



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la vida útil de un extracto con polifenoles procedentes de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Emily Vanessa Aldás Loma

Tutor: Mg. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Danae Fernández Rivero

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 17 de enero de 2025.



Mg. Danae Fernández Rivero

1757181209

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Emily Vanessa Aldás Loma, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Emily Vanessa Aldás Loma

1805345871

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Emily Vanessa Aldás Loma

1805345871

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Firmado electrónicamente por:
**LORENA DE LOS
ANGELES NUNEZ
VILLACIS**

Presidente del Tribunal



Firmado electrónicamente por:
**WILLIAM RICARDO
CALERO CACERES**

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859



Firmado electrónicamente por:
**SANTIAGO ESMIRO
CADENA CARRERA**

Dr. Santiago Esmiro Cadena Carrera

1715602593

Ambato, 3 de febrero de 2025

DEDICATORIA

A quienes creyeron en mí, que con su amor y apoyo se convirtieron en la fuerza que me impulso a seguir adelante, y a quienes, desde el cielo o la tierra siempre han sido mi inspiración más grande.

*A **Dios**, por permitirme llegar hasta aquí, por darme sabiduría y paz tanto en los momentos más adversos como en los días de alegría. Gracias por ser la luz en este camino y por darme la fortaleza para alcanzar este logro.*

*A mis padres **Graciela** y **Freddy**, por enseñarme con su ejemplo que los sueños se alcanzan con esfuerzo y dedicación. Este logro es el reflejo del amor, esfuerzo, y sacrificio que han puesto en mi vida.*

*A mi hijo **Nicolás**, la luz que ilumina mis días, cada esfuerzo, cada sacrificio y cada sueño han tenido como inspiración su sonrisa. Este logro es tan tuyo como mío.*

*A mi hermana **Doménica**, por el apoyo incondicional brindado a lo largo de mi vida, las palabras de aliento y confianza en mí han sido fundamentales para llegar hasta aquí.*

~ Los amo con el corazón

Emily

AGRADECIMIENTO

*A **Dios**, por el propósito, la paciencia y la gracia que hicieron posible este sueño.*

*A mis dos grandes ejemplos, mis padres **Graciela** y **Freddy** por el apoyo incondicional a lo largo de mi vida, a mi madre porque cada día a creído en mí y me ha impulsado a no rendirme, a ella le debo cada triunfo porque estoy segura que sin su apoyo, amor y fé no podría haber llegado hasta aquí, todo su esfuerzo y los días arduos de trabajo se ven reflejados en el éxito de hoy, gracias a la vida por permitirme tener un ejemplo de mamá y por jamás cortarme las alas, si no empujarme a volar y saber que el cielo es el límite. A mi padre porque a pesar de su carácter ha hecho de mí una persona con un gran corazón, gracias por darme la confianza para superar cada obstáculo.*

*A mi hermana **Doménica**, gracias por creer en mí incluso en los momentos en los que yo dudé, por los sueños, alegrías, tristezas y desafíos, gracias por caminar siempre conmigo.*

*A mi querido hijo **Nicolás**, quien le da sentido a mi vida y razón a mis esfuerzos, tu presencia me ha inspirado a soñar más alto y a ser mejor cada día. En tus ojos veo mis sueños reflejados y en tu risa encuentro mi impulso para enfrentar cada desafío. Te amo más de que lo que las palabras puedan expresar.*

*A mi gran amor, **Ariel** quien siempre estuvo a mi lado sosteniendo mis sueños como si fueran suyos. Este logro también es tuyo, porque sin tu compañía y apoyo inquebrantable, esto no habría sido posible. Gracias por celebrar cada pequeño logro y recordarme que era capaz de alcanzar este meta, por creer en mí, por motivarme y por ser mi compañero en esta etapa tan importante de mi vida.*

*A mis abuelitos maternos **Hilda** y **Jaime** por cuidarme y regalarme los mejores recuerdos de mi infancia, su apoyo ha sido un abrazo al corazón y un alivio en este camino, a mi abuelita paterna **Alicia**, porque sé que si el cielo no estuviera tan lejos hoy estaría feliz y festejando por verme aquí, su recuerdo sigue siendo mi inspiración.*

*A mi amiga y compañera de laboratorio **Eve**, cada idea, cada discusión y cada esfuerzo compartido nos permitió avanzar y aprender juntas, haciendo de esta experiencia algo mucho más valioso, hemos llegado al final de este gran desafío. A mi amiga de carrera **Yajis** tu amistad, apoyo y motivación han sido fundamentales en este camino lleno de retos y aprendizajes.*

*A mi tutora **Mg. Danae Hernández**, por confiar en mí y por su invaluable orientación, por guiarme en este proyecto y por ser un ejemplo de profesionalismo, entrega y compromiso, gracias.*

~ Con el corazón lleno de agradecimiento, simplemente gracias.

Emily

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Planteamiento del problema y justificación.....	1
1.1.2 Polifenoles.....	2
1.1.2.1 Métodos de extracción de polifenoles en materiales vegetales	3
1.1.3 Antioxidantes	5
1.1.3.1 Estrés oxidativo.....	5
1.1.3.2 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo	6
1.1.3.3 Capacidad antioxidante	7
1.1.3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante	7
1.1.4 Antiinflamatorios	9
1.1.4.1 Inflamación y capacidad antiinflamatoria.....	9
1.1.4.2 Métodos para evaluar la capacidad antiinflamatoria.....	10
1.1.5 Descripción de la planta	10
1.1.5.1 Origen y usos	11

1.1.5.2	Clasificación Taxonómica	11
1.1.5.3	Valor nutricional	12
1.1.6	Vida útil	12
1.1.6.1	Factores que afectan la degradación de los compuestos bioactivos	13
1.1.7	Cinética de degradación	13
1.2	Objetivos.....	15
1.2.1	Objetivo general.....	15
1.2.2	Objetivos Específicos.....	15
1.3	Hipótesis	16
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....		17
2.1	Materiales	17
2.1	Métodos	19
2.1.1	Extracción de compuestos fenólicos de la flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido.	19
2.1.1.1	Obtención de la materia prima	19
2.1.1.2	Preparación del material vegetal.....	20
2.1.1.3	Extracción de compuestos fenólicos.....	20
2.1.1.4	Cuantificación de polifenoles	21
2.1.1.5	Análisis estadístico.....	21
2.1.2	Determinación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto utilizando el método DPPH e inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo	21
2.1.2.1	Análisis de la capacidad antioxidante de los polifenoles empleando el método DPPH (2,2 diphenil-1-1-picrylhdrazil).....	22
2.1.2.2	Determinación de la capacidad antiinflamatoria del extracto obtenido mediante la Inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo.	22
2.1.3	Estimación del tiempo de vida útil del extracto con alto contenido de polifenoles.....	24
2.1.3.1	Análisis de humedad y porcentaje de sólidos solubles totales	24
2.1.3.2	Análisis del pH.....	24
2.1.3.3	Análisis del contenido total de polifenoles	25
2.1.3.4	Análisis de la capacidad antioxidante.....	25

2.1.3.5	Análisis de la capacidad antiinflamatoria	25
2.1.3.6	Determinación de la cinética de reacción	25
2.1.3.7	Análisis de datos	26
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
3.1	Análisis y discusión de resultados	27
3.1.1	Extracción de compuestos fenólicos de la flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido.	27
3.1.1.1	Cuantificación de polifenoles de los extractos obtenidos	27
3.1.1.2	Análisis estadístico.....	30
3.1.2	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto obtenido con mayor concentración de polifenoles.....	33
3.1.4.1	Análisis de la estabilidad del extracto en base al pH	38
3.1.4.2	Análisis de la estabilidad del extracto en función de la humedad.....	40
3.1.4.3	Análisis de la estabilidad del extracto en función de los sólidos solubles totales	42
3.1.4.4	Análisis de la estabilidad del contenido total de polifenoles	42
3.1.4.5	Análisis de la estabilidad de la capacidad antioxidante del extracto	44
3.1.4.7	Determinación de la cinética de reacción	47
3.1.5	Verificación de hipótesis	49
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		50
4.1	Conclusiones.....	50
4.2	Recomendaciones	51
MATERIALES DE REFERENCIA.....		52
ANEXOS.....		64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de extracción convencionales y no convencionales de compuestos bioactivos.....	4
Tabla 2. Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo	6
Tabla 3. Diferentes ensayos empleados en la determinación de la capacidad antioxidante	8
Tabla 4. Clasificación Taxonómica de la flor de Jamaica	11
Tabla 5. Composición proximal de cálices de la flor de Jamaica (100 g).....	12
Tabla 6. Factores cinéticos relacionados a los diferentes ordenes de reacción de degradación	14
Tabla 7. Equipos de laboratorio utilizados.	17
Tabla 8. Reactivos de laboratorio utilizados.	17
Tabla 9. Materiales fungibles de laboratorio utilizados.....	18
Tabla 10. Concentración de polifenoles extraídos de los extractos obtenidos a partir de la flor de Jamaica.	28
Tabla 11. Actividad antioxidante del mejor extracto de flor de Jamaica.	34
Tabla 12. Actividad antiinflamatoria del mejor extracto de flor de Jamaica.	36
Tabla 13. Sólidos solubles totales presentes en el extracto de flor de Jamaica en función a la humedad registrada durante el mes de estudio.	42
Tabla 14. Coeficientes de determinación de los modelos cinéticos de degradación del extracto de flor de Jamaica.	47
Tabla 15. Cálculo del tiempo de vida media y vida útil del extracto de flor de Jamaica en el orden de reacción determinado (Primer orden).....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformación estructural del fenol.	2
Figura 2. Color de referencia de la flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L).	19
Figura 3. Contenido de polifenoles obtenidos de los extractos de flor de Jamaica en cada tratamiento.	29
Figura 4. Diagrama de Pareto de la relevancia de los factores en el contenido de polifenoles del mejor extracto de flor de Jamaica.....	30
Figura 5. Gráfica del efecto de las variables independientes en el extracto de flor de Jamaica con mayor contenido de polifenoles.	31
Figura 6. Gráfica de superficie de respuesta de las variables independientes en el extracto de flor de Jamaica con mayor contenido de polifenoles.....	33
Figura 7. Inhibición de la desnaturalización de albúmina por el extracto de flor de Jamaica y diclofenaco de sodio como control.....	37
Figura 8. Comparación de medias con respecto al pH del extracto.....	39
Figura 9. Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función al pH.....	40
Figura 10. Comparación de medias con respecto a la humedad del extracto.....	41
Figura 11. Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la humedad.....	41
Figura 12. Comparación de medias con respecto al contenido de polifenoles del extracto.	43
Figura 13. Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función al contenido de polifenoles.	44
Figura 14. Comparación de medias con respecto a la capacidad antioxidante del extracto.	45
Figura 15. Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la capacidad antioxidante del extracto.	45
Figura 16. Comparación de medias con respecto a la capacidad antiinflamatoria del extracto.	46
Figura 17. Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la capacidad antiinflamatoria del extracto.	47
Figura 18. Gráficas del orden de reacción (cero y primer orden) del extracto de flor de Jamaica.	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso de obtención de extractos con polifenoles de la flor de Jamaica.	64
Anexo 2. Microplaca para la determinación de polifenoles mediante el método Folin - Ciocalteu....	64
Anexo 3. Curva de calibración de ácido gálico (10 – 100 µL).....	65
Anexo 4. Cuantificación de TPC de cada tratamiento (GAE mg/L).	65
Anexo 5. Fórmula para calcular los polifenoles de cada uno de los tratamientos.	65
Anexo 6. Cuantificación de TPC de cada tratamiento (mg GAE/g PS).	66
Anexo 7. Tabla ANOVA para la cuantificación de polifenoles de la flor de Jamaica, basada en un diseño experimental de dos factores con dos niveles.....	66
Anexo 8. Determinación de la capacidad antioxidante del tratamiento con mayor concentración de polifenoles.	67
Anexo 9. Cálculo demostrativo del porcentaje de inhibición del DPPH.	67
Anexo 10. Curva de calibración de Trolox (50 - 500 µmol/L).....	67
Anexo 11. Proceso de desnaturalización de la albúmina de huevo.	68
Anexo 12. Microplaca de 96 pocillos para la determinación de la actividad antiinflamatoria.	68
Anexo 13. Actividad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica con mayor concentración de polifenoles y del Diclofenaco de sodio (control positivo).	69
Anexo 14. Cálculo ilustrativo del porcentaje de inhibición del extracto mediante la desnaturalización de la albúmina de huevo.	69
Anexo 15. ANOVA del pH en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes. ...	69
Anexo 16. Resumen del pH en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes. ...	70
Anexo 17. ANOVA de la humedad en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.....	70
Anexo 18. Resumen de la humedad del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.	70
Anexo 19. ANOVA del contenido de polifenoles en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.....	71
Anexo 20. Resumen del contenido de polifenoles del extracto de flor de Jamaica con un período de estudio de un mes.....	71
Anexo 21. ANOVA de la capacidad antioxidante del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.	71
Anexo 22. Resumen de la actividad antioxidante del extracto de flor de Jamaica registrado en un mes de estudio.....	72
Anexo 23. ANOVA de la capacidad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.....	72
Anexo 24. Resumen de la actividad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica registrado en un mes de estudio.	72

RESUMEN EJECUTIVO

El enfoque en el aprovechamiento de productos naturales ha crecido considerablemente en los últimos años debido a sus beneficios terapéuticos, entre los que destacan la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Los extractos vegetales representan una importante fuente de compuestos bioactivos, como los polifenoles, que contribuyen de manera directa con estas propiedades. Sin embargo, para asegurar la eficacia y calidad de estos extractos, es esencial determinar su tiempo de vida útil, ya que factores como el pH, la humedad y la temperatura de almacenamiento pueden influir en la estabilidad de estos compuestos. En este estudio se obtuvo el extracto de flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido y la concentración de polifenoles se determinó por medio del método Folin-Ciocalteu, logrando un mayor contenido de polifenoles al emplear una concentración de etanol del 70 por ciento y con una temperatura de extracción de 50 grados centígrados, alcanzando un valor de 62,667 miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco. Posteriormente, se evaluó su capacidad antioxidante a través del ensayo DPPH, obteniendo un 90,886 por ciento de inhibición y con respecto a los equivalentes de Trolox se obtuvo 221,234 micromoles por gramo de peso seco. La actividad antioxidante fue analizada mediante el ensayo de desnaturalización de albúmina de huevo, registrando porcentajes de inhibición entre 38,642 a 62,585. Finalmente, se determinó que la vida útil, almacenado en frascos de vidrio ámbar bajo condiciones de refrigeración, fue de alrededor de 32 días, ajustándose a un modelo cinético de primer orden con una constante de velocidad de 0,0032 por días.

Palabras clave: Flor de Jamaica, extractos vegetales, polifenoles, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, vida útil.

ABSTRACT

The focus on the use of natural products has grown considerably in recent years due to their therapeutic benefits, including antioxidant and anti-inflammatory activity. Plant extracts represent an important source of bioactive compounds, such as polyphenols, which contribute directly to these properties. However, to ensure the efficacy and quality of these extracts, it is essential to determine their shelf life, since factors such as pH, humidity and storage temperature can influence the stability of these compounds. In this study, the Jamaican flower extract was obtained by ultrasound-assisted extraction and the concentration of polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method, achieving a higher polyphenol content when using an ethanol concentration of 70 percent and with an extraction temperature of 50 degrees Celsius, reaching a value of 62,667 milligrams of gallic acid per gram of dry weight. Subsequently, its antioxidant capacity was evaluated through the DPPH assay, obtaining 90.886 percent inhibition, and with respect to Trolox equivalents, 221.234 micromoles per gram of dry weight were obtained. The antioxidant activity was analyzed by egg albumin denaturation assay, registering inhibition percentages between 38.642 and 62.585. Finally, the shelf life, stored in amber glass jars under refrigerated conditions, was determined to be about 32 days, fitting a first-order kinetic model with a rate constant of 0.0032 per day.

Key words: Hibiscus flower, plant extracts, polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, shelf life.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Planteamiento del problema y justificación

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta herbácea nativa de África que se ha adaptado correctamente a ciertos lugares de la Costa y Amazonía ecuatoriana, debido a que es una especie que crece en climas tropicales y subtropicales, específicamente a 25°C y a una altitud de 0 a 1400 msnm (**Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019**). La importancia de esta flor radica en sus cualidades medicinales y funcionales, puesto que, en su mayoría sus cálices son empleados en la obtención de diversos beneficios (**Mengo, 2019**). No obstante, a pesar de poseer notables propiedades biológicas, no todas las personas tienen conocimiento de ella y menos aún la incluyen en su consumo.

En los últimos años, diversos estudios han analizado los beneficios de consumir polifenoles para mejorar la salud, debido al contenido de compuestos fenólicos que posee, elementos que le otorgan a esta flor propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (**Nahuatt et al., 2017**). Específicamente, los polifenoles son compuestos bioactivos que poseen la capacidad de equilibrar los radicales libres presentes en el cuerpo, dado que estos compuestos tienen efectos vasodilatadores que ayudan a mejorar el perfil lipídico, reducir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), prevenir el deterioro celular, ayudan en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer y son capaces de regular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (**Quiñones et al., 2016**). Además, los polifenoles presentes en la flor de Jamaica contribuyen al correcto funcionamiento del tránsito gastrointestinal, a través de la estimulación de la eliminación de líquidos y toxinas del organismo (**Anaya, 2021**).

Así mismo, la flor de Jamaica posee efectos diuréticos que pueden favorecer la disminución de la acumulación de líquidos y la hinchazón, contribuyendo de este modo en el alivio de la inflamación (**Batalla-Mayoral et al., 2019**). Por otra parte, los estudios de estabilidad de los polifenoles extraídos de la flor de Jamaica, permiten asegurar que la calidad del producto se mantenga a lo largo del tiempo, debido a que estos estudios garantizan que los compuestos bioactivos se mantengan en concentraciones efectivas, preservando de tal forma su actividad terapéutica. También, ayudan a prevenir la degradación

de los extractos en productos potencialmente tóxicos y evitar la proliferación de contaminantes microbianos (Mallea et al., 2004).

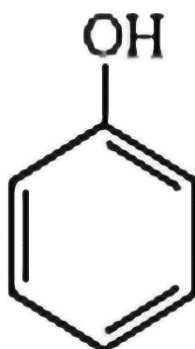
Según **Guardiola y Mach (2014)** los polifenoles de la flor de Jamaica pueden contribuir en el diseño de estrategias de prevención de enfermedades y a la promoción de estilos de vida más saludables. Consecuentemente, en la presente investigación se plantea evaluar la vida útil de un extracto con polifenoles extraídos de la flor de Jamaica con capacidades biológicas lo que serviría como punto de partida para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas y en la elaboración de formas farmacéuticas.

1.1.2 Polifenoles

Los fenoles o también conocidos como polifenoles son metabolitos secundarios caracterizados por tener uno o más anillos aromáticos y al menos dos grupos hidroxilo y se encuentran ampliamente distribuidos en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas de plantas (Li et al., 2023). Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se consideran parte esencial de la dieta humana debido a sus efectos beneficiosos para la salud. Así mismo, se generan a través de las vías metabólicas del fenilpropanoide y el ácido shikímico, desempeñando un papel crucial en la defensa de las plantas contribuyendo significativamente al color, sabor y aroma de especies vegetales (Peñarrieta et al., 2014). Por otro lado, investigaciones epidemiológicas manifiestan que el consumo prolongado de polifenoles derivados de plantas podría ofrecer protección contra enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, diabetes y trastornos neurodegenerativos (Dini y Grumetto, 2022). En la **Figura 1** se presenta la conformación estructural de un fenol.

Figura 1

Conformación estructural del fenol.



Nota. Adaptado de (Wade, 2018).

Según un estudio realizado por **López et al. (2016)** con extractos de cálices de la flor de Jamaica se ha determinado que en los tejidos de estas estructuras existe una alta concentración de antioxidantes fenólicos de tipo extraíbles y no extraíbles. Los polifenoles extraíbles incluyen fenoles monoméricos, oligómeros y algunas fracciones poliméricas, mientras que los no extraíbles consisten en compuestos de alto peso molecular, como taninos hidrolizables, proantocianidinas y ciertos polifenoles que no logran ser extraídos por disolventes comúnmente utilizados (**Sáyago y Goñi, 2014**).

Actualmente, los productos farmacológicos derivados de compuestos naturales que presentan una estructura y funcionalidad singular, se consideran enfoques complementarios prometedores para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y la insuficiencia cardiaca (**Hedayati et al., 2023**).

1.1.2.1 Métodos de extracción de polifenoles en materiales vegetales

La extracción constituye el primer proceso clave en el estudio de plantas con propiedades medicinales, ya que permite obtener los compuestos químicos de interés a partir de los materiales vegetales, facilitando su posterior separación y caracterización (**Sasidharan et al., 2011**). A su vez la selección del disolvente es fundamental, teniendo en cuenta aspectos como la selectividad, la capacidad de disolución y la seguridad. Los disolventes más frecuentemente empleados en los procesos de extracción de polifenoles son el etanol, el metanol, el agua y la acetona, además, basado en las características del compuesto que se desee aislar y extraer es posible combinar diferentes solventes (**Lee et al., 2024**).

El proceso de extracción puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales o técnicas modernas o no convencionales, según la eficiencia buscada y el nivel de sensibilidad de los compuestos (**Jha y Sit, 2022**). Los métodos convencionales suelen tener una extracción limitada, lo que exige realizar varios ciclos para obtener rendimientos adecuados, esta baja eficiencia implica tiempos de procesamiento más prolongados, un mayor consumo de energía y un mayor uso de disolventes lo que reduce la sostenibilidad del proceso (**Mungwari et al., 2024**). Mientras que los métodos no convencionales emplean una cantidad reducida de disolventes orgánicos o más amigables con el medio ambiente y que tienen baja o nula toxicidad, además, requieren menos consumo de energía lo que los convierte en métodos altamente eficientes, capaces de obtener mayores rendimientos y el máximo

porcentaje de compuestos bioactivos (**Awad et al., 2021**). Los distintos métodos de extracción de compuestos bioactivos se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Métodos de extracción convencionales y no convencionales de compuestos bioactivos.

Método	Detalle	Referencias bibliográficas
Métodos convencionales		
Maceración	La muestra vegetal se sumerge en un recipiente con el disolvente a emplear con o sin agitación. Este método requiere una gran cantidad de disolvente y tiempo, además de ofrecer un rendimiento de extracción limitado.	(Nguyen et al., 2024).
Decocción	La muestra en polvo se hierve en un recipiente cerrado con una cantidad de agua adecuada durante aproximadamente 30 minutos o hasta que la mitad del agua se haya evaporado, este método es adecuado únicamente para extraer compuestos bioactivos que sean termoestables y solubles en agua.	(More et al., 2022).
Soxhlet	Método que ofrece alta eficiencia, reduciendo el tiempo y el consumo de disolvente. Sin embargo, las temperaturas elevadas y el tiempo de extracción prologando incrementa el riesgo de degradación térmica de los compuestos.	(Zhang et al., 2018).
Percolación	La percolación es un método más eficiente que la maceración, ya que se trata de un proceso continuo donde el disolvente saturado es sustituido de forma constante por disolvente fresco.	(Zhang et al., 2018).
Métodos no convencionales		

Extracción de fluidos supercríticos (SFE)	En estas condiciones, la polaridad del disolvente se reduce mientras que su capacidad de solubilidad aumenta facilitando que el fluido penetre en las paredes celulares, como resultado los compuestos bioactivos se disuelven y se extraen.	(Patra et al., 2022).
Extracción asistida por microondas (MAE)	Técnica que emplea microondas para mejorar la eficacia y eficiencia en la ruptura celular. La interacción de las microondas genera movimiento molecular, lo que provoca fricción y calor en el material vegetal haciendo que los compuestos se liberen.	(Ridlo et al., 2020).
Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	Este método emplea ondas ultrasónicas que alteran los tejidos de las células vegetales provocando la ruptura de la pared celular, esto mejora considerablemente la tasa de extracción de compuestos en comparación de los métodos convencionales.	(Shen et al., 2023).

Nota. Métodos comúnmente utilizados en la extracción de compuestos bioactivos.

1.1.3 Antioxidantes

1.1.3.1 Estrés oxidativo

Las distintas especies reactivas, como las ROS (especies reactivas de oxígeno) pueden dar lugar a la condición denominada estrés oxidativo **(Carvajal, 2019)**.

Las ROS actúan como mensajeros intracelulares en diversas vías de señalización, desempeñando roles tanto beneficiosos como dañinos. Estas moléculas se producen como subproductos del metabolismo celular, especialmente durante la respiración mitocondrial. En condiciones fisiológicas la producción de ROS a niveles bajas se equilibra con su eliminación, lo que resulta fundamental para la señalización y el funcionamiento celular. Sin embargo, en condiciones patológicas, como la aterosclerosis o la hipertensión arterial la liberación excesiva de ROS supera la capacidad antioxidante del organismo, provocando daño celular y eventualmente muerte celular. Por otro lado, el estrés oxidativo juega un papel crucial en condiciones como el infarto de miocardio, la isquemia y la insuficiencia cardíaca **(Dubois-Deruy et al., 2020)**.

Por lo tanto, el estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes del cuerpo, contribuyendo de tal forma al envejecimiento prematuro y diversas enfermedades crónicas (**Viada et al., 2017**). Este es un proceso nocivo que puede impactar de manera negativa sobre estructuras celulares, incluyendo membranas, lípidos, proteínas, lipoproteínas y ADN (**Pizzino et al., 2017**).

1.1.3.2 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

El estrés oxidativo, causado por un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y otros radicales libres dentro de las células, desempeña un papel clave en el desarrollo y avance de diversas enfermedades (**Reddy, 2023**). En la **Tabla 2** se describe detalladamente varias enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Tabla 2

Enfermedades asociadas con el estrés oxidativo

Enfermedad	Descripción
Enfermedades Cardiovasculares	El estrés oxidativo contribuye a la formación de placa en las arterias (aterosclerosis), esta acumulación de placa puede generar complicaciones, como la reducción del flujo sanguíneo hacia el corazón e incluso un ataque cardíaco.
Cáncer	El estrés oxidativo provoca daños en el ADN de las células sanas, lo que puede elevar el riesgo de desarrollar cáncer.
Enfermedades Neurológicas	El exceso de radicales libres favorece la degeneración neuronal, lo que puede llevar de manera progresiva a padecer Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple.
Artritis Reumatoide	Los radicales libres desempeñan un papel fundamental en la inflamación crónica que caracteriza la artritis reumatoide.
Enfermedad Renal	El estrés oxidativo prologando puede generar la formación de tejido cicatricial en los riñones, afectando su capacidad para funcionar correctamente y desencadenando insuficiencia renal.

Nota. Información recopilada de **Pizzino et al. (2017); Cleveland Clinic (2024)**.

1.1.3.3 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de un compuesto o una enzima para reducir la generación de oxidantes o especies reactivas, el mecanismo mediante el cual se ejerce la acción antioxidante implica la interacción de una carga eléctrica no equilibrada con los radicales libres que pueden ser átomos, moléculas o iones (**Silvestrini et al., 2023**). A esto se suma que, los compuestos bioactivos como los polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos son poderosos antioxidantes que juegan un papel importante en la protección celular contra el daño oxidativo.

Ahora bien, los antioxidantes son sustancias producidas por las plantas en diversas partes de su estructura como frutos, hojas, ramas, raíces entre otras. Estos compuestos poseen grupos hidroxilo (-OH) que están unidos por anillos bencénicos (**Zamora et al., 2018**). **Munteanu y Apetrei (2021)** mencionan que, según su mecanismo de acción los antioxidantes se pueden dividir en primarios y secundarios. Estos compuestos previenen la propagación de las reacciones en cadena de oxidación al funcionar como donadores e hidrogeno o aceptores de radicales libres, formando radicales libres más estables.

De acuerdo con **Sáyago y Goñi (2014)** la flor de Jamaica revela que los cálices y sus residuos son las partes más abundantes en fibra antioxidante y compuestos fenólicos, por lo tanto, emplearlos como ingredientes funcionales con un alto contenido de fibra antioxidante podría incrementar su valor añadido, además de proporcionar una calidad nutricional elevada en los alimentos funcionales elaborados a partir de estas materias primas naturales.

1.1.3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de extractos vegetales puede evaluarse empleando diversos métodos según las reacciones químicas implicadas, estos ensayos se clasifican en dos categorías principales: los basados en la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) y los que dependen de la transferencia de un único electrón (SET), sin embargo, algunos ensayos se clasifican de forma mixta HAT y SET (**Shahidi y Zhong, 2015**). En la **Tabla 3** se presenta una descripción de los diversos tipos de ensayos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante.

Tabla 3*Diferentes ensayos empleados en la determinación de la capacidad antioxidante*

Ensayo de capacidad antioxidante	Principio del método	Reacción	Determinación del producto final
DPPH	Reacción antioxidante con un radical orgánico.	Mixta	Colorimetría
ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico.	Mixta	Colorimetría
FRAP	Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III).	SET	Colorimetría
PFRAP	Reducción de ferrocianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción del ferrocianuro de potasio Fe ³⁺ .	SET	Colorimetría
CUPRAC	Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes.	SET	Colorimetría
ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo inducida por AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano).	HAT	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína.

Nota. DPPH Eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; ABTS: Eliminación del catión radical (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)); FRAP: Poder antioxidante reductor férrico; PFRAP: Poder antioxidante reductor del ferricianuro de Potasio; CUPRAC: Capacidad antioxidante reductora del ion cúprico; ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Información tomada de **Moharram y Youssef (2014)**.

Uno de los métodos más utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales es el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), puesto que es un método rápido, sencillo, asequible, válido, preciso y muy empleado en la evaluación de antioxidantes, debido a que el compuesto radical es estable y no requiere ser generado (**Baliyan et al., 2022**).

Por otro lado, este método destaca por permitir la reacción de la muestra con DPPH en una mezcla de metanol – agua lo que facilita la extracción de los compuestos antioxidantes presentes. A diferencia de otros métodos que pueden estar limitados a compuestos solubles en solventes específicos este ensayo

es versátil pudiéndose emplear en solventes acuosos, orgánicos y no polares, lo que lo hace adecuado para analizar antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos, sumado a esto, el ensayo DPPH reacciona con la totalidad de la muestra e incluso con los antioxidantes más débiles **(Kedare et al., 2011)**.

1.1.4 Antiinflamatorios

1.1.4.1 Inflamación y capacidad antiinflamatoria.

La inflamación constituye una respuesta compleja que tiene el propósito de eliminar estímulos dañinos provenientes del entorno interno y externo del huésped. La inflamación se inicia cuando el cuerpo detecta una lesión, infección o presencia de agentes extraños como virus o bacterias, en respuesta a estos estímulos, las células del sistema inmunológico liberan sustancias químicas, como histaminas, prostaglandinas y citocinas, las cuales desencadenan una serie de procesos en el tejido afectado, estos incluyen la dilatación de los vasos sanguíneos para incrementar el flujo de sangre hacia la zona dañada, provocando enrojecimiento y aumento de la temperatura local **(Estrada et al., 2018)**.

Los extractos vegetales se han empleado como agentes terapéuticos naturales en el tratamiento de la inflamación, la cual se caracteriza por una producción excesiva de mediadores inflamatorios, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las citoquinas proinflamatorias **(Rodríguez-Yoldi, 2021)**. El potencial que tiene un extracto natural para disminuir la reacción inflamatoria del cuerpo se conoce como capacidad antiinflamatoria **(Narayanaswamy y Veeraragavan, 2020)**.

Por otra parte, una reacción inflamatoria normal se caracteriza por la llegada de leucocitos y la liberación de mediadores inflamatorios en el lugar de la lesión, lo que eventualmente se controlará con la acción de mediadores antiinflamatorios **(Sánchez y Hernández, 2011)**. En consecuencia, en varios casos es necesario suministrar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que disminuyen el dolor y la inflamación al inhibir el metabolismo del ácido araquidónico a través de la enzima ciclooxigenasa. No obstante, su uso está limitado en términos de dosificación y frecuencia debido a su alto potencial de toxicidad gastrointestinal y hepática, es por esto que los extractos de flor de Jamaica resultan ser una alternativa natural para sustituir estos medicamentos **(Geeganage y Gunathilaka, 2024)**.

1.1.4.2 Métodos para evaluar la capacidad antiinflamatoria

La capacidad que tiene un compuesto para reducir la inflamación puede evaluarse a través de diversos métodos, ya sea mediante estudios *in vitro* o *in vivo* (**Shaikh et al., 2015**). Dentro de los métodos *in vivo* se establece el modelo de Edema de pata de rata inducido por carregina, cuyo fundamento se basa en inyectar una cantidad de carregina en el tejido subplantar de la pata de rata y medir la inflamación provocada, además se emplea un fármaco antiinflamatorio estándar para calcular el porcentaje de inhibición que este genera (**Meshram et al., 2016**). Por otro lado, también se encuentra el método de Edema de oído inducido por aceite de crotón, el edema se genera aplicando aceite de crotón y el grosor generado se mide antes del tratamiento y varias horas después de inducir la inflamación (**Almeida, 2019**). Sin embargo, el incremento significativo de los costos y cuestiones éticas con el uso de modelos animales han impulsado el desarrollo de métodos *in vitro* para la investigación de nuevos fármacos (**Van Norman, 2019**).

Entre los métodos *in vitro*, la desnaturalización de la albumina de huevo es uno de los métodos más empleados para evaluar el potencial antiinflamatorio de extractos de plantas, en el cual se analiza la capacidad de los compuestos para impedir la desnaturalización de proteínas. En consecuencia, los compuestos que logran inhibir este proceso son considerados como potencialmente valiosos debido a su posible actividad antiinflamatoria (**Chaiya et al., 2022**). Según **Madhuranga y Samarakoon (2023)**, la desnaturalización sucede cuando una proteína cambia su estructura y pierde su actividad biológica, este fenómeno se produce al exponer la proteína a extremos de calor, pH u otros agentes desnaturalizantes.

1.1.5 Descripción de la planta

La flor de Jamaica de nombre científico *Hibiscus sabdariffa* L., es una planta perteneciente a la familia botánica Malvaceae, crece y se desarrolla hasta llegar a una altura máxima de 3 m. Presenta hojas alternas en el tallo, con una forma tri o pentalobulada y una longitud de aproximadamente 15 cm. Las flores poseen un diámetro que varía entre 8 y 10 cm, la parte basal de las flores exhibe un tono rojo que se desvanece hacia los extremos, mostrando un color más claro. Sin embargo, lo que más destaca de esta flor es el cáliz, el mismo que presenta un tono rojo intenso llamativo, además es carnoso y contiene una notable cantidad de ácido málico y de compuestos bioactivos (**Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021**). Así mismo, la flor de Jamaica es una fuente natural de fibra con propiedades

antioxidantes, antiinflamatorias, antisépticas, purgativas, diuréticas, astringentes, emolientes y sedantes **(Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016)**.

1.1.5.1 Origen y usos

La flor de Jamaica es originaria de África tropical, desde Egipto y Sudán hasta Senegal. Sin embargo, debido a sus propiedades medicinales o su agradable sabor en infusión, se cultiva también en otras regiones favorables como el sudeste de Asia, Centroamérica y el Caribe **(Castro, 2018)**. Por otro lado, esta planta se desarrolla en localidades con condiciones de sequedad, mostrando una notable capacidad de ajuste a entornos tropicales y semi tropicales. Sin embargo, es una especie delicada en términos climáticos, demostrando sensibilidad a ciertas condiciones, es bastante resistente al frío y puede adaptarse eficientemente a áreas con climas templados **(Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016)**.

Esta flor posee diversos usos, entre los cuales destacan tres, en el área culinaria, se la utiliza para hacer infusiones, bebidas refrescantes, mermeladas, salsas y conservas. En el ámbito medicinal, se le atribuye propiedades diuréticas, antiinflamatorias, antioxidantes y antihipertensivas, además de ser usada tradicionalmente para aliviar problemas digestivos y resfriados. Finalmente, en la industria los pigmentos derivados de la flor de Jamaica se utilizan como colorantes naturales en la formulación de alimentos y productos cosméticos **(González, 2020)**.

1.1.5.2 Clasificación Taxonómica

Según **Sayágo et al. (2018)** la taxonomía de la flor de Jamaica se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 4

Clasificación Taxonómica de la flor de Jamaica

Nombre científico	Hibiscus sabdariffa
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Anthophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvácea
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>Sabdariffa</i> Linn

Nota. Información tomada de **Sayágo et al. (2018)**.

1.1.5.3 Valor nutricional

De acuerdo a estudios realizados por **Hernández y López (2019)** ; **Sáyago y Goñi (2014)**, los cálices de la flor de Jamaica presentan los siguientes componentes:

Tabla 5

Composición proximal de cálices de la flor de Jamaica (100 g)

Composición	Cantidad
Proteínas	1,9 g
Grasas	0,1 g
Carbohidratos	12,3 g
Fibra	2,3 g
Vitamina C	14 mg
β-caroteno	300 µg
Calcio	1,72 mg
Hierro	57 mg
Polifenoles	66 mg/1000 mL

Nota. Información tomada de **(Hernández y López, 2019 ; Sáyago y Goñi, 2014)**.

1.1.6 Vida útil

La vida útil se define como el tiempo necesario para que se produzca una degradación del 10% de un compuesto bioactivo, mientras que la vida media de una reacción corresponde al tiempo requerido para que la concentración inicial del compuesto disminuya en un 50% (**Lozano et al., 2012**).

La duración de la vida útil de un producto es crucial para asegurar la calidad y seguridad del mismo a lo largo del tiempo (**Verma et al., 2021**). Es por esto que, Ecuador al estar regulado por el ARCSA, sigue un conjunto de directrices y normativas internacionales para evaluar los productos farmacéuticos. Esto incluye la guía científica del ICH, particularmente la norma Q1A(R2) que se centra en la estabilidad de las sustancias y productos farmacéuticos nuevos. Aunque esta norma no aborda específicamente a los extractos naturales, presenta recomendaciones generales. Entre estas recomendaciones se aborda el diseño del estudio de estabilidad, esencial para estimar la duración del producto, implicando la selección apropiada de las condiciones de almacenamiento y seguridad (**European Medicines Agency, 2003**).

La vida útil de los productos está estrechamente relacionada con las condiciones de almacenamiento, las cuales pueden proporcionar un ambiente favorable o desfavorable para el desarrollo de patógenos y microorganismos responsables de la descomposición **(Sattar et al., 2020)**.

1.1.6.1 Factores que afectan la degradación de los compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos presentes en plantas, frutas verduras y especias son altamente susceptibles a degradarse debido a diversos factores como la acción de enzimas, tratamientos térmicos, variaciones de pH, procesos de oxidación, exposición a la luz o hidrólisis. Entre las principales reacciones de degradación de compuestos se encuentran la oxidación de fenoles, flavonoides, glucósidos y la oxidación e hidrólisis de la vitamina C y de ésteres **(ElGamal et al., 2023)**.

Por otro lado, se recomienda el uso de frascos de color ámbar para almacenar extractos de plantas y evitar la degradación, estos frascos están específicamente diseñados para contener soluciones sensibles a la luz. La característica principal de estos envases radica en que están fabricados con vidrio de borosilicato de tonalidad ámbar, lo cual impide la penetración de la luz y protege así las sustancias vegetales de los efectos nocivos de los rayos UV **(Mariaki et al., 2016)**.

1.1.7 Cinética de degradación

La degradación de extractos naturales puede seguir diferentes órdenes de reacción, dependiendo de la naturaleza de los compuestos y las condiciones en las que se encuentra, entre los que se identifican: orden cero y primer orden **(Palazón et al., 2002)**. En las reacciones de orden cero la descomposición de los compuestos ocurre de manera independiente a su concentración, mientras que en las reacciones de primer orden están directamente relacionadas con la concentración de los reactivos, además, este tipo de orden de reacción es uno de los más comunes dentro de la cinética de degradación de extractos naturales **(Lozano et al., 2012)**.

Lozano et al. (2012) mencionan que determinar la vida útil de un producto es fundamental, por otro lado, las pruebas de estabilidad están regidas por las normas ICH, cuyo objetivo es garantizar que el producto mantenga su calidad, seguridad y eficacia.

En la **Tabla 6** se presentan las ecuaciones correspondientes a los distintos ordenes de reacción de degradación, las mismas que se emplearon en la determinación del tiempo de vida útil.

Tabla 6

Factores cinéticos relacionados a los diferentes ordenes de reacción de degradación

Orden de reacción	Vida media	Vida útil
Orden cero	$t_{1/2} = \frac{[F]_0}{2k_0}$	$t_{10\%} = \frac{0,1 [F]_0}{k_0}$
Primer Orden	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}$	$t_{10\%} = \frac{0,104}{k_1}$

Nota. k = Constante de velocidad y F = Concentración del compuesto de interés. Información tomada de **(Lozano et al., 2012)**.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Evaluar la vida útil de un extracto con polifenoles procedentes de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Extraer los polifenoles de la flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido.
- Determinar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto obtenido con mayor concentración de polifenoles.
- Estimar el tiempo de vida útil del extracto obtenido con alto contenido de polifenoles.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

La vida útil del extracto con polifenoles de la flor de Jamaica obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido con capacidad antioxidante y antiinflamatoria no varía significativamente con el tiempo.

1.3.2 Hipótesis alternativa

La vida útil del extracto con polifenoles de la flor de Jamaica obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido con capacidad antioxidante y antiinflamatoria varía significativamente con el tiempo.

1.3.3 Variables

1.3.3.1 Variable dependiente

- Concentración de polifenoles

1.3.3.2 Variables independientes

- Concentración del solvente utilizado en la extracción.
- Temperatura de extracción.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación se llevó a cabo en los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En las **Tablas 7, 8 y 9** se enlistan los equipos, reactivos y material fungible que se emplearon durante esta investigación.

Tabla 7

Equipos de laboratorio utilizados.

Equipos	Cantidad
Estufa (Binder ED400)	1
Balanza analítica (Ohaus N13M1U)	1
Baño ultrasónico (Branson CPX2800H)	1
Espectrofotómetro (Fisher Scientific ACCUSKAN GO)	1
Incubadora (Mettmert IN30)	1
Centrífuga (Rotina 380)	1
Baño María (Wisebath WSB-18)	1
pH metro (METTLER TOLEDO SEVEN COMPACT)	1
Balanza de humedad (KERN MLS50-3)	1
Refrigerador (Indurama N2BE8U)	1

Tabla 8

Reactivos de laboratorio utilizados.

Reactivo	Cantidad
Etanol 96%	6 L
Reactivo de Folin - Ciocalteu	8 mL

Carbonato de sodio 7%	100 mL
Ácido gálico	0,01 g
2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	0,0118 g
Metanol	500 mL
Trolox	0,0125 g
Tampón fosfato salino (PBS)	100 mL
Diclofenaco de sodio	100 mg

Tabla 9

Materiales fungibles de laboratorio utilizados.

Material	Cantidad
Fundas Ziploc	3
Papel industrial	1
Paquete de papel aluminio	2
Balón de aforo 100 mL	1
Matraz Erlenmeyer 250 mL	4
Tubos Eppendorf	15
Tubos de ensayo con tapa rosca	10
Papel filtro	3 pliegos
Micropipeta de 96 pocillos	1
Vasos de precipitación (50, 250 y 1000 mL)	5
Probeta volumétrica 50 mL	1
Micropipetas (10-100, 20-200 y 1000 µL)	1
Mortero y pistilo	1
Tubos Falcon	4
Gradilla	1

Frascos de vidrio color ámbar	10
Huevos	6

2.1 Métodos

2.1.1 Extracción de compuestos fenólicos de la flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido.

2.1.1.1 Obtención de la materia prima

Las flores de Jamaica empleadas, fueron adquiridas en el Centro naturista “Narcisa de Jesús” ubicado en las calles Eugenio Espejo y Juan Benigno Vela. Las flores que se utilizaron fueron frescas y posteriormente trasladadas a los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para su análisis. Las flores fueron recolectadas en su etapa de floración plena, ya que aquí han alcanzado su máxima concentración de compuestos bioactivos y ser recogidas antes de que se vuelvan marrones para conservar su frescura y calidad (Tutus, 2018). Adicional a esto, se revisó que las flores adquiridas al momento de su compra aún mantengan un color rojo oscuro intenso asegurando de tal forma su calidad, esto se evaluó visualmente, tomando como referencia la **Figura 2**.

Figura 2

Color de referencia de la flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L).



Nota. Tonalidad para la elección del material vegetal para el estudio. Información tomada de Sayágo et al. (2018)

2.1.1.2 Preparación del material vegetal

Para la preparación del material vegetal a utilizar se inició lavando cuidadosamente con agua destilada cada una de las flores de Jamaica para eliminar cualquier tipo de impureza que pueda interferir en la ejecución del posterior estudio. Posteriormente, las flores se expusieron a una fase de secado en una estufa (Binder ED400) a 30°C por un periodo de 40 horas. Se seleccionó dicha temperatura, debido a que, en un análisis realizado por **Efosa et al. (2023)** obtuvieron una mayor concentración de polifenoles y actividad antioxidante a una temperatura de secado de 30°C, resultando ser el mejor tratamiento del estudio realizado.

Finalmente, las flores secas fueron molidas con ayuda de un procesador de alimentos hasta obtener pequeñas partículas y se conservaron dentro de bolsas herméticas a una temperatura que oscile entre 15 y 25°C, en un ambiente, fresco, seco y oscuro (**Batalla-Mayoral et al., 2019**).

2.1.1.3 Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de los polifenoles se tomó como referencia la metodología descrita por **García-Santoyo et al. (2020)** con modificaciones. Se inició pesando 6 g del polvo de los cálices secos de las flores de Jamaica en una balanza analítica, posterior al pesaje se colocó el contenido en un vaso de precipitado. Se prepararon los solventes en balones de aforo de 1000 mL empleando distintas concentraciones de etanol y agua (50:50 y 70:30 %) v/v y a dos diferentes temperaturas (30 y 50°C).

Posterior a esto, se colocó 25 mL de cada disolvente en matraces Erlenmeyer, se mezcló con los 6 g del polvo de los cálices secos, a continuación, los vasos fueron colocados en un baño ultrasónico a cada una de las temperaturas propuestas, (30 y 50°C) por 40 min. Se tomó este tiempo, debido a que, un estudio publicado por **Rojas et al. (2019)** comprobaron que la mayor parte de los polifenoles de especies vegetales se extraen eficientemente entre los primeros 30 y 40 minutos de contacto con el etanol empleando una extracción asistida por ultrasonido, en comparación con otros tiempos de extracción evaluados en su estudio. Finalmente, se filtró la muestra con ayuda de papel filtro el sobrenadante y se almacenó el contenido en frascos ámbar cubiertos totalmente con papel aluminio para evitar que la luz produzca alteraciones en el contenido.

2.1.1.4 Cuantificación de polifenoles

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos a los extractos obtenidos con ayuda del reactivo Folin – Ciocalteu y siguiendo la metodología propuesta por **Cornejo y Párraga (2021)**. Para lo cual se tomó 10 µL del extracto de flor de Jamaica diluido (1:20) y se mezcló con 130 µL de agua destilada, seguidamente se añadió 10 µL del reactivo Folin – Ciocalteu y se dejó reposar por 6 minutos. Posterior a esto, se añadió 100 µL de carbonato sódico al 7% y se incubó por 90 minutos. Una vez finalizado el tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Para esto, se realizó una curva de calibración con soluciones secuenciales de ácido gálico (GAE) que fueron desde 10 a 100 µg/mL, finalmente el contenido total de polifenoles se expresó en forma de miligramos de ácido gálico por gramos de peso seco de la muestra (mg GAE/ g DW). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.1.1.5 Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental 2², es decir, dos factores con dos niveles cada uno. Los factores que se evaluaron fueron la concentración del disolvente y la temperatura que se utilizó en la extracción.

De forma detallada, los niveles analizados para el factor concentración del disolvente fueron: etanol y agua (50:50 y 70:30 %) v/v y dos diferentes temperaturas de extracción (30 y 50°C). Para determinar cómo estos factores afectaron a la concentración total de polifenoles se utilizó el paquete estadístico Minitab en su versión gratuita, por medio de un análisis de varianza ANOVA aplicando un nivel de la significancia de $p < 0.05$, en donde se consideraron diferencias estadísticamente relevantes cuando el valor p sea mayor al nivel de significancia.

2.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto utilizando el método DPPH e inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo

El análisis de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria se realizó al extracto con mayor concentración de polifenoles que se obtuvo del análisis estadístico.

2.1.2.1 Análisis de la capacidad antioxidante de los polifenoles empleando el método DPPH (2,2 diphenil-1-1-picrylhdrazil)

Para medir la capacidad antioxidante del extracto de la flor de Jamaica se siguió la metodología diseñada por **Bobo-García et al. (2014)** con modificaciones. Para esto, se empleó una microplaca con 96 pocillos y se inició colocando 20 µL del extracto diluido juntamente con 180 µL de solución DPPH, en una concentración de metanol – agua (80:20) a una concentración de 150 µmol L⁻¹ y se agitó vigorosamente por 1 min. Se dejó incubar la microplaca por 45 min en un lugar oscuro a temperatura ambiente y se procedió a medir la absorbancia a 515 nm. Posterior a esto, se elaboró una curva de calibración de Trolox de 50 a 500 µmol/ L. Cada uno de los análisis se los realizó por triplicado y los resultados se presentaron como porcentaje de inhibición de la muestra y actividad equivalente a Trolox (µmol/g PS).

Para el blanco se empleó 180 µL de la mezcla de metanol – agua con 20 µL de agua destilada, finalmente, para el control se mezcló 180 µL del reactivo DPPH y 20 µL de agua destilada, mientras que para la muestra se empleó 180 µL de DPPH con 20 µL del extracto. Para el cálculo del porcentaje de inhibición del DPPH se utilizó la **Ecuación 1** empleada por el autor antes citado.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] * 100$$

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de inhibición.

En donde:

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra.

A_{blanco} = Absorbancia del blanco.

A_{control} = Absorbancia del control.

2.1.2.2 Determinación de la capacidad antiinflamatoria del extracto obtenido mediante la Inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo.

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto de la flor de Jamaica con mayor concentración de polifenoles se utilizó como modelo la prueba de la Inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo. Puesto que, **Yesmin et al. (2020)** manifiestan que las enfermedades inflamatorias y artríticas están asociadas con la desnaturalización de proteínas y la generación de

autoantígenos en diversas enfermedades inflamatorias y artríticas, lo que sugiere que el proceso de desnaturalización *in vivo* podría ser el responsable de la aparición de dichas enfermedades.

Para esto, se siguió la metodología descrita por **Yesmin et al. (2020)**, con modificaciones y adaptada a la muestra de estudio. En primer lugar, se procedió a obtener la albúmina de huevo, para lo cual se separó la clara de la yema y se la depositó en un vaso de precipitación, seguidamente se colocó 100 mL de agua destilada a la clara de huevo y se agitó vigorosamente hasta que se forme un precipitado (ovoglobulinas). Posterior a esto, se colocó la muestra en tubos falcón de 50 mL y se centrífugo por 10 min a 4000 rpm, se conservó el sobrenadante (ovoalbúmina).

Para iniciar con la prueba de desnaturalización se necesitó un tubo de ensayo con su respectiva tapa, en donde se colocó 0,2 mL de albúmina de huevo con 2,8 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 6,4) y 2 mL del extracto con polifenoles de la flor de Jamaica, en este caso se empleó agua destilada como control. Seguidamente, se incubaron todas las muestras a 37°C por 15 min y se midió la absorbancia a 660 nm antes de someter las muestras al proceso de desnaturalización. Después, se procedió a inducir la desnaturalización de las muestras colocándolas a 70°C en baño maría por 5 min, se dejó enfriar la muestra y se midió la turbidez a 660 nm mediante un espectrofotómetro. Finalmente, se empleó como control positivo una concentración de diclofenaco (50 mg/mL) y se preparó distintas diluciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL), cada ensayo se realizó por triplicado. Para calcular el porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{calentada}} - A_{\text{sin calentar}}}{A_{\text{control calentado}} - A_{\text{sin calentar}}} \right) \right] * 100$$

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de inhibición.

En donde:

$A_{\text{calentada}}$ = Absorbancia de la muestra posterior a la desnaturalización.

$A_{\text{sin calentar}}$ = Absorbancia de la muestra previa a la desnaturalización.

$A_{\text{control calentado}}$ = Absorbancia del control posterior a la desnaturalización.

2.1.3 Estimación del tiempo de vida útil del extracto con alto contenido de polifenoles.

Después de determinar las actividades biológicas, se procedió a evaluar el tiempo de vida útil del extracto con mayor contenido de polifenoles de la flor de Jamaica. Seguidamente, se almacenó en frascos de vidrio ámbar, a temperatura ambiente, durante un período de estudio de un mes. Debido a que, la norma internacional del ICH, especialmente la Q1A(R2), detalla que los estudios de estabilidad a corto plazo se utilizan para proporcionar información inicial sobre la estabilidad de un producto, especialmente cuando se están desarrollando nuevas formulaciones o en estudios piloto (**European Medicines Agency, 2003**).

En este apartado, se llevó a cabo análisis de diversos parámetros entre los que se incluyeron: pH, humedad del extracto, determinación de sólidos totales, contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

2.1.3.1 Análisis de humedad y porcentaje de sólidos solubles totales

Para determinar el porcentaje de humedad del extracto se tomaron 2,5 mL del extracto y se colocaron en una termobalanza de humedad, seguidamente se registraron los datos por triplicado y se llevaron a cabo controles en los tiempos 0, 7, 15, 21 y 30 días. Por otro lado, el porcentaje de sólidos solubles totales (SST) se calculó a partir del valor obtenido de la humedad (H) que refleja el equipo restandole el 100%, este parámetro resulta importante dentro del estudio, debido a que es un indicativo de la cantidad de compuestos presentes en el extracto (**Li et al., 2010**).

$$SST\% = 100 - \% H$$

Ecuación 3. Determinación del porcentaje de sólidos solubles totales.

2.1.3.2 Análisis del pH

Se utilizó un método potenciométrico para determinar la alcalinidad o acidez del extracto. En donde, se tomó 10 mL del extracto de flor de Jamaica y se colocó en un vaso de precipitado, posterior a esto se midió el pH con ayuda de un potenciómetro. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado cada 7 días durante un mes (0, 7, 15, 21 y 30 días).

2.1.3.3 Análisis del contenido total de polifenoles

Para analizar el contenido total de polifenoles del extracto de flor de Jamaica se realizó un análisis por triplicado siguiendo la metodología planteada en el apartado 6.1.4, cada 7 días por un período de un mes (0, 7, 15, 21 y 30 días).

2.1.3.4 Análisis de la capacidad antioxidante

Para la determinación de la capacidad antioxidante del extracto se siguió la metodología que se muestra en el apartado 6.2.1, y se realizó un análisis por triplicado cada 15 días por un periodo de un mes.

2.1.3.5 Análisis de la capacidad antiinflamatoria

La determinación de la capacidad antiinflamatoria del extracto se realizó de acuerdo a la metodología establecida en el apartado 6.2.2, y se efectuó un análisis por triplicado cada 15 días por un mes.

2.1.3.6 Determinación de la cinética de reacción

Se estableció la cinética de reacción a partir de los valores obtenidos de la concentración de polifenoles en el tiempo, para esto se determinó el orden de reacción que puede ser orden cero u orden uno. Se analizarán únicamente dos de los tres órdenes de reacción existentes, dado que la evaluación de una reacción de segundo orden requiere de dos reactivos (**Lozano et al., 2012**).

Para comprobar si es orden cero se realizó la gráfica de concentración de polifenoles en el tiempo, donde la pendiente es igual a la constante de velocidad de degradación, siguiendo la siguiente ecuación.

$$[F] = [F]_0 - k_0 t$$

Ecuación 4. Reacción de orden cero

Mientras que, para comprobar si la reacción es de primer orden se graficó el logaritmo de la concentración de polifenoles en el tiempo, en donde la pendiente es igual a $k_1 / 2,303$, de acuerdo con la ecuación 5.

$$\log[F] = \log[F]_0 - \frac{k_1 t}{2,303}$$

Ecuación 5. Reacción de primer orden

Por lo tanto, para las dos ecuaciones que se obtengan se determinó el coeficiente de determinación (R^2), en donde, el resultado que sea más cercano a 1 se seleccionó como orden de la reacción. Además, se calculó el tiempo de vida útil y el tiempo de vida media siguiendo las expresiones de la **Tabla 5**.

2.1.3.7 Análisis de datos

Para evaluar la vida útil del extracto con mayor contenido de polifenoles extraídos de la flor de Jamaica se realizó comparaciones de medias entre todos los datos obtenidos de contenido de polifenoles, pH, análisis de humedad, actividad antioxidante y antiinflamatoria empleando el software estadístico Minitab versión 17 gratuita, en donde, se llevó a cabo un análisis con un nivel de significancia del 95% por triplicado.

Además, para confirmar los resultados proporcionados por el software, se elaboraron gráficas de la concentración de polifenoles con el tiempo. A partir de la pendiente de estas gráficas, se determinó la velocidad de reacción, lo que permitió calcular tanto la vida media como la vida útil del extracto.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Extracción de compuestos fenólicos de la flor de Jamaica mediante extracción asistida por ultrasonido.

La extracción de compuestos fenólicos procedentes de la flor de Jamaica se llevó a cabo utilizando el método de extracción asistida por ultrasonido, puesto que es una tecnología que brinda procesos más eficientes en términos de energía, ambientalmente amigables y considerablemente más limpios, con respecto a los métodos convencionales (**Mehta et al., 2022**). Puesto que, este método aprovecha la energía de las ondas sonoras que se transmiten a través del material creando un efecto de cavitación en el disolvente, provocando un movimiento acelerado de las moléculas y un ingreso más eficiente del disolvente en la matriz vegetal facilitando la liberación de los compuestos deseados (**Paraíso et al., 2019**).

Dentro de los disolventes más utilizados en la extracción de compuestos bioactivos se encuentran el etanol, el metanol y la acetona. Sin embargo, en el presente trabajo se empleó etanol como disolvente para la extracción de polifenoles, debido a que estudios realizados por **Singh et al. (2021)** señalan que el tratamiento con etanol extrajo una cantidad significativamente mayor de polifenoles de los calices de flor de Jamaica en comparación con el agua. Según **Haminiuk et al. (2014)** los polifenoles tienden a disolventes orgánicos con menor polaridad que el agua, ya que su solubilidad está influenciada por las características polares de estos compuestos, siendo el etanol menos polar que el agua.

Además, un estudio realizado por **Kelber et al. (2017)** mencionan que el etanol resulta ser menos tóxico que otros disolventes como el metanol y la acetona, lo que lo hace más seguro, especialmente si va a destinarse a aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Por lo tanto, se prepararon distintas concentraciones de etanol (50 – 50% y 70 – 30%) y se varió las temperaturas de extracción (30° y 50° C), resultando en 4 tratamientos.

3.1.1.1 Cuantificación de polifenoles de los extractos obtenidos

La cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos derivados de flor de Jamaica en relación a los cuatro tratamientos definidos, se llevó a cabo utilizando una curva de calibración con ácido gálico

(Anexo 3), misma que reflejó la ecuación de regresión lineal $y = 0,0029(x) + 0,0746$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9989$. En la **Tabla 10** se presentan las distintas concentraciones de polifenoles obtenidas en cada uno de los tratamientos.

Tabla 10

Concentración de polifenoles extraídos de los extractos obtenidos a partir de la flor de Jamaica.

Tratamientos	Concentración de etanol	Temperatura de extracción	Contenido de polifenoles totales (mg GAE/g PS)
1	50%	30°C	35,655 ± 0,597
2	70%	30°C	53,931 ± 6,651
3	50%	50°C	49,563 ± 0,527
4	70%	50°C	62,667 ± 1,305

Nota. Los valores obtenidos corresponden al promedio del contenido de polifenoles totales para cada tratamiento ± la desviación estándar.

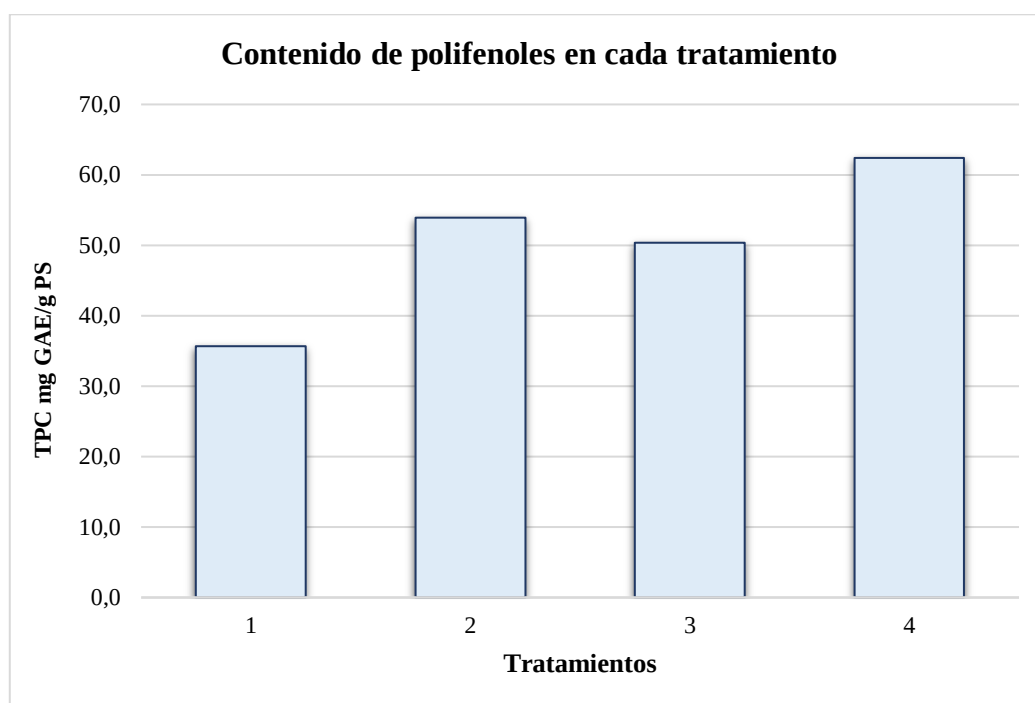
En la concentración de polifenoles de cada uno de los tratamientos presentados en la **Tabla 10** se observa que el mejor tratamiento resultante fue el número 4 (concentración de etanol 70 – 30% y una temperatura de extracción 50°C) con un valor de 62,667 ± 1,305 mg GAE/g PS, mientras que el tratamiento 1 (concentración de etanol 50 – 50% y una temperatura de extracción 30°C) presentó un rendimiento inferior en comparación con los demás tratamientos, con un resultado de 35,655 ± 0,597 mg GAE/g PS.

Por otro lado, en un estudio realizado por **Sanou et al. (2023)**, obtuvieron 10,58 g GAE/ g PS de contenido de polifenoles extraídos de flor de Jamaica empleando la misma técnica de extracción, sin embargo, el valor de rendimiento menor se puede asociar al disolvente empleado que en este caso fue agua. Así mismo, en una investigación realizada por **García-Santoyo et al. (2020)**, se obtuvieron valores entre 23,54 ± 3,11 y 28,88 ± 5,91 mg GAE/g PS correspondientes a la concentración de polifenoles de la misma especie vegetal estudiada, además de emplear el mismo método de extracción

con la única variación de que el disolvente empleado fue metanol. La **Figura 3** muestra de manera visual las diferencias en el contenido de polifenoles extraídos entre los distintos tratamientos. Con lo cual, se puede inferir que la combinación de factores del tratamiento 4 influye directamente en la cantidad de polifenoles extraídos.

Figura 3

Contenido de polifenoles obtenidos de los extractos de flor de Jamaica en cada tratamiento.



Nota. Tratamiento 1: Concentración de etanol 50% - 30°C Temperatura de extracción; Tratamiento 2: Concentración de etanol 70% - 30° C Temperatura de extracción; Tratamiento 3: Concentración de etanol 50% - 50° C Temperatura de extracción; Tratamiento 4: Concentración de etanol 70% - 50° C Temperatura de extracción.

Los valores correspondientes a la concentración de polifenoles de los estudios realizados por **Sanou et al. (2023)** y **García-Santoyo et al. (2020)** son inferiores a los registrados en el presente estudio, esto podría deberse a las distintas condiciones ambientales de cada país en las que fue cultivada la flor de Jamaica, pues según **Francini et al. (2020)** los factores ambientales como la altitud, la temperatura y la luz pueden afectar a la concentración de compuestos bioactivos. Además, la selección del disolvente, la temperatura y el tiempo empleado en la extracción son factores determinantes dentro del contenido total de compuestos fenólicos (**Carreira-Casais et al., 2021**).

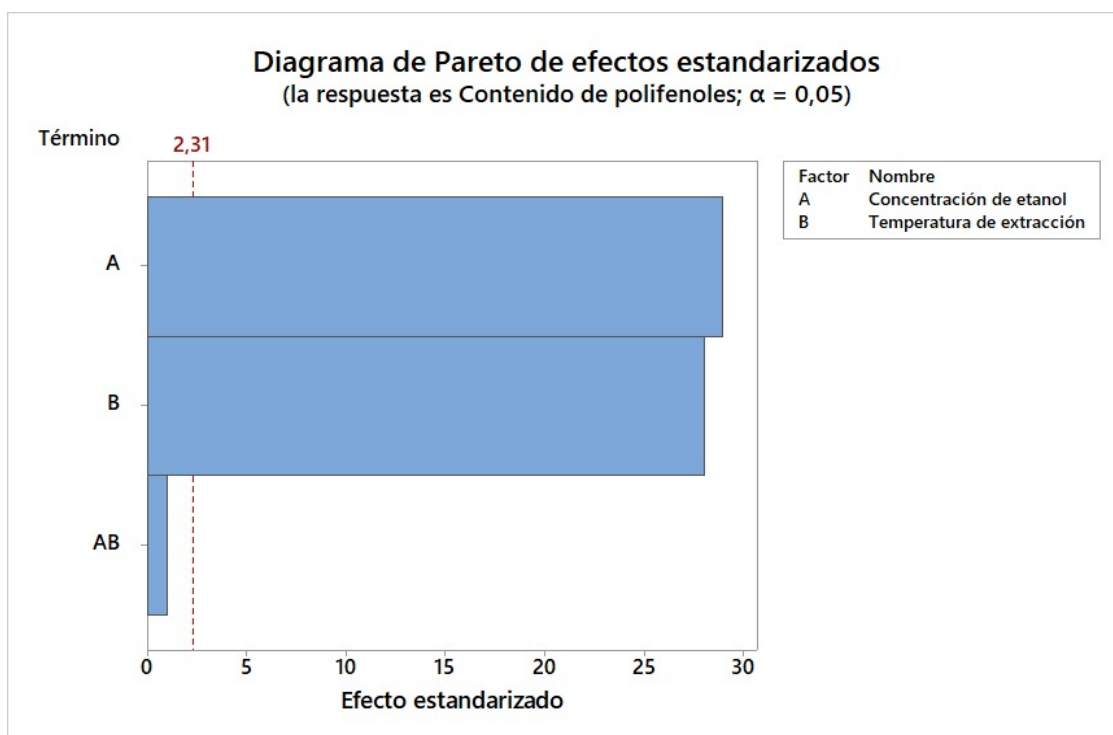
3.1.1.2 Análisis estadístico

Por medio del análisis ANOVA realizado con un nivel de confianza del 95% (**Anexo 7**), se determinó los factores que fueron estadísticamente significativos sobre la concentración de polifenoles de la flor de Jamaica, los mismos que resultaron ser: (A) Concentración de etanol y (B) Temperatura de extracción.

En la **Figura 4**, se muestra el diagrama de Pareto que refleja la influencia de los factores y sus interacciones en el contenido de polifenoles de la flor de Jamaica. Por lo que, los factores A y B tienen un efecto positivo sobre el contenido de polifenoles demostrando que la concentración de etanol y la temperatura de extracción influyen de forma decisiva en la extracción, sin embargo, la interacción de ambos factores (AB) no muestra un efecto estadísticamente relevante, puesto que presenta un valor-p menor a 0,05 y no supera el límite de significancia.

Figura 4

Diagrama de Pareto de la relevancia de los factores en el contenido de polifenoles del mejor extracto de flor de Jamaica.

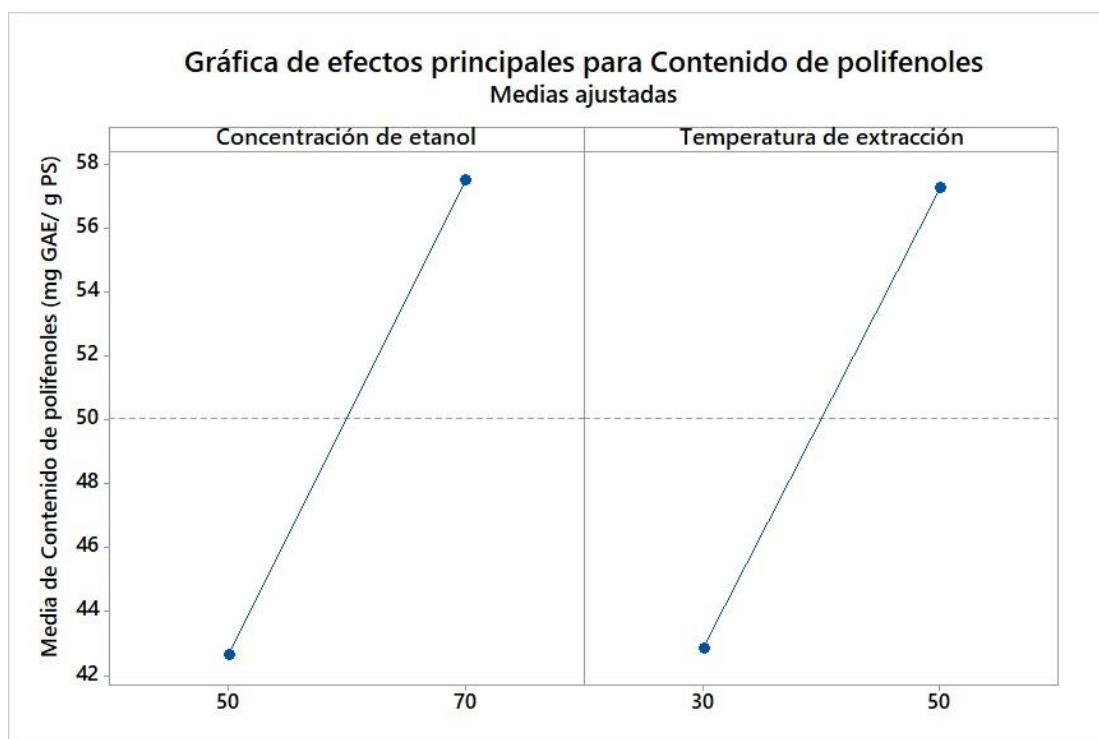


Nota. Aquellos factores que exceden el límite de significancia ($\alpha = 0,05$) se consideran estadísticamente significativos.

En la **Figura 5** se observa las interacciones que tienen las variables sobre el contenido de polifenoles de la flor de Jamaica.

Figura 5

Gráfica del efecto de las variables independientes en el extracto de flor de Jamaica con mayor contenido de polifenoles.



La **Figura 5** presenta los efectos principales de cada factor analizado, destacando que, en relación con la concentración del disolvente hay una diferencia significativa en la concentración de polifenoles con la variación de etanol (70 – 30%). Pues, mientras la concentración de etanol se incrementaba el contenido de polifenoles aumentaba significativamente. De igual manera, con relación al efecto de la temperatura de extracción (50°C), mientras la temperatura se incrementaba aumentaba de manera notoria también la concentración de polifenoles.

Según la investigación de **Rohmah et al. (2022)** la extracción de polifenoles depende en gran medida de la polaridad del disolvente, puesto que el uso de disolventes puros no resulta eficiente para separar polifenoles derivados de plantas, esto evidencia que la combinación de agua con etanol es altamente efectiva para la extracción de compuestos bioactivos de origen vegetal. De igual forma, **Hikmawanti**

et al. (2021) obtuvieron valores menores de extracción en concentraciones de etanol cercanas al 100% en comparación con las concentraciones combinadas con agua.

En cuanto a la temperatura, **Kaur y Ubeyitogullari (2023)** manifiestan que las altas temperaturas de extracción mejoran la eficiencia de la extracción de polifenoles de matrices vegetales, sin exceder los límites de temperatura de entre 60-70°C, puesto que, puede llegar a existir una degradación térmica de los compuestos bioactivos. Además, las temperaturas elevadas del disolvente que no sobrepasan el límite, facilitan la disolución de los polisacáridos de la pared celular en el medio, debilitándola y permitiendo que los compuestos fenólicos se liberen con mayor facilidad (**Plaskova y Mlcek, 2023**).

En base al tiempo de extracción, fue un factor que permaneció constante, siendo 40 minutos el tiempo empleado en la extracción. Durante el proceso de extracción es fundamental que el tiempo de contacto sea adecuado para permitir que el disolvente disuelva una cantidad suficiente de soluto y que el medio alcance el equilibrio, en el método de extracción asistido por ultrasonido, la energía ultrasónica facilita la ruptura de las paredes celulares del material vegetal, incrementando el contacto entre los compuestos bioactivos y el disolvente, lo que reduce significativamente el tiempo requerido para la extracción (**Paraíso et al., 2019**).

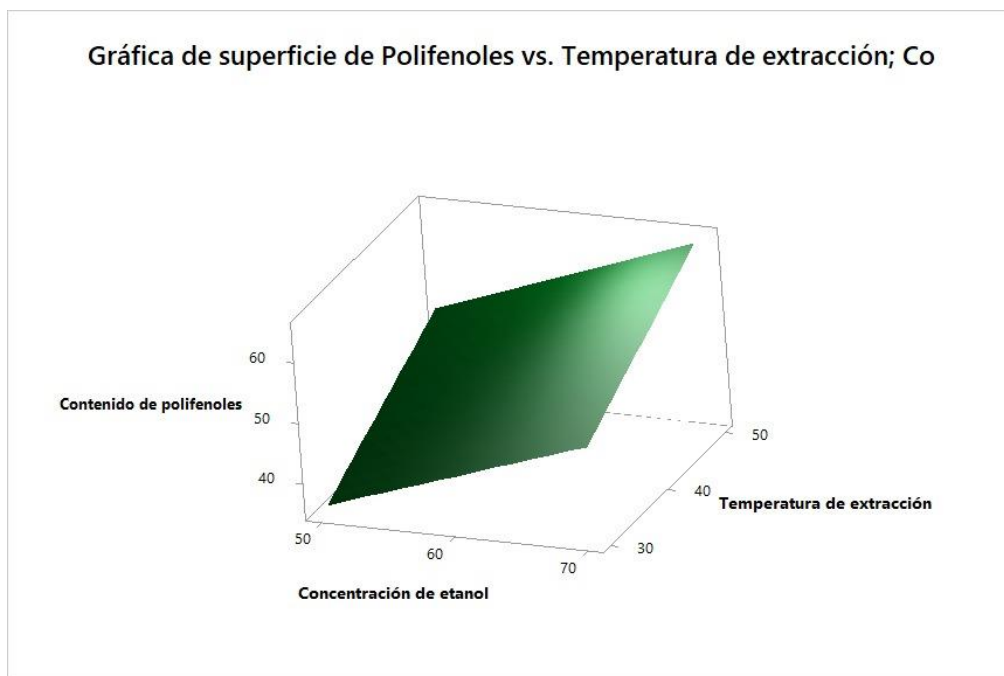
En un estudio realizado por **Xia et al. (2023)** lograron el mayor contenido de polifenoles a los 40 minutos de extracción de la especie vegetal estudiada, además manifiestan que extender el tiempo de extracción más allá de los 60 minutos no produce valores significativos en el rendimiento de los compuestos fenólicos, indicando que tiempos de extracción prologados podrían ocasionar la degradación de polifenoles, debido a reacciones químicas o procesos de oxidación. Además, los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por **Paraíso et al. (2019)**, en donde al emplear el mismo método de extracción y con la misma especie vegetal demostraron que a los 45 minutos de extracción y con una temperatura de 65°C se consideran las mejores opciones de extracción de compuestos bioactivos.

La **Figura 6**, muestra que a medida que aumenta la concentración de etanol y la temperatura de extracción el contenido de polifenoles incrementa notablemente. Las zonas más altas de la superficie (color más claro) representan las combinaciones óptimas de concentración de etanol y temperatura que maximizan la extracción de polifenoles, siendo la mejor combinación (concentración de etanol 70 –

30% y a una temperatura de extracción de 50° C), reafirmando así los valores proporcionados en la **Tabla 9**.

Figura 6

Gráfica de superficie de respuesta de las variables independientes en el extracto de flor de Jamaica con mayor contenido de polifenoles.



3.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto obtenido con mayor concentración de polifenoles.

Para la determinación de la actividad antioxidante del extracto de flor de Jamaica se empleó el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), debido a que es un método ampliamente utilizado, rápido, sencillo y accesible para medir propiedades antioxidantes **Baliyan et al. (2022)**. Basado en el uso de radicales libres para evaluar el potencial antioxidante de moléculas puras, especialmente extractos de plantas o compuestos fenólicos **(Gulcin y Alwaseel, 2023)**. Por otro lado, se ha revelado que los polifenoles son potentes antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres mediante la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno. Incluso, se ha demostrado que los polifenoles son los principales responsables de las actividades antioxidantes totales presentes en matrices vegetales **(Tsao, 2010)**.

En la **Tabla 11** se presentan los resultados correspondientes al porcentaje de inhibición del DPPH, junto con valores expresados en equivalentes de Trolox. Para ello, se utilizó la ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibración de Trolox $y = 0,1494 (Trolox) + 8,2551$, la misma que presentó un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9984$ (**Anexo 9**).

Tabla 11

Actividad antioxidante del mejor extracto de flor de Jamaica.

Concentración de etanol	Temperatura de extracción	% Inhibición de radical DPPH	$\mu\text{mol Eq. Trolox/g}$
70 – 30%	50°C	$90,886 \pm 0,443$	$221,234 \pm 1,190$

Nota. Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas $\pm$ desviación estándar.

El extracto de flor de Jamaica mostró un porcentaje de inhibición del $90,886 \pm 0,443\%$ con $221,234 \pm 1,190$ de μmoles equivalentes de Trolox/g, lo que demuestra que los polifenoles recuperados exhibieron una elevada actividad antioxidante. El resultado obtenido en este estudio es comparable al reportado por **Peredo et al. (2020)**, puesto que en su análisis se determinó que el extracto de flor de Jamaica presentó un porcentaje de inhibición del 74,580%, inferior al reportado en este estudio

Por otro lado, en un estudio realizado por **Rassem et al. (2024)** reportaron resultados concernientes al porcentaje de inhibición de DPPH de $72,97 \pm 0,1\%$ en una extracción con metanol y $86,24 \pm 0,5$, en una extracción con agua, siendo inferiores a los datos obtenidos en el presente estudio. Así mismo, una investigación efectuada por **Sirag et al. (2014)** obtuvo 86 % de inhibición de DPPH. Mientras que en el estudio realizado por **Obouayeba et al. (2014)** obtuvieron un valor concerniente al porcentaje de inhibición de DPPH de 97%, siendo el valor más cercano del estudio en mención.

Los resultados obtenidos muestran valores comparables a los reportados en investigaciones previas, específicamente en los porcentajes de inhibición observados. Como muestra el estudio de **Peredo et al. (2020)**, en donde se obtuvieron valores menores del porcentaje de inhibición. Es importante destacar que ambos estudios emplearon los mismos métodos, tanto para la extracción como para la evaluación de la actividad antioxidante, sin embargo, la diferencia de resultados puede estar relacionada con la

concentración de etanol, puesto que en el estudio emplean una concentración más alta y se ha demostrado que concentraciones cercanas a la pureza del solvente afectan el contenido de polifenoles y por ende la capacidad antioxidante, esto se debe a que los polifenoles tienen características polares y el etanol en concentraciones puras resulta ser menos polar que las soluciones de etanol y agua con polaridades intermedias (**Hikmawanti et al., 2021**).

Los valores registrados por **Rassem et al. (2024)**, de igual forma, son menores a los obtenidos en el presente estudio, la diferencia que presentan puede deberse a los disolventes empleados que fueron metanol y agua. En el caso del metanol, aunque se ha demostrado que es eficaz para extraer compuestos fenólicos en comparación con el etanol y el agua (**González et al., 2012**), se le puede atribuir la variación de resultados al método de extracción empleado que fue hidrodestilación asistida por microondas (MADH), puesto que, esta es una técnica innovadora y de gran potencial que emplea calentamiento por microondas para extraer mayoritariamente aceites esenciales de hojas secas (**Abdurahman y Sundarajan, 2019**). Mientras que, en el caso del agua, se ha evidenciado en varios estudios que es un disolvente menos eficiente en comparación con el metanol y el etanol para extraer compuestos bioactivos y por ende exhibe un menor porcentaje de inhibición del DPPH (**Villalobos-Vega et al., 2023**), en este caso se incluye también el método de extracción empleado en la variación de los resultados.

Por otro lado, en la investigación efectuada por **Sirag et al. (2014)** la disminución de los resultados se puede atribuir al método de extracción mediante maceración, puesto que, es un método convencional que presenta varias desventajas, entre las que destaca la necesidad de emplear grandes volúmenes de disolventes orgánicos, que en ciertos casos pueden ser tóxicos, además de ofrecer un menor rendimiento en comparación con las técnicas de extracción no convencionales (**Cassol et al., 2019**).

Respecto a la investigación realizada por **Obouayeba et al. (2014)**, los resultados obtenidos fueron sumamente similares a los del presente estudio, con la variación de que en la investigación emplearon la técnica de maceración utilizando como disolvente metanol acidificado con ácido trifluoroacético, según **Petreska et al. (2020)** el disolvente se puede acidificar lo que mejora la extracción de manera eficiente, además, las mezclas de metanol acidificadas son el segundo disolvente más utilizado.

Adicionalmente, en el **Anexo 8** se puede visualizar la microplaca de 96 pocillos empleada en el ensayo DPPH, según **Gonçalves et al. (2018)** cuando el reactivo DPPH interactúa con un compuesto

antioxidante, pierde su propiedad de radical libre lo que provoca un cambio en su color de violeta a amarillo, siendo este cambio de coloración proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra

De igual forma, los μ moles equivalentes de Trolox/g presentados en la **Tabla 11**, permiten comparar la capacidad antioxidante del extracto de flor de Jamaica con la capacidad estándar del Trolox. Se empleó Trolox como antioxidante estándar porque permite expresar los resultados de forma estandarizada y comparable (**Sochor et al., 2010**). En este contexto, mientras que el Trolox logró un 90% de inhibición del radical DPPH, el extracto de flor de Jamaica alcanzó un 90,886% de inhibición.

3.1.3 Determinación de la capacidad antiinflamatoria del extracto obtenido con mayor concentración de polifenoles.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria exclusivamente en el extracto con la mayor concentración de polifenoles. Los resultados, presentados en la **Tabla 12** están expresados como el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la ovoalbúmina de huevo, obtenido mediante la Ecuación 2, tanto para el extracto de flor de Jamaica como para el Diclofenaco de sodio, que se utilizó en el ensayo como control positivo.

Tabla 12

Actividad antiinflamatoria del mejor extracto de flor de Jamaica.

Concentración (μ g/mL)	% Inhibición	
	Diclofenaco de sodio	Extracto de flor de Jamaica
1000	94,143 $\pm$ 3,563	62,585 $\pm$ 1,627
500	72,963 $\pm$ 1,862	56,745 $\pm$ 1,489
200	53,118 $\pm$ 3,006	45,321 $\pm$ 2,978
100	35,457 $\pm$ 2,092	38,642 $\pm$ 2,124

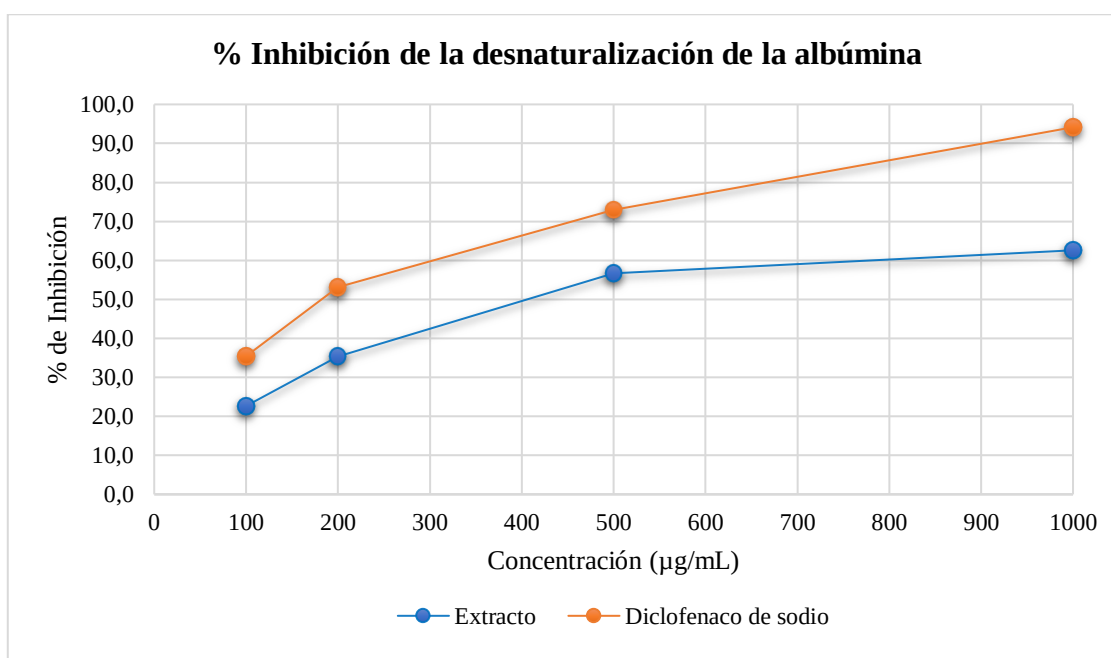
Nota. Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas $\pm$ desviación estándar.

El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la **Ecuación 2**, dando como resultado una inhibición máxima de 62,585 % en una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, con una reducción proporcional a medida que disminuye la concentración, alcanzando un mínimo de 38,642 a 100 $\mu\text{g/mL}$. En comparación, el Diclofenaco de sodio (control positivo) mostró un porcentaje de inhibición significativamente alto, con un 94,143% a 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 35,457% a 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados indican que el extracto de flor de Jamaica a pesar de no llegar al porcentaje de inhibición del control positivo posee propiedades antiinflamatorias.

El diclofenaco de sodio se utiliza como control positivo de la actividad antiinflamatoria porque es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que inhibe la producción de prostaglandinas que intervienen en la inflamación, el dolor y la fiebre (**Dina et al., 2010**). En la **Figura 7** se observa de manera grafica los resultados de inhibición registrados.

Figura 7

Inhibición de la desnaturalización de albúmina por el extracto de flor de Jamaica y diclofenaco de sodio como control.



Cuando las proteínas se desnaturalizan pierden su conformación original y esta modificación estructural está directamente vinculada con el inicio y persistencia de la inflamación. Por lo tanto, la habilidad de

un extracto natural para estabilizar la estructura de la proteína y minimizar su alteración está directamente vinculada con su capacidad antiinflamatoria (**Hasan et al., 2023**). Por otra parte, la inhibición de la desnaturalización de la albúmina de huevo es un modelo comúnmente empleado para evaluar *in vitro* la actividad antiinflamatoria de nuevas y seguras fuentes de extractos de plantas con propiedades antiinflamatorias. Este enfoque se utiliza como alternativa a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que suelen estar asociados con efectos secundarios no deseados (**Chaiya et al., 2022**).

De acuerdo con un estudio realizado por **Garbi et al. (2017)** obtuvieron un resultado de 51,220% de inhibición de un extracto metanólico de flor de Jamaica empleando la técnica de extracción Soxhlet, siendo un valor menor al obtenido en el presente estudio. Sin embargo, en la investigación citada se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición en la concentración mayor perteneciente a 100 µg/mL, por lo tanto, se pueden corroborar los resultados obtenidos en este estudio, los cuales muestran que, a medida que la concentración disminuye, también se reduce la actividad antiinflamatoria del extracto.

Esto refuerza la noción de que la flor de Jamaica, regularmente subestimada podría tener aplicaciones prometedoras en el ámbito de la salud, proporcionando una fuente alternativa de compuestos con propiedades biológicas beneficiosas.

3.1.4 Estimación del tiempo de vida útil del extracto obtenido con alto contenido de polifenoles.

Para estimar la vida útil del extracto, se tomaron en cuenta diversos factores, como el pH, la humedad, los sólidos solubles totales (SST), los cambios en el contenido de polifenoles y las actividades biológicas (antioxidante y antiinflamatoria). Estas evaluaciones se realizaron de forma periódica durante un mes por medio del uso del software Minitab, equipado con un paquete estadístico especializado en estudios de estabilidad que permitió predecir el tiempo de vida útil del extracto.

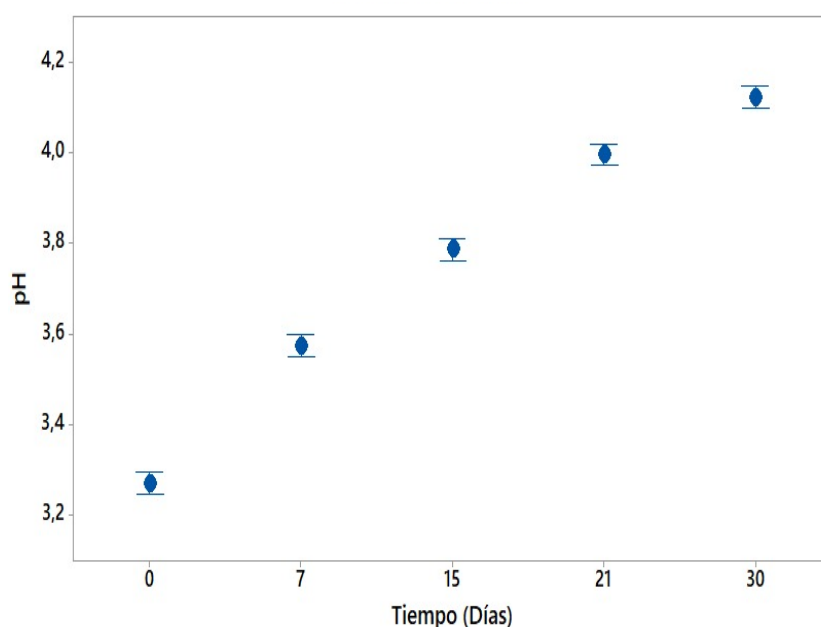
3.1.4.1 Análisis de la estabilidad del extracto en base al pH

El análisis del pH del extracto, llevado a cabo cada 7 días durante un mes estima una vida útil de alrededor de 53 días (**Figura 9**), además de que si existieron diferencias significativas entre el período de estudio de un mes ($p < 0,05$) (**Anexo 14**). Los límites pH (3 y 6), fueron determinados con base a la

información de **Tsao (2010)** que señala que los polifenoles son más estables a pH bajos, además, un entorno ácido favorece que los polifenoles permanezcan en estado neutro, facilitando así su extracción en disolventes orgánicos. En la **Figura 8** se presenta la comparación de medias con respecto al pH del extracto.

Figura 8

Comparación de medias con respecto al pH del extracto.



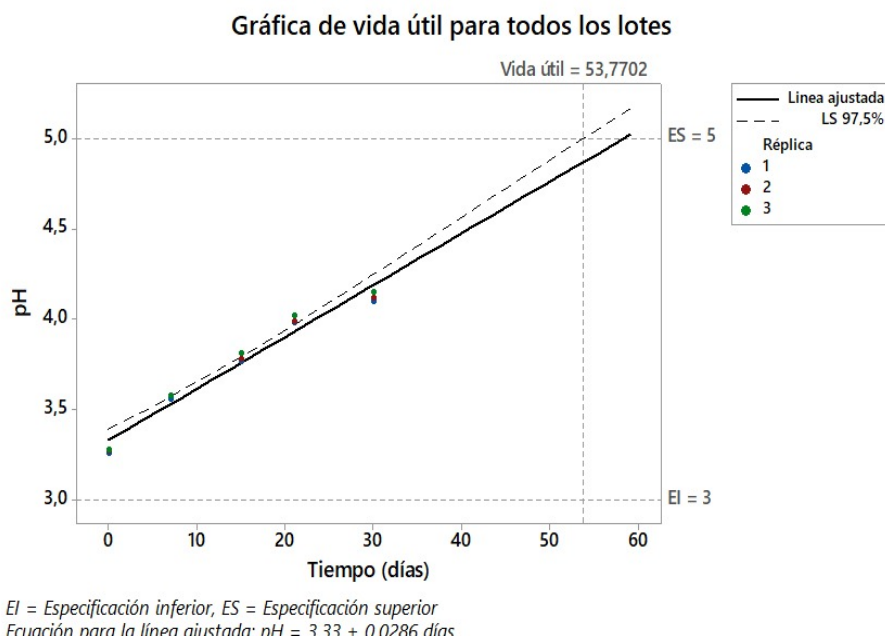
Nota. La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

En relación con el pH, se muestra que no hubo diferencias significativas a lo largo del período de estudio de un mes, no obstante, se percibe un incremento gradual del pH a medida que transcurre el tiempo. Las fluctuaciones en los valores de pH registradas podrían estar relacionadas con las interacciones entre los componentes del extracto y ciertos factores ambientales, incluso cuando se mantuvieron condiciones óptimas de almacenamiento (**Luo et al., 2024**).

Según lo mencionado por **Laguerre et al. (2014)** afirman que un pH más bajo aumenta la probabilidad de que los compuestos presentes sean polifenoles, dado que estos se mantienen estables en condiciones ácidas.

Figura 9

Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función al pH.



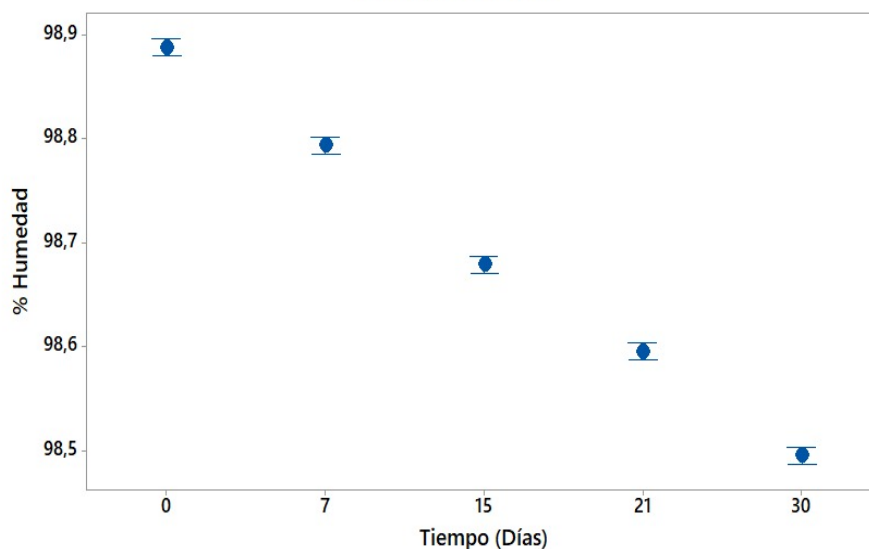
3.1.4.2 Análisis de la estabilidad del extracto en función de la humedad

El análisis de la humedad del extracto, realizado cada 7 días durante un mes, estima una vida útil aproximada de 64 días. En la **Figura 10** se puede evidenciar una reducción en el contenido de humedad del extracto durante el período comprendido entre la semana 0 y la semana 4, además de presentarse diferencias significativas entre el tiempo de estudio ($p < 0,05$) (**Anexo 16**).

Los límites definidos para calcular la vida útil en base al contenido de humedad (98 y 99%) se determinaron con base a los valores obtenidos en la determinación del porcentaje de humedad del extracto de flor de Jamaica, puesto que, **İşleroğlu y Türker. (2023)**, señalan que un extracto con un nivel bajo de humedad favorece a una rápida disminución de las actividades biológicas que posea.

Figura 10

Comparación de medias con respecto a la humedad del extracto.



Nota. La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

De acuerdo con **Kinhal (2023)** la disminución de humedad se genera por procesos metabólicos, como la respiración y la transpiración propia de las matrices vegetales. También, la reducción gradual del contenido de humedad observada durante el estudio podría estar relacionada con procesos naturales de deshidratación, a pesar de haber implementado condiciones óptimas de almacenamiento (**Komala y Haryoto, 2020**).

Figura 11

Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la humedad.



3.1.4.3 Análisis de la estabilidad del extracto en función de los sólidos solubles totales

En extractos que contienen compuestos fenólicos, los sólidos solubles totales (SST) reflejan la concentración de sustancias disueltas, como azúcares, ácidos, minerales y compuestos bioactivos (**Hadiwijaya et al., 2020**). Aunque los SST no cuantifican directamente polifenoles, pueden correlacionarse con su presencia y concentración en el extracto (**Vilas-Boas, 2017**).

Tabla 13

Sólidos solubles totales presentes en el extracto de flor de Jamaica en función a la humedad registrada durante el mes de estudio.

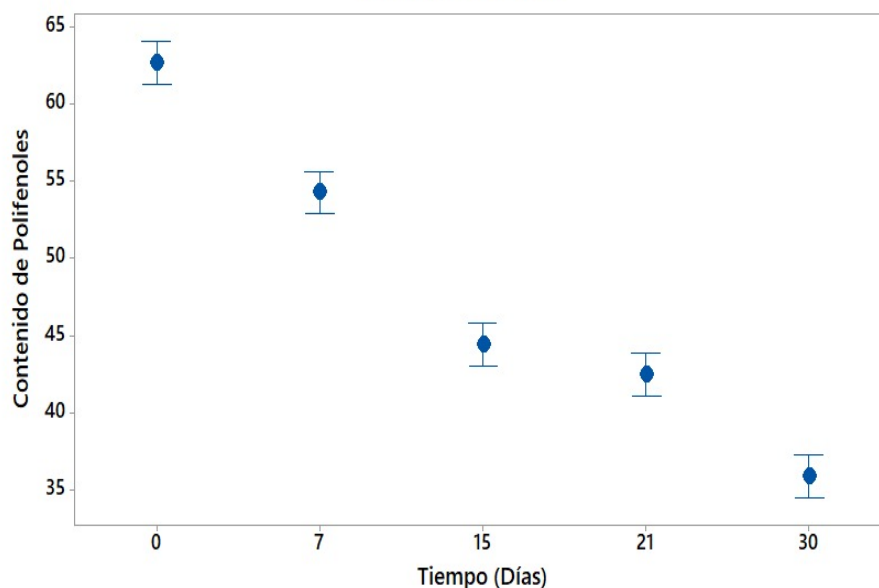
Tiempo (Días)	% Humedad	% Sólidos solubles totales
0	98,918	1,082
7	98,794	1,206
15	98,679	1,321
21	98,595	1,405
30	98,495	1,505

3.1.4.4 Análisis de la estabilidad del contenido total de polifenoles

El análisis del contenido total de polifenoles presentes en el extracto, llevado a cabo cada 7 días durante un mes estima una vida útil de alrededor de 32 días (**Figura 13**). Además, durante el tiempo de estudio, si existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) (**Anexo 18**). Los límites definidos para pronosticar la vida útil se fijaron entre un 30 GAE/ g PS y 70 GAE/ g PS del contenido total de polifenoles considerando que una concentración muy baja de polifenoles no resulta en actividades biológicas significativas (**Li et al., 2014**).

Figura 12

Comparación de medias con respecto al contenido de polifenoles del extracto.



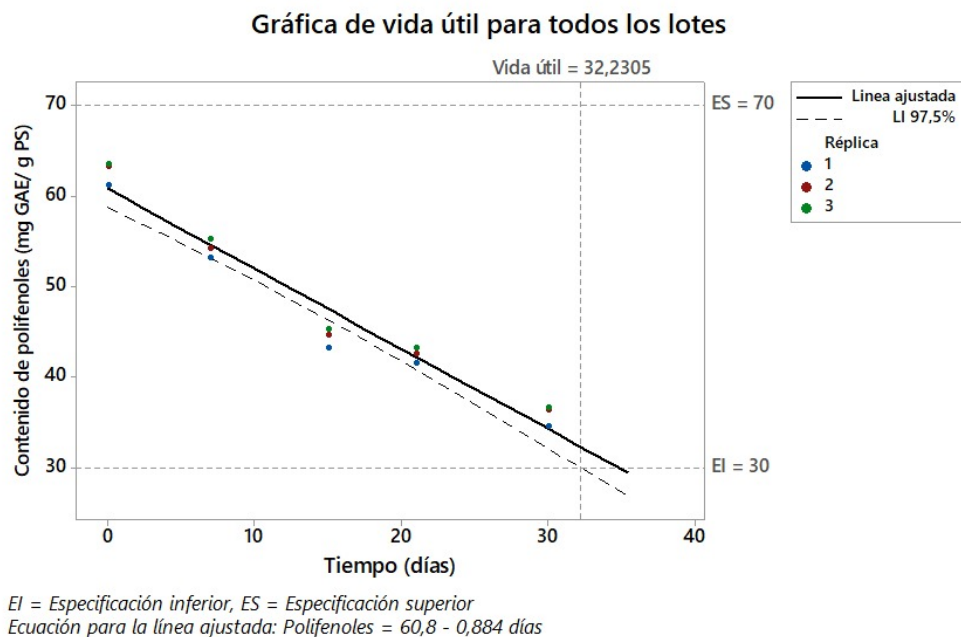
Nota. La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

En la **Figura 12**, se puede visualizar que la concentración de polifenoles disminuyó moderadamente con el tiempo, esto se puede atribuir a las condiciones de almacenamiento del extracto, puesto que, **Green Sky Biological Tech. (2024)** menciona que la conservación de extractos vegetales a bajas temperaturas es una estrategia eficaz para disminuir notablemente los procesos de degradación, en particular, la refrigeración entre 2 y 8°C suele ser una alternativa ideal para numerosos extractos naturales, debido a que, las bajas temperaturas ralentizan las reacciones químicas responsables de la descomposición de los compuestos bioactivos. Por otro lado, el uso de frascos de color ámbar también contribuyó a la reducción de la descomposición en la concentración de polifenoles del extracto (**Mariaki et al., 2016**).

La reducción moderada en el contenido de polifenoles, respalda lo señalado por **Costa et al. (2021)**, quien indica que las interacciones químicas pueden darse incluso en sistemas cerrados, debido a la complejidad de los componentes presentes en un extracto natural y a la probable influencia de factores endógenos que podrían actuar como catalizadores en determinadas reacciones.

Figura 13

Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función al contenido de polifenoles.



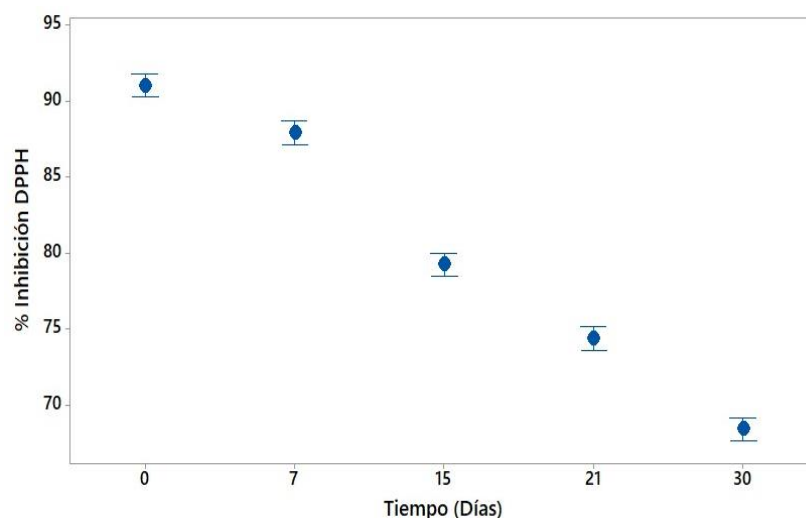
3.1.4.5 Análisis de la estabilidad de la capacidad antioxidante del extracto

El análisis de la capacidad antioxidante del extracto, llevado a cabo cada 7 días durante un mes estima una vida útil de alrededor de 32 días (**Figura 15**). Además, es evidente una marcada reducción en la actividad antioxidante durante el período comprendido entre los días 15 y 30, existiendo diferencias significativas entre la actividad antioxidante en el tiempo de estudio ($p < 0,05$) (**Anexo 20**).

Por medio de lo señalado por **Alam et al. (2013)**, se determinó un límite mínimo de 30% de inhibición del DPPH para evitar que la actividad antioxidante caiga por debajo de este valor, comprometiendo así su actividad biológica, de igual manera, se estipuló un límite máximo del 95%, considerando que, aunque los polifenoles aportan de manera significativa a la capacidad antioxidante de los extractos, existen otros compuestos que constituyen el porcentaje restante.

Figura 14

Comparación de medias con respecto a la capacidad antioxidante del extracto.

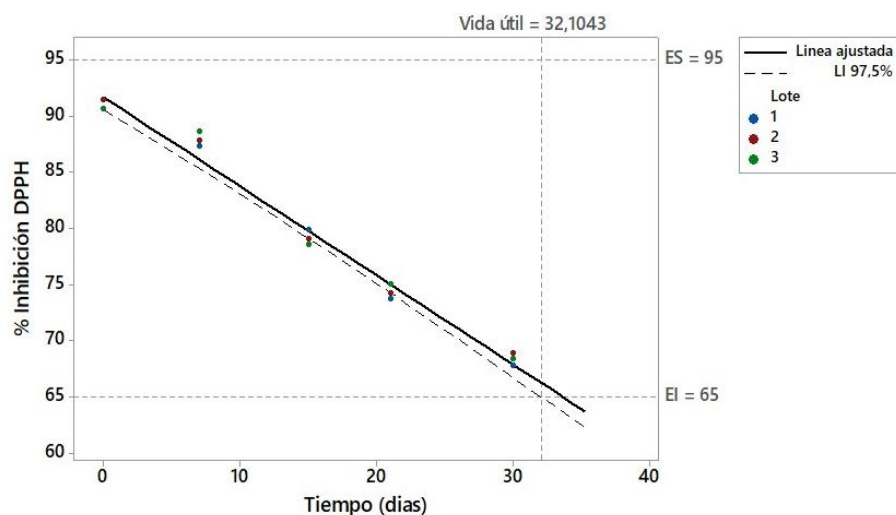


Nota. La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Como se muestra en la **Figura 14**, la actividad antioxidante experimentó una disminución en los valores del porcentaje de inhibición del DPPH, conforme a los valores registrados en el contenido de polifenoles del extracto. Puesto que, según **López et al. (2019)** existe una relación lineal entre el contenido total de polifenoles y la capacidad de captación de radicales libres, también conocida como actividad antioxidante. Una posible explicación para esta disminución en los valores, es que en el extracto los compuestos fenólicos que tienen una menor contribución a la actividad antioxidante son los primeros en degradarse (**Foss et al., 2022**).

Figura 15

Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la capacidad antioxidante del extracto.



EI = Especificación inferior, ES = Especificación superior
Ecuación para la línea ajustada: $DPPH = 91,7 - 0,792 \text{ Dias}$

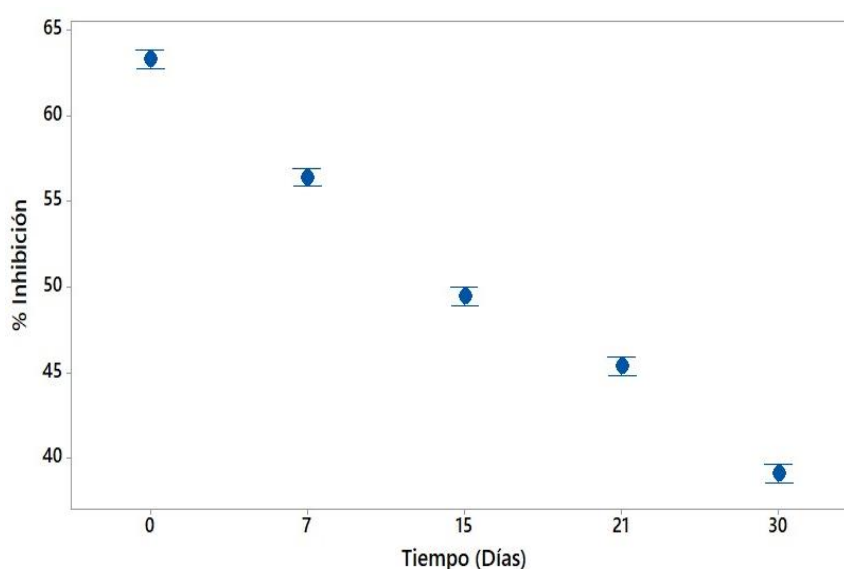
3.1.4.6 Análisis de la estabilidad de la capacidad antiinflamatoria del extracto

El análisis de la capacidad antiinflamatoria del extracto, llevado a cabo cada 7 días durante un mes estima una vida útil de alrededor de 32 días (**Figura 17**). Además, se muestra que si existieron diferencias significativas entre el período de estudio de un mes ($p < 0,05$) (**Anexo 22**).

Los límites definidos para pronosticar la vida útil se fijaron entre un 35% y 70% de inhibición, determinados con base en los requerimientos mínimos necesarios para que el extracto sea considerado de utilidad significativa (**Gonfa et al., 2023**).

Figura 16

Comparación de medias con respecto a la capacidad antiinflamatoria del extracto.

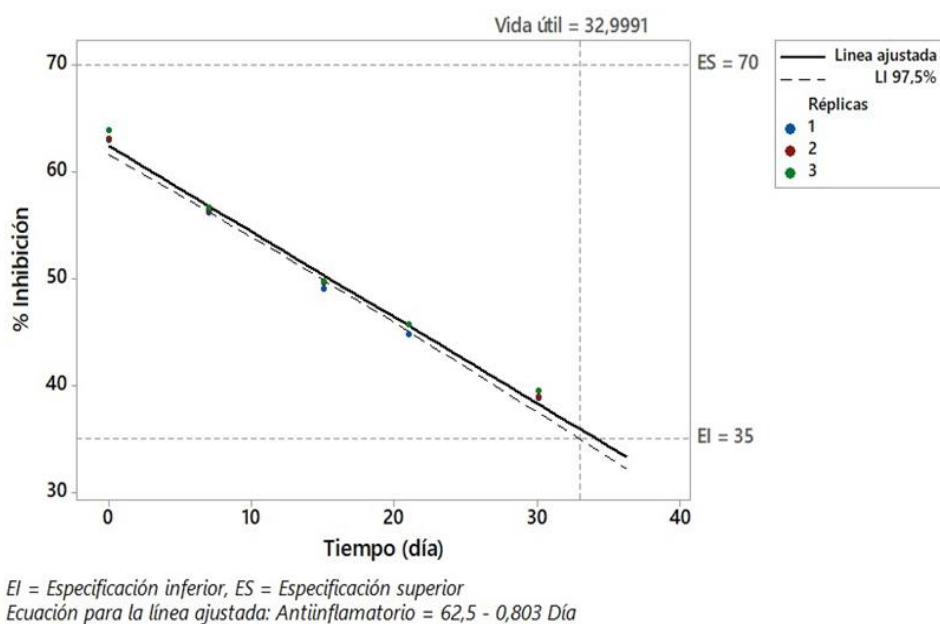


Nota. La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

En la **Figura 16**, se puede observar que el porcentaje de inhibición redujo de manera gradual con el transcurso del tiempo, estos cambios, se pueden asociar con alteraciones ocurridas en la composición química del extracto, que con el tiempo pueden influir en la capacidad del extracto para regular procesos inflamatorios (**Zbeeb et al., 2024**).

Figura 17

Pronóstico de tiempo de vida útil del extracto en función a la capacidad antiinflamatoria del extracto.



3.1.4.7 Determinación de la cinética de reacción

Para identificar el orden de reacción, se compararon los valores de los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos en los modelos cinéticos de orden cero y primer orden, presentados en la **Tabla 14**, seleccionando posteriormente el modelo que mostró el mejor ajuste.

Tabla 14

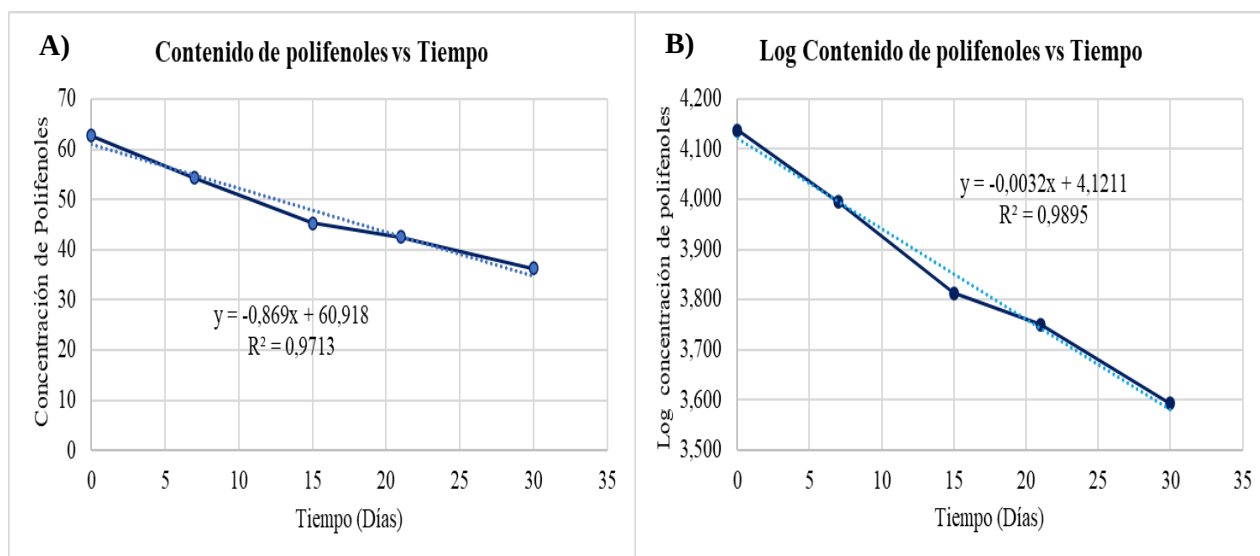
Coefficientes de determinación de los modelos cinéticos de degradación del extracto de flor de Jamaica.

Orden de reacción	Coefficiente de determinación (R^2)
Orden cero	0,9713
Primer orden	0,9895

En la **Figura 18** se visualiza de manera grafica los distintos ordenes de reacción para la determinación del orden de reacción del extracto de flor de Jamaica.

Figura 18

Gráficas del orden de reacción (cero y primer orden) del extracto de flor de Jamaica.



Nota. A) Orden de reacción cero. B) Primer orden de reacción.

La vida útil del extracto se determinó en función del orden de reacción, empleando la ecuación correspondiente (**Tabla 6**). La constante de velocidad k_1 registró un valor de $0,0032 \text{ días}^{-1}$, calculada a partir de la pendiente de la recta generada en la gráfica de reacción de primer orden. Como resultado, se estimó un tiempo de vida útil para el extracto de flor de Jamaica de 32,500 días (**Tabla 15**), correspondiente al período en el que ocurre un 10% de degradación del contenido total de polifenoles. Estos resultados coincidieron con las predicciones realizadas por el paquete estadístico utilizado para la concentración de polifenoles.

La degradación de compuestos bioactivos generalmente sigue una cinética de orden cero o primer orden. En este estudio, los datos experimentales de degradación se analizaron utilizando ambos modelos cinéticos, ya que son los más adecuados para describir la degradación de compuestos funcionales (**Ling et al., 2021**). Por consiguiente, se determinó que la reacción corresponde un modelo de primer orden, basado en el coeficiente de determinación R^2 que mostró el mejor ajuste en comparación con la reacción de orden cero. Esto indica, que la velocidad de la reacción de la degradación de los compuestos en el extracto es directamente proporcional a la concentración de los polifenoles.

Tabla 15

Cálculo del tiempo de vida media y vida útil del extracto de flor de Jamaica en el orden de reacción determinado (Primer orden).

Lote	Velocidad de reacción k	Vida media	Vida útil
	(días ⁻¹) n=1	$t_{1/2} = \ln 2/k_1$	$t_{10\%} = 0,104/k_1$
1	0,0032	216,608	32,500

3.1.5 Verificación de hipótesis

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Puesto que, los datos muestran que la vida útil del extracto con polifenoles de la flor de Jamaica obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido con capacidad antioxidante si varia significativamente con el tiempo.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Los extractos de flor de Jamaica se obtuvieron a través de un diseño experimental 2², evaluando diversas condiciones de extracción mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido. Los resultados indicaron que el tratamiento 4, correspondiente a una concentración de etanol del 70%, una temperatura de extracción de 50°C y con un tiempo constante de 40 minutos, fue el más eficiente, alcanzando una concentración de 62,667 mg GAE/g PS de polifenoles. Este resultado destaca a la flor de Jamaica como una fuente natural de compuestos fenólicos y demuestra que la combinación adecuada de factores empleados puede optimizar la extracción, convirtiendo estos factores en una referencia útil para estudios posteriores.
- La capacidad antioxidante del extracto fue evaluada mediante el método de inhibición del radical DPPH con equivalentes de Trolox. Los resultados mostraron que el extracto con mayor contenido de polifenoles obtuvo una inhibición del 90,886 % con 221,234 $\mu\text{mol Eq. Trolox/g}$, lo que demuestra una elevada capacidad antioxidante.
- La actividad antiinflamatoria del extracto con mayor concentración de polifenoles fue evaluada a través del ensayo de desnaturalización de la albúmina de huevo, alcanzando una inhibición del 62,585%. Aunque este porcentaje de inhibición fue inferior al obtenido en el diclofenaco de sodio empleado como fármaco estándar, los resultados evidencian una actividad antiinflamatoria significativa, resaltando el potencial de la flor de Jamaica como un extracto con propiedades antiinflamatorias naturales.
- Las evaluaciones de estabilidad realizadas permitieron determinar que el extracto obtenido a partir de la flor de Jamaica, presentó una vida útil de 32 días. Este período corresponde al tiempo necesario para que se degrade el 10% del contenido total de polifenoles. Mientras que el análisis de la cinética de reacción reveló que la degradación de los polifenoles siguió un modelo cinético de primer orden, con una constante de velocidad k_1 de 0,0032 días⁻¹. Estos resultados se obtuvieron al almacenar el extracto en frascos de color ámbar y bajo condiciones de refrigeración adecuadas (2 y 8 °C).

4.2 Recomendaciones

- Llevar a cabo análisis avanzados para identificar de forma precisa los compuestos fenólicos responsables de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
- Analizar las actividades biológicas (antioxidante y antiinflamatoria) mediante la aplicación de métodos *in vivo*, con el propósito de confirmar los valores obtenidos.
- Optimizar las condiciones de almacenamiento del extracto durante el período del estudio de estabilidad, con especial énfasis en preservar sus propiedades biológicas.
- Realizar estudios de estabilidad a largo plazo para analizar con mayor detalle cómo evolucionan los polifenoles presentes en el extracto a lo largo del tiempo.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abdurahman, N. H., y Sundarajan, S. (2019). Characterization of bioactive compounds extracted from patchouli: Comparing microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 702, No. 1, p. 012042). IOP Publishing. DOI: 10.1088/1757-899X/702/1/012042
- Alam, M. N., Bristi, N. J., y Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Almeida Junior, S. D. (2019). In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinoceptive potential. *BrJP*, 2, 386-389. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20190070>
- Anaya, J. (2021). *Agua de Jamaica: estos son sus beneficios antiinflamatorios y digestivos*. <https://www.semana.com/vida-moderna/articulo/agua-de-jamaica-estos-son-sus-beneficios-antiinflamatorios-y-digestivos/202111/>
- Awad, A. M., Kumar, P., Ismail-Fitry, M. R., Jusoh, S., Ab Aziz, M. F., y Sazili, A. Q. (2021). Green Extraction of Bioactive Compounds from Plant Biomass and Their Application in Meat as Natural Antioxidant. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1465. <https://doi.org/10.3390/antiox10091465>
- Batalla Mayoral, J., Vega Hernández, M., y Silveti-Loeza, A. (2019). Análisis de la actividad antioxidante en la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante las técnicas FRAP y DPPH. *RD-ICUAP*, 5(14). <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2019.14.386>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., y Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4), 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., y Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., y Prieto, M. A. (2021). Benefits and Drawbacks of Ultrasound-

- Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *International journal of environmental research and public health*, 18(17), 9153. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Cassol, L., Rodrigues, E., y Noreña, C. P. Z. (2019). Extracting phenolic compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyx using microwave assisted extraction. *Industrial crops and products*, 133, 168-177. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.023>
- Castro, G. (2018). *Flor de Jamaica Africana (Hibiscus sabdariffa)*. <https://colombia.inaturalist.org/taxa/163773-Hibiscus-sabdariffa>
- Chaiya, P., Senarat, S., Phaechamud, T., y Narakornwit, W. (2022). In vitro anti-inflammatory activity using thermally inhibiting protein denaturation of egg albumin and antimicrobial activities of some organic solvents. *Materials Today: Proceedings*, 65, 2290-2295. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.916>
- Cleveland Clinic. (2024). *Oxidative Stress*. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/oxidative-stress>
- Cornejo, L. A., y Párraga, R. (2021). Capacidad antioxidante y contenido fenólico de una bebida a base de la flor de jamaica (Hibiscus sabdariffa). *CIENCIAMATRIA*, 7(12), 229-249. <https://doi.org/10.35381/cm.v7i12.427>
- Costa, M., Sezgin-Bayindir, Z., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Saso, L., y Bravo-Díaz, C. (2021). Polyphenols as Antioxidants for Extending Food Shelf-Life and in the Prevention of Health Diseases: Encapsulation and Interfacial Phenomena. *Biomedicines*, 9(12), 1909. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909>
- Dina, T. A., Taslima, M. A., Ahmed, N. U., y Uddin, M. N. (2010). Analgesic and anti-inflammatory properties of Argyreia argentea methanol extract in animal model. *Journal of Taibah University for science*, 3(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60014-4](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60014-4)
- Dini, I., y Grumetto, L. (2022). Recent Advances in Natural Polyphenol Research. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24), 8777. <https://doi.org/10.3390/molecules27248777>
- Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., y Pinet, F. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(9), 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>

- Efosa, J. O., Omeke, K., y Azeke, M. A. (2023). Drying temperature affects the hypolipidemic, antioxidant, and antihypertensive potential of *Hibiscus sabdariffa* calyx in rats induced with L-NAME. *Toxicology reports*, 11, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.09.005>
- ElGamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S., y ElMasry, G. (2023). Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, 13(6), 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- European Medicines Agency. (2003). ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products step 5 note for guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-and-products-step-5_en.pdf
- Estrada, H. A. G., Ruiz, K. N. G., y Medina, J. D. (2018). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 10(3), 182-217. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>
- Francini, A., Pintado, M., Manganaris, G. A., y Ferrante, A. (2020). Bioactive compounds biosynthesis and metabolism in fruit and vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 11, 129. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00129>
- Foss, K., Przybyłowicz, K. E., y Sawicki, T. (2022). Antioxidant activity and profile of phenolic compounds in selected herbal plants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(3), 383-389. DOI: 10.1007/s11130-022-00989-w
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Qin, X. S., Gan, R. Y., y Li, H. B. (2010). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8602–8617. <https://doi.org/10.3390/molecules15128602>
- Garbi, M. I., Mohammed, S. F., Magzoub, A. A., Hassabelrasoul, R. M., Saleh, M. S., Badri, A. M., ... y Garbi, I. (2017). In vitro anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Int. J. Home Sci*, 3, 234-237. https://www.researchgate.net/publication/314284141_In_vitro_anti-inflammatory_properties_of_methanolic_extract_of_Hibiscus_sabdariffa_flowers
- García-Santoyo, K. P., Ozuna-Lopez, C., y Mares-Mares, E. (2020). Extracción de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) asistida por ultrasonidos de potencia. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 227-232. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume5/5/3/46.pdf>

- Geeganage, J. R., y Gunathilaka, M. D. T. L. (2024). Mechanistic Insight Into Anti-inflammatory Potential of Hibiscus rosa-sinensis Flower Extract as a Herbal Remedy: A Systematic Review. *Journal of Herbal Medicine*, 45, 100884. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2024.100884>
- Gonçalves, A. C., Bento, C., Jesus, F., Alves, G., y Silva, L. R. (2018). Sweet cherry phenolic compounds: Identification, characterization, and health benefits. *Studies in natural products chemistry*, 59, 31-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00002-5>
- Gonfa, Y. H., Tessema, F. B., Bachheti, A., Rai, N., Tadesse, M. G., Singab, A. N., Chaubey, K. K y Bachheti, R. K. (2023). Anti-inflammatory activity of phytochemicals from medicinal plants and their nanoparticles: A review. *Current Research in Biotechnology*, 6, 100152. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100152>
- González, A. (2020). *Flor de Jamaica*. <https://www.utep.edu/herbal-safety/hechos-herbarios/hojas-de-datos-a-base-de-hierbas/flor-de-jamaica.html>
- Green Sky Biological Tech. (2024). *Beyond the Harvest: Optimal Conditions for Storing Plant Extracts*. https://www.greenskybio.com/plant_extract/beyond-the-harvest-optimal-conditions-for-storing-plant-extracts.html#:~:text=Storing%20plant%20extracts%20at%20low,the%20breakdown%20of%20bioactive%20compounds.
- Guardiola, S., y Mach, N. (2014). Potencial terapéutico del Hibiscus sabdariffa: una revisión de las evidencias científicas [Therapeutic potential of Hibiscus sabdariffa: a review of the scientific evidence]. *Endocrinología y nutrición: Órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*, 61(5), 274–295. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.10.012>
- Gulcin, İ., y Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Hadiwijaya, Y., Putri, I. E., Mubarak, S., y Hamdani, J. S. (2020). Rapid and non-destructive prediction of total soluble solids of guava fruits at various storage periods using handheld near-infrared instrument. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 458, No. 1, p. 012022). doi:10.1088/1755-1315/458/1/012022
- Haminiuk, C. W., Plata-Oviedo, M. S., de Mattos, G., Carpes, S. T., y Branco, I. G. (2014). Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from Eugenia pyriformis using different solvents. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2862–2866. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0759-z>

- Hasan, M. M., Islam, M. E., Hossain, M. S., Akter, M., Rahman, M. A. A., Kazi, M., Khan, S., y Parvin, M. S. (2023). Unveiling the therapeutic potential: Evaluation of anti-inflammatory and antineoplastic activity of *Magnolia champaca* Linn's stem bark isolate through molecular docking insights. *Heliyon*, 10(1), e22972. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22972>
- Hedayati, N., Yaghoobi, A., Salami, M., Gholinezhad, Y., Aghadavood, F., Eshraghi, R., Aarabi, M. H., Homayoonfal, M., Asemi, Z., Mirzaei, H., Hajijafari, M., Mafi, A., y Rezaee, M. (2023). Impact of polyphenols on heart failure and cardiac hypertrophy: clinical effects and molecular mechanisms. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 10, 1174816. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1174816>
- Hernández, L., y López, J. (2019). *Flor de Jamaica: Ben <eficios e Información Nutricional*. <https://www.vegaffinity.com/comunidad/alimento/flor-de-jamaica-beneficios-informacion-nutricional--f2468>
- Hikmawanti, N. P. E., Fatmawati, S., y Asri, A. W. (2021). The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) leaves extracts. In *IOP conference series: Earth and environmental science* (Vol. 755, No. 1, p. 012060). IOP Publishing. Doi:10.1088/1755-1315/755/1/012060
- İşleröğlu, H., y Türker, İ. (2023). Thermal stability and degradation kinetics of the phenolics of *Trigonella-foenum graecum* L. leaf extracts. *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 7(2), 116-124. <https://doi.org/10.35860/iarej.1262837>
- Jha, A. K., y Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>
- Kaur, S., y Ubeyitogullari, A. (2023). Extraction of phenolic compounds from rice husk via ethanol-water-modified supercritical carbon dioxide. *Heliyon*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14196>
- Kedare, S. B., y Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Kelber, O., Steinhoff, B., Nauert, C., Biller, A., Adler, M., Abdel-Aziz, H., Okpanyi, S. N., Kraft, K., y Nieber, K. (2017). Ethanol in herbal medicinal products for children: Data from pediatric studies and pharmacovigilance programs. *Wiener medizinische Wochenschrift*, 167(7-8), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s10354-016-0474-x>

- Kinhal, V. (2023). *Medicinal Plant Extracts for Post-harvest Fresh Produce Preservation*. <https://felixinstruments.com/blog/medicinal-plant-extracts-for-post-harvest-fresh-produce-preservation/>
- Komala, A. M., y Haryoto, H. (2020). Tests of Ash Content, Moisture Content and Dry Shrinkage of Ethanol Extracts of Capidada Leaves (*Sonneratia alba*) and Ketapang (*Terminilia cattapa*). *Journal of Nutraceuticals and Herbal Medicine*, 3(1), 10-14.
- Laguerre, M., Lecomte, J. y Villeneuve, P. (2014). The physico-chemical basis of phenolic antioxidant activity. *Lipid Technology*, 26(3), 59-62. <https://doi.org/10.1002/lite.201400017>
- Lee, J. E., Jayakody, JTM, Kim, J. I., Jeong, J. W., Choi, K. M., Kim, T. -S., Seo, C., Azimi, I., Hyun, J., y Ryu, B. (2024). La influencia de la elección del disolvente en la extracción de compuestos bioactivos de Asteráceas: una revisión comparativa. *Foods*, 13 (19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., y Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Li, W., Chen, H., Xu, B., Wang, Y., Zhang, C., Cao, Y., y Xing, X. (2023). Research progress on classification, sources and functions of dietary polyphenols for prevention and treatment of chronic diseases. *Journal of Future Foods*, 3(4), 289-305. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.001>
- Ling, J. K. U., San Chan, Y., y Nandong, J. (2021). Degradation kinetics modeling of antioxidant compounds from the wastes of Mangifera pajang fruit in aqueous and choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent. *Journal of Food Engineering*, 294, 110401. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110401>
- López, C., González, C., Guerrero, M.J., Mariño, G., Jácome, B. y Beltrán, E. (2019). Estudio de la estabilidad de los antioxidantes del vino de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) en el almacenamiento. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 29(1), 105-118. <http://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.09>.
- Lozano, M. D. C., Córdoba, D., y Córdoba, M. (2012). *Manual de tecnología farmacéutica*. Fotoletra S.A
- Luo, D., Fan, J., Jin, M., Zhang, X., Wang, J., Rao, H., y Xue, W. (2024). The influence mechanism of pH and polyphenol structures on the formation, structure, and digestibility of pea starch-

- polyphenol complexes via high-pressure homogenization. *Food Research International*, 194, 114913. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114913>
- Madhuranga, H. D. T., y Samarakoon, D. N. A. W. (2023). In vitro Anti-Inflammatory Egg Albumin Denaturation Assay: An Enhanced Approach. *Nat Ayurvedic Med*, 7(3), 000411. DOI: 10.23880/jonam-16000411
- Mallea, A., Zalazar, F., Burgos, F., y Morales, A. (2004). Estudio de la Estabilidad de Extractos Vegetales empleados en Bases Cosméticas mediante análisis Espectrofotométrico. *BIOFARBO*, 12.
- Maraiki, F., Farooq, F., y Ahmed, M. (2016). Eliminating the use of intravenous glass bottles using a FOCUS-PDCA model and providing a practical stability reference guide. *International Journal of Pharmacy Practice*, 24(4), 271–282. <https://doi.org/10.1111/ijpp.12245>.
- Mengo, O. (2019). *Flor de Jamaica: Beneficios, propiedades y desventajas*. <https://agrotendencia.tv/agropedia/cultivos/cultivo-de-flor-de-jamaica/>
- Meshram, G. G., Kumar, A., Rizvi, W., Tripathi, C. D., y Khan, R. A. (2016). Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Albizzia lebbek* in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(2), 172-175. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.038>
- Mehta, N., S. J., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Khatkar, S. K., Khatkar, A. B., Pathak, D., Kaka, U., y Sazili, A. Q. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(19), 2973. <https://doi.org/10.3390/foods11192973>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (2019). *Se promueve cultivo de Jamaica en El Oro*. <https://www.agricultura.gob.ec/se-promueve-cultivo-de-jamaica-en-el-oro/>
- Moharram, H. A., y Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alex. J. Food Sci. Technol*, 11, 31-42. https://ajfs.journals.ekb.eg/article_20251_46bd1a0433e6dc694aa7953b19fd1868.pdf
- More, P. R., Jambrak, A. R., y Arya, S. S. (2022). Green, environment-friendly and sustainable techniques for extraction of food bioactive compounds and waste valorization. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 296-315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.016>

- Mungwari, C. P., King'onde C. K., Sigauke, P., Obadele, B. A. (2024). Conventional and Modern Techniques for Bioactive Compounds Recovery from Plants: Review. *Scientific African*, e02509. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02509>
- Munteanu, I. G., y Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nahuatt, G., Martínez, M., Ruiz, E., Morales, R., Carrillo, R., y Ceferino, J. G. (2017). Propiedades antimicrobianas y antioxidantes de Jamaica. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 3(3), 61-69.
- Narayanaswamy, R., y Veeraragavan, V. (2020). Chapter 8 - Natural products as antiinflammatory agents. *Studies in Natural Products Chemistry*. 269-306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819483-6.00008-4>
- Nguyen, T. L., Ora, A., Häkkinen, S. T., Ritala, A., Räisänen, R., Kallioinen-Mänttari, M., y Melin, K. (2024). Innovative extraction technologies of bioactive compounds from plant by-products for textile colorants and antimicrobial agents. *Biomass conversion and biorefinery*, 14(20), 24973-25002. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04726-4>
- Palazón, M. A., Ross, G., Vidal, M. L., y Abellán, P. (2003). Revisión: cinética de los procesos de deterioro de los alimentos. *Alimentación, equipos y tecnología*, 22(183), 61-68.
- Paraíso, C. M., Dos Santos, S. S., Correa, V. G., Magon, T., Peralta, R. M., Visentainer, J. V., y Madrona, G. S. (2019). Ultrasound assisted extraction of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) bioactive compounds for application as potential functional ingredient. *Journal of food science and technology*, 56(10), 4667–4677. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03919-y>
- Patra, A., Abdullah, S. y Pradhan, R.C. (2022). Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresour. Bioprocess.* 9, 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00498-3>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81
- Peredo Pozos, G. I., Ruiz-López, M. A., Zamora Nátera, J. F., Álvarez Moya, C., Barrientos Ramírez, L., Reynoso Silva, M., Rodríguez Macías, R., García-López, P. M., González Cruz, R., Salcedo Pérez, E., y Vargas Radillo, J. J. (2020). Antioxidant Capacity and Antigenotoxic Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Extracts Obtained with Ultrasound-Assisted Extraction Process. *Applied Sciences*, 10(2), 560. <https://doi.org/10.3390/app10020560>
- Petreska Stanoeva, J., Balshikevska, E., Stefova, M., Tusevski, O., y Simic, S. G. (2020). Comparison of the effect of acids in solvent mixtures for extraction of phenolic compounds from Aronia

- melanocarpa. *Natural Product Communications*, 15(7), 1934578X20934675. <https://doi.org/10.1177/1934578X20934675>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., y Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2016). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89. DOI: 10.3305/nh.2012.27.1.5418.
- Rassem, H. H., Khamidun, M. H. B., Ali, U. F. M., Hadibarata, T., y Alrabie, N. A. (2024). Comprehensive analysis of antioxidant and antibacterial activities of water and methanol extracts of Hibiscus flower. *Journal of King Saud University-Science*, 36(11), 103506. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103506>
- Reddy V. P. (2023). Oxidative Stress in Health and Disease. *Biomedicines*, 11(11), 2925. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112925>
- Ridlo, M., Kumalaningsih, S., y Pranowo, D. (2020, April). Process of microwave assisted extraction (MAE) for Rhodomyrtus tomentosa fruit and its bioactive compounds. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* DOI: 10.1088/1755-1315/475/1/012038
- Rodríguez-Yoldi M. J. (2021). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Plant Extracts. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 921. <https://doi.org/10.3390/antiox10060921>
- Rojas, T., Fuentes Campos, M. E., Contreras-López, E., Gómez, S., y Muñoz-Jáuregui, A. M. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (Corryocactus brevistylus). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(2), 258-267. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000200012&script=sci_arttext&tlng=pt
- Rohmah, F. U., Safitri, R. A., Rahmawati, A. U., y Rahmawati, A. (2022). Effect of Ethanol Solution Concentration in the Extraction Process of Centella asiatica L. Bioactive Components Using Microwave-Assisted Extraction (MAE) Method. *Journal of Biobased Chemicals*, 2(2), 113-125. <https://doi.org/10.19184/jobc.v2i2.274>
- Sánchez Ricardo, L. I., y Hernández Gárciga, F. F. (2011). Reacciones adversas por antiinflamatorios no esteroideos. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(1), 60-68.
- Sanou, A., Konaté, K., Kabakde, K., Dakuyo, R., Bazié, D., Hemayoro, S., y Dicko, M. H. (2023). Modelling and optimisation of ultrasound-assisted extraction of roselle phenolic compounds using the surface response method. *Scientific Reports*, 13(1), 358. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27434-5>

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., y Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 8(1), 1–10. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3218439/>
- Sáyago, S., y Goñi, I. (2014). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición: Hibiscus sabdariffa L: Fuente de fibra antioxidante*. [https://www.alanrevista.org/ediciones/2010/1/art12/#:~:text=Adem%C3%A1s%2C%20la%20presencia%20de%20compuestos,intestinal%20m%C3%A1s%20sano%20\(40\).](https://www.alanrevista.org/ediciones/2010/1/art12/#:~:text=Adem%C3%A1s%2C%20la%20presencia%20de%20compuestos,intestinal%20m%C3%A1s%20sano%20(40).)
- Sayágo, S., Navidad, M., Perales, G., Sánchez, J., y Zamora, V. (2018). *Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados*. <https://alimentos-autoctonos.fabro.com.mx/legal.html>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). *Gobierno de México: Refrescante y nutritivo sabor de la jamaica*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/refrescante-y-nutritivo-sabor-de-la-jamaica?idiom=es#:~:text=Sus%20flores%20miden%20de%208,agrio%20de%20Guinea%20o%20saril.>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). *Gobierno de México: Bebida de flor de jamaica, además de sabrosa es saludable y refrescante*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/bebida-de-flor-de-jamaica-ademas-de-sabrosa-es-saludable-y-refrescante>
- Shahidi, F., y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shaikh, R. U., Pund, M. M., y Gacche, R. N. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system *in vitro* as well as *in vivo*. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(4), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.07.001>
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashi, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., y Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Silvestrini, A., Meucci, E., Ricerca, B. M., y Mancini, A. (2023). Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 10978. <https://doi.org/10.3390/ijms241310978>
- Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., y Adhikari, B. (2021). Extraction and characterization of polyphenolic compounds and potassium hydroxycitrate from *Hibiscus sabdariffa*. *Future Foods*, 4, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100087>

- Sirag, N., Elhadi, M. M., Algaili, A. M., Hassan, H. M., y Ohaj, M. (2014). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx ethanolic extract. *Standard Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1(2), 034-039.
- Sochor, J., Ryvolova, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., Adam, V., Trnkova, L., Havel, L., Beklova, M., Zehnalek, J., Provaznik, I., y Kizek, R. (2010). Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8618–8640. <https://doi.org/10.3390/molecules15128618>
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tutus, L. (2018). *Cultivo de Hibisco roselle*. <https://ediblenortheastflorida.ediblecommunities.com/food-thought/roselle-hibiscus>
- Van Norman G. A. (2019). Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?. *JACC. Basic to translational science*, 4(7), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2019.10.008>
- Verma, M., Shakya, S., Kumar, P., Madhavi, J., Murugaiyan, J., y Rao, M. (2021). Trends in packaging material for food products: historical background, current scenario, and 59 future prospects. *Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 4069–4082. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04964-2>.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., y Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo científico médico*, 21(1), 171-186.
- Vilas-Boas, S. M. (2017). *Studies on the solubility of phenolic compounds* (Doctoral dissertation). DOI: 10.13140/RG.2.2.23497.77926
- Villalobos-Vega, M. J., Rodríguez-Rodríguez, G., Armijo-Montes, O., Jiménez-Bonilla, P., y Álvarez-Valverde, V. (2023). Optimization of the Extraction of Antioxidant Compounds from Roselle *Hibiscus Calyxes (Hibiscus sabdariffa)*, as a Source of Nutraceutical Beverages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6), 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules28062628>
- Wade, L.G. (2018). *Phenols*. <https://www.britannica.com/science/benzene>
- Xia, P., Ahmmed, M. K., y Rashidín, A (2023). Exploring efficient extraction methods: Bioactive compounds and antioxidant properties from New Zealand damson plums. *Food Bioscience*, 55, 103057. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103057>
- Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A., Akhter, Sarkar., Ibne, Wahed., Emran, Talha., y Siddiqui, Shafayet (2020). *Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of*

ethanolic root extract of Choi (Piper chaba) Clinical Phytoscience, 6, 1-10
<https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>

Zamora, V., Mariño, G., González, C., Jácome, B., y Beltrán-Sinchiguano, E. (2018). Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en el proceso de clarificación del vino de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) utilizando cálices frescos. *Enfoque UTE*, 1-14.
<https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.305>

Zbeeb, H., Baldini, F., Zeaiter, L., y Vergani, L. (2024). The Anti-Inflammatory Potential of an Ethanolic Extract from *Sarcopoterium spinosum* Fruits for Protection and/or Counteraction against Oxidative Stress in Dysfunctional Endothelial Cells. *International journal of molecular sciences*, 25(3), 1601. <https://doi.org/10.3390/ijms25031601>

Zhang, QW., Lin, LG. y Ye, WC. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

ANEXOS

Anexo 1

Proceso de obtención de extractos con polifenoles de la flor de Jamaica.



Nota: Obtención de extractos con polifenoles de la flor de Jamaica. A) Flor de Jamaica seca. B) Flor de Jamaica seca. C) Flor de Jamaica triturada. D) Extracción de polifenoles mediante baño ultrasónico. E) Filtrado del extracto. F) Almacenamiento del extracto obtenido.

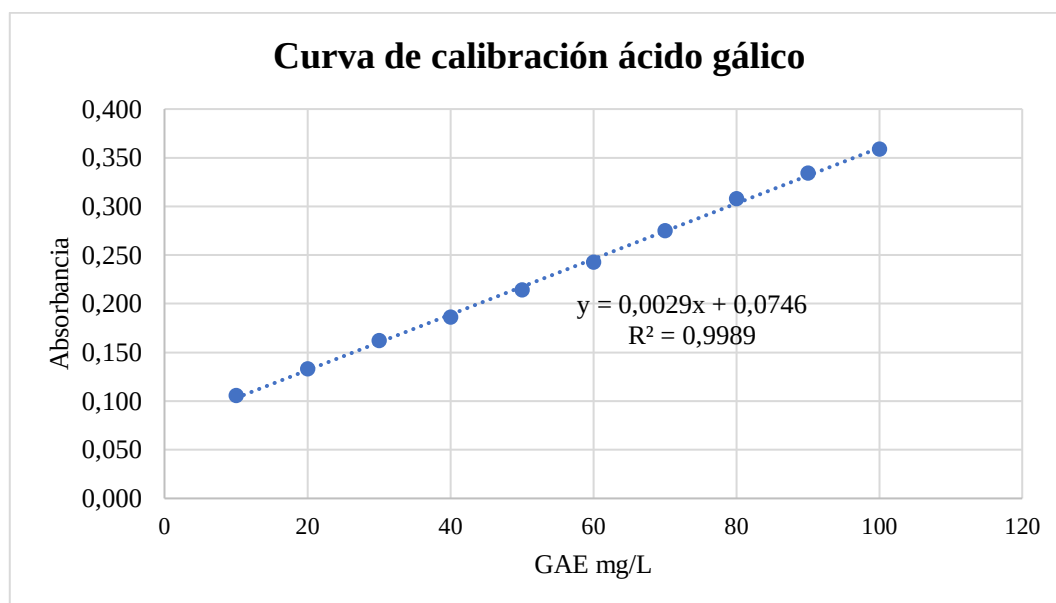
Anexo 2

Microplaca para la determinación de polifenoles mediante el método Folin - Ciocalteu.



Anexo 3

Curva de calibración de ácido gálico (10 – 100 µL).



Anexo 4

Cuantificación de TPC de cada tratamiento (GAE mg/L).

Tratamientos	R1	R2	R3	Promedio	FD
1	0,177	0,177	0,180	0,178 ± 0,002	25
2	0,223	0,217	0,253	0,231 ± 0,019	25
3	0,227	0,217	0,218	0,221 ± 0,006	25
4	0,243	0,265	0,294	0,267 ± 0,026	25

Anexo 5

Fórmula para calcular los polifenoles de cada uno de los tratamientos.

$$\text{Polifenoles} = \frac{\text{Abs} - b}{m} * FD * \frac{V_{ExtF}}{m_0}$$

$$\text{Polifenoles} = \frac{0,177 - 0,0746}{0,0029} * 25 * \frac{0,240}{6}$$

$$\text{Polifenoles} = 35,310$$

Donde:

V_{ExtF} = Volumen del extracto final.

m_0 = Masa del material vegetal.

Anexo 6

Cuantificación de TPC de cada tratamiento (mg GAE/g PS).

Tratamientos	Compuestos fenólicos totales (TPC) (mg GAE/g PS)				Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
	R1	R2	R3	Promedio		
1	35,310	35,310	36,345	35,655	0,597	1,675
2	51,172	49,103	61,517	53,931	6,651	12,332
3	50,138	49,103	49,448	49,563	0,527	1,063
4	61,172	63,241	63,586	62,667	1,305	5,023

Anexo 7

Tabla ANOVA para la cuantificación de polifenoles de la flor de Jamaica, basada en un diseño experimental de dos factores con dos niveles.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Concentración de etanol	1	664,69	664,690	838,34	0,000
Temperatura de extracción	1	624,27	624,271	787,36	0,000
Interacciones de 2 términos	1	0,80	0,803	1,01	0,344
Concentración de etanol *					
Temperatura de extracción	1	0,80	0,803	1,01	0,344
Error	8	6,34	0,793		
Total	11	1296,11			

Anexo 8

Determinación de la capacidad antioxidante del tratamiento con mayor concentración de polifenoles.



Anexo 9

Cálculo demostrativo del porcentaje de inhibición del DPPH.

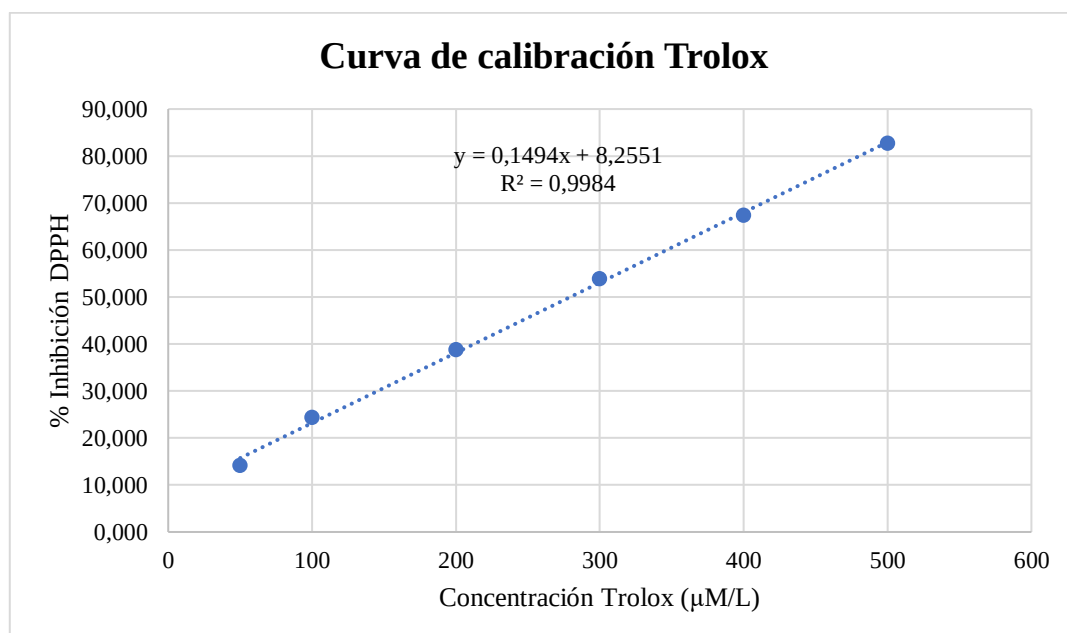
$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] * 100$$

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{0,093 - 0,057}{0,448 - 0,057} \right) \right] * 100$$

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = 90,886$$

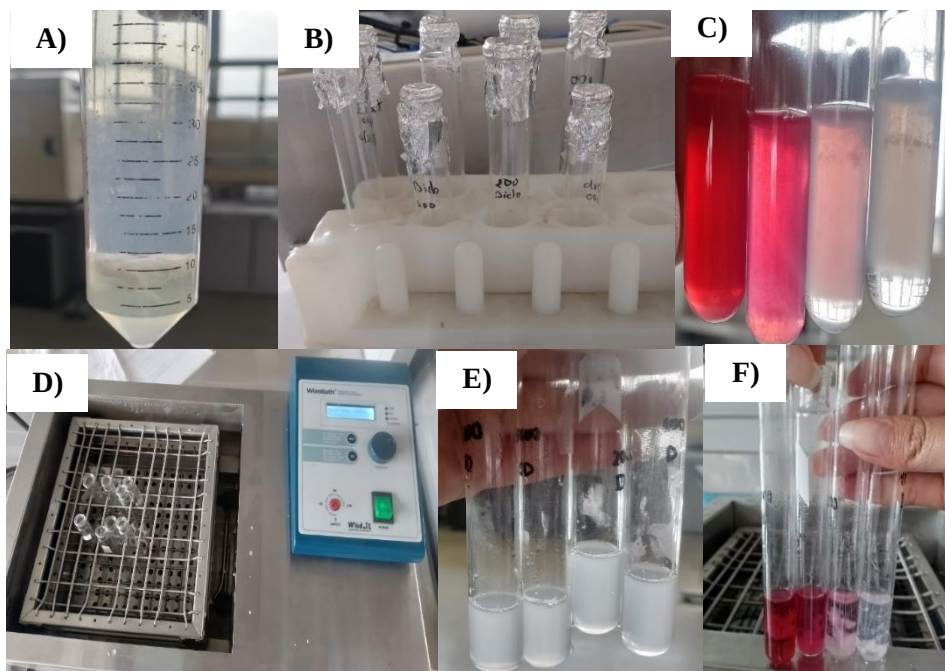
Anexo 10

Curva de calibración de Trolox (50 - 500 µmol/L).



Anexo 11

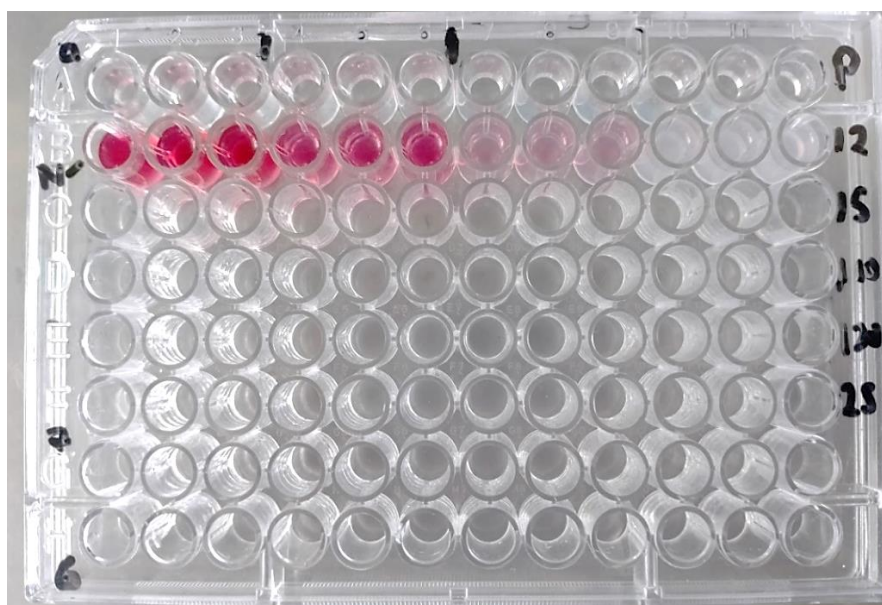
Proceso de desnaturalización de la albúmina de huevo.



Nota: Ensayo de desnaturalización de la albúmina de huevo para la determinación de la actividad antiinflamatoria del mejor extracto. A) Obtención de la ovoalbúmina mediante centrifugación. B) Preparación de las distintas muestras. C) Incubación de las muestras. D) Desnaturalización de la albumina de huevo en baño maría. E) y F) Ovoalbúmina desnaturalizada de la muestra de Diclofenaco de sodio y el extracto de flor de Jamaica.

Anexo 12

Microplaca de 96 pocillos para la determinación de la actividad antiinflamatoria.



Anexo 13

Actividad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica con mayor concentración de polifenoles y del Diclofenaco de sodio (control positivo).

Concentración (µg/mL)	Control positivo no desnaturalizado	Control positivo desnaturalizado	Extracto no desnaturalizado	Extracto desnaturalizado
1000	0,072	0,079	0,136	0,152
500	0,098	0,120	0,122	0,147
200	0,078	0,125	0,102	0,152
100	0,059	0,137	0,056	0,151
Control negativo no desnaturalizado	0,048	Control negativo desnaturalizado	0,179	

Anexo 14

Cálculo ilustrativo del porcentaje de inhibición del extracto mediante la desnaturalización de la albúmina de huevo.

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{calentada}} - A_{\text{sin calentar}}}{A_{\text{control calentado}} - A_{\text{sin calentar}}} \right) \right] * 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{0,152 - 0,136}{0,179 - 0,136} \right) \right] * 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 62,585$$

Anexo 15

ANOVA del pH en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Tiempo (Días)	4	1,38953	0,347383	1002,07	0,000
Error	10	0,00347	0,000347		
Total	14	1,39300			

Anexo 16

Resumen del pH en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Tiempo (Días)	# Réplicas	Media	Desviación estándar	IC del 95%
0	3	3,270	0,010	(3,246 – 3,293)
7	3	3,573	0,011	(3,549 – 3,597)
15	3	3,786	0,021	(3,762 – 3,810)
21	3	3,996	0,021	(3,972 – 4,020)
30	3	4,123	0,025	(4,099 – 4,147)

Anexo 17

ANOVA de la humedad en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Tiempo (Días)	4	0,291198	0,072799	1819,99	0,000
Error	10	0,000400	0,000040		
Total	14	0,291598			

Anexo 18

Resumen de la humedad del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Tiempo (Días)	# Réplicas	Media	Desviación estándar	IC del 95%
0	3	98,888	0,0095	(98,879 – 98,896)
7	3	98,793	0,0051	(98,755 – 98,801)
15	3	98,678	0,0086	(98,670 – 98,686)
21	3	98,595	0,0021	(98,587 – 98,603)
30	3	98,495	0,0020	(98,486 – 98,503)

Anexo 19

ANOVA del contenido de polifenoles en el extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Tiempo (Días)	4	1335,61	333,903	284,59	0,000
Error	10	11,73	1,173		
Total	14	1347,35			

Anexo 20

Resumen del contenido de polifenoles del extracto de flor de Jamaica con un período de estudio de un mes.

Tiempo (Días)	# Réplicas	Media	Desviación estándar	IC del 95%
0	3	62,666	1,306	(61,273 – 64,060)
7	3	54,276	1,035	(52,882 – 55,669)
15	3	44,391	1,054	(42,997 – 45,784)
21	3	42,437	0,868	(41,043 – 43,830)
30	3	35,885	1,108	(34,492 – 37,279)

Anexo 21

ANOVA de la capacidad antioxidante del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Tiempo (Días)	4	1054,05	263,513	735,77	0,000
Error	10	3,58	0,358		
Total	14	1057,64			

Anexo 22

Resumen de la actividad antioxidante del extracto de flor de Jamaica registrado en un mes de estudio.

Tiempo (Días)	# Réplicas	Media	Desviación estándar	IC del 95 %
0	3	90,896	0,532	(90,216 – 91,756)
7	3	87,899	0,644	(87,129 – 88,669)
15	3	79,194	0,644	(78,424 – 79,964)
21	3	74,330	0,644	(73,560 – 75,100)
30	3	68,356	0,512	(67,586 – 69,126)

Anexo 23

ANOVA de la capacidad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica en un período de estudio de un mes.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Tiempo (Días)	4	1070,99	267,746	1568,33	0,000
Error	10	1,71	0,171		
Total	14	1072,69			

Anexo 24

Resumen de la actividad antiinflamatoria del extracto de flor de Jamaica registrado en un mes de estudio.

Tiempo (Días)	# Réplicas	Media	Desviación estándar	IC del 95 %
0	3	63,325	0,509	(62,793 – 63,856)
7	3	56,401	0,224	(55,869 – 56,932)
15	3	49,441	0,395	(48,909 – 49,973)
21	3	45,369	0,506	(44,837 – 45,900)
30	3	39,076	0,365	(38,545 – 39,608)