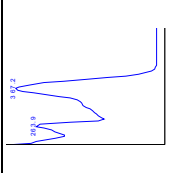
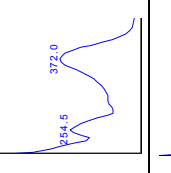
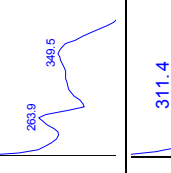
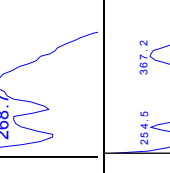
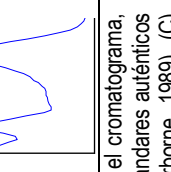
¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 2.6). ²Tomadas a partir del espectro de absorción de cada pico en el cromatograma, h=hombró. ³Método empleado para determinar la identidad de cada pico: (A) Identificación por comparación directa del espectro de absorción UV-Visible del pico con los estándares auténticos de la biblioteca de espectros; (B) Identificación por comparación de espectros UV-VIS de cada pico, con los espectros reportados en bibliografía (Mabry *et al.*, 1991; Harborne, 1989), (C) Identificación por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA, (D) Identificación por comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas, (E) Identificación por comparación de estándares y valores bibliográficos de las Rf realizada con el análisis de cromatografía bidimensional en papel.

Tabla 2.7. (continuación). Identificación tentativa por HPLC-PDA y cromatografía en papel bidimensional y por de los picos detectados en extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica.

Fracción, (Número de pico)	Tiempo de retención (min) ¹	λ_{max} bandas de absorción	Identificación preliminar ²	Método de identificación ³	Rf TBA	Rf HOAc	PDA
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	9 20.3	216.8, 240h, 300h 330.4	Ácido clorogénico	A, B, C, D	ND	ND	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	10 (20.9)	264, 350	Posible flavona metoxilada	B, D, E	0.80	0.42	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	11 (22.6)	216.8, 240h, 300h 330.4	Coelusión del ácido clorogénico	A, B	ND	ND	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	12 (25.0)	254, 367	Posible Quercetina 3,7-O-diglucósido o	B, D, E	0.13	0.66	

¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 2.6). ²Tomadas a partir del espectro de absorción de cada pico en el cromatograma, h=ombro. ³Método empleado para determinar la identidad de cada pico: (A) Identificación por comparación directa del espectro de absorción UV-Visible del pico con los estándares auténticos de la biblioteca de espectros; (B) Identificación por comparación de espectros UV-VIS de cada pico, con los espectros reportados en bibliografía (Mabry *et al.*, 1991; Harborne, 1989), (C) Identificación por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA, (D) Identificación por comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas, (E) Identificación por comparación de estándares y valores bibliográficos de las R_f realizada con el análisis de cromatografía bidimensional en papel.

Tabla 2.7. (continuación). Identificación tentativa por HPLC-PDA y cromatografía en papel bidimensional y por de los picos detectados en extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica.

Fracción, (Número de pico)	Tiempo de retención (min) ¹	λ_{\max} bandas de absorción ²	Identificación preliminar ²	Método de identificación ³	Rf TBA	Rf HOAc	PDA
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	13 (34.7)	264, 367	Kaempferol 3-glucósido	A, B, C, D, E	0.80	0.45	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	14 36	254.5, 372	Miricetina	A,B,C	ND	ND	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	15 (37.9)	264, 349	Posible flavona	B, D, E	0.61	0.78	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	16 38.073	269, 311	Posible flavona	B, D, E	0.63	0.20	
Extracto Crudo Extracto crudo hidrosoluble Fracción-EtOAc	18 (40.9)	254, 367	Quercetina	A,B,C,D,E	0.82	0.54	

¹Número de pico asignado de acuerdo al orden de aparición en el cromatograma (Figura 2.6). ²Tomadas a partir del espectro de absorción de cada pico en el cromatograma, h=hombro. ³Método empleado para determinar la identidad de cada pico: (A) Identificación por comparación directa del espectro de absorción UV-Visible del pico con los estándares auténticos de la biblioteca de espectros; (B) Identificación por comparación de espectros UV-VIS de cada pico, con los espectros reportados en bibliografía (Mabry *et al.*, 1991; Harborne, 1989), (C) Identificación por comparación de los tiempos de retención para cada pico con los tiempos de retención de los compuestos de la biblioteca de fenólicos en el HPLC-PDA, (D) Identificación por comparación de los espectros UV-VIS con los reportados en bases de datos electrónicas, (E) Identificación por comparación de estándares y valores bibliográficos de las Rf realizada con el análisis de cromatografía bidimensional en papel.

Se logró asignar una identificación tentativa a los compuestos presentes en los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica (Tabla 2.7) lo cual provee información sobre los tipos de compuestos potencialmente responsables de la bioactividad observada. Estudios previos indican que la jamaica posee flavonoides como gossipetina e hibiscetina con sus respectivos glucósidos (Sankara y Nair, 1972), sin embargo ninguno de estos compuestos se detectaron en la variedad de flor de jamaica que se utilizó en este proyecto. Es posible que las diferencias en composición se deban a la variedad de flor de jamaica utilizada ó a una separación cromatográfica incompleta y/o limitaciones de detección analíticas debidas a su baja concentración. Se logró confirmar la presencia de diferentes ácidos fenólicos como el ácido gálico, ácido caféico, ácido protocateico, ácido clorogénico, los cuales han sido asociados con propiedades antimicrobiales y antiinflamatorias (Salah *et al.*, 2002, Tsai *et al.*, 2002).

Entre los flavonoides presentes en la flor de jamaica se encuentran la quercetina, kaempferol y la miricetina. Yoshida *et al.*, (1990) sugirió que la quercetina es un agente anticancerígeno y también un potente agente antioxidante que puede prevenir la aterosclerosis (Miean y Mohamed, 2001). Las concentraciones de quercetina han sido reportados en diferentes vegetales, frutas y plantas, como por ejemplo cebolla (1497.5 mg/kg BS), papaya (811 mg/Kg BS), coliflor (219 mg/Kg BS), brócoli (60 mg/Kg BS), ajo (47 mg/Kg BS) y en *Hibiscus esculentus* (205.5 mg/Kg BS). (Rice-Evans, 2001). El kaempferol también se encuentra ampliamente distribuido y se le han asociado propiedades antioxidantes y antiinflamatorios, se ha cuantificado en vegetales y plantas tales como frijoles, cebollas, té, miel entre otras (Hertog *et al.*, 1993).

2.3.4.2 Cuantificación de Flavonoides por HPLC-PDA.

Las áreas recolectadas en el HPLC-PDA se cuantificaron en equivalentes de tres estándares comerciales, para las tres longitudes de onda seleccionadas. Se utilizó 280 nm para la cuantificación de ácidos fenólicos, 335 nm, para las flavonas y 380 nm para los flavonoles (Markham, 1982). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico, equivalentes de luteolina y equivalentes de quercetina, respectivamente (Tabla 2.8). Los resultados de cuantificación mostraron diferencias significativas entre cada una de las fracciones, sin embargo no se esperaba que la Fracción-EtOAc presentará mayores concentraciones de flavonoides que las concentraciones en los extractos crudos debido a que existe una pérdida inherente durante el fraccionamiento. Lo anterior se puede atribuir principalmente a que para poder lograr la separación de los compuestos fenólicos por HPLC-PDA el Extracto Crudo tuvo que pasarse a través de un Sep-Pak C₁₈ con el propósito de remover azúcares y proteínas. El eluyente utilizadó para la elusión en la preparación de la muestra fue metanol, sin embargo en el fraccionamiento para los flavonoides el acetato de etilo resultó ser un solvente de elusión

más eficiente para los flavonoides lo que explica las concentraciones ligeramente mayores en la Fracción- EtOAc.

La caracterización y cuantificación química permitieron la confirmación de la capacidad del protocolo utilizado de segregar los compuestos de la flor de jamaica. La Fracción-MeOH, no presentó ningún pico adicional a las longitudes de onda estudiadas sólo presentó en gran cantidad antocianinas. De igual forma los cromatogramas de fracciones acuosas, sólo en algunos casos llegaron a presentar flavonoides por efecto residual durante los lavados del Sep-Pak C₁₈. De igual manera los flavonoides se concentraron en la Fracción-EtOAc aunque en algunos casos se pudieron observar trazas de flavonoides en las demás fracciones, por efecto de los lavados de columnas.

Conforme a los resultados presentados en este estudio se puede inferir que el efecto inhibitorio contra aterosclerosis relacionado con la capacidad de inhibición de la oxidación de las LDL parece estar asociada al contenido de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica, principalmente en las antocianinas (delfinidina y cianidina) y flavonoides aislados del Extracto Crudo, entre ellos se encuentran la quercetina, miricetina. Estudios previos han reportado la capacidad de inhibición sobre la oxidación de LDL *in vitro* por diferentes flavonoides como la catequina y quercetina (70% y 77%, respectivamente) las cual inhibieron la oxidación de LDL con respecto al blanco (Abelson y Simon, 2001). Sin embargo no se puede descartar la contribución de compuestos adicionales presentes en los extractos y fracciones estudiadas.

Tabla 2.8. Análisis comparativo de la concentración de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica por HPLC-PDA.

Número de pico y Tiempo de retención (min) ¹	Identificación ²	Fracción	Concentración (mg/g)
1	Ácido gálico	Extracto Crudo	0.0323 a ³
		Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0229 b
		Fracción-EtOAc	0.0367 a
		Fracción-MeOH	ND
		Fracción-acuosa no ligada	ND
		Fracción-acuosa ligada	ND

¹Número de pico asignado de acuerdo al tiempo de retención en el cromatograma. ²Concentración expresada como equivalente de ácido gálico en la determinación de ácidos fenólicos a 280 nm, equivalente de luteolina en la determinación de flavonas a 335 nm, equivalente de quercetina en la determinación de flavonoles a 380 nm. ³Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05).

Tabla 2.8 (continuación). Análisis comparativo de la concentración de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica por HPLC-PDA.

Número de pico y Tiempo de retención (min) ¹	Identificación ²	Fracción	Concentración (mg/g)		
2	10.32	Posible flavona	Extracto Crudo	0.0597	a
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0345	b
			Fracción-EtOAc	0.0632	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
3	11.9	Ácido caféico	Extracto Crudo	0.0363	b
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0154	b
			Fracción-EtOAc	0.0672	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
4	12.7	Ac. Protocateico	Extracto Crudo	0.0264	a
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0229	a
			Fracción-EtOAc	0.0245	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
5	14.8	Posible coelusión de ácido caféico	Extracto Crudo	0.0232	b
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0805	b
			Fracción-EtOAc	0.2423	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
6	15.1	Posible coelusión de ácido clorogénico	Extracto Crudo	0.0276	
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0391	a
			Fracción-EtOAc	0.0283	b
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
7	(17.2)	Posible coelusión ácido fenólico	Extracto Crudo	0.0451	b
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0698	b
			Fracción-EtOAc	0.2425	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	

¹Número de pico asignado de acuerdo al tiempo de retención en el cromatograma. ²Concentración expresada como equivalente de ácido gálico en la determinación de ácidos fenólicos a 280 nm, equivalente de luteolina en la determinación de flavonas a 335 nm, equivalente de quercetina en la determinación de flavonoles a 380 nm. ³Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05).

Tabla 2.8 (continuación). Análisis comparativo de la concentración de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica por HPLC-PDA.

Número de pico y Tiempo de retención (min) ¹	Identificación ²	Fracción	Concentración (mg/g)		
8	(18.3)	Posible coelusión de ácido fenólico	Extracto Crudo	0.1302	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.2511	b
			Fracción-EtOAc	0.6372	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	0.0044	d
9	20.3	Ácido clorogénico	Extracto Crudo	0.0078	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0349	b
			Fracción-EtOAc	0.1271	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
10	(20.9)	Posible 3',5,5'-trihidroxí-3,4',6,7-tetramethoxyflavona	Extracto Crudo	0.0093	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0439	b
			Fracción-EtOAc	0.0618	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
11	(22.6)	Posible coelusión del ácido clorogénico	Extracto Crudo	0.0109	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0593	b
			Fracción-EtOAc	0.1969	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
12	25.0	Posible Quercetina 3,7-O-diglucósido	Extracto Crudo	0.0272	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0950	a
			Fracción-EtOAc	0.0521	b
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
13	34.7	Posible Kaempferol 3-glucósido	Extracto Crudo	0.0143	b
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0153	b
			Fracción-EtOAc	0.0640	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
		Fracción-acuosa ligada	ND		

¹Número de pico asignado de acuerdo al tiempo de retención en el cromatograma. ²Concentración expresada como equivalente de ácido gálico en la determinación de ácidos fenólicos a 280 nm, equivalente de luteolina en la determinación de flavonas a 335 nm, equivalente de quercetina en la determinación de flavonoles a 380 nm. ³Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05).

Tabla 2.8 (continuación). Análisis comparativo de la concentración de los extractos crudos y fracciones de la flor de jamaica por HPLC-PDA.

Número de pico y Tiempo de retención (min) ¹	Identificación ²	Fracción	Concentración (mg/g)		
14	36.1	Miricetina	Extracto Crudo	0.0150	a
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0142	a
			Fracción-EtOAc	0.0266	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
15	37.9	Posible flavona	Extracto Crudo	0.0067	b
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0112	b
			Fracción-EtOAc	0.0644	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
16	38.07	Posible flavona	Extracto Crudo	0.0023	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0161	b
			Fracción-EtOAc	0.0324	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
17	40.9	Quercetina	Extracto Crudo	0.0352	a
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.0418	a
			Fracción-EtOAc	0.0451	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	ND	
Total			Extracto Crudo	0.5095	c
			Extracto Crudo Hidrosoluble	0.8679	b
			Fracción-EtOAc	2.0123	a
			Fracción-MeOH	ND	
			Fracción-acuosa no ligada	ND	
			Fracción-acuosa ligada	0.0044	

¹Número de pico asignado de acuerdo al tiempo de retención en el cromatograma. ²Concentración expresada como equivalente de ácido gálico en la determinación de ácidos fenólicos a 280 nm, equivalente de luteolina en la determinación de flavonas a 335 nm, equivalente de quercetina en la determinación de flavonoles a 380 nm. ³Valores con diferente letra entre una misma columna indican que los valores de los extractos crudos y fracciones son significativamente diferentes, (LSD prueba, P<0.05).

2.3.4 Conclusiones

El presente estudio permitió fraccionar de manera efectiva los principales compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica cosechada en México. Se logró confirmar que la Fracción-MeOH compuesta primordialmente por antocianinas (delfinidina y cianidina) de forma aislada tiene la capacidad de potenciar la inhibición de la oxidación de LDL *in vitro* en comparación con el Extracto Crudo de la flor de jamaica. El presente estudio también permitió contribuir con la evaluación de un modelo matemático para poder obtener los valores de IC50 del bioensayo de oxidación de LDL *in vitro*,

el cual permitió realizar comparaciones estadísticas. Así mismo el presente trabajo aportó evidencia experimental relevante en soporte de la inhibición de la oxidación de LDL entre los principales mecanismos de acción de la actividad anti-aterosclerótica del extracto acuoso de la flor de jamaica reportada en conejos hipercolesterolémicos (Chen *et al.*, 2003).

Según los resultados obtenidos, la actividad inhibitoria puede ser atribuida a los compuestos fenólicos aislados del extracto crudo de la flor de jamaica principalmente a las antocianinas (IC₅₀= 4 μM EAG) y flavonoides (IC₅₀= 3.8 μM EAG). De igual manera se demostró que la capacidad antioxidante de la flor de jamaica (valor ORAC) está correlacionada con su contenido de fenólicos totales. Sin embargo también es posible que la capacidad antioxidante se deba a la presencia de otros compuestos no fenólicos en los extractos crudos y fracciones como ácidos orgánicos (ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido ascórbico) entre otros compuestos como saponinas.

La caracterización tentativa de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica cosechada en México permitió confirmar la presencia de diferentes tipos de flavonoides los cuales se identificaron tentativamente como kaempferol, miricetina, quercetina entre otros flavonoles y ácidos fenólicos como el ácido gálico, protocateico, caféico y clorogénico, los cuales conjuntamente contribuyen a su capacidad antioxidante (valor ORAC) y actividad de la inhibición de la oxidación de LDL.

CAPITULO III

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE LA FLOR DE JAMAICA CON OTROS EXTRACTOS DE FUENTES NATURALES PRODUCIDOS EN MÉXICO

3.1 INTRODUCCIÓN

Un gran número de estudios han reportado las propiedades antioxidantes de diferentes fuentes naturales las cuales se han relacionado principalmente con su contenido de compuestos fenólicos entre ellos, antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos e isoflavonas. Dichos fitoquímicos también están presentes en las cosechas Mexicanas nativas o que las hace importantes para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Rice-Evans, *et al.*, 1997). De interés para el presente estudio es el frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), el maíz azul (*Zea mays*), chile poblano (*Capsicum annum*) y flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

La importancia del frijol negro radica en que es la leguminosa de mayor consumo en México, con un consumo per capita de 22 kg/año. La clase comercial con mayor importancia con fines alimentarios es el frijol negro centrada principalmente en la región sur del país (Catellanos 1997). El frijol negro, es una fuente importante de antocianinas e isoflavonoides. Franke *et al.*, (1994) reportaron niveles en el contenido de isoflavonas en el frijol negro de 1396 mg/kg en peso seco las cuales son sólo 10 a 13 % menores que las reportados para la soya, la cual es la fuente principal de isoflavonas más conocida. Sin embargo el contenido de flavonoides varía dependiendo de la especie, así como de los diferentes estados de maduración y factores ambientales como la luz, temperatura, agua, etc. (Mazza y Miniati 1993).

Entre los compuestos fenólicos más abundantes en el frijol negro están, isoflavonas como: 2'-hidroxigenisteína, 2,3-dehidrokievitona y licoisoflavona A, isoflavanonas como: 7,2',4'-trihidrovestigitona y 5-deoxikievitona; isoflavonas como demetilvestitol y 2'-Metil-faseolin-isoflavona, 2'-hidroxigenisteína, 2,3-dehidrokievitona y licoisoflavona A (Harborne y Williams, 2000).

En el caso del chile poblano, pertenece a la familia de plantas tropicales *Solanaceae*. Su composición química ha sido estudiada con bastante profundidad, principalmente en lo que concierne a la vitamina C, vitamina E, β - carotenos, y carotenoides. Los capsaicinoides también presentan en el chile son alcaloides importantes para la industria farmacéutica por sus efectos neurológicos. Sin

embargo las investigaciones del contenido de flavonoides y ácidos fenólicos en *Capsicum* son escasas (Materska *et al.*, 2003).

Por otro lado en el caso del maíz, su importancia radica en que es el alimento básico de las culturas americanas, además de ser uno de los cereales más cultivados del mundo y constituye una fuente rica de carbohidratos. Se han reportado 45 diferentes variedades de maíz, presentan características muy diversas, el color de algunos granos de maíz varía entre el verde claro y el oscuro, y puede verse modificado por pigmentos de color castaño, rojo o púrpura. Los compuestos responsables del pigmento en el maíz azul son las antocianinas, entre las cuales se han reportado Estos compuestos se encuentran principalmente en el endospermo (Zazueta-Morales *et al.*, 2001). Se han reportado diferentes tipos de antocianinas presentes en el maíz azul entre las cuales se encuentran, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido las cuales fueron identificadas en la variedad del maíz azul boliviano (Fossen *et al.*, 2001).

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), de la Familia de las Malvaceas, tiene gran valor comercial en México ya que se ha utilizado como aditivo alimentario, aprovechándola como colorante natural, gelatinas e infusiones, así como para la preparación de mermeladas, ates, jalea, cremas pero principalmente como bebida por sus propiedades antihipertensivas (Herrera-Arellano, 2004). Entre las antocianinas reportadas en literatura se encuentran cianidina-3-glucósido, delphinidina-3-glucósido, algunos flavonoides como gosipetina, hibiscetina, miricetina, quercetina y sus respectivos glucósidos. Así también se ha reportado que la flor de jamaica contiene algunos ácidos fenólicos como el ácido protocateico, ácido pelargonídico, eugenol, catequina, ácido caféico, rutina, ácido gálico y algunos esteroides como el β -sitosterol, y ergosterol (Salah, *et al.*, 2002, Koo Hiu, *et al.*, 2001; Tsai, *et al.*, 2002).

En el presente capítulo nos enfocamos en la comparación de las propiedades antioxidantes de algunas frutas y cereales de gran importancia para México como lo son el frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), maíz azul (*Zea mays*) y chile poblano (*Capsicum annuum*) en comparación con la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) estudiada en el capítulo anterior.

3.2 MATERIALES Y METODOS

La extracción y fraccionamiento de los compuestos fenólicos del maíz azul (*Zea mays*) y chile poblano (*Capsicum annuum*) se realizó de un mismo lote de producto obtenido a granel en un supermercado de la zona. El frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) se obtuvo del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, D.F. México). Los estándares de calibración, Trólox, fluoresceína, fosfatos de sodio y potasio y reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvieron de Sigma-Aldrich

Co. (St. Louis, MO., EUA.). El radical 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) de Waco Chemicals and Supplies Co. (Richmond, VA., EUA.). El metanol grado reactivo, acetato de etilo, éter etílico, acetona grado reactivo utilizados en los protocolos de extracción y fraccionamiento se obtuvieron de Fisher Scientific International (Winnipeg, MB., Canadá) y de Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V, (Monterrey, NL., México). La mezcla de estándares de antocianinas se obtuvo de Polyphenols Laboratories AS. (Sandnes, Noruega). Las columnas cromatográficas de purificación con capacidad de 20 mL y 5 g de adsorbente C-18 Sep-Pak® se obtuvieron de Waters Co. (Milford, MA., EUA.).

3.2.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos del Frijol Negro, Maíz Azul y Chile Poblano.

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó en base a una modificación del protocolo descrito por Oszmianski *et al.*, (1988). El chile poblano se molió en una licuadora Osterizer (Oster Company, Tlalnepantla, México, México); por su parte el grano de maíz azul se molió en un molino Wiley Mili (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EUA.). Para la extracción de los compuestos presentes en el frijol negro solamente se trabajó con las testas. Para separar las testas del cotiledón, de los granos del frijol (100 g) se pusieron a remojar con agua bidestilada (100 mL) a 4°C en oscuridad durante 24 horas.

La extracción de los compuestos fenólicos del chile poblano y de las testas de frijol se realizó con una solución al 70 % (v/v) de acetona, y para los compuestos presentes en el maíz azul se utilizó con una solución al 80 % (v/v) debido a la cantidad de almidón en la muestra. A una muestra de cada producto (100 g de maíz azul, 10 g de cáscara de frijol y 200 g de chile) se le adicionó la solución de acetona en una relación 1:10 (p/v). La solución se homogenizó con el producto durante 5 min con un homegenizador Ika - Werke modelo Ultra turrax T 25 basic (Wilmintong, N.C., EU.). Terminada la extracción los sólidos de los extractos del frijol negro, maíz azul y chile poblano se separaron mediante filtración al vacío. El líquido recuperado se almacenó a -85°C y los sólidos se pusieron nuevamente en solución acetónica. El procedimiento antes descrito se repitió hasta que el líquido filtrado no presentara ninguna coloración. Una vez finalizada la extracción, todo el líquido se juntó y la acetona se evaporó al vacío en un rotavapor (Büchi, Scientific Glass Apparatus, Inc., Bloomfield, N.J., EU.) a una temperatura menor de 40°C.

El extracto acuoso obtenido de la evaporación se aforó a un volumen constante (200 mL, y se etiquetó como Extracto Crudo), posteriormente se tomó una sub-muestra (50 mL) del mismo para

continuar con la extracción. Se separaron los compuestos liposolubles de la sub-muestra mediante dos extracciones consecutivas con éter etílico en una relación 1:1 (v/v). El Extracto Crudo con el éter etílico se agitó durante 15 min y se dejó reposar 15 min en embudos de separación para conseguir la separación de las fases, posteriormente, se recuperó el Extracto Crudo Hidrosoluble el cual se utilizó como punto de partida para fraccionamientos posteriores. Se tomó una alícuota del Extracto Crudo Hidrosoluble (15 mL) y se ligó en la fase sólida C₁₈ Sep-Pak para fraccionar los compuestos fenólicos utilizando el protocolo descrito en detalle en la Figura 2.1. Todos los extractos y fracciones se almacenaron a -85°C. El procedimiento de extracción y fraccionamiento de la flor de jamaica se describió en el Capítulo 2, Sección 2.2.1.

3.2.2 Caracterización Espectrofotométrica de Extractos Fenólicos

3.2.2.1 Fenólicos Totales

La concentración de fenólicos totales solubles presentes en los extractos y fracciones del frijol negro, maíz azul y chile poblano se determinó mediante una modificación reportada por Abelson y Simon (2001) del método de Folin-Ciocalteu (Swain y Hillis, 1959). Como se describió en el Capítulo 2, Sección 2.2.2.1.

3.2.2.2 Antocianinas Monoméricas Totales

La concentración de antocianinas monoméricas totales presentes en los extractos y fracciones de frijol negro, maíz azul y flor de jamaica (a excepción del chile poblano el cual no presenta este tipo de compuestos) se determinó utilizando el método del pH diferencial descrito por Wrolstad (1976). Como se describió en el Capítulo 2, Sección 2.2.2.2.

3.2.3 Propiedades Antioxidantes de Flavonoides y Compuestos Fenólicos.

La capacidad antioxidante del extracto acuoso y de las fracciones del frijol negro, maíz azul, chile poblano y flor de jamaica se determinó mediante el método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). La metodología fue adaptada de Prior *et al.*, (2003). Como se describió en el capítulo 2 sección 2.2.3.1

3.2.4 Análisis Estadístico

El análisis de los resultados se llevo a cabo utilizando el paquete estadístico JMP® versión 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC., EUA.) mediante el análisis de varianza (ANOVA). La separación de medias se llevó a cabo utilizando la prueba de LSD ($p < 0.05$). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3.3 Resultados y Discusión de Resultados

3.3.1 Extracción y Fraccionamiento de Compuestos Fenólicos del Frijol negro, Maíz azul y Chile poblano

El esquema de extracción y fraccionamiento utilizado en el presente estudio fue seleccionado con el propósito de separar los grupos de compuestos contenidos en el frijol negro, maíz azul, chile poblano y flor de jamaica de acuerdo con su solubilidad en diferentes solventes y su afinidad por la columna de C₁₈. Siguiendo el protocolo de extracción y fraccionamiento descrito en la Figura 2.1 se obtuvieron el Extracto Crudo y Extracto Crudo Hidrosoluble. El cual se introdujo a la columna C₁₈ para obtener cuatro sub-fracciones (Fracción-EtOAc, Fracción-MeOH, Fracción-acuosa-no ligada, Fracción-acuosa -ligada) que se utilizaron en los bioensayos que midieron la capacidad antioxidante.

Dentro de los inconvenientes o dificultades que se presentaron en la realización del fraccionamiento de los compuestos presentes en frijol negro, maíz azul y chile poblano fue el desconocimiento de la cantidad adecuada en la extracción a utilizar. Un ejemplo es en el caso del chile poblano, inicialmente se utilizaron 50 gr, pero una vez terminado el fraccionamiento se obtuvieron concentraciones muy bajas, esto fue debido a que el chile poblano tiene un alto porcentaje de humedad (93.5%) por lo que se optó por trabajar con 200 g de muestra. Para el caso particular del maíz azul al realizar la extracción acetónica (70% v/v) para la obtención del Extracto Crudo se formó una capa morada viscosa, posiblemente causada por el almidón y proteína por lo que se aumentó la concentración a 80% (v/v) para precipitar los polímeros. El porcentaje de humedad para las fuentes naturales estudiadas en este proyecto se reporta en la Tabla 3.1, en la cual se observa que el chile poblano contiene el mayor porcentaje de humedad, seguido por el frijol negro y finalmente por el maíz azul.

Tabla 3.1. Contenido de agua de las fuentes naturales

Fuente natural	Humedad (%)	Error estándar ¹
Frijol negro	59.77%	1.63
Maíz azul	10.96%	0.34
Chile poblano	93.56%	1.20

¹ Error estándar calculado por triplicado

Al igual que ha sido mencionado en el Capítulo 2 durante la extracción lipofílica se recomienda asegurar la completa evaporación del éter etílico, debido a que puede provocar una disminución en la capacidad de adsorción del Sep-Pak C₁₈ al igual que con lo realizado con la flor de jamaica fue necesario evaporar el éter etílico con nitrógeno y posteriormente someter las muestras a vacío antes de iniciar el fraccionamiento.

El contenido de fenólicos totales en los extractos crudos y fracciones se encuentra reportado en la Tabla 3.2. Los resultados indican que el procedimiento del fraccionamiento es repetible y se logró la separación de los diferentes compuestos fenólicos presentes en el frijol negro, maíz azul y chile poblano. Se realizó un balance de masa partiendo del Extracto Crudo Hidrosoluble (compuestos no solubles en éter) como flujo de entrada y como salida las diferentes fracciones obtenidas entre ellas, Fracción-EtOAc, Fracción-MeOH, Fracción-acuosa-no ligada, Fracción-acuosa-ligada.

Tabla 3.2. Contenido de fenólicos totales presentes en los extractos crudos y fracciones del frijol negro, maíz azul, chile poblano y flor de jamaica.

Fenólicos Totales (mg ácido gálico/100 gr peso seco)												
Extractos ¹												
Fuente vegetal	Extracto crudo		Extracto Crudo Hidrosoluble		Fracción-EtOAc		Fracción-MeOH		Fracción acuosa no ligada		Fracción acuosa ligada	
Flor de jamaica	1414	a ²	821	b	136	c	494	b	5.8	c	11	c
Frijol negro	1378	a	1025	b	48	c	1093	b	22	c	5.2	c

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con letras diferentes entre una misma fila indican que son significativamente diferentes (LSD test, P<0.05).

Tabla 3.2. (continuación). Contenido de fenólicos totales presentes en los extractos crudos y fracciones del frijol negro, maíz azul, chile poblano y flor de jamaica.

Fenólicos Totales (mg ácido gálico/100 gr peso seco)												
Extractos ¹												
Fuente vegetal	Extracto crudo	Extracto Crudo Hidrosoluble		Fracción-EtOAc		Fracción-MeOH		Fracción acuosa no ligada		Fracción acuosa ligada		
Maíz azul	22	a	13	b	5.5	c	20	a	2	d	0.2	d
Chile poblano	93	a	62	b	18	b	22	b	6.5	c	4.8	c

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con letras diferentes entre una misma fila indican que son significativamente diferentes (LSD prueba, P<0.05).

Los resultados indican una buena separación y un porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos presentes en el flujo de entrada de un 72.3%, 70%, 74 % para el caso del frijol negro, maíz azul y chile poblano, respectivamente. Las pérdidas obtenidas en la realización del fraccionamiento pueden ser atribuidas a la complejidad de la mezcla de los compuestos y a la afinidad que tienen dichos compuestos por la resina C₁₈.

3.3.2 Determinación de Fenólicos Totales y Antocianinas Monoméricas Totales

La comparación del contenido fenólicos totales de las fuentes naturales mostrados en la Tabla 3.2 con los resultados para la flor de jamaica estudiada en el capítulo anterior, indica que la flor de jamaica posee el contenido de compuestos fenólicos más elevado (1414 mg EAG /100 g) aunque es muy similar al del frijol negro. En general las diferentes fuentes vegetales estudiadas en este proyecto se pueden ordenar de manera descendiente con base en su contenido de fenólicos totales como, flor de jamaica>frijol negro>chile poblano>maíz azul.

A manera de referencia con otras fuentes naturales, el contenido de fenólicos totales del frijol negro y flor de jamaica son similares al de la cereza (1956 mg EAG/100g BS, Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2003), en el caso del chile poblano su contenido de fenólicos totales se puede comparar con otras frutas y vegetales como la cebolla (100 mg EAG/100g BS, Proteggente *et al.*, 2002) espinacas (78mg EAG/100g BS, Proteggente *et al.*, 2002) y bananas (146 mg EAG/100g BS, Proteggente *et al.*, 2002). El maíz azul es similar al reportado para el tomate (31 mg EAG/100g BS, Vinson, 1998).

Así también se determinó y comprobó la presencia de antocianinas monoméricas en los extractos y fracciones del frijol negro, maíz azul y chile poblano por el método de pH diferencial de

Wrolstad (1976) (Tabla 3.3). Como se esperaba el contenido de antocianinas fue fraccionada preferentemente en la Fracción-MeOH, la cual constituye el 64.8%, 66.6% y 72% de antocianinas monoméricas totales en comparación con el Extracto Crudo Hidrosoluble para el frijol negro, el maíz azul y flor de jamaica, respectivamente. Las pérdidas obtenidas pueden ser atribuidas a que se encuentren trazas de antocianinas en las demás fracciones, sin embargo por ser tan pequeña la concentración no fue posible medirla por este método espectrofotométrico como se ha comentado anteriormente en el Capítulo 2.

De forma general se puede observar que el extracto de flor de jamaica (6.24 g/100 g BS) contiene mayor cantidad de antocianinas en comparación con el frijol negro y el maíz azul (0.69 y 0.27 g/100 g BS, respectivamente). Así mismo el contenido de antocianinas presentes en el maíz azul y frijol negro puede ser comparable con lo reportado para la ciruela roja (0.06 g/100 g BS, Kalt *et al.*, 1999) y frambuesa (0.49 g/100 g BS, Kalt *et al.*, 1999). En general las diferentes fuentes vegetales estudiadas en este proyecto se pueden ordenar de manera descendiente con base en el contenido de antocianinas monoméricas totales como, flor de jamaica>maíz azul.>frijol negro.

Tabla 3.3. Contenido de antocianinas monoméricas presentes en el extracto crudo y en cada una de las fracciones del frijol negro, maíz azul y flor de jamaica.

Antocianinas monoméricas (g/100 g peso seco)¹				
Extractos²				
Fuente natural	Extracto Crudo	Extracto Crudo Hidrosoluble	Fracción-MeOH	
Frijol negro	0.69 a ³	0.54 b	0.35 c	
Maíz azul	0.27 a	0.27 a	0.18 b	
Flor de jamaica²	6.24 b	7.26 a	5.22 c	

¹Calculado por el método de pH diferencial y expresado en equivalentes de delphinidina-3-glucósido. ²Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. ³Valores con diferentes letras entre una misma fila indican que los valores del extracto crudo y de las fracciones son significativamente diferentes. (LSD prueba, P<0.05).

3.3.3 Capacidad Antioxidante de los Extractos Crudos y Fracciones

Los resultados del bioensayo ORAC para los extractos crudos y fracciones del frijol negro, maíz azul y chile poblano se muestran en la Tabla 3.4. Los resultados obtenidos para el frijol negro (169 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en BS) muestran un alto valor ORAC, en comparación con el maíz azul y chile poblano. Sin embargo al comparar el valor ORAC de estas fuentes vegetales con respecto el de la flor de jamaica estudiada en el capítulo anterior, los resultados indican que el valor ORAC de la flor de jamaica es superior (338 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en BS). En general las diferentes fuentes vegetales estudiadas en éste proyecto se pueden ordenar de manera descendiente con base a su valor ORAC como, flor de jamaica>frijol negro>chile poblano>maíz azul.

Tabla 3.4 Capacidad antioxidante de los extractos crudos y fracciones del frijol negro, maíz azul y chile poblano reportado en base seca (BS).

Fuente vegetal	Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol Trolox / g BS}$)						
	Extractos ¹						
	Extracto Crudo	Extracto Crudo Hidrosoluble	Fracción-EtOAc	Fracción-MeOH	Fracción-acuosa no ligada	Fracción-acuosa ligada	
Frijol negro	169 a ²	133 b	32 c	79 b	12 c	5.6 c	
Maíz azul	8.8 a	4.8 b	2.8 c	8 a	0.8 d	0.6 d	
Chile poblano	44 a	32 b	11 b	2.7 b	8.3 d	2.6 d	
Flor de jamaica	338 a	209 b	51 c	88 c	8.9 d	9.7 d	

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con diferentes letras entre una misma fila indican que los valores del extracto crudo y de las fracciones son significativamente diferentes. (LSD prueba, P<0.05).

Los valores de ORAC obtenidos para los extractos crudos de la flor de jamaica y del frijol negro es superior a 100 $\mu\text{mol Trolox/ g}$ en BS lo cual es considerado dentro de los alimentos con alta capacidad antioxidante, característico de algunas fuentes naturales como fresas, cerezas, espinacas y moras (Prior y Cao, 2000). De igual manera el valor ORAC del Extracto Crudo del chile poblano (44 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en BS) es similar al reportado para fuentes vegetales como ajo, cebollas y lechuga, las cuales poseen un valor ORAC en el rango de 20 a 60 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (Prior y Cao, 2000). Por último el valor de ORAC del maíz azul (8.8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ en BS) se encuentra por debajo de los 20 $\mu\text{mol Trolox/g}$, lo cual es característico de algunas fuentes naturales como tomate, manzanas, bananas y peras (Prior y Cao, 2000).

Realizando una comparación entre los valores ORAC de cada una de las fracciones en el caso del frijol negro, maíz azul y flor de jamaica de manera general se pueden ordenar de manera

descendiente con base a su valor ORAC como Fracción-MeOH>Fracción-EtOAc> Fracción-acuosa no ligada> Fracción-acuosa ligada. Sin embargo para el chile poblano la Fracción-EtOAc mostró un valor ORAC más elevado que el observado para su correspondiente Fracción-MeOH.

Es importante resaltar que al parecer la capacidad antioxidante para el frijol negro, chile y flor de jamaica recibe contribución importante de las antocianinas y otros compuestos presentes en la Fracción-MeOH debido a que dicha fracción representa del 55-70% del valor ORAC de todas las fuentes naturales estudiadas en este proyecto, a excepción del chile poblano (10%) en el cual dichos compuestos no fueron detectados.

En el presente estudio se pudo observar que la capacidad antioxidante (valor ORAC) presente en cada una de las fuentes naturales estudiadas en este proyecto está estrechamente relacionada con su contenido de fenólicos totales. La Figura 3.1 A-D muestra una altas correlaciones lineales entre el valor ORAC y las concentraciones de fenólicos totales en los extractos y fracciones de la flor de jamaica, frijol negro, maíz azul y chile poblano (r^2 0.98 $r^2 \sim 0.88$; $r^2 \sim 0.99$, $r^2 \sim 0.93$, respectivamente), lo cual sugiere que los compuestos fenólicos contribuyen significativamente a su capacidad antioxidante. No obstante cada fuente natural mostró una pendiente diferente lo cual indica que los compuestos fenólicos presentes en cada fuente natural poseen diferentes capacidades antioxidantes específicas las cuales dependen del tipo de compuestos presentes en cada fracción.

Las capacidades antioxidantes específicas ó valores de ORAC específicos se muestran en la Tabla 3.5 y se calcularon como la relación de la capacidad antioxidante entre el contenido de fenólicos totales para cada fracción y para los extractos. Los valores de la capacidad antioxidante específica indican que la Fracción-MeOH tiene una menor capacidad antioxidante específica en comparación con las otras fracciones, siendo también la fracción con el mayor contenido de fenólicos totales a excepción del chile poblano. Por otro lado las fracciones acuosas ligada y no ligada presentan una capacidad antioxidante específica mayor, indicando que los compuestos aunque estén presentes en bajas concentraciones presentan valores de ORAC relevantes. Sin embargo esto puede deberse a la presencia de compuestos no fenólicos que poseen actividad antioxidante.

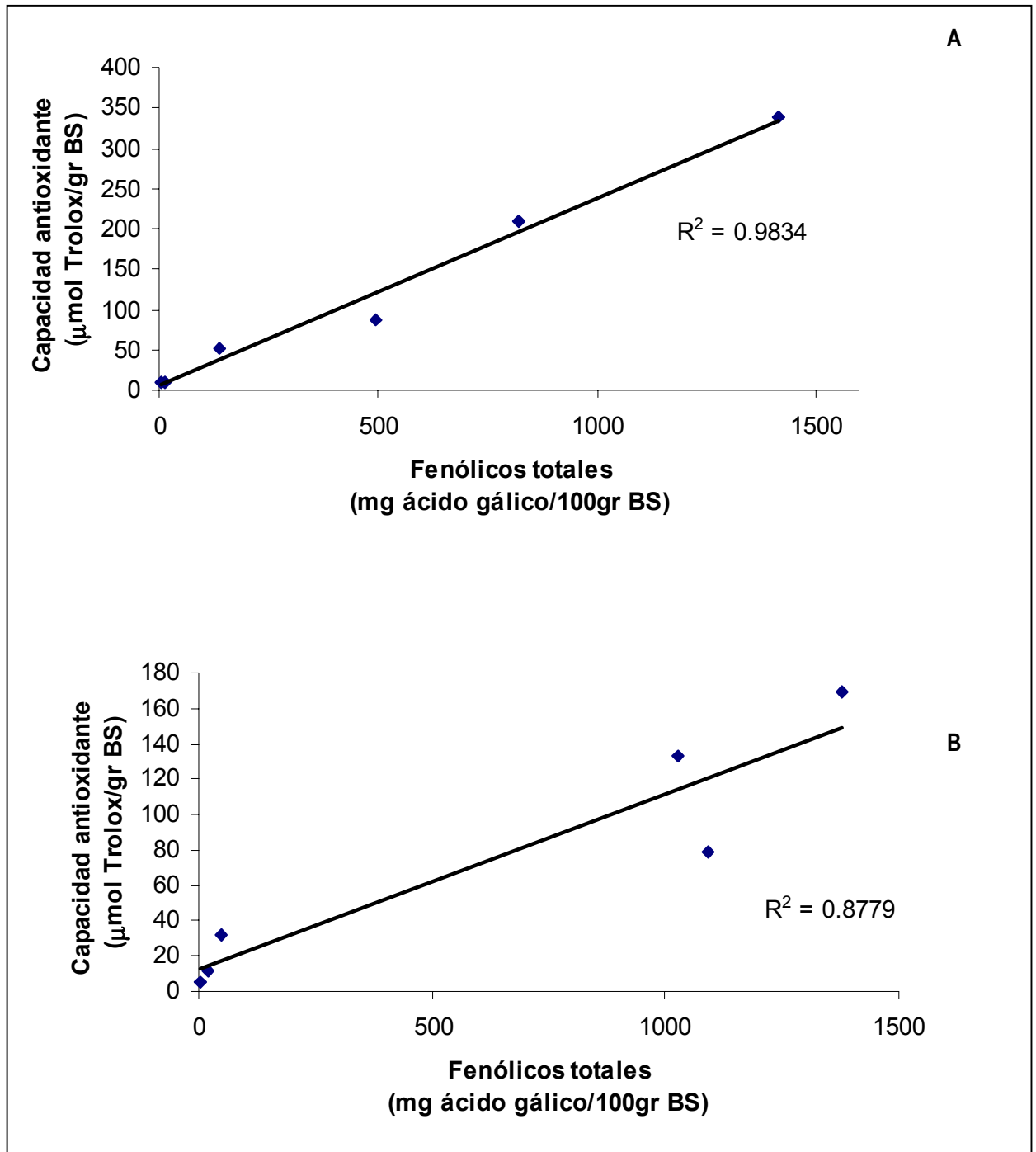


Figura 3.1. Correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenólicos totales presentes en los extractos y fracciones de flor de jamaica (A) y frijol negro (B).

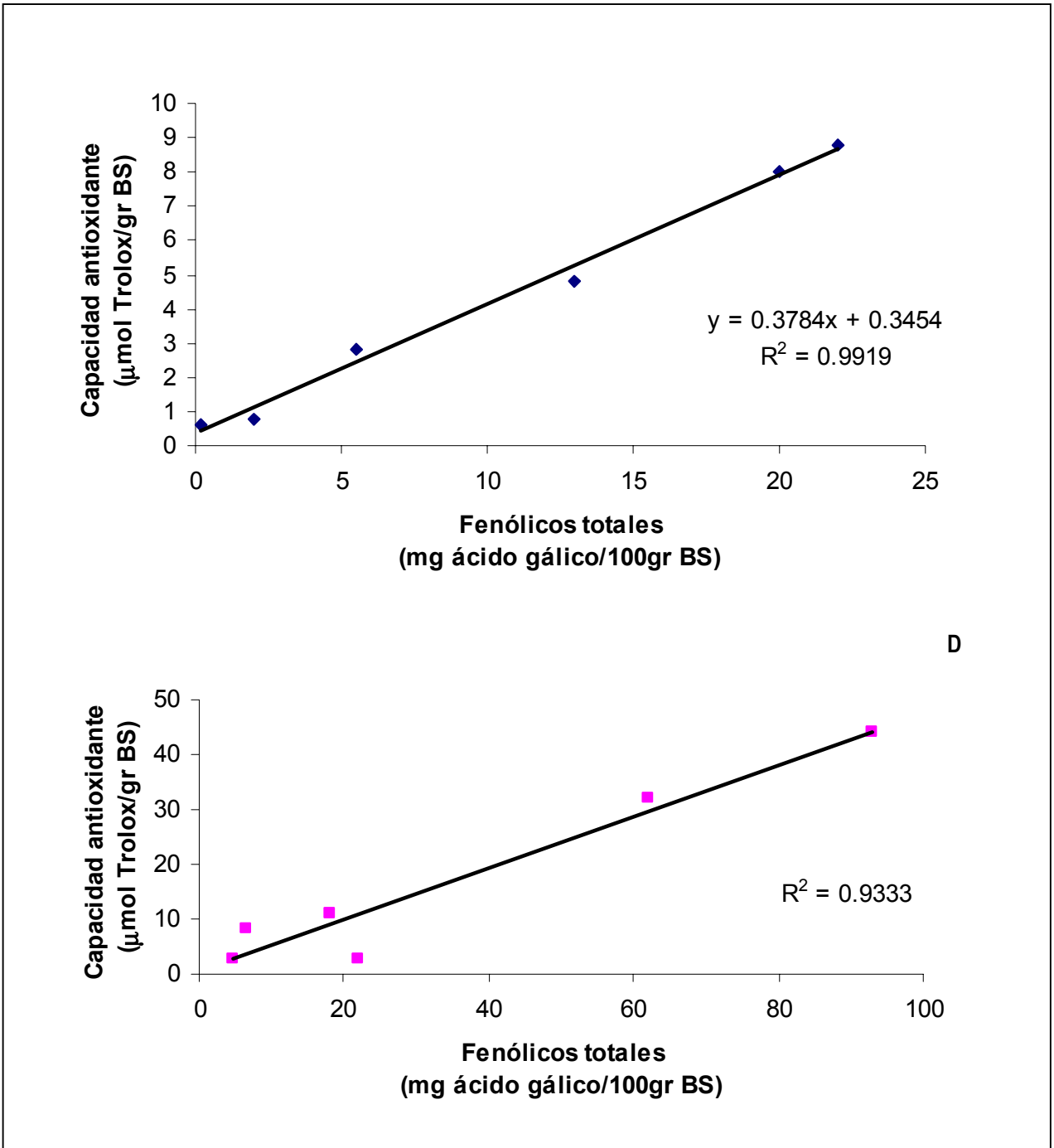


Figura 3.1 (continuación). Correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenólicos totales presentes en los extractos y fracciones del maíz azul (C) y chile poblano (D).

Realizando una comparación entre los Extractos Crudos del frijol negro, maíz azul, chile poblano y flor de jamaica, se pueden ordenar de manera descendiente con base a su valor ORAC específico como, chile poblano > Maíz azul > Flor de jamaica > Frijol negro. Estos resultados sugieren que los compuestos fenólicos presentes en el chile poblano tienen una alta capacidad antioxidante específica comparada con los compuestos fenólicos presentes en las demás fuentes naturales.

Tabla 3.5 Capacidad antioxidante específica de los extractos crudos y fracciones del frijol negro, maíz azul y chile poblano en base seca (BS).

Capacidad Antioxidante Específica ($\mu\text{mol Trolox / mg fenólicos EAG}$)												
Fuente vegetal	Extractos ¹											
	Extracto Crudo		Extracto Crudo Hidrosoluble		Fracción-EtOAc		Fracción-acuosa no ligada		Fracción-acuosa ligada			
Flor de jamaica	23.9	c ²	25.5	c	37.2	b	17.8	c	154.5	a	90.2	a
Frijol negro	12.2	a	13.0	b	65.8	c	7.2	b	52.3	c	107.9	c
Maíz azul	40.2	a	36.8	b	51.0	c	39.5	a	38.7	d	280.4	d
Chile poblano	47.3	a	52.5	b	61.3	b	12.5	b	128.4	d	53.8	d

¹Extracto Crudo Hidrosoluble=Compuestos fenólicos no solubles en éter, Fracción-EtOAc= Compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo. Fracción-MeOH= Compuestos fenólicos solubles en metanol. Fracción-acuosa-no ligada= Compuestos fenólicos no ligados a C₁₈ pH 3.5. Fracción-acuosa ligada= Compuestos fenólicos ligados a C₁₈ pH 3.5. ²Valores con diferentes letras entre una misma fila indican que los valores del extracto crudo y de las fracciones son significativamente diferentes. (LSD prueba, P<0.05).

3.4 Conclusiones

El presente estudio permitió comparar de manera efectiva la capacidad antioxidante de la flor de jamaica con otras fuentes naturales de importancia económica y agrícola del país como lo son el frijol negro, maíz azul y chile poblano. El estudio comparativo resalto a la flor de jamaica como el producto con la de mayor capacidad antioxidante (338 $\mu\text{mol Trolox/ g BS}$) seguida del frijol negro, chile poblano y por último el maíz azul. Según los resultados obtenidos se logró demostrar que las capacidades antioxidantes de dichas fuentes naturales (valor ORAC) están correlacionadas con su contenido de fenólicos totales. Se observó que los compuestos presentes en los extractos crudos tienen la capacidad de potenciar la capacidad antioxidante en comparación con cada una de las fracciones. Esto se concluye porque la suma de la capacidad antioxidante en cada una de las fracciones, es menor en comparación con el obtenido para el extracto crudo.

Sin embargo la capacidad antioxidante específica para las fracciones acuosas es mayor en comparación con las demás fracciones y extractos crudos, esto puede ser atribuido a la presencia de otro tipo de compuestos no fenólicos como ácido ascórbico y saponinas.

REFERENCIAS

1. Vinson JA, Proch J, Bose P. 2001. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. In: Abelson JN, Simon MI, editors. *Methods in Enzymology. Flavonoids and other polyphenols*. 1er ed. San Diego California: Academic Press. 35: 103-111p.
2. Andrlauer W, Fürst P. 1998. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *J Agric Food Chem* 5: 356-360.
3. Badui S. 1997. *Química de los alimentos*. 3er. ed. Alambra mexicana. México D.F. 388-395 p.
4. Bradford M.M. 1976. *Anal Biochem* 72:248.
5. Cao G, Sofic E, Prior RL. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 44:3426-2431.
6. Carey A. 2000. *Organic Chemistry*. Fourth Edition. University of Virginia. U.S.A.
7. Castellanos J. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 47: 2.
8. Cevallos-Casals B y Cisneros-Zevallos L. 2003. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *J Agric Food Chem* 51:3313-3319.
9. Chen CC, Chou FP, Ho YC, Lin WL, Kao ES, Huang AC, Wang CJ. 2004. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. *J Sci Food Agric* 84:1989–1996.
10. Chen CC, Hsu J, Wang S; Chiang H, Yang M, Kao ES; Wang AC; 2003. *Hibiscus sabdariffa* Extract Inhibits the Development of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits. *J Agric Food Chem* 48:2135 -2141.
11. Cronquist A, 1968. *The evolution and classification of flowering plants*. 1er ed. Nueva York: Houghton Mifflin. 200p.
12. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. 2003. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). Aprobado para publicación Journal Series No. R-09051.
13. DeLang R, Glazer A. 1989: Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Peroxy Radicals: A Screen for Biologically Relevant Protective Agents. *Analyt Biochem* 177:300-306.
14. Fennema, O. 1996. *Food Chemistry*. 3era ed. Nueva York: Dekker. 254-260p.
15. Fossen T, Slimestad R, Andersen OM. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J Agric Food Chem* 49:2318-2321.
16. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. 1994. Quantitation of Phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 42:1905–1913.
17. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 61:549.
18. Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M. 2000. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antiox Redox Signal* 2:491-506.

19. García H. 1995. Efecto del deterioro de tres tamaños de semilla de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). 1er. ed. México D.F. 14-18p.
20. German JB, Walzem RL. 2000. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* 20:561-593.
21. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agric Food Chem* 46:361-367
22. Harborne JB, Mabry TJ. 1982. *The Flavonoids: Advances in research*. Cambridge: Chapman and Hall 261-273p.
23. Harborne JB, Williams CA. 2000. Review. *Advances in Flavonoid Research since 1992*. *Phytochemistry* 55:481-504.
24. Harborne JB. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Dey PM, Harborne JB. (Ed) Academic Press, Oxford. 283-323p.
25. Harborne, JB, Gavazzi G. 1969. Effect of *Pr* and *pr* alleles on anthocyanin biosynthesis in *Zea mays*. *Phytochemistry* 8:999-1001.
26. Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chavez-Soto MA, Tortoriello J. 2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine* 11:375-382.
27. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan M.B, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342:1007-1011.
28. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. 1992. Content of potentially anticarcinogenic Flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40:2379-2383.
29. Hong V, Wrolstad RE. 1990. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanin. *J Agric Food Chem* 38:708-715.
30. Janoszka B, Wielkoszyński T, Tyrpień K, Dobosz C, Bodzek D. 2003. Effect of Steroid Hormones on Results from the determination of oxysterol by TLC. *Acta Chromatographica*. 13:95-101
31. Jaworski AW, Lee CY. 1987. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J Agric Food Chem* 35:249-251.
32. Kalt W, Forney CF, Martin A, y Prior RL. 1999. Anti-oxidant capacity, vitamin C. Phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agric and Food Chem* 47: 638-4644.
33. Lee MJ, Chou FP, Tseng TH, Lin MC, Wang CJ. 2002. Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J of Agric and Food Chem* 50:2130-2136.
34. Mabry T, Markham K, Thomas M. 1991. *The systematic Identification of flavonoids*. Academic Press. New York. 11, 13, 45p.
35. Markakis P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colours* New York. Academic Press. 63-180p.
36. Materska M, Piacente S, Stochmal A, Pizza, C, Oleszek W, Perucka, I. 2003. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry* 63: 893-898.
37. Mazza G, Brouillard R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem* 25:207-225.

38. Mazza G, Fukumoto L, Delaquis B, Girard B, Ewert B. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from British Columbia. *J Agric Food Chem* 47: 4009-4017.
39. Mazza G, Miniati E. 1993. Introduction. In: Mazza, G. and Miniati, E. editors. *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. 2a ed. Boca Raton: CRC Press. 1-5p.
40. Miesan KH, Mohamed S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem* 49:3106-3112.
41. Myant NB. 1990. Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor. Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA. pp. 56, 100, 114.
42. Onyenekwe PC, Ajani EO, Ameh DA, Gamaniel KS. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 17:199-206.
43. Oszmianski J, Ramos T, Bourzeix M. 1988. Fraction of phenolic compounds in red wine. *Am. J Enol Vitic* 39(3): 259-262.
44. Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, J. 2002. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J Sci Food Agric* 82:1003-1006.
45. Secretaria de Salud. Principales causas de mortalidad hospitalaria. <http://www.salud.gob.mx>. Fecha de consulta: Agosto, 2005.
46. Prior R and Cao G. 2000. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J of the AOAC International* 83 (4): 950-956.
47. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B. and Jacob R. 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J Agric Food Chem* 51:3273-3279.
48. Prottogente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van de Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad Res* 36:217-233.
49. Rice-Evans C, Packer L. 2003. *Flavonoids in health and disease*. 2nd Ed. Nueva York: Marcel Dekker Inc. 72-79p.
50. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 66:401-436.
51. Romero C, Bakker J. 1999. Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *J Agric Food Chem* 47 (8):3130-3139.
52. Rubies J. 1993. *El colesterol*. 1er. Ed. Diana. México.
53. Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. 2002. Inhibition of Intestinal Motility by Methanol Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in Rats. *Phytotherapy Research* 16:283-285.
54. Sankara SS, Nair AGR. 1972. Flavonoids of four Malvaceous plants. *Phytochemistry* 11: 1518-1519.
55. Schonfeld G, Patsch W, Rude1 LL, Nelson C, Epstein M, Olson RM. 1982. Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma lipoproteins. *J Clin Invest* 69:1072-1080.
56. Siriwoharn T. y Wrolstad RE. 2004. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Journal of Food Science* 69(4): 233-240

57. Soleas GJ, Tomlinson G, Diamandis EP, & Goldberg DM. 1997. Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: development of a predictive model. *Journal of Agric and Food Chem* 45:3995-4003.
58. Solomons T, Gram W. *Química Orgánica*. 2da. Ed. Limusa Wiley. México. 2000.
59. Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10:63-68.
60. Tijburg LBM, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. 1997. Tea flavonoides and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:771-785.
61. Tsai P, McIntoshb J, Pearceb P, Camdenb B, Jordanc BR. 2001. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract *Food. Research International* 35:351-356.
62. Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin-Wu HW, Wang CJ. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 35:1159-1164.
63. Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem* 43:2800-2802.
64. Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. 1998. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *J Agric Food Chem* 46:3630-3634.
65. Voet D, Voet J. 2004. *Biochemistry*. 3er. Ed. Nueva York. John Wiley & Sons. U.S.A.
66. Walter J. 1975. *The biology of plant phenolics*. 1era. Ed. New York: Edward Arnold Limited. 57p.
67. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. 2000. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol* 38: 411-416.
68. Whitney E.N. y Rolfes S.R. 2004. *Understanding Nutrition*. 10th. Thomson Whadsworth. USA.
69. Wong P, Yusof S, Ghazali H. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Nutrition and Food Science* 32:68-73.
70. Wrolstad RE. 1976. Color and pigment analysis in fruit products. Bull N° 624. Oregon Agricultural Experiment Station, Corvallis, OR.
71. Yagoub A, Mohamed B, Ahmed A, Tinay A. 2004. Study on furundu, a traditional sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition, and functional properties of the total proteins. *J Agric Food Chem* 52:6143-6150.
72. Zazueta-Morales J, Martínez-Bustos F, Jacobo-Valenzuela N, Paredes-López O. 2001. Effect of the addition of calcium hydroxide on some characteristics of extruded products from blue maize using response surface methodology. *Journal Sci Agric* 81:1379-1386.
73. Zheng W and Wang SY. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165-5170.

ANEXO 1

EXPLICACIÓN DETALLADA DEL MODELO MATEMÁTICO “ASOCIACIÓN EXPONENCIAL UNIDIMENSIONAL” PARA LA OBTENCIÓN DE LOS VALORES IC50

El modelo matemático de asociación exponencial unidimensional describe el comportamiento de los datos experimentales del ensayo de la capacidad de inhibición de extractos de flor de jamaica y sus fracciones ante la oxidación de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH. La modelación matemática permite la obtención de los valores IC50, lo cual puede ser útil en experimentos similares.

El modelo matemático asociación exponencial unidimensional es de regresión no lineal y su ecuación de partida es $Y = Y_{\max}(1 - e^{-k \cdot x})$ en donde:

X = concentraciones del extracto (μM de fenólicos EAG)

Y = Porcentaje de inhibición

Ymax = porcentaje máximo de inhibición (100%)

Este modelo permite calcular los nuevos valores de Y' de una modelación a una pendiente (K) la cual está en función de la concentración de la muestra (X). El valor IC50 se obtuvo cuando los valores X son iguales a 0.5 Ymax (50% Inhibición).

A continuación se ejemplifica la obtención del IC50 del Extracto Crudo Hidrosoluble desarrollando el modelo en Microsoft Office– Excel (Redmond, Washington, USA) cabe recalcar que el análisis de los resultados se llevó a cabo mediante la modelación matemática utilizando el programa Grap Pad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego CA., USA).

Tabla A1. Valores experimentales para una repetición con el Extracto Crudo Hidrosoluble en el bioensayo de la capacidad de inhibición de extractos de flor de jamaica y fracciones ante la oxidación de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH

X (μM de fenólicos EAG)	Y % Inhibición de oxidación de LDL
0	0
1	12
3	22
5	37
8	59
10	71
15	85
20	91

1.-Despejar K a partir de la ecuación general del modelo matemático $Y = Y_{\max}(1 - e^{-k \cdot x})$ Despejando k:

$$\frac{Y}{Y_{\max}} = (1 - e^{-k \cdot x}) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\frac{Y}{Y_{\max}} - 1 = (-e^{-k \cdot x})$$

$$-\frac{Y}{Y_{\max}} + 1 = (+e^{-k \cdot x})$$

$$\text{Ln}\left(1 - \frac{Y}{Y_{\max}}\right) = -kx$$

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{Y}{Y_{\max}}\right)}{x} \quad \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo los valores experimentales de la Tabla A1 en la ecuación 2

Para X=1, Y =12:

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{12}{100}\right)}{1} = 0.127833$$

Para X= 3, Y= 22

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{22}{100}\right)}{3} = 0.08282$$

Para X= 5, Y= 37

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{37}{100}\right)}{5} = 0.092407$$

Para X= 8, Y= 59

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{59}{100}\right)}{8} = 0.11145$$

Para X= 10, Y= 71

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{71}{100}\right)}{10} = 0.123787$$

Para X= 15, Y= 85

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{85}{100}\right)}{15} = 0.126475$$

Para X= 20, Y= 91

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{91}{100}\right)}{20} = 0.120397$$

Promedio de valores de **k = 0.0112167**

Una vez obtenida la k con los datos experimentales, se obtuvieron los nuevos valores de X' a partir de realizar incrementos en concentración de fenólicos muy pequeños, utilizando intervalos de cambio de 0.02 y sustituyendo en la Ecuación 1 se generaron nuevos valores, algunos de ellos se muestran en Tabla A2. Los valores de Y' se obtuvieron sustituyendo en la Ecuación 1 los valores de X' y el promedio del valor k. Es importante mencionar que mientras más pequeño sea el intervalo de los datos, el valor de IC 50 se mantiene constante.

Tabla A2. Valores de X' y Y'

X' (μM de fenólicos EAG)	Y' % Inhibición de oxidación de LDL
0	0
0.1	1.115404238
1	10.61052
2	20.0952
3	28.57352
4	36.15223
5	42.92681
6	48.98257
6.16	49.89000293
<u>6.18</u>	<u>50.00229085</u>
6.2	50.11432715
7	54.39579
8	59.23463
9	63.56005
10	67.42651
11	70.88273
12	73.97222

Tabla A2 (continuación). Valores de X' y Y'

X'	Y'
(μM de fenólicos EAG)	% Inhibición de oxidación de LDL
13	76.7339
14	79.20256
15	81.40927
16	83.38185
17	85.14512
18	86.7213
19	88.13024
20	89.968

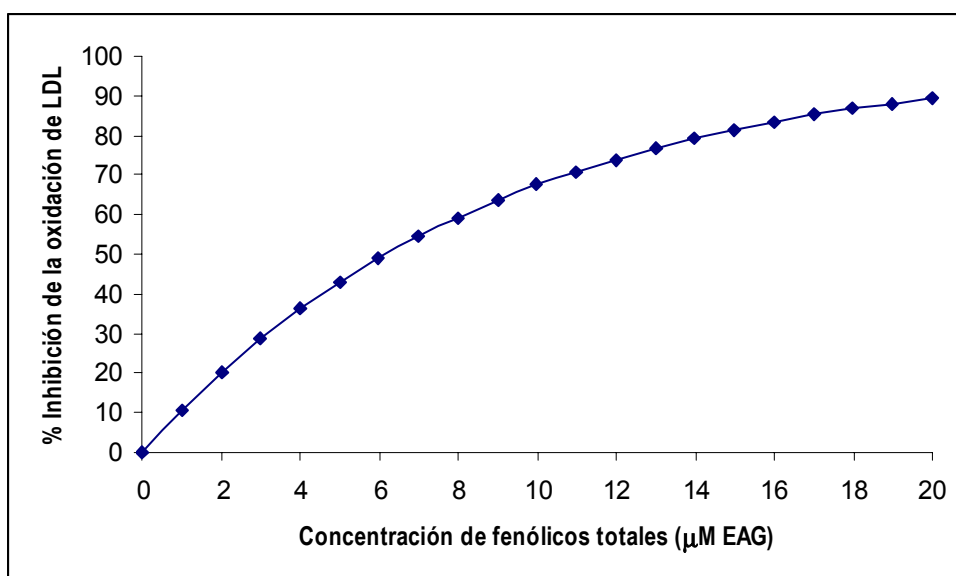


Figura A1. Línea de tendencia según la ecuación de asociación exponencial unidimensional de los compuestos antioxidantes del Extracto Hidrosoluble de la flor de jamaica ante la oxidación de LDL inducida por el generador de radicales libres AAPH

El valor IC 50 obtenido a través del modelo matemático (tabla A2) es a una concentración de 6.18 μM EAG, y se puede corroborar gráficamente en la Figura A1.