

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE INGENIERIA



Desarrollo del método de extracción de compuestos bioactivos de flor de Jamaica, y su aplicación en el diseño de una biopelícula

Por:

ALBA MARCELA GONZALEZ PUENTE

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE INGENIERIA

Desarrollo del método de extracción de compuestos bioactivos de flor de Jamaica,
y su aplicación en el diseño de una biopelícula

Por:

ALBA MARCELA GONZALEZ PUENTE

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

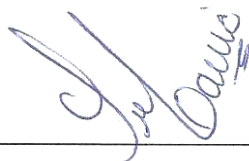
INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Xochitl Ruelas Chacón

Asesor Principal



QFB. María Carmen Julia García

Coasesor



Dr. Antonio Flores Naveda

Coasesor

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE INGENIERIA

PROGRAMA DOCENTE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis

Desarrollo del método de extracción de compuestos bioactivos de flor de Jamaica,
y su aplicación en el diseño de una biopelícula.

Presentada por:

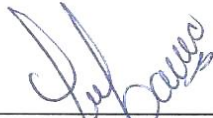
ALBA MARCELA GONZALEZ PUENTE

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

De acuerdo al artículo 90 del reglamento para Alumnos de Licenciatura

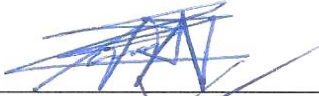
QFB. María Carmen Julia García
Presidente



Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Vocal



Dr. Antonio Flores Naveda
Vocal



Dr. Neymar Camposeco Montejo
Vocal





M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citar; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Alba Marcela González Puente

Agradecimientos

Principalmente agradezco a **Dios** por haber iluminado mi camino y darme la fortaleza para haber logrado llegar a este punto a pesar de muchas dificultades que se presentaron a lo largo de mi formación académica.

A mi ALMA MATER la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por ser una noble institución que me recibió y me dio las herramientas necesarias para mi formación profesional y personal.

A mi asesora de tesis la **Dra. Xochitl Ruelas Chacón** por no dejarme sola en este proyecto, darme consejos y haberme transmitido sus conocimientos que me fueron de mucha utilidad para el desarrollo de este trabajo, además por ser una excelente profesora con vocación para que los jóvenes aprendamos de verdad.

A la **QFB. María Carmen Julia García** por su apoyo, contribución durante mi formación profesional y en el apoyo para el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Antonio Flores Naveda** por su colaboración en el desarrollo y revisión de mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Neymar Camposeco Montejo** por su apoyo y colaboración en el desarrollo y revisión de mi trabajo de tesis.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis padres por su apoyo incondicional tanto moral como económicamente, sé que sin ellos no hubiera llegado a este punto, por haberme forjado en ser la persona que soy en la actualidad. Mi madre que siempre se levantaba muy temprano para despedirme y darme su bendición para todos los días atravesar la ciudad de polo a polo.

A mi padre que sé que desde el cielo está muy feliz de que su hija más pequeña se formó profesionalmente en la misma Institución que él, y finalmente culminó sus estudios, este trabajo es un tributo a tu memoria y todo lo que me enseñaste.

A mi hermana que siempre me escuchó, me apoyó y me dio consejos que me fueron de utilidad a lo largo de mi formación. Es un ejemplo para mí, el verla a ella realizada profesionalmente me inspiró a no rendirme para lograr todos mis objetivos y llegar hasta este momento.

A mi familia en general por siempre haberme dado consejos, apoyo ya que también fueron parte de este sueño.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 13 |
| 2. Hipótesis | 14 |
| 3. Objetivos | 15 |
| 3.1 Objetivo general | 15 |
| 3.2 Objetivos específicos | 15 |
| 4. Revisión de literatura | 16 |
| 4.1 Generalidades de la hoja de Roselle | 16 |
| 4.1.1 Aspectos morfológicos y taxonómicos. | 16 |
| 4.1.2 Origen y distribución geográfica | 17 |
| 4.2 Composición química y nutricional | 17 |
| 4.3 Macro y micronutrientes de la flor de Roselle | 20 |
| 4.4 Polifenoles | 20 |
| 4.4.1 Generalidades | 20 |
| 4.5 Antocianinas | 21 |
| 4.5.1 Definición | 21 |
| 4.5.2 Estructura | 22 |
| 4.5.3 Antocianinas presentes en <i>Hibiscus sabdariffa</i> | 23 |
| 4.6 Flavonoides | 24 |
| 4.6.1 Generalidades | 24 |
| 4.6.2 Estructura de los flavonoides | 24 |
| 4.6.3 Flavonoides en <i>Hibiscus sabdariffa</i> | 26 |
| 4.7 Capacidad antioxidante | 26 |
| 2.7.1 Métodos de evaluación de capacidad antioxidante | 27 |
| 2.9 Extracción convencional de compuestos bioactivos | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 4.10 Extracción enzimática | 29 |
| 4.11 Extracción por ultrasonido | 29 |
| 4.11.1 Factores que afectan el ultrasonido en la extracción de compuestos bioactivos | 30 |
| 4.12 Aplicación de biopelículas en alimentos | 32 |
| 5. Metodología | 34 |
| 5.1 Obtención del material vegetal | 34 |
| 5.2 Preparación de las muestras para análisis | 34 |
| 5.2.1. Extracción convencional por agitación | 34 |
| 5.2.1 Extracción asistida por ultrasonido | 34 |
| 5.2.1 Extracción enzimática | 34 |
| 5.3 Técnicas de determinación de componentes bioactivos | 35 |
| 5.3.1 Técnica de determinación de polifenoles hidrolizables por método Folin-Ciocalteu | 35 |
| 5.3.2 Técnica de determinación de Antocianinas | 35 |
| 5.3.3 Técnica de determinación de Flavonoides | 35 |
| 5.3.4 Técnica de DPPH Y ABTS para determinación de actividad antioxidante | 36 |
| 5.4 Elaboración de la biopelícula | 36 |
| 5.5 Caracterización de la biopelícula | 37 |
| 3.5.1 Medición de grosor | 37 |
| 5.5.2 Propiedades ópticas | 37 |
| 3.5.3 Medición de color | 38 |
| 5.5.4 Contenido de humedad | 38 |
| 5.5.5 Solubilidad | 38 |
| 5.5.6 Permeabilidad al vapor de agua | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6 Análisis estadísticos | 39 |
| 6. Resultados y discusión | 41 |
| 6.1 Cuantificación de componentes bioactivos | 41 |
| 6.1.1 Polifenoles | 41 |
| 6.1.2 Antocianinas | 43 |
| 6.1.3 Flavonoides | 45 |
| 6.1.4 Actividad antioxidante DPPH | 47 |
| 6.1.5 Actividad antioxidante ABTS | 49 |
| 6.2. Caracterización de la biopelícula | 51 |
| 7. Conclusión | 53 |
| 8. Bibliografía | 54 |

Lista de cuadros

| | |
|---|-------|
| Cuadro 1. Composición química de hojas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> por cada 100g..... | 17-18 |
| Cuadro 2. Composición química de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> por cada 100 g..... | 18 |
| Cuadro 3. Composición química de semillas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> | 19 |
| Cuadro 4. Parámetros evaluados de la caracterización de la biopelícula..... | 52 |

Lista de figura

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de las subclases de polifenoles. | 21 |
| Figura 2. Estructura básica y de las diferentes antocianinas | 22 |
| Figura 3. Estructura básica de los flavonoides..... | 24 |
| Figura 4. Estructura del flavonol quercetina..... | 25 |
| Figura 5. Estructura de la flavona diosmetina..... | 25 |
| Figura 6. Estructura básica de las isoflavonas..... | 26 |
| Figura 7. Contenido de polifenoles por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C, y en tiempo de 0 a 30 minutos de reacción..... | 41 |
| Figura 8. Contenido de polifenoles por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos..... | 42 |
| Figura 10. Contenido de antocianinas por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta 90 minutos..... | 43 |
| Figura 11. Contenido de flavonoides por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 a 30 minutos..... | 45 |
| Figura 12. Contenido de flavonoides por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta 90 minutos..... | 46 |
| Figura 13. Actividad antioxidante DPPH por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 a 30 minutos..... | 48 |
| Figura 14. Actividad antioxidante DPPH por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C a 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos..... | 48 |
| Figura 15. Actividad antioxidante ABTS por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 30 minutos..... | 50 |
| Figura 16. Actividad antioxidante ABTS por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos..... | 50 |

Resumen

Hibiscus sabdariffa también conocida en México como flor de Jamaica posee propiedades antioxidantes, anticancerígenas; es por esta razón que se le ha dado diversos usos en el área de alimentos, industria cosmética, farmacéutica, entre otras.

Debido a este interés industrial es que se genera mucho residuo de esta flor, la Integradora Agroindustrial de Chiautla de Tapia del estado de Puebla genera aproximadamente entre 150 a 300kg de residuo de flor de Jamaica. En este trabajo se evaluaron métodos de extracción de componentes bioactivos de estos residuos para el diseño de una biopelícula y su posterior aplicación en alimentos.

Se evaluó el método de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C, asimismo se evaluó el método de extracción enzimática a esas mismas temperaturas (50°C y 55°C) mediante el uso de la enzima celulasa con su respectivo control para ambos métodos. Posteriormente se evaluó el contenido de polifenoles, antocianinas, flavonoides, actividad antioxidante por DPPH y ABTS, en donde la extracción asistida por ultrasonido a 50°C y 55°C presentaron mayores cantidades de estos compuestos bioactivos. La biopelícula fue desarrollada a base de goma guar, glicerol, aceite esencial de clavo y el extracto de flor de Jamaica, se hizo una caracterización en cuanto a grosor, contenido de humedad, solubilidad, color, etc. Los resultados de la caracterización fueron favorables para su aplicación en alimentos, dándoles a estos la propiedad de ser alimentos funcionales.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, residuos, componentes bioactivos, extracción, biopelícula, alimentos funcionales.

1. Introducción

La flor de *Hibiscus sabdariffa* o mejor conocida en México como flor de Jamaica ha tomado mucha importancia y gran valor económico debido a sus propiedades y la industria la ha utilizado para muchos fines, principalmente en el sector alimenticio, asimismo en la industria cosmética, farmacológica, etc. Lo que provoca que la demanda vaya en aumento año tras año. Guerrero, Michoacán y Oaxaca se posicionan entre los principales estados productores de la flor de Jamaica a nivel nacional, alcanzando entre los años 2010 y 2011 una producción de 5,640 toneladas (Ochoa, 2013).

Michoacán se posiciona como el segundo estado con mayor producción de Jamaica a nivel nacional con 1,780 hectáreas cultivadas en el año 2019, junto con otros 10 estados sumando una cantidad de 18,654 hectáreas cultivadas en México. Por otra parte, estados como Guerrero, cultivan la Jamaica no tanto por demanda en el ámbito industrial, sino por costumbres y tradiciones culturales del propio estado representando un 75% de hectáreas cultivadas (Ávalos et al., 2022; Ochoa, 2013).

La Integradora Agroindustrial de Chiautla de Tapia, S.A de C.V que se encuentra en el estado de Puebla, procesa alrededor de 7 toneladas de Jamaica anualmente, esta empresa se dedica a la producción de licor, concentrados, mermeladas, etc. Por lo que genera alrededor de 150 a 300 kg de residuos por semana, ya que depende mucho de la demanda que se tenga (Ramos Andrea, 2018). A lo largo de los años se ha intensificado el uso de residuos agroindustriales debido a que se encuentran de manera abundante y son de fácil acceso (López et al., 2021). A pesar de que los residuos son orgánicos y se pueden usar alternativas como el compostaje, se les puede dar un valor agregado extrayendo compuestos bioactivos que sean utilizados para la elaboración de biopelículas que sirvan en los alimentos.

De acuerdo con lo anterior podemos proponer las siguientes hipótesis nulas y alternativas a comprobar con la investigación realizada.

2. Hipótesis

Ho₁: La extracción de componentes bioactivos de residuos de *Hibiscus sabdariffa* asistida por ultrasonido puede ser una alternativa más eficiente considerando tiempo y cantidad de componentes bioactivos que el método convencional de calentamiento y agitación.

Ho₂: La extracción de componentes bioactivos de residuos de *Hibiscus sabdariffa* asistida enzimáticamente puede ser una alternativa más eficiente considerando tiempo y cantidad de componentes bioactivos que el método convencional de calentamiento y agitación.

Ha₁: La extracción de componentes bioactivos de residuos de *Hibiscus sabdariffa* asistida por ultrasonido puede no ser una alternativa más eficiente considerando tiempo y cantidad de componentes bioactivos que el método convencional de calentamiento y agitación.

Ha₂: La extracción de componentes bioactivos de residuos de *Hibiscus sabdariffa* asistida enzimáticamente puede no ser una alternativa más eficiente considerando tiempo y cantidad de componentes bioactivos que el método convencional de calentamiento y agitación.

Para poder comprobar las hipótesis planteadas se establecieron los siguientes objetivos a desarrollar durante el trabajo experimental de investigación.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia del método de extracción de los componentes bioactivos recuperados de la flor de Jamaica, y su aplicación del extracto en la elaboración de una biopelícula.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer el proceso de extracción de componentes bioactivos recuperados de flor de jamaica, empleando el método de ultrasonido, el enzimático y combinando los dos métodos.
- Cuantificar los componentes bioactivos extraídos para definir cuál método es más efectivo.
- Diseñar y caracterizar una película bioactiva a base de xantano, glicerol, aceite de coco, aceite esencial de clavo y extracto bioactivo de flor de Jamaica.

4. Revisión de literatura

4.1 Generalidades de la hoja de Roselle

4.1.1 Aspectos morfológicos y taxonómicos.

Hibiscus sabdariffa es un arbusto que pertenece a la familia de las malváceas, del género *Hibiscus*. La planta es un hibisco autóctono perenne, es decir que puede sobrevivir varias temporadas, su periodo vegetativo va de cuatro a cinco meses, siendo sensible a fotoperiodos, ya que para su desarrollo vegetativo necesita de días largos, por el contrario, los días cortos promueven la inducción floral (Aguilar-Luna et al., 2023). Se considera que se adapta fácilmente a condiciones desfavorables como es la sequía, esto debido a que es una planta tetraploide que está conformada por 72 cromosomas (Ramos Andrea, 2018).

Posee un cáliz grueso con forma de copa y de tonalidad rojiza dependiendo de la variedad, además el cáliz suele tener una consistencia carnosa a medida que avanza la maduración, el cáliz es la parte de la planta que más se utiliza con fines industriales (Agunbiade et al., 2022). Dependiendo de la variedad, hay diferencia en la tonalidad de los cálices, también influye el grado de madurez en el que se encuentre la planta, pueden presentarse tonos amarillo-verde, así como tonos rojizos, siendo estos últimos los que tienen altos niveles de actividad antioxidante (Ramos Andrea, 2018).

Se caracteriza por alcanzar grandes alturas llegando a los 3 metros, presenta tallos erectos que alcanzan los 2.5cm de largo y 3 cm de ancho, su raíz se presenta de forma vertical a la tierra, resultando del centro de esta, brotes de raíces laterales, también de una tonalidad roja (Edo et al., 2023). Sus hojas se presentan de manera alternada, variando en tamaño y forma, color verde con peciolo ya sean cortos o largos (Ramos Andrea, 2018).

Las flores de *Hibiscus sabdariffa* son compuestas y pentámera, es decir que el cáliz y la corola tienen integrado 5 pétalos en que se encuentra distribuidas en las axilas de las hojas, asimismo en el interior del cáliz se encuentran las semillas que van de 23 a 34, son pequeñas en forma de frijol de una tonalidad café claro que están recubiertas de vellosidades (Edo et al., 2023).

4.1.2 Origen y distribución geográfica

Por su nombre científico *Hibiscus sabdariffa* también conocida como flor de Jamaica o Roselle en diversos países como México, India, Japón, Egipto; recibe otros nombres como Basap en el país de Senegal (Ross, 2003). Su origen radica en el continente de Asia específicamente en los países de India y Malasia, posteriormente se distribuyó en países aledaños en donde el clima tropical y subtropical es propicio para el desarrollo de la planta, llegando incluso hasta países como México resultado de los españoles en tiempos de la colonización. (SAGARPA–ASERCA, 1999). Entre los principales estados productores de Jamaica en México se encuentran Michoacán, Oaxaca y Guerrero, ocupando este último el 75% de hectáreas sembradas a nivel nacional (Ávalos et al., 2022). A nivel mundial se encuentran registradas 150 variedades de Jamaica, de las cuales sólo 7 tienen registro ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) en México (Rosas, A 2019).

4.2 Composición química y nutricional

Pueden existir variaciones en la composición química y nutricional de la hoja de Roselle debido a las condiciones en las que se desarrolla, ya sean ambientales, ecológicas, genéticas, etc. (Edo et al., 2023). Según investigaciones afirman que la hoja de Roselle está compuesta principalmente de proteína, carbohidratos, fibra, grasas, vitaminas, compuestos fenólicos, entre otros, asimismo varía la concentración de estos compuestos dependiendo de la parte de la planta de la que se extraigan ya sea cálices, hojas frescas o secas, semilla etc. (Da-Costa-Rocha et al., 2014) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de hojas de *Hibiscus sabdariffa* por cada 100g.

| | |
|---------------|--------|
| Proteínas | 3.3g |
| Grasas | 0.3g |
| Carbohidratos | 9.2g |
| Hierro | 4.8g |
| Fósforo | 214 mg |

| | |
|-----------------|--------|
| β-caroteno | 4135μg |
| Tiamina | 0.45mg |
| Riboflavina | 0.45mg |
| Ácido ascórbico | 54mg |

Fuente: Da-Costa-Rocha et al., 2014b

Los cálices son ricos en carbohidratos, y contienen altos niveles de minerales como K, Na, Ca, Fe, Mg. Investigaciones afirman que el potasio es el mineral más abundante en los cálices (Luvonga et al., 2012).

La investigación de Luvonga et al. (2012) sobre la caracterización química de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* para usos en la industria alimentaria arroja que el porcentaje de carbohidratos presentes es el más alto con un 68.7%, la fibra ocupa el segundo lugar con 14.6% y las cenizas con 12.2%, esta última siendo de gran importancia para usos en dietas debido a que alivia el estreñimiento (Riaz & Chopra, 2018, Edo et al., 2023) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química de cálices de *Hibiscus sabdariffa* por cada 100 g.

| | |
|---------------|--------|
| Proteínas | 1.9g |
| Grasas | 0.1g |
| Fibra | 2.3g |
| Carbohidratos | 12.3g |
| Vitamina C | 14mg |
| β-caroteno | 300μg |
| Hierro | 57mg |
| Calcio | 1.72mg |

Fuente: Da-Costa-Rocha et al., 2014b

Las semillas contienen altos niveles de proteínas, grasas, minerales como Calcio, Magnesio, Potasio, Fósforo, Sodio, las cuales son usadas para diferentes usos industriales (Edo et al., 2023).

Cuadro 3. Composición química de semillas de *Hibiscus sabdariffa*.

| | |
|--|------------------|
| Proteína bruta | 21.85% |
| Fibra | 16.44% |
| Carbohidratos | 21.25% |
| Ceniza | 6.2% |
| Minerales presentes por cada 100g | |
| Potasio | 1329±1.47mg |
| Sodio | 659 ±1.58mg |
| Calcio | 647 ±1.21mg |
| Fósforo | 510 ±1.58mg |
| Magnesio | 442.8± 1.80mg |
| Ácidos grasos saturados presentes | |
| Ácido palmítico | 20.84% |
| Ácido esteárico | 5.885 |
| Ácidos grasos insaturados presentes | |
| Ácido linoleico | 39.31% |
| Ácido oleico | 32.06% |

Fuente: Da-Costa-Rocha et al., 2014

4.3 Macro y micronutrientes de la flor de Roselle

Los macronutrientes presentes en la flor de Roselle como son los carbohidratos, proteínas, lípidos, fibra, ácidos nucleicos, etc., son producidos por la misma planta cubriendo sus necesidades debido a que son seres fotosintéticos y hacen uso de la luz solar para producir esto mismo (Edo et al., 2023). Asimismo, producen micronutrientes que muchas veces no proporcionan gran valor nutricional, sin embargo, tiene un papel importante en la protección de la planta ante enfermedades, radiación, entre otros, por lo que la deficiencia de macro o micronutrientes afecta directamente a la salud de la planta en diferente grado dependiendo de cuál sea ese nutriente y en qué cantidad se encuentra (Edo et al., 2023).

Según investigaciones la flor de Roselle tiene muchos beneficios por sus propiedades antioxidantes, antimicrobiana, anticancerígena, antihipertensivas, entre otros beneficios por lo que a lo largo de los años se ha utilizado en diferentes presentaciones y diferentes ramas de la industria como lo es la alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras (Edo et al., 2023).

4.4 Polifenoles

4.4.1 Generalidades

Los polifenoles pertenecen a un grupo amplio de compuestos bioactivos que en su estructura presentan anillos fenólicos, estos polifenoles se encuentran en alimentos de la dieta humana, especialmente en las frutas y verduras, estos son importantes a nivel nutricional por sus propiedades antioxidantes, antimicrobiana, antiinflamatorios que son benéficos para la salud y por tanto de gran interés para la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras (Duque-Soto et al., 2023; Quiñones et al., 2012).

Los polifenoles se dividen en polifenoles que son extraíbles los cuales son monoméricos, oligoméricos y en algunas ocasiones fracciones poliméricas. Los polifenoles que no son extraíbles, esto debido a su alto peso molecular (Sáyago-Ayerdi et al., 2010). Asimismo, se subclasifican de acuerdo con la cantidad de anillos fenólicos que presentan en su estructura. Algunos ejemplos que se pueden

mencionar son los ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos, entre otros (Quiñones et al., 2012) (Fig. 1).

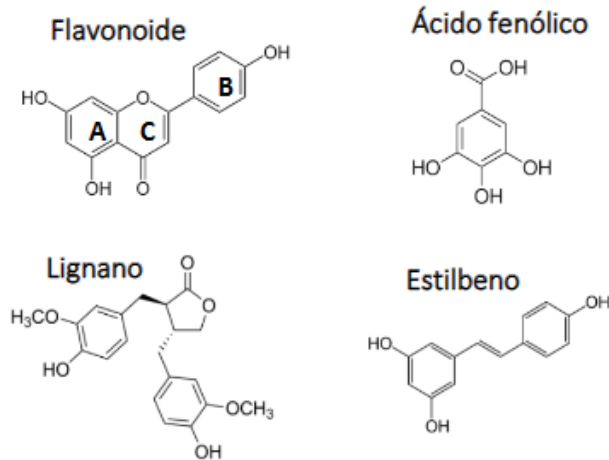


Figura 1. Estructura de las subclases de polifenoles. Fuente: Castro Acosta, 2019.

4.5 Antocianinas

4.5.1 Definición

Dentro del grupo de pigmentos solubles en agua que son detectables por el ojo humano se encuentran las antocianinas y son de las más importantes. Estos pigmentos se encuentran en la vacuola de la célula y se encargan de dar coloración a vegetales, frutas y cereales, abarcando tonalidades desde rojo hasta azul (Garzón, 2008)

Según investigaciones tienen funciones como atraer a polinizadores, proteger a la planta contra adversidades como lo es radicación y ante una contaminación ya sea bacteriana o viral. Asimismo, estos pigmentos han llamado la atención de muchos investigadores no solo por la diversa gama de colores en donde se presentan, sino por sus propiedades benéficas para la salud como antiinflamatorio, reducción de enfermedades como el cáncer, diabetes, entre otras, Por lo que a estos compuestos se les puede dar un valor agregado que pueda ser consumido por el humano (Garzón, 2008).

4.5.2 Estructura

Las antocianinas son moléculas formadas por un glúcido que regularmente son monosacáridos y un compuesto no glucídico, es decir son glucósidos, y a su vez estos están compuestos de antocianidinas (Garzón, 2008). La estructura básica de las antocianinas está conformada por dos anillos aromáticos que se unen mediante una cadena de 3 Carbonos (Garzón, 2008) (Fig.2). Se conocen alrededor de 20 antocianinas, sin embargo 6 de ellas se clasifican entre las más importantes y se encuentran distribuidas en frutas como uvas, frambuesas y en verduras como la col morada entre otras; estas son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Aguilera-Ortíz et al., 2011). La diversa gama de colores que produce se ve influenciada por el número y la posición u orientación en la que se encuentren los grupos hidroxilo y metoxilo (Garzón, 2008). Se generan tonalidades azules cuando se producen aumentos en la hidroxilación, por otro lado, se generan tonalidades rojas cuando existen aumentos en las metoxilaciones (Garzón, 2008)

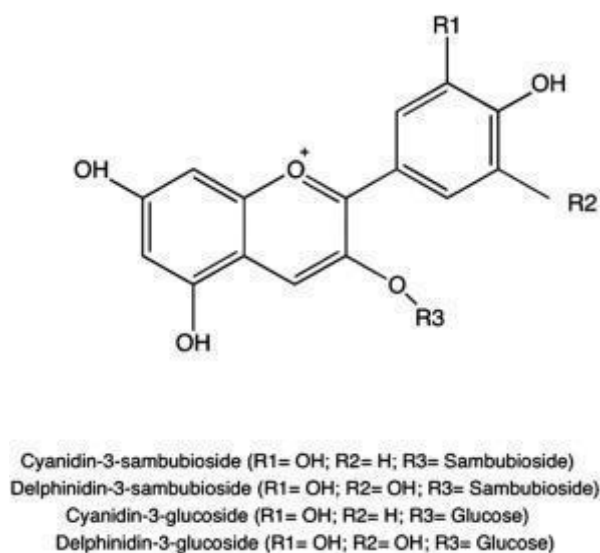


Figura 2. Estructura básica y de las diferentes antocianinas.

Fuente: Da-Costa-Rocha et al., 2014.

4.5.3 Antocianinas presentes en *Hibiscus sabdariffa*

Las antocianinas son las que les dan a los cálices *Hibiscus sabdariffa* esa tonalidad roja muy brillante (Gómez-Aldapa et al., 2019). Según estudios realizados el cáliz de Jamaica es rico en antocianinas de entre las que destacan delfifina-3-sambubiósido y cinidina-3-sambubiósido, llegando a concentrar alrededor de 2.5g/100g (Méndez & Adolfo, 2013; Da-Costa-Rocha et al., 2014).

En un estudio realizado para evaluar las propiedades antioxidantes del extracto de *Hibiscus sabdariffa* por Wu et al. (2018) se encontró que los cálices deshidratados presentaron 361.99 mg CGE/100 g como contenido total de antocianinas (Wu et al. (2018). La coloración que dan las antocianinas como se mencionó anteriormente se ve influenciada por el número y posición de hidroxilos y metoxililos (Garzón, 2008).

Sin embargo, otros factores que afectan es el pH y la temperatura en el que se encuentre la fase acuosa, por lo que en este mismo estudio se reportó que existen variaciones en la coloración del extracto de *Hibiscus sabdariffa* en un rango de pH de 1 a 7 antes de sufrir calentamiento (Wu et al., 2018). Estas coloraciones fueron desde un rojo intenso a tonalidades más claras en un rango de pH de 1 a 4, posteriormente a un pH de 5 el extracto ya se presentaba incoloro, por el contrario, la tonalidad cambio a azul cuando a la fase acuosa presentaba un pH de 7 (Wu et al., 2018).

Con respecto a la temperatura la degradación de las antocianinas es mayor conforme aumenta la temperatura y el tiempo, por lo que en el estudio se encontró que si existe un calentamiento a 70°C por 2 horas el contenido de antocianinas es muy bajo, por el contrario, si existen estas mismas condiciones, pero en un ambiente ácido, entonces el contenido de antocianinas aun superaría el 80% (Wu et al., 2018).

4.6 Flavonoides

4.6.1 Generalidades

Los flavonoides son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de compuestos fenólicos que están presentes en muchas frutas y verduras principalmente, asimismo los flavonoides se subdividen en antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Trueba & Sánchez, 2001). Sus funciones son muy diversas de defensa como la protección contra rayos UV, regulación de funciones como el crecimiento, comunicación, incluso la pigmentación de las plantas (Edo et al., 2023).

Los flavonoides son quelantes de hierro, secuestradores de radicales libres, así como actividad de inhibir oxidasas, de ahí es que se consideran buenos antioxidantes, por lo que la ingesta de estos se ve influenciada con la prevención de enfermedades cardiovasculares, entre otros beneficios a la salud (Trueba & Sánchez, 2001; Ramos Andrea, 2018).

4.6.2 Estructura de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura básica de 15 carbonos, con una configuración $C_6C_3C_6$ (Edo et al., 2023). Esta estructura se conforma por dos anillos aromáticos que se unen mediante un anillo heterocíclico (Trueba & Sánchez, 2001) (Fig. 3).

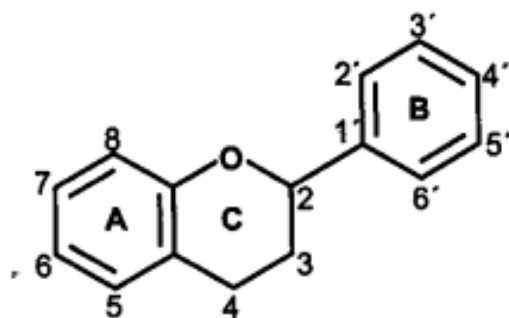


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides. Fuente: Trueba & Sánchez, 2001.

Los flavonoides se clasifican en flavonoles, flavonas, antocianinas e isoflavonas (Peñarrieta et al., 2014). Los flavonoles tienen en la posición 4 un grupo carbonilo y

en posición 3 un grupo hidroxilo, estos dos grupos en el anillo C, ejemplo de esto está la quercetina (Jiménez et al., 2009) (Fig. 4).

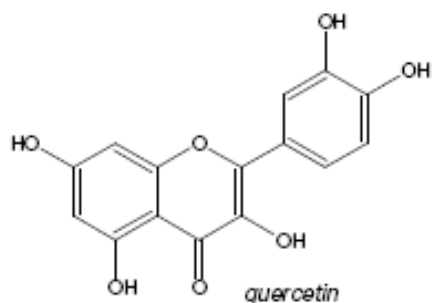


Figura 4. Estructura del flavonol quercetina. Fuente: Peñarrieta et al., 2014.

Las flavonas al igual que los flavonoles en la posición 4 del anillo C, poseen un grupo carbonilo, sin embargo, difieren en que las flavonas no tienen el grupo hidroxilo en la posición 3, un ejemplo sería la diosmetina (Jiménez et al., 2009) (Fig. 5).

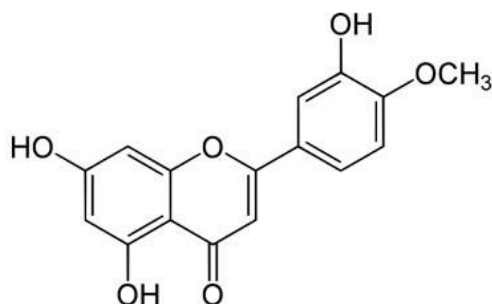


Figura 5. Estructura de la flavona diosmetina. Fuente: Quimica Alkano, 2016.

Las antocianinas poseen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, así como un doble enlace entre la posición 3 y 4 del mismo anillo (Jiménez et al., 2009). En el caso de las isoflavonas el anillo B se encuentra unido a la posición 3 del anillo C.

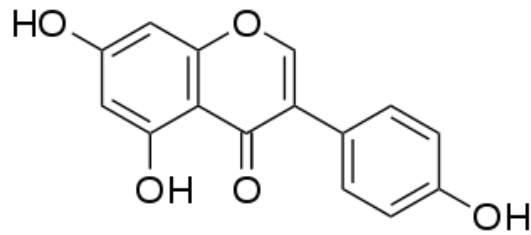


Figura 6. Estructura básica de las isoflavonas (Google).

4.6.3 Flavonoides en *Hibiscus sabdariffa*

Las hojas de *Hibiscus sabdariffa* en su composición contienen flavonoides que se presentan en forma de polifenoles flavonoles y flavonoles (Edo et al., 2023). Según investigaciones *Hibiscus sabdariffa* posee como principales flavonoides la gossipitrina, hibiscitrina, gossistrina, gosipetina, quercetina entre otros (Edo et al., 2023). La gosipetina es uno de los principales flavonoides encontrados en la flor de *Hibiscus Sabdariffa*, la cual tiene propiedades benéficas para la salud. Un estudio realizado en ratas sometidas a tetraclorometano y por consecuencia con daño hepático, arrojó que el tratamiento con el extracto de este flavonoide redujo considerablemente la severidad del daño (Edo et al., 2023). En el cáliz de *Hibiscus sabdariffa* hay presencia de quercetina en una concentración de 3.2mg/g, 2.67% de catequina, por otra parte, las hojas secas contienen alrededor de 4.25% del flavonoide catequina (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

4.7 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante es muy estudiada en *Hibiscus sabdariffa* debido a la presencia de antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas que se encuentran en los cálices de la flor (Pacheco, 2019). Estos compuestos tienen la capacidad de atrapar radicales libres que son los causantes del estrés oxidativo, previniendo gran cantidad de enfermedades (Kuskoski et al., 2005). Esta capacidad antioxidante puede darse de diferentes maneras, ya sea atrapando los radicales libres, inhibiendo la peroxidación lipídica o quelando iones metálicos (Ramos Andrea, 2018).

Según estudios realizados sobre la actividad antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* reportaron que el extracto acuoso del cáliz induce a la apoptosis de líneas celulares de cáncer gástrico, disminución de la proliferación de células cancerígenas, así como la inhibición de radicales libres DPPH (Méndez Gustavo, 2013). Según un estudio realizado para evaluar la capacidad antioxidante de bebidas obtenidas a partir de la decocción de cáscara de mango, orujo de uva, y de flor de Jamaica, se encontró que existe mayor capacidad antioxidante precisamente por la decocción, por lo que se concluye que muchos de estos compuestos bioactivos permanecen en los residuos teniendo un valor agregado (Sáyago-Ayerdi et al., 2010).

2.7.1 Métodos de evaluación de capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante, la diferencia radica en si están basados en transferencia de electrones, es decir transferir un electrón para reducir un compuesto y que este se exprese por medio del cambio de color como por ejemplo DPPH, ABTS, o en transferencia atómica de hidrogeno, estos últimos miden la capacidad que tiene el antioxidante para atrapar los radicales por donación de hidrogeno como por ejemplo el ensayo ORAC (Ramos Andrea, 2018). Los métodos espectrofotométricos que más se usan son el DPPH y ABTS (Floegel et al., 2011).

Los radicales libres se consideran moléculas muy reactivas ya que se caracterizan por poseer ya sea uno o más electrones que están fuera de su órbita por lo que el ser humano puede generar estrés oxidativo trayendo consigo enfermedades vinculados a este efecto (Guija-Poma et al., 2015).

La técnica DPPH o también conocida como 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo y ABTS o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolina-6-sulfónico se basan en el mismo principio en la captura de los radicales libres en presencia de antioxidantes, por lo cual mide esta inactivación de esos radicales en medios acuosos (Floegel et al., 2011). Esta técnica se ha utilizado mucho, sin embargo, cada autor hace sus ajustes necesarios ya sea modificando la concentración, o el tiempo de acuerdo con sus objetivos. La diferencia está en que la técnica ATBS genera un color verde- azul y en la técnica DPPH se genera un color morado (Floegel et al., 2011).

2.9 Extracción convencional de compuestos bioactivos

Como es sabido *Hibiscus sabdariffa* se caracteriza por sus componentes bioactivos presentes en los cálices, además muchos de estos componentes persisten aun después de la decocción por lo que existe gran interés en estos componentes bioactivos debido a su potencial en diversas áreas de la industria, por lo que a lo largo de los años se han desarrollado métodos para la extracción de estos componentes.

Dentro de estas técnicas de extracción está la extracción sólido-líquido por agitación que se basa en una matriz por el cual puede pasar el soluto al disolvente por lo que se conoce como una técnica de separación y en la cual intervienen diversos factores como lo es la temperatura, agitación, tamaño de partícula (Villalobos-Vega et al., 2023).

Asimismo, otra técnica muy utilizada es el uso de solventes como etanol, metanol, acetona y las variantes de estos (Wong-Paz et al., 2020). Existen ventajas y desventajas del uso de solventes, de entre sus ventajas se encuentra que es una técnica sencilla y eficiente ya que se pueden obtener grandes cantidades de estos compuestos bioactivos a diferencia de otros métodos, sin embargo, se requiere gran cantidad de estos solventes por lo que resulta ser una técnica costosa, además se necesita un paso extra para purificar el extracto obtenido ya que puede contener trazas de estos solventes aunado que es dañino para el ser humano (Wong-Paz et al., 2020). De acuerdo a una investigación realizada sobre el efecto de los solventes en el proceso de extracción de extractos de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla* por Soto-García & Rosales-Castro (2016) se reportó que la extracción es más eficiente cuando hay más cantidad de agua que de concentración de etanol.

La maceración es otra técnica que resulta sencilla por lo que se ha convertido en la técnica convencional para la extracción de componentes bioactivos, sin embargo, requiere de mucho tiempo ya que el tamaño de partícula debe ser muy pequeña (Duque-Soto et al., 2023). De acuerdo con una investigación sobre los procesos de extracción para residuos cítricos Wong-Paz et al. (2020), se encuentra que la técnica de maceración requiere un tiempo estimado de entre 1 hora hasta 20 horas

dependiendo del residuo cítrico con el que se trabaje y los disolventes y sus respectivas concentraciones.

4.10 Extracción enzimática

El uso de enzimas para la extracción de compuestos bioactivos mediante el uso de enzimas como la pectinasa, celulasa y α -amilasa son una buena opción debido a que rompen los tejidos celulósicos, pero con la ventaja de que no generan residuos tóxicos facilitando de esta manera la salida de los compuestos (Córdova & Roque, 2014, Pérez-Loredo et al., 2017). Una de las enzimas que se utiliza con mayor frecuencia es la pectinasa esto debido a que actúa directamente sobre la pectina que forma parte de la pared celular (Arias et al., 2023).

La extracción enzimática ofrece ventajas como lo son la reducción de tiempo en comparación con las técnicas convencionales, así como una mejor calidad y rendimiento en los compuestos extraídos, así como la aceleración de la reacción hasta que la concentración del sustrato ya no sea suficiente, sin embargo, en este método de extracción depende mucho la interacción enzima- sustrato, el tiempo de reacción con la enzima y el tipo de enzima que se utilice (Marathe et al., 2019).

En un estudio realizado por Pérez-Loredo et al. (2017) en donde se evaluaron diferentes métodos de extracción de compuestos bioactivos en Pitaya roja (*Stenocereus stellatus*), se encontró que, con el uso de enzimas hidrolíticas (específicamente la proteasa y pectinasa) existe un aumento en la extracción de compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes.

4.11 Extracción por ultrasonido

Como se ha mencionado anteriormente existen diversos métodos de extracción convencionales de compuestos bioactivos, que resultan eficientes, sin embargo, son métodos que no son del todo amigables con el medio ambiente, es por esta razón que se han desarrollado métodos más ecológicos o “verdes”, uno de ellos la extracción asistida por ultrasonido (EAU).

La EAU se basa en ondas sonoras que se producen por ciclos que van más allá de la audición humana con una frecuencia de 20-100 MHz y que se pueden propagar

por medios líquidos sólidos o gaseosos, por lo que el efecto de estas ondas produce una compresión y expansión al material que está sometido a las ondas por lo que estos movimientos permiten la liberación de los compuestos bioactivos, este fenómeno se conoce como cavitación acústica y es el principal mecanismo de acción del ultrasonido (Pérez-Loredo et al., 2017). Una vez que el componente bioactivo se libera, se solubiliza en disolvente debido a que aumenta la superficie y disminuye el tamaño de partícula (Kumar et al., 2021).

Lo que se produce en el tejido es una erosión celular, es decir un daño en una parte específica del tejido, esto provoca un mayor contacto con el disolvente, generando un alto contenido de compuestos en el proceso de extracción, asimismo, al producir un aumento en el índice de hinchazón de la matriz del tejido del cual se quiere extraer, se facilita la difusión de solutos resultando una mayor extracción (Kumar et al., 2021).

El sistema utiliza un baño ultrasónico en donde la matriz sólida con el disolvente se coloca en un tanque de acero inoxidable, el cual se conecta al transductor y una sonda ultrasónica que va conectada igualmente al transductor. La sonda es sumergida en el recipiente con la muestra para la extracción y se somete a las ondas sonoras (Kumar et al., 2021).

Existen dos maneras de realizar la extracción, ya sea directa o indirecta; la forma directa es cuando el sistema de ondas es sumergido en la matriz sólido-líquido con intensidades muy elevadas, la forma indirecta es hacer uso del baño de agua en donde la muestra se coloca en un matraz con su respectivo disolvente y las ondas van a atravesar el agua hasta llegar a la muestra vegetal (Wong-Paz et al., 2020).

4.11.1 Factores que afectan el ultrasonido en la extracción de compuestos bioactivos

Uno de los factores que afectan la extracción de compuestos bioactivos haciendo uso del ultrasonido es la potencia ultrasónica, esta potencia varía dependiendo del material vegetal con el que se trabaje y los componentes de interés a extraer, este rango va desde 20 a 700W (Kumar et al., 2021).

La frecuencia de los ultrasonidos es otro factor que afecta la extracción de compuestos bioactivos; normalmente para la extracción de componentes bioactivos en frutas y verduras oscila entre los 20 y 120 kHz. Existe una relación entre la frecuencia y la intensidad, ya que por ejemplo si se utiliza baja frecuencia con una potencia alta, provoca una fuerza mecánica deseable, por otro lado, si se aplica una alta frecuencia, pero con poca potencia, se generan radicales reactivos (Kumar et al., 2021). Como se mencionó anteriormente, el uso de la potencia y la frecuencia varía dependiendo del material vegetal y los componentes que se desean extraer; según investigaciones para la extracción de antocianinas en uva utilizar una frecuencia de 30 a 40 kHz resulta ser más efectivo (Kumar et al., 2021).

Por otro lado, los ciclos de trabajo expresado en porcentaje también afectan al momento de la extracción. El concepto ciclo de trabajo está relacionado con la duración del pulso (tiempo que el transductor se mantiene encendido) y el tempo del ciclo (Kumar et al., 2021).

Se tiene que tomar en cuenta también el disolvente que se va a utilizar para la extracción, diversas investigaciones reportan el uso de disolventes como etanol, acetona, agua acidificada, etc. (Kumar et al., 2021). Según reportes de investigaciones se ha comprobado que la combinación del uso de ultrasonido con ácido cítrico es eficiente para la extracción de pectina, por otro lado, el uso de alcoholes y acetona son eficientes para la extracción de compuestos fenólicos (Kumar et al., 2021).

Es sabido que el uso de etanol tiene mejores rendimientos al momento de la extracción, sin embargo el uso de este trae consigo otro paso que es la purificación, esto debido a que quedan residuos de etanol, es por esa razón que se ha implementado el uso de agua destilada para la extracción, siendo esta más amigable con el ambiente, sin embargo si se hace una comparación entre el uso de etanol y agua como disolvente, resulta ser más eficiente el etanol, el uso de agua es capaz de extraer entre el 12% al 38% de compuestos bioactivos, por lo que resulta difícil dejar los disolventes como el etanol (Kumar et al., 2021).

4.12 Aplicación de biopelículas en alimentos

A lo largo de los años el uso de biopelículas y recubrimientos ha sido muy utilizado, en China practicaban la inmersión de naranjas y limones en cera a fin de que estos frutos no perdieran agua, durante el siglo XVI Inglaterra utilizaba como recubrimiento la manteca con el propósito de evitar la pérdida de humedad en alimentos (Vázquez et al., 2013).

Un recubrimiento o biopelícula comestible es una matriz delgada y transparente, es comestible por el hecho que están conformados por polímeros biodegradables y que no son tóxicos para el consumo humano, el uso de estos recubrimientos aplicados en alimentos tiene diferentes usos y funciones; tales como evitar la pérdida de agua, evitar el daño mecánico del alimento, mejorar la calidad sensorial, así como retardar los cambios químicos que puede sufrir el alimento como lo es el color, textura, aroma, composición química, entre otras (Solano-Doblado et al., 2018). Estas propiedades dependen en gran medida del material con el que se elaborará la biopelícula, así como el plastificante que se utilizará, además de las condiciones para su elaboración (Vázquez et al., 2013).

Debido a las funciones de las biopelículas, se ha hecho uso de esta tecnología como alternativa a alimentos más saludables que pasen por un mínimo procesamiento y que sean libres de aditivos sintéticos (Vázquez et al., 2013). Actualmente las biopelículas son utilizadas como un medio de transporte que ayude a incorporar componentes bioactivos al alimento al cual se le aplicó la biopelícula, trayendo consigo ventajas como lo es la calidad sensorial y un alimento funcional o un producto más nutritivo. Se le ha prestado mucha atención a esta tecnología para incorporar compuestos funcionales como vitaminas, minerales, probióticos que sean beneficiosas para la salud (De Ancos et al., 2015).

De acuerdo con el trabajo realizado por Medina et al. (2015) en donde se diseñó un recubrimiento bioactivo comestible aplicado en frutilla (*Fragaria vesca*) en postcosecha, el componente bioactivo fue aceite esencial de canela y glicerol como plastificante. Se evaluó la vida útil de la frutilla con el recubrimiento comparado con el control, en donde el control presentó un tiempo de 3 días de vida útil, mientras

que en la que presentaba el recubrimiento su vida útil fue de 7 días sin presentar cambio en su análisis sensorial.

Las biopelículas y recubrimientos comestibles para el área de alimentos tienen que cumplir con ciertos requisitos para que pueda proveer dichas ventajas antes mencionadas; una de ellas es que tiene que ser seguro para el consumo humano, es decir se deben elaborar con productos que no sean tóxicos, su elaboración debe ser sencilla, una vez aplicado el recubrimiento o biopelícula debe cumplir con las propiedades sensoriales; es decir este recubrimiento debe ser transparente y no se debe distinguir durante su consumo.

La composición de estas biopelículas está basadas en polisacáridos y proteínas, que son polímeros formadores de redes que hacen que la biopelícula adquiera esta propiedad mecánica y de barrera, algunos de los más usados en la industria son pectinas, gomas, carragenato, dextrina, entre otros (Fernández et al, 2015).

El uso de lípidos son un componente importante de las biopelículas confiriéndole propiedades de barrera ante la humedad y transpiración, algunos de los más utilizados son ceras, resinas, aceites esenciales, entre otros. Otro componente esencial son los emulsificantes y plastificantes con el fin de darle flexibilidad como lo es el glicerol, aceites, ceras, entre otros (Fernández et al, 2015).

5. Metodología

5.1 Obtención del material vegetal

Los residuos de *Hibiscus sabdariffa* se obtuvieron de la producción de agua de Jamaica de hogares domésticos, una vez que se filtró el agua se recolectó el residuo y se llevó a refrigeración para su posterior uso en la obtención de las muestras.

5.2 Preparación de las muestras para análisis

En un matraz Erlenmeyer se colocó 78.03% de agua destilada con 14.56% de ácido cítrico al 1.5%, a un pH de 2.4 se homogenizó con 7.41% del material vegetal.

5.2.1. Extracción convencional por agitación

Se corrió una extracción control en donde el contenido del matraz se adicionó al reactor y se colocó en una placa de agitación, tomando muestras cada 10 minutos por triplicado, por un tiempo de 30 minutos en tubos de ensaye con taparrosca cubiertos con papel aluminio evitando la luz y se mantuvieron en refrigeración.

5.2.1 Extracción asistida por ultrasonido

Para la extracción asistida por ultrasonido se utilizó un baño ultrasónico en donde se sumergieron los reactores en agua destilada, conectados a una bomba de manera que circule el agua.

A los reactores se les adicionó el contenido del matraz (preparación de muestras para análisis punto 5.2.1), una vez que alcanzarán la temperatura de 52.25°C se taparon para evitar la evaporación del extracto.

El tiempo total de extracción fue de 30 minutos, cada 10 minutos se tomó muestra por triplicado y se colocó en tubos de ensaye con taparrosca cubiertos con papel aluminio y una vez terminado el proceso se llevaron a refrigeración durante 24 horas. Se realizó extracción a una temperatura de 50°C y 55°C para analizar si esta influye en la obtención de compuestos funcionales.

5.2.1 Extracción enzimática

Para la extracción de componentes bioactivos mediante la extracción enzimática se usó celulasa con un buffer de pH 5, en dos reactores (un control y con enzima), se realizó extracción a tiempo 0, 10, 20, 30, 50, 70, 90 minutos con dos temperaturas

(50°C y 55°C), la extracción se realizó por triplicado y se llevaron a refrigeración durante 24 horas para su posterior análisis de polifenoles, antocianinas, flavonoides, DPPH y ABTS.

5.3 Técnicas de determinación de componentes bioactivos

5.3.1 Técnica de determinación de polifenoles hidrolizables por método Folin-Ciocalteu

El contenido fenólico total se realizó por triplicado, con una curva de calibración de ácido gálico (SIGMA). Se tomaron 10 mL del extracto y se homogenizó con 10 mL de acetona 30% en el vórtex a 5000 rpm por 1 minuto y se dejó reposando toda la noche en ausencia de luz y refrigeración.

Pasado el tiempo de refrigeración las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos; una vez transcurrido el tiempo, se obtuvo del líquido sobrenadante 400 µL de la muestra, se utilizó como blanco 400 µL de agua destilada. y adicionó 400 µL del reactivo Folin Ciocalteu en celdillas de espectrofotómetro, se homogenizó y se dejó reposar 5 minutos, posteriormente se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio 0.01M y nuevamente se dejaron reposar las muestras por 5 minutos y se adicionó 2 mL de agua destilada a cada tubo para posteriormente leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 725 nm. La concentración de fenoles totales fue expresada en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ g de extracto.

5.3.2 Técnica de determinación de Antocianinas

El contenido de antocianinas se determinó por triplicado; en un matraz de aforación se colocaron 2.5 g del extracto y se aforó con solución extractora de antocianinas, posteriormente se tomaron 2 mL de la muestra aforada en celdillas para espectrofotómetro y se le adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, se utilizó como blanco 2 mL de solución extractora de antocianinas y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm.

5.3.3 Técnica de determinación de Flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó por triplicado con el método de tricloruro de aluminio utilizando como estándar la Quercetina. En donde se colocó 1 mL del

extracto en celdillas para espectrofotómetro y se le adicionó 1 mL de la solución de AlCl_3 2% etanol, se homogenizó y se dejó reposar 1 hora en ausencia de luz para posteriormente leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm, y las lecturas se expresaron como mg equivalentes a Quercetina por gramo de muestra.

5.3.4 Técnica de DPPH Y ABTS para determinación de actividad antioxidante

5.3.4.1 Preparación de las muestras para determinación de actividad antioxidante

Se tomaron 10 g del extracto y se homogeneizaron con 100 ml de metanol al 80% en un agitador durante 30 minutos en ausencia de luz, posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se utilizó para la determinación de actividad antioxidante.

5.3.4.2 Método DPPH

Se utilizó como blanco 1.5 mL de metanol al 80%, y como absorbancia control 1.5 mL de DPPH-MeOH. La técnica se realizó por triplicado en donde se adicionó 50 μL del sobrenadante en celdillas para espectrofotómetro y se agregó 1.45 mL del reactivo DPPH, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 minutos en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo se registraron las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 517 nm.

5.3.4.3 Método ABTS

En el análisis se utilizó como blanco 2 mL de buffer de acetato a pH 5 con un control de absorbancia de 2.2 mL de agua destilada con 800 μL de solución radical ABTS-Buffer, la técnica se realizó por triplicado adicionando 200 μL del sobrenadante de los extractos con 2 mL de agua destilada y 800 μL de solución radical ABTS- Buffer, posteriormente se registraron las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm a los 3 minutos de reacción.

5.4 Elaboración de la biopelícula

Se preparó un total de 200 mL de la formulación de biopelícula con el extracto obtenido mediante la extracción asistida por ultrasonido a 50°C durante 30 minutos, se colocaron 50 mL de agua destilada a una temperatura de 50°C en agitación con

ayuda de un magneto y posteriormente se agregó 450µl de glicerol. Una vez que el glicerol se disolvió se incorporó 3µl. Tween-80 y 0.3g de CaCl₂, se elevó la temperatura a 50°C y se añadió 3µl aceite esencial de clavo y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Posteriormente se bajó la temperatura a 45°C y se agregó 50 mL del extracto del residuo de la flor de Jamaica 1.5 g de goma guar. Se tomaron 20 mL de la formulación y mediante el método de casting se realizó el vaciado de la formulación en cajas petri evitando evitando la formación de burbujas de aire y se dejaron reposando toda la noche y pasado el tiempo se colocaron en la estufa a 53°C durante 3 horas.

5.5 Caracterización de la biopelícula

3.5.1 Medición de grosor

La medición del grosor de las películas se realizó con ayuda de un micrómetro digital (Mitutoyo Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan) en cinco posiciones diferentes al azar y se calculó el promedio.

5.5.2 Propiedades ópticas

La película se cortó en rectángulos de 1 cm x 3 cm y se colocaron en celdas para espectrofotómetro, las propiedades ópticas se determinaron mediante el uso de un espectrofotómetro Génesis 10 UV spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Madison, Wisconsin, USA), la transmitancia de las películas fue leída a una longitud de onda de 400 a 800 nm, se realizó por triplicado y se calculó el promedio de las lecturas.

La transparencia a 600 nm se obtuvo mediante la siguiente ecuación (Han & Floros, 1997).

$$T_{600} = \log \%T/b$$

En donde %T representa el porcentaje de transmitancia y b el grosor de la película medida en mm.

La opacidad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula propuesta por Gontard & Guilbert (1994).

Opacidad = absorbancia a 500 nm (AU)*grosor de las películas (mm)

3.5.3 Medición de color

Para la medición del color se utilizó un colorímetro (Minolta CR-400, Tokyo, Japan), se calibro el aparato mediante una placa de color blanco (L=97.75, a=0.49, b=1.96, supplied by Minolta Co.). El aparato proporciona 3 valores de color; L componente negro-blanco, luminosidad) y coordenadas de cromaticidad, a (componente +rojo a –verde) y b (componente +amarillo a –azul). Se midió el color de las biopelículas en 5 puntos diferentes al azar.

5.5.4 Contenido de humedad

El contenido de humedad se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Mei & Zhao (2003). Se tomaron trozos de biopelícula de 2cm x 2cm, se colocaron en recipientes de aluminio por triplicado con un peso constante, estas se llevaron a la estufa de secado (Qunicy Lab Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.) a 53 °C durante 3 horas. Se tomó el peso antes y después del secado en una balanza analítica (Adventurer Ohaus Corp., Pine Brook, New Jersey, U.S.A.).

El porcentaje del contenido de humedad fue determinado considerando el peso inicial antes de la deshidratación y después de la deshidratación.

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{(\text{Peso seco inicial} - \text{peso seco final}) * 100}{(\text{Peso seco inicial})}$$

5.5.5 Solubilidad

De acuerdo con la metodología propuesta por Romero-Bastida et al. (2005), se utilizaron las muestras de determinación de humedad por triplicado, éstas muestras secas se colocaron en vasos de precipitados de 250 mL con 80 mL de agua destilada con agitación constante a 25 °C y 300 rpm durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se secaron durante 24 h a 60°C hasta peso constante utilizando una balanza digital (Adventurer Ohaus Corp., Pine Brook, New Jersey, U.S.A.) Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de solubilidad.

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{(\text{Peso seco inicial} - \text{peso seco final}) * 100}{(\text{Peso seco inicial})}$$

5.5.6 Permeabilidad al vapor de agua

Para la determinación de permeabilidad al vapor de agua se utilizó cloruro de calcio anhidro (CaCl_2 , aproximadamente 3.0 g) como desecante. La distancia entre la superficie del desecante y la película fue menos de 6 mm tal y como lo sugiere la ASTM E 96 (ASTM, 2001). Las celdas se ubicaron en desecadores a humedades relativas de 75 %, 85 % y 100% a 25 ± 1.5 ° C (Labuza et al., 1985). El proceso de permeabilidad se estuvo evaluando durante 3 horas. Si la relación entre el peso ganado (Δw) y el tiempo (Δt) es lineal, entonces la pendiente se utiliza para calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) (Arévalo et al., 2010).

La pendiente se obtiene de una regresión lineal de los pesos de las celdas con las películas. La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) se calculó de la pendiente ($\Delta w / \Delta t$) dividido por el área de prueba (A) ($\text{g (m}^2\text{)}^{-1} \text{d}^{-1}$)

$$\text{WVTR} = (\Delta w / \Delta t) / A \quad (5)$$

Donde $\Delta w / \Delta t$ = velocidad de transferencia, cantidad de pérdida de humedad por unidad de tiempo (g d^{-1}); A = área expuesta a la transferencia de humedad (m^2). La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calcula con la siguiente ecuación

$$\text{WVP} = [\text{WVTR} * L / \Delta p] \quad (6)$$

Donde WVP es la permeabilidad al vapor de agua ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$), WVTR es la velocidad de transmisión al vapor de agua ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$), L es el grosor de la película (mm) y Δp es la diferencia entre las presiones de vapor de agua en ambos lados de la película (kPa) (Arévalo et al., 2010).

5.6 Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño completamente al azar, y para las comparaciones se empleó el programa estadístico computacional Infostat versión 2018 y se realizó la

comparación utilizando la prueba Fisher. Las determinaciones de cada parámetro se hicieron por triplicado y se expresaron los resultados como medias.

6. Resultados y discusión

6.1 Cuantificación de componentes bioactivos

6.1.1 Polifenoles

Los resultados arrojan que existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) con el método de extracción asistida por ultrasonido a 50°C por 30 minutos, mostrando el contenido libre de 7.55 mg GAE/g en un corto período de tiempo como se puede observar en la figura 7. Asimismo, no existe diferencia significativa al tiempo 0 y 10, mostrando los resultados más bajos durante el período de extracción (1.62 mg GAE/g).

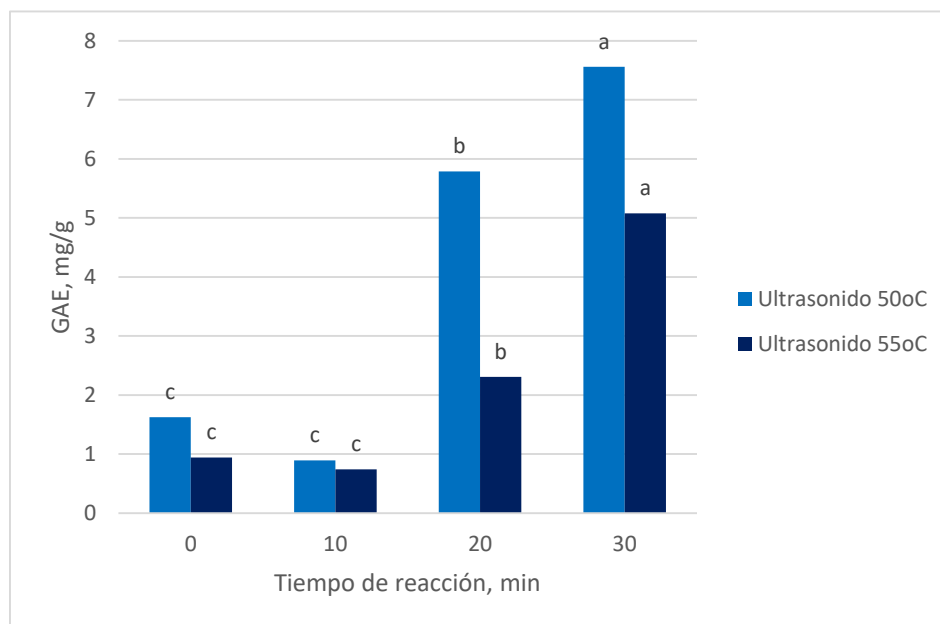


Figura 7. Contenido de polifenoles por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C, y en tiempo de 0 a 30 minutos de reacción.

Borrás-Enríquez et al. (2021) realizó una investigación de extracción mediante ultrasonido en *Mangifera indica* L. var. *Manililla* en donde se evaluó cáscara, grano y semilla. Se obtuvieron valores de 203 a 1814 mg GAE/100 g para la cáscara. Por lo que se presentan valores altos en cuanto al contenido de polifenoles obtenidos mediante este método.

A diferencia del método de ultrasonido, el método asistido enzimáticamente muestra que el contenido libre de polifenoles obtenido se presenta hasta los 90 minutos de reacción con 27.55 mg GAE/g (Fig 8), y no existe diferencia significativa respecto a las dos temperaturas evaluadas (50°C y 55° C)

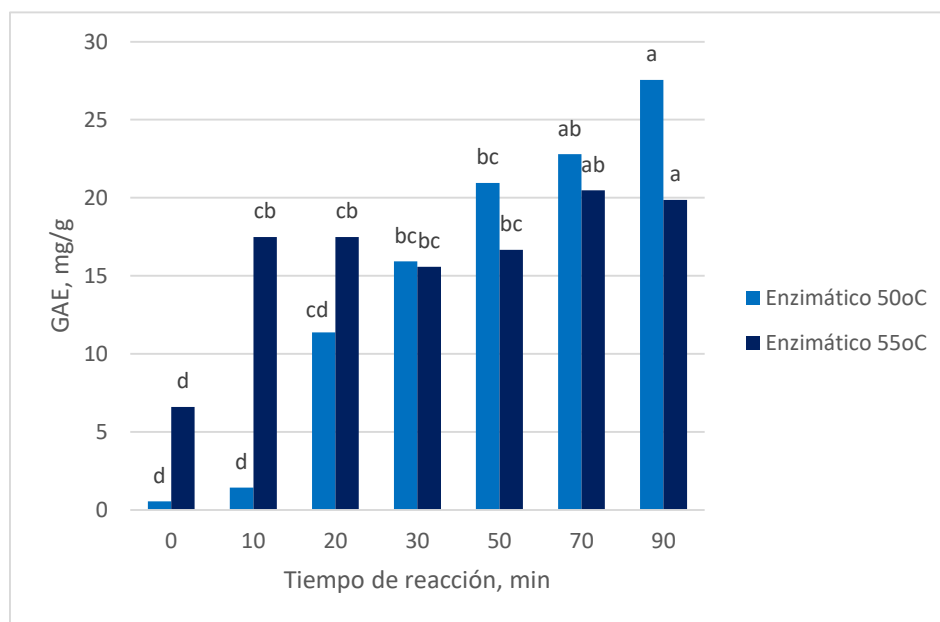


Figura 8. Contenido de polifenoles por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos.

Alba et al (2023) reporta un promedio de 21.48 mg/100 g de masa fresca mediante el método de extracción enzimática.

De acuerdo con la investigación de Pacheco-Coello et al. (2019), en donde se determinó concentración de fenoles en cálices tanto comerciales como no comerciales de *Hibiscus sabdariffa* se encontró que los cálices comerciales presentan alrededor de 10.3 mg de GAE/g de material vegetal, mientras que los no comerciales 6.1 mg de GAE/g de material vegetal. De tal modo tanto la técnica asistida por ultrasonido como enzimática son buenas alternativas de extracción de estos compuestos bioactivos presentando un mayor contenido que la literatura reportada.

Agunbiade et al. (2022) en su investigación sobre las propiedades antioxidantes de una bebida a base de la mezcla de café verde/ tostado y harinas de cálices de

Hibiscus sabdariffa reporta que el contenido de polifenoles se encontró en un rango de 36,26 y 351,35 mg GAE/g haciendo uso del método de extracción por agitación, y este valor aumenta conforme se incrementa la concentración del extracto en las bebidas. Por lo que las muestras con alto fenólico son las que presentaban mayor cantidad del extracto de *Hibiscus sabdariffa*.

6.1.2 Antocianinas

A partir de las muestras de residuos de *Hibiscus sabdariffa* en la extracción asistida por ultrasonido se puede observar en la figura 9, a los 30 minutos de reacción tanto a 50°C como 55°C se obtuvo la mayor cantidad de antocianinas (7.06 mg/g de masa fresca) a los 30 minutos de extracción ya que no existe diferencia significativa con las dos variaciones de la temperatura.

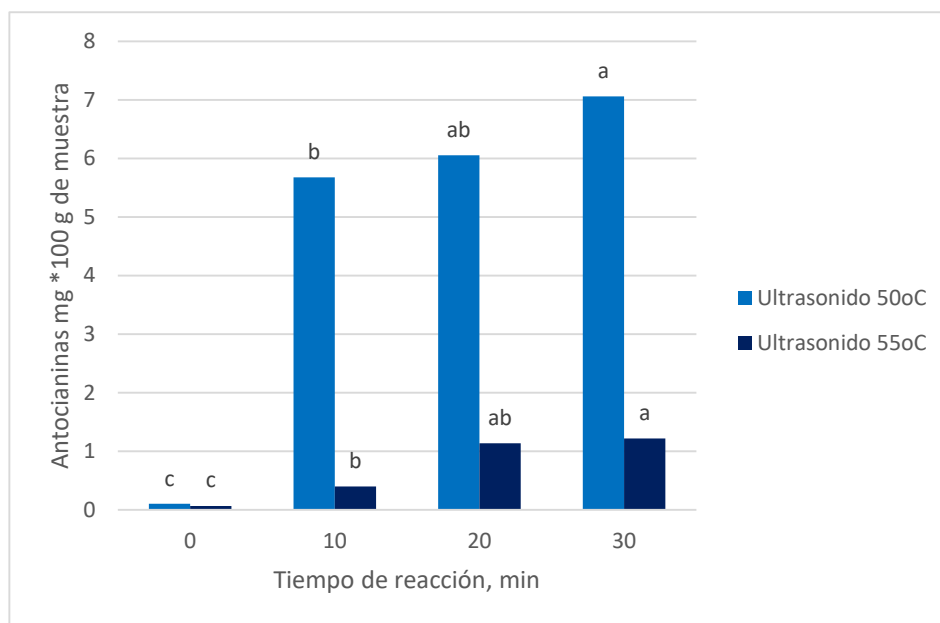


Figura 9. Contenido de antocianinas por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 30 minutos.

La antocianinas son pigmentos hidrosolubles que le dan esa tonalidad roja a los cálices de *Hibiscus sabdariffa*, estos pigmentos se encuentran en las vacuolas de la célula vegetal, según la investigación realizada por Aguilar-Luna et al (2023) en donde evaluaron los cambios agronómicos y fisicoquímicos que sufren los cálices de *Hibiscus sabdariffa* en función del ambiente y densidad de plantación, se

encontró que las concentraciones de este componente bioactivo está dentro del rango de 2 a 11 mg/g de masa fresca utilizando el método de extracción por agitación a los 30 minutos de reacción haciendo uso de solventes como metanol acidificado al 1% con ácido trifluoroacético al 99% . Ramírez-Cortés et al. (2011) reporta valores que alcanzan los 5.9 mg*g.

Esta diferencia de valores puede atribuirse de acuerdo con el método de extracción utilizado, además considerando que tanto para el método asistido por ultrasonido como enzimático es la segunda extracción, ya que es a partir del residuo generado. En general se obtiene mayor cantidad de antocianinas mediante el método de extracción asistida por ultrasonido, y resulta ser más amigable con el ambiente que utilizando solventes.

Con el método de extracción enzimática el contenido de antocianinas a los 30 minutos de reacción a las dos temperaturas evaluadas (50°C y 55°C) presentan el mayor contenido de este compuesto con un valor de 1.02 mg/100 g. Esa cantidad de antocianinas se mantiene estable hasta los 50 minutos de reacción a una temperatura de 50°C y posteriormente se observa un descenso en el contenido de antocianinas llegando hasta 0.131 mg/ 100 g.

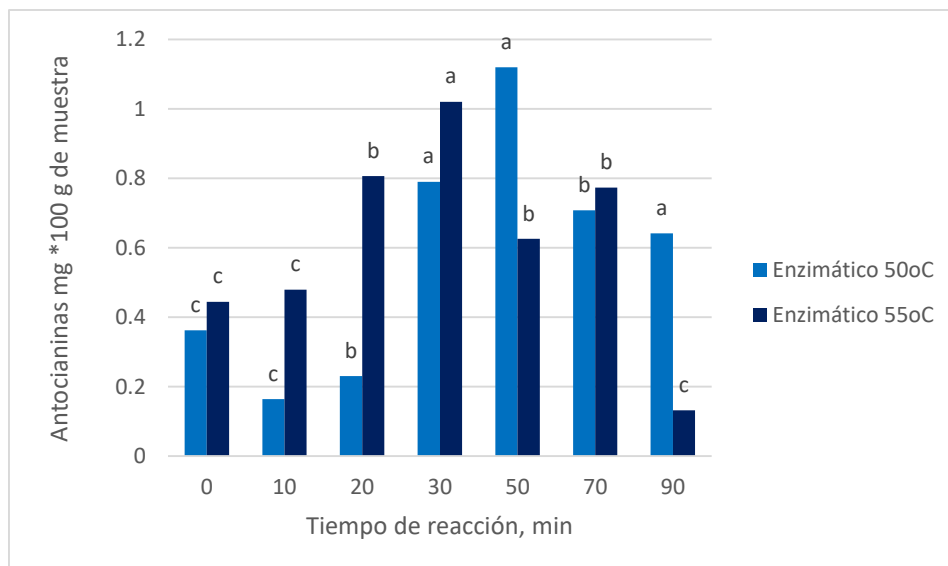


Figura 10. Contenido de antocianinas por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta 90 minutos.

La investigación realizada por Alba et al. (2023) sobre la optimización del método enzimático para la obtención de componentes bioactivos en mora utilizando la enzima pectinasa de *Aspergillus niger*, y etanol al 70% como solvente muestra que se obtuvo un valor de 2.14 mg/100 g, además este contenido se obtiene a los 5 minutos de extracción y se mantiene constante hasta los 10 minutos.

De acuerdo con investigaciones la concentración de antocianinas está muy relacionada con la actividad antioxidante, por otra parte, los cálices son los que presentan mayor contenido de compuestos bioactivos en comparación con otras partes de la planta (Pacheco-Coello et al., 2019).

6.1.3 Flavonoides

Los resultados arrojan que mediante extracción asistida por ultrasonido a 55°C presentan un contenido elevado de flavonoides a partir del minuto 10 con 0.0033 mg de catequina equivalente/g de material vegetal y se mantiene constante hasta los 30 minutos de reacción. A diferencia del tratamiento con temperatura a 50°C, existe diferencia significativa entre el minuto 10, hasta los 30 minutos de reacción, siendo a partir del minuto 20 en donde se presenta un contenido igual que con la temperatura a 55°C (Fig 11).

Según la investigación de Pacheco-Coello et al. (2019) en donde se determinó la concentración de flavonoides en cálices de *Hibiscus Sabdariffa*, se encontró que en cálices comerciales se presentan alrededor de 6.3 mg de catequina equivalente/g de material vegetal, mientras que para cálices no comerciales se obtuvo 3.1 mg de catequina equivalente/g de material vegetal. Por lo que la extracción por ultrasonido resulta una técnica eficiente para la obtención de componentes bioactivos, pero no se obtiene tanta cantidad en comparación con otras investigaciones.

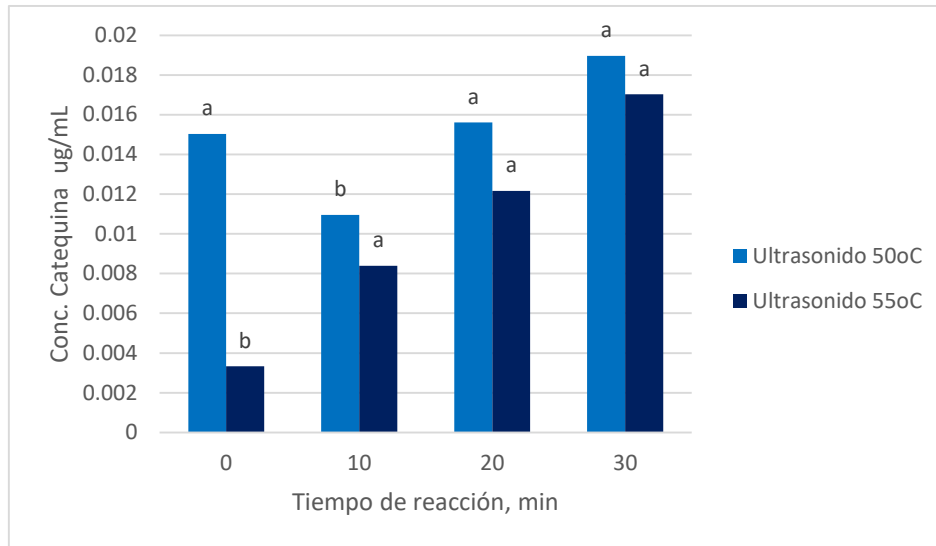


Figura 11. Contenido de flavonoides por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 a 30 minutos.

De acuerdo con la investigación de Duque-Soto et al. (2023) en donde se evaluaron los componentes fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* mediante varios métodos de extracción, se encontró que el nivel más alto de extracción en flavonoides fue utilizando el método extracción de líquido presurizado (PLE) con un valor de 6,1 mg/g.

Con respecto al tratamiento enzimático los resultados de la figura 12 muestran que el mayor contenido de flavonoides presenta una diferencia significativa ($P > 0.05$) a los 90 minutos de extracción con respecto al tiempo de reacción de evaluado 0.049 mg de catequina equivalente/g de material vegetal. Asimismo, este contenido es igual a las dos temperaturas evaluadas, se puede observar que a partir del minuto 10 empieza a aumentar el contenido de flavonoides.

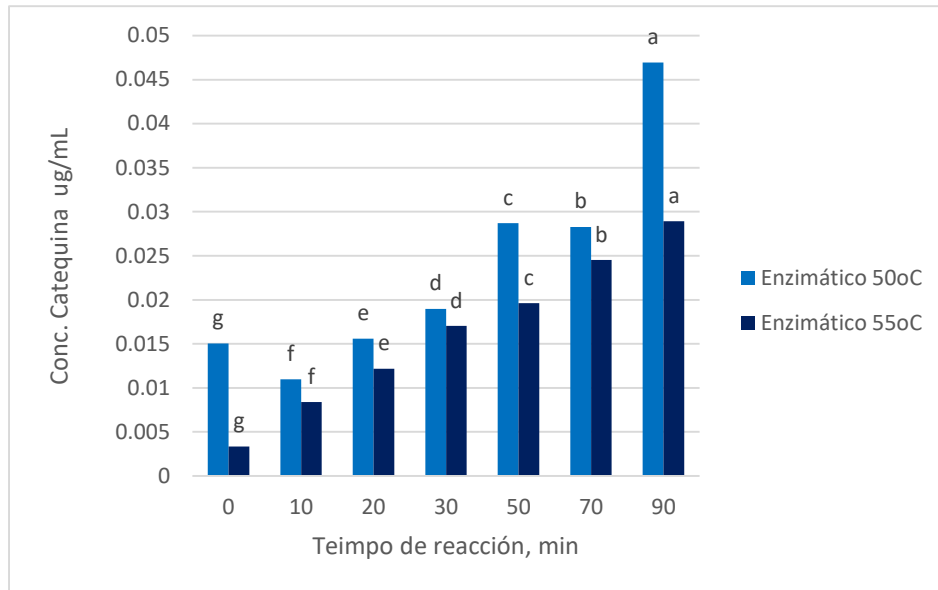


Figura 12. Contenido de flavonoides por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta 90 minutos.

6.1.4 Actividad antioxidante DPPH

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH en el tratamiento de ultrasonido muestran que a los 10 minutos de reacción para ambas temperaturas (50°C y 55°C) hay una mayor capacidad antioxidante con un valor de 4.127 Conc. ET mM/m (DPPH) y posteriormente comienza a disminuir, como se muestra en la figura 13.

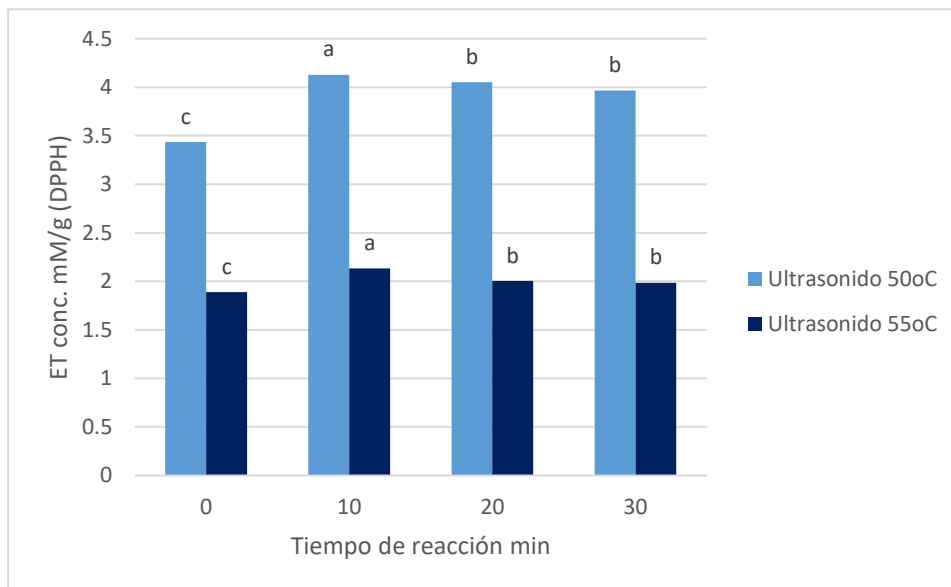


Figura 13. Actividad antioxidante DPPH por medio de extracción asistida por ultrasonido a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 a 30 minutos.

A diferencia del método por ultrasonido, el tratamiento enzimático muestra una mayor capacidad antioxidante desde el tiempo 0 con un valor de 4.51 Conc. ET mM/m (DPPH) para ambas temperaturas, posteriormente se observa (Fig 14) como empieza a disminuir esta capacidad antioxidante hasta llegar a 3.88 Conc. ET mM/m (DPPH) a los 90 minutos de reacción.

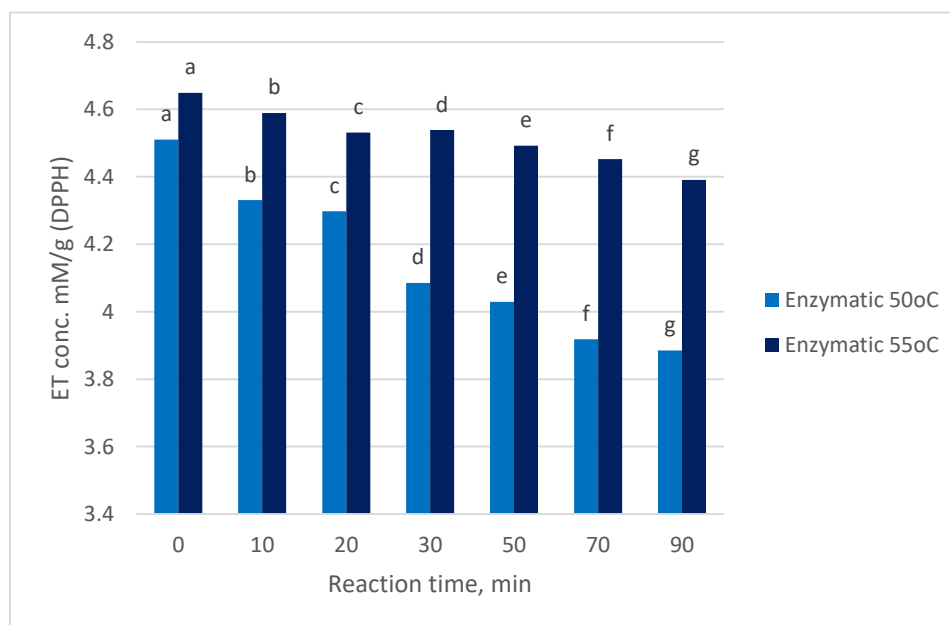


Figura 14. Actividad antioxidante DPPH por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C a 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos.

Según investigaciones se ha reportado que entre mayor sea el contenido de antocianinas existe mayor actividad antioxidante por lo que comparando con los resultados obtenidos de la concentración de antocianinas y la actividad antioxidante se puede apreciar mejor con el método de extracción asistida por ultrasonido en el tiempo 10 que es cuando existe gran contenido de antocianinas, en la actividad antioxidante también se presenta entre el tiempo 0 y a los 10 minutos, lo mismo pasa con la técnica ABTS pero se mantiene más estable esta actividad antioxidante entre los 10 y 20 minutos.

Un factor importante es el tiempo de extracción sobre la capacidad antioxidante, los tiempos de extracción prolongada pueden llegar a descomponer y oxidar los

componentes bioactivos y por tanto la actividad antioxidante va disminuyendo, como se puede observar en la figura 14.

De acuerdo con los resultados de la investigación de Villalobos-Vega et al. (2023), el extracto que tuvo mayor capacidad antioxidante fue utilizando una temperatura de 60°C durante 33 minutos.

6.1.5 Actividad antioxidante ABTS

Uno de los métodos más utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, es el radical ABTS + debido a su alta sensibilidad, es rápido y práctico (Kuskoski et al., 2005)

Tanto la técnica DPPH como ABTS miden la capacidad del antioxidante para reducir a un oxidante y ese se puede observar mediante el cambio de coloración. La máxima actividad antioxidante ABTS mediante extracción asistida por ultrasonido tanto a 50°C como 55°C se presenta desde el tiempo 0 y se mantiene estable hasta los 10 minutos de reacción con un valor de 0.63 Conc. Trolox umol/g (ABTS), pasado ese tiempo la actividad comienza a disminuir hasta llegar a 0.52 Conc. Trolox umol/g (ABTS) (Fig. 15)

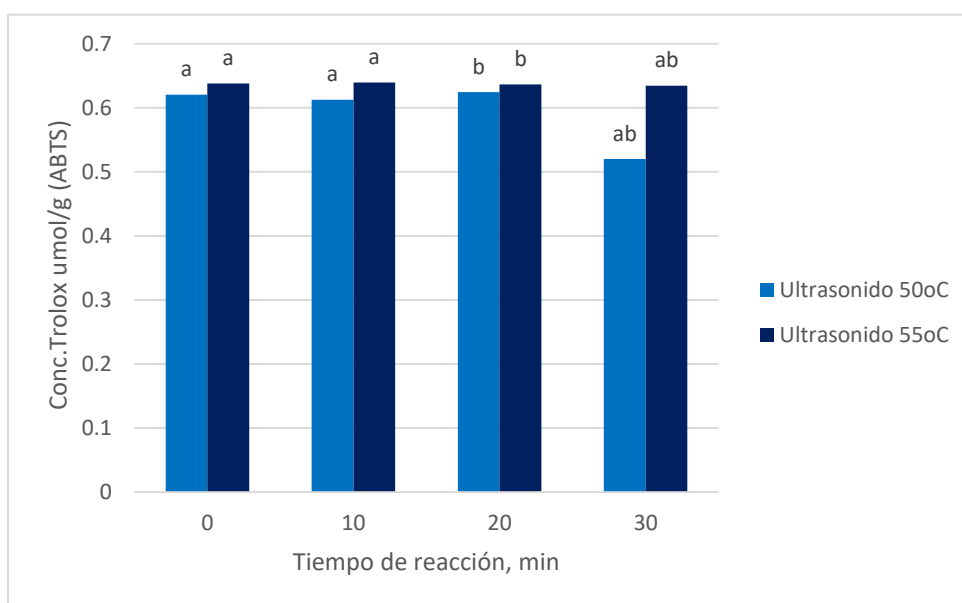


Figura 15. Actividad antioxidante ABTS por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 30 minutos.

Caso contrario con la técnica de extracción enzimática, a partir de los 20 minutos se observa una alta capacidad antioxidante (0.062 Conc. Trolox $\mu\text{mol/g}$ (ABTS)) y se mantuvo constante hasta los 90 minutos de reacción para ambas temperaturas evaluadas como se observa en la figura 16.

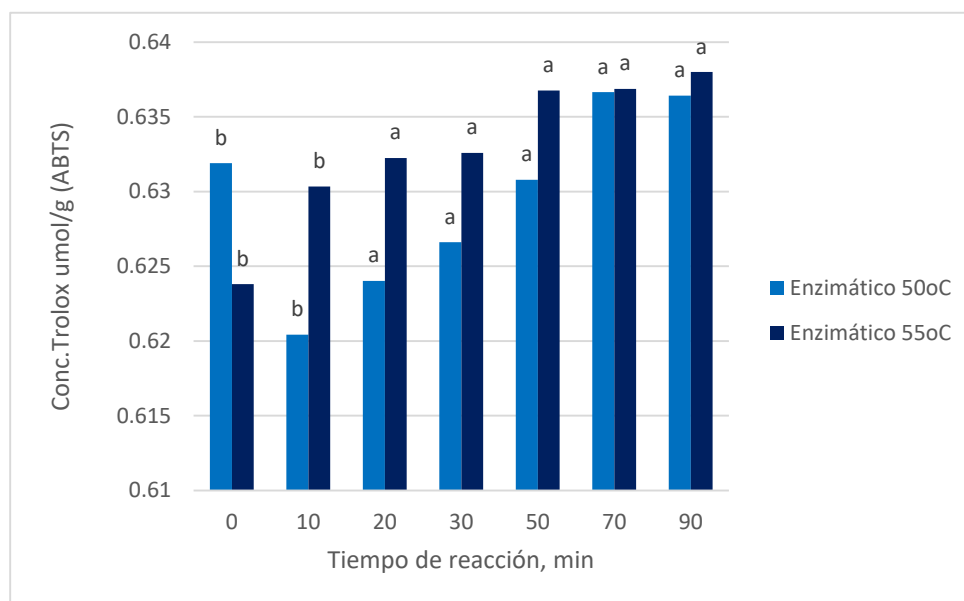


Figura 16. Actividad antioxidante ABTS por medio de extracción enzimática a temperatura de 50°C y 55°C a tiempos de 0 hasta los 90 minutos.

6.2. Caracterización de la biopelícula

Los parámetros evaluados presentados en el cuadro 4 sirvieron de referencia para ver el comportamiento de estas biopelículas para su posterior aplicación en alimentos, uno de estos parámetros fue el grosor en las biopelículas y se obtuvo un promedio de 0.044mm, según investigaciones este parámetro es importante al momento que se aplique al alimento, se forme una capa fina sobre el mismo y que pase desapercibido por el consumidor (Zamudio et al., 2016).

Asimismo, se evaluaron las propiedades ópticas en donde se obtuvo un 34.71% de transparencia y opacidad de 52% estos parámetros son de relevancia ya que están estrechamente relacionado con la conservación de las propiedades sensoriales, así como las propiedades de barrera contra la luz. Según investigaciones las proteínas liposolubles aumentan la transparencia por lo que con el tiempo permiten la entrada

de luz, lo que se acelera la oxidación de los componentes y por tal motivo la rancidez, es por esta razón que se ha hecho uso de extractos de orégano y romero para aumentar la opacidad y el color en las biopelículas (Solano et al., 2018).

En cuanto a la evaluación del color en donde L (componente negro-blanco, luminosidad) presento un valor de 55.016, en cuanto a las coordenadas de cromaticidad, a (componente +rojo a –verde) se obtuvo un valor de 24.318 y para b (componente +amarillo a –azul) el valor obtenido fue de 5.682.

La solubilidad es un factor muy importante que se debe tomar en cuenta ya que esta propiedad está relacionada con la capacidad que la biopelícula pueda disolverse en el agua, para la formulación de la biopelícula se obtuvo un 99.74 % por lo que esta formulación sugiere ser un buen candidato para alimentos de baja humedad. El contenido de humedad que presentó la biopelícula fue de 52.27% esto se pudo deber a la formulación de la biopelícula ya que reportes indican que componentes hidrofílicos, un ejemplo es la miel guardan mucha humedad.

La permeabilidad de vapor de agua es una medida de que tan fácil o difícil es que el vapor del agua penetre el material y esto depende en gran medida de los componentes con los cuales se elaboró la biopelícula ya que esto permite que se controle la humedad y entre más lento sea este proceso es mejor para la biopelícula en los alimentos ya que aumenta su vida de anaquel (Solano et al., 2018). La tasa de permeabilidad que presentó la biopelícula al 100% HR fue de 246.493 g mm/d m² kPa, al 85% g mm/d m² kPa se obtuvo 0.90803466 y para el 25% una tasa de 0.00222 g mm/d m² kPa (Cuadro 4).

Según investigaciones reportan que los componentes de la biopelícula afectan de manera directa en la permeabilidad al vapor de agua, las biopelículas basadas en lípidos y ceras presentan una tasa de permeabilidad muy baja, debido a la naturaleza del componente (Solano et al., 2018).

Posteriormente se evaluó el contenido de componentes bioactivos presentes en la biopelícula, respecto los flavonoides se obtuvo 0.090482882 mg equivalentes a Catequina, de polifenoles 4.428 concentración equivalente a Acido Gálico (GAE),

de antocianinas 0.1646 mg*100 gramos de muestra y en cuanto actividad antioxidante ABTS 0.60961 Conc. Trolox umol/g, por lo que resulta ser una biopelícula que se puede aplicar a diversos alimentos haciéndolo funcional.

Cuadro 4. Parámetros evaluados de la caracterización de la biopelícula.

| | |
|----------------------------------|--|
| Grosor (mm) | 0.044 mm |
| Transparencia (%) | 34 % |
| Opacidad (%) | 52% |
| Color (L,a,b) | L: 55.016 a: 24.318 b: 5.682 |
| Humedad (%) | 52% |
| Solubilidad (%) | 99% |
| Permeabilidad (g mm/d m2 kPa) | 100%: 246.493 85%:0.908 25%: 0.0022 |

7. Conclusiones

Se obtiene una mayor cantidad de polifenoles por el método asistido por ultrasonido tanto a 50°C como 55°C a los 30 minutos de reacción, por el contrario, con el método enzimático se obtiene la mayor cantidad de polifenoles hasta los 90 minutos de reacción.

El mayor contenido de antocianinas se obtiene al igual que con los polifenoles a ambas temperaturas a los 30 minutos de reacción, con el método enzimático el mayor contenido se obtiene hasta los 50 minutos de reacción.

Con el método asistido por ultrasonido tanto a los 50°C como 55°C se obtiene una mayor cantidad de flavonoides a los 20 minutos de reacción, caso contrario con el método enzimático que el mayor contenido se obtiene hasta los 90 minutos de reacción.

El método de extracción asistida por ultrasonido es más eficiente a los 10 minutos de reacción y no existe diferencia significativa para ambas temperaturas (50°C y 55°C), sin embargo, con el método enzimático desde el tiempo 0 presenta la mayor actividad antioxidante y con el paso del tiempo esta va disminuyendo.

La actividad antioxidante ABTS es mayor desde el tiempo 0 hasta los 10 minutos de reacción por el método asistido por ultrasonido, sin diferencia significativa para ambas temperaturas. Asimismo, con el método de extracción enzimático la mayor actividad antioxidante se presenta hasta los 20 minutos de reacción.

La formulación y caracterización de la biopelícula a base de goma guar, glicerol, aceite esencial de clavo y extracto de flor de Jamaica presenta propiedades adecuadas en cuanto a color, grosor, solubilidad, humedad, además de la evaluación de componentes bioactivos presentes en esta biopelícula resulta una técnica favorable para su aplicación en alimentos brindándoles un valor funcional a este.

8. Bibliografía

- Aguilar-Luna, J. M. E., Loeza-Corte, J. M., & Alcántara-Jiménez, Á. (2023). Cambios agronómicos y fisicoquímicos en cálices de Hibiscus sabdariffa en función del ambiente y densidad de plantación. *Bioagro-*, 35(1), 83-96. <https://doi.org/10.51372/bioagro352.1> (Aguilar-Luna et al.,2023)
- Aguilera-Otíz, M., Del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Agunbiade, H., Fagbemi, T. N., & Aderinola, T. A.(2022). Antioxidant properties of beverages from graded mixture of green/roasted coffee and Hibiscus sabdariffa calyx flours. *Applied Food Research*, 2(2), 100163. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100163>
- Arias, A. N. A., Aliaño-González, M. J., Palma, M., Barbero, G. F., & Carrera, C. (2023). Enhancing Efficiency of Enzymatic-Assisted Extraction Method for Evaluating Bioactive Compound Analysis in Mulberry: An Optimization Approach. *Agronomy*, 13(10), 2548. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102548>
- Ávalos, V. M. C., Flores, H. J. M., Aguilar, R. T., Reyes, J. T. S., Cruz, G. P. S., & Ramírez, R. B. (2022). Rendimiento de variedades de Jamaica con relación a fechas de poda apical. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 27, 45-56. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3177>
- Borrás-Enríquez, A. J., Reyes-Ventura, E., Villanueva-Rodríguez, S. J., & Moreno-Vilet, L. (2021). Effect of Ultrasound-Assisted extraction parameters on total polyphenols and its antioxidant activity from mango residues (*Mangifera indica* L. var. manililla). *Separations*, 8(7), 94. <https://doi.org/10.3390/separations8070094>
- Camelo Méndez G, A (2013). Caracterización química y colorimétrica de cultivares de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Tesis de maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto politécnico nacional, Morelos.
- Carrillo, C., Wilches-Pérez, D., Hallmann, E., Kazimierczak, R., & Rembiałkowska, E. (2019). Organic versus conventional beetroot. *Bioactive*

compounds and antioxidant properties. LWT, 116, 108552.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108552>

- Castañeda-Valbuena, D., Ayora-Talavera, T., Luján-Hidalgo, C., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Galero, N. X. M., & Meza-Gordillo, R. (2021). Ultrasound extraction conditions Effect on antioxidant capacity of mango by-product extracts. Food and Bioproducts Processing, 127, 212-224.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.03.002>
- Castro Acosta, M. (2019). Polifenoles: compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. RED Cien, 1(1).
<https://www.redcien.com/index.php/redcien/article/view/5/4>
- Córdova, J. S., & Roque, B. L. (2014). Extracción por acción biocatalítica y cuantificación de luteína de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). Ciencia E Investigación, 17(1), 21-26. <https://doi.org/10.15381/ci.v17i1.11089>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L. – A Phytochemical and Pharmacological Review. Food Chemistry, 165, 424-443.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., & Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos de iv y v gama. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 16(1), 8-17. [fecha de Consulta 2 de Mayo de 2024]. ISSN: 1665-0204. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81339864002>
- De la Luz Ramos, A (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.): actividad antioxidante y nanoencapsulación. Tesis Licenciatura, Universidad de Puebla.
<https://hdl.handle.net/20.500.12371/7261>
- Debelo, H., Fiecke, C., Terekhov, A. I., Reuhs, B. L., Hamaker, B. R., & Ferruzzi, M. G. (2023). Compositional analysis of phytochemicals and polysaccharides from senegalese plant ingredients: *Adansonia digitata* (baobab), *Moringa oleifera* (moringa) and *Hibiscus sabdariffa* (hibiscus). NFS Journal, 32, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.100144>

- *DIOSMETINA*. (2017). Quimica Alkano.<http://quimicaalkano.com/product/diosmetina/>
- Duque-Soto, C., Expósito-Almellón, X., García, P., Pando, M. E., Borrás-Linares, I., & Lozano-Sánchez, J. (2023). Extraction, Characterization, and Bioactivity of Phenolic Compounds—A case on hibiscus genera. *Foods*, 12(5), 963. <https://doi.org/10.3390/foods12050963>
- Edo, G. I., Samuel, P. O., Jikah, A. N., Oloni, G. O., Ifejika, M. N., Oghenegueke, O., Ossai, S., Ajokpaoghene, M. O., Asaah, E., Uloho, P. O., Akpoghelie, P. O., Ugbune, U., Ezekiel, G. O., Onoharigho, F. O., Agbo, J. J., & Essaghah, A. E. (2023). Proximate composition and health benefit of Roselle leaf (*Hibiscus Sabdariffa*). *Insight on food and health benefits. Food Chemistry Advances*, 3, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100437>
- Fernández Valdés, Daybelis, Bautista Baños, Silvia, Fernández Valdés, Dayvis, Ocampo Ramírez, Arturo, García Pereira, Annia, & Falcón Rodríguez, Alejandro. (2015). Eatable films and coverings: a favorable alternative in the postharvesting conservation of fruits and vegetables. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52-57. Recuperado en 16 de mayo de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S207100542015000300008&lng=es&tlng=en.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Gámez Villasana, J. (2020). Avances en la determinación de compuestos bioactivos en alimentos. *Tecnol.Agroalim*, 19. https://www.researchgate.net/publication/358738872_avances_en_la_determinacion_de_compuestos_bioactivos_en_alimentos
- Garzón, G. A., (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica colombiana*, 13(3),27-36.

[fecha de consulta 28 de diciembre de 2023]. Issn: 0120-548x. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028004002>

- Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Rangel-Vargas, E., Navarro-Cortez, R. O., Cabrera-Canales, Z. E., Díaz-Batalla, L., Martínez-Bustos, F., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfán-Cortés, R. N. (2022). Erratum to “A modified Achira (*Canna indica* L.) starch as a wall material for the encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* extract using spray drying” [Food Res.Int. 119 (2019) 547–553]. Food Research International, 152, 110382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110382>
- Guija-Poma, Emilio, Inocente-Camones, Miguel Ángel, Ponce-Pardo, John, & Zarzosa-Norabuena, Edwin. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Médico (Lima), 15(1), 57-60. Recuperado en 16 de enero de 2024, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727558X2015000100008&lng=es&tlng=es.
- INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA (INEGI). 2005. Anuario estadístico del estado de Guerrero. México.
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E., & Fonseca, J. G. (2009b). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista de la Facultad de Medicina, 52(2), 73-75. <https://www.mediagraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092g.pdf>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: a review. Ultrasonics Sonochemistry, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology, 25(4), 726-732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>
- Lamos, D. A., Díaz, L. N. M., Sanchez, M. C. H., & Girón, J. M. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. Tecnura, 22(57), 55-68. <https://doi.org/10.14483/22487638.12178>

- Luvonga, W. A., Njoroge, M. S., Makokha, A., & Ngunjiri, P. (2012). Chemical characterization of *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) calyces and evaluation of its functional potential in the food industry. Scientific Conference Proceedings. <http://journals.jkuat.ac.ke/index.php/jscp/article/view/745>
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Dubey, K. K., & Singhal, R. S. (2019). Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion In Food Science*, 25, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.009>
- Medina, M. R., Ávila, J., & Ruales, J. (2015). Diseño de un recubrimiento comestible bioactivo para aplicarlo en la frutilla (fragaria vesca) como proceso de postcosecha. En Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha (Vol. 17, Número 2, pp. 276-287). <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/11181/1/CD-6412.pdf>.
- Monreal, A. M. J., Manzanera, M. S., & Tomé, M. M. (2012). Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 28, 67-78. <https://www.cabdirect.org/abstracts/20133224916.html>
- Mostafa, H. S. (2023). Production of low-tannin *Hibiscus sabdariffa* tea through D-optimal design optimization of the preparation conditions and the catalytic action of new Tannase. *Food Chemistry: X*, 17, 100562. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100562>
- Nwuzor, I. C., Adinoyi, B. J., Okey-Onyesolu, C. F., & Oyeoka, H. C. (2023). *Hibiscus sabdariffa* Natural dye extraction process with central composite design for optimal extract yield. *Sustainable Chemistry for the Environment*, 2, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.scenv.2023.100008>
- Ochoa, M. G. (2013, 6 marzo). Producción de Jamaica en México. *El Economista*. <https://www.economista.com.mx/opinion/Produccion-de-jamaica-en-Mexico-20130306-0010.html>
- Pacheco, F. (2019) Polifenoles y actividad antioxidante de extractos acuosos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. *Revista Científica FAV UNRC Ab Intus 4* (2): 14-20.

- Pacheco-Coello, F., Ramírez-Azuaje, D., Pinto-Catari, I., Peraza-Marrero, M., & Orosco-Vargas, C. (2019). Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-FarmacéUticas/Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(3). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n3.84956>
- Peñarrieta, J. Mauricio, Tejeda, Leslie, Mollinedo, Patricia, Vila, José L, & Bravo, José A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. Recuperado en 08 de enero de 2024, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025054602014000200006&lng=es&tlng=es.
- Pérez-Loredo, María G., Hernández-De Jesús, Lourdes, & Barragán-Huerta, Blanca E.. (2017). Extracción de compuestos bioactivos de Pitaya Roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Agrociencia*, 51(2), 135-151. Recuperado en 14 de febrero de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952017000200135&lng=es&tlng=es
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. Recuperado en 14 de enero de 2024, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021216112012000100009&lng=es&tlng=es
- Riaz, G., & Chopra, R. N. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic Uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
- Rizkiyah, D. N., Putra, N. R., Yunus, M. A. C., Veza, I., Irianto, I., Aziz, A. H. A., Rahayuningsih, S., Yuniarti, E., & Ikhwan, I. (2023). Insight into green extraction for roselle as a source of natural red pigments: a review. *Molecules*, 28(3), 1336. <https://doi.org/10.3390/molecules28031336>

- Rodrigues, S., De Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from Jaboticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>
- Rosas, A (2019). Aplicación de un Modelo SARIMA en la Predicción de Precios del Cáliz de Jamaica en México. Tesis de maestría de Ciencias en Economía Agrícola y de los Recursos Naturales. Universidad Autónoma Chapingo, Edo de México. <http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080/handle/20.500.12098/653>
- Ross, I.A. (2003). Hibiscus sabdariffa. In: *Medicinal Plants of the World*. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-365-1_13
- SAGARPA–ASERCA. 1999. México, proveedor de plantas medicinales al mundo. *Claridades Agropecuarias*, 73, 13–21.
- Salazar López, R., Francisco Ponce, B. A., Vidal Silva, I. M., Maldonado Astudillo, Y. I., Jiménez Hernández, J., Flores Casamayor, V., & Arámbula Villa, G. (2021). Efecto de la adición de subproductos agroindustriales en las propiedades físicas de un biopolímero almidón-gelatina. *Biotecnia*, 23(1), 52–61. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1324>
- Sáyago-Ayerdi, Sonia G, & Goñi, Isabel. (2010). Hibiscus sabdariffa L: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(1), 79-84. Recuperado en 21 de diciembre de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00040622201000010012&lng=es&tlng=es.
- Solano-Doblado, L. G., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *Deleted Journal*, 21, 30. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>
- Solano-Doblado, Luz Georgina, Alamilla-Beltrán, Liliana, & Jiménez-Martínez, Cristian. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21(Supl. 2), e20180153. Epub 02 de diciembre de 2020. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>

- Soto-García, Marcela, & Rosales-Castro, Martha.(2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxylla. Maderas. Ciencia y tecnología, 18(4), 701-714. Epub 00 de de 2016.<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Trueba, G. P., & Sánchez, G. M. (2001b). Los flavonoides como antioxidantes naturales. Acta farmacéutica bonaerense, 20(4), 297-306. http://www.latamipharm.org/trabajos/20/4/LAJOP_20_4_3_1_P9HXUFPEV7.pdf
- Vázquez-Briones, M. C., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(2), 5-14.
- Villalobos-Vega, M. J., Rodríguez-Rodríguez, G., Armijo-Montes, O., Jiménez-Bonilla, P., & Valverde, V. Á. (2023). Optimization of the extraction of antioxidant compounds from roselle hibiscus calyxes (Hibiscus sabdariffa), as a source of nutraceutical beverages. Molecules, 28(6), 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules28062628>
- Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñoz-Márquez, D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>
- Wu, H., Yang, K., & Chiang, P. (2018). Roselle anthocyanins: antioxidant properties and stability to heat and pH. Molecules, 23(6), 1357. <https://doi.org/10.3390/molecules23061357>
- Zamudio, E. O., Aguilar, C. N., Salcedo, G. O., Pérez, M. V. A., & Violante, H. G. M. (2016b). Caracterización fisicoquímica de películas comestibles a base de cera de candelilla. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 17(1), 17. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81346341001.pdf>

