

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE EXTRACTOS DE CÁLICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)"

MERCEDES MORALES CABRERA

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis titulada: "**Actividad antimicrobiana y caracterización fenólica de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)**" realizada por la alumna: Mercedes Morales Cabrera bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

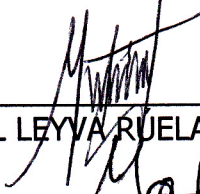
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



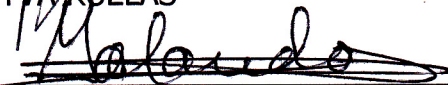
DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR



DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESOR



DRA. YOLANDA SALINAS MORENO

ASESOR



DR. JAVIER CASTRO ROSAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2011

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A mi consejo particular:

Dr. Javier Hernández Morales, Dr. Gabriel Leyva Ruelas, Dr. Javier Castro Rosas y Dra. Yolanda Salinas Moreno por la confianza, el esfuerzo, el tiempo, la dedicación y el apoyo incondicional que me brindaron.

A los profesores que fueron parte de mi formación académica, así también a los laboristas y el personal administrativo de Fitosanidad-Fitopatología.

A mi novio Javier por su amor a mí persona ya que siempre me apoyo durante mis estudios de maestría.

A mis amigos, en especial a Alba Priscilia por su gran amistad durante estos dos años.

DEDICATORIA

A DIOS por darme la vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor

A mis padres José del Carmen y Gloria quienes siempre me han amado, gracias por confiar en mí.

A mis hermanas y hermanos con quienes siempre he compartido excelentes momentos y por su enorme apoyo.

A mis sobrinas y sobrinos, gracias por su compañía.

A mi novio Javier, gracias por estar a mi lado.

A mis amigas de la licenciatura Rosy, Lupita, Sandy y Elena que me han brindado su amistad hasta el momento.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2. Objetivos generales	3
1.3. Literatura citada	4
CAPITULO I	8
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE CALICES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) EN SEROTIPOS DE <i>Salmonella</i>.	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Origen del material vegetal	12
2.2. Sitio experimental	12
2.3. Diseño experimental y listado de tratamientos.	12
2.4. Preparación de los extractos	14
2.4.1. Preparación de los extractos metanólicos y etanólicos	14
2.4.2. Preparación del extracto acuoso en caliente y frío	14
2.5. Obtención de la cepa	15
2.6. Preparación del inoculo	15
2.7. Pruebas de inhibición de <i>S. typhimurium</i> y <i>S. choleraesuis</i> en presencia de los extractos de jamaica	15
2.8. Pruebas de inhibición de <i>S. typhimurium</i> en otras partes de la planta de jamaica	16
2.9. Influencia del pH de los extractos del genotipo de Criolla de Oaxaca sobre la actividad antimicrobiana	16

2.10.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca.....	17
2.11.	Análisis de resultados.....	18
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1.	pH de los extractos	18
3.2.	Pruebas de inhibición de <i>S. typhimurium</i> y <i>S. choleraesuis</i> en presencia de los extractos de jamaica.....	20
3.3.	Pruebas de inhibición de <i>S. typhimurium</i> con otras partes de la planta de jamaica.	24
3.4.	Influencia del pH de los extractos acuosos del genotipo Criolla de Oaxaca sobre la actividad antimicrobiana	25
3.5.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca.....	26
4.	CONCLUSIONES	27
5.	LITERATURA CITADA	27
	CAPITULO II	34
	CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	34
	RESUMEN	34
	ABSTRACT	35
1.	INTRODUCCIÓN	36
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1.	Material vegetal.....	37
2.2.	Sitio experimental	37
2.3.	Diseño experimental	38
2.4.	Preparación de los extractos etanólicos y cuantificación de sólidos recuperados.....	38
2.5.	Sólidos solubles totales (°Brix).....	39
2.6.	Acidez titulable.....	39
2.7.	Cuantificación de antocianinas	39
2.8.	Cuantificación de fenoles solubles totales	40

2.9.	Cuantificación de proantocianidinas.....	40
2.10.	Análisis de ácidos fenólicos por HPLC.....	40
2.11.	Análisis de resultados.....	41
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	Sólidos recuperados en los extractos etanólicos.....	42
3.2.	Acidez titulable y sólidos solubles totales (°Brix).....	43
3.3.	Cuantificación de antocianinas.....	44
3.4.	Cuantificación de fenoles solubles totales	46
3.5.	Cuatificación de proantocianidinas	48
3.6.	Análisis de ácidos fenólicos	49
3.7.	Análisis de ácidos fenólicos por HPLC.....	50
4.	CONCLUSIONES.....	53
5.	LITERATURA CITADA.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I.

Cuadro 1. Listado de tratamientos para el análisis de la actividad antimicrobiana..... 13

Cuadro 2. Variación del pH de los cinco genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en los diferentes extractos. 19

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana de los extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con *S. typhimurium*..... 21

Cuadro 4. Actividad antimicrobiana de los genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en los diferentes extractos con *S. choleraesuis*. 22

CAPITULO II.

Cuadro 1. Sólidos recuperados en el extracto etanólico en genotipos de los cálices de jamaica. 42

Cuadro 2. °Brix y acidez titulable en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)..... 43

Cuadro 3. Contenido promedio de ácidos fenólicos ($\mu\text{g/g}$) del extracto etanólico de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de cinco genotipos. 51

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO II.

Figura 1. Contenido promedio de antocianinas, en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes..... 45

Figura 2. Contenido promedio de fenoles solubles totales, en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes. .. 47

Figura 3. Contenido promedio de proantocianidinas de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes. 49

Figura 4. Contenido promedio de las fracciones de ácidos fenólicos contenidos en cinco muestras de extractos etanólicos de cálices de jamaica..... 50

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE EXTRACTOS DE CÁLCICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Mercedes Morales Cabrera, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos (frío y caliente) de cálices deshidratados de *Hibiscus sabdariffa* L. de cinco genotipos, sobre *S. typhimurium* (ATCC14028) y *S. choleraesuis* (ATCC10708), se empleó el método difusión en agar. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) por dilución. Se analizó la influencia del pH en la actividad antimicrobiana. Así mismo se realizó la caracterización fenólica de los extractos etanólicos. El efecto antimicrobiano fue variable; los extractos de la variedad Alma blanca (cálices verdes), presentaron el mayor efecto antimicrobiano (diámetros de inhibición de 12.5 a 19.5 mm) sobre ambos serotipos de *Salmonella*. Los extractos etanólicos tuvieron el mayor efecto antimicrobiano; estos extractos exhibieron aproximadamente 35 % más efecto que los metanólicos y 65 % más que lo observado con los acuosos. La CMI fue de $6.67 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la CMB de $7.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los extractos etanólicos de Criolla de Oaxaca. Alma blanca mostró el menor contenido de polifenoles y Criolla de Oaxaca el mayor. Sin embargo, en el porcentaje de acidez titulable fue lo contrario. El contenido de polifenoles no explica de manera clara la respuesta de la actividad antimicrobiana entre los genotipos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos compuestos pueden estar influyendo.

Palabras clave: CMI, CMB, pH, *Salmonella*, compuestos fenólicos, HPLC.

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHENOLIC CHARACTERIZATION OF EXTRACT
OF CALYCES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Mercedes Morales Cabrera, MC.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity of ethanol extracts, methanolic and aqueous (cold and hot) dehydrated calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. five genotypes of *S. typhimurium* (ATCC14028) and *S. choleraesuis* (ATCC10708) was used agar diffusion method. We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by dilution. The influence of pH on antimicrobial activity. Likewise characterization was performed ethanolic phenolic extracts. The antimicrobial effect was variable extracts the variety Alma blanca (calyx green) showed the highest antimicrobial effect (inhibition diameters of 19.5 mm de 12.5) on both serotypes of *Salmonella*. The ethanol extracts had the greatest antimicrobial effect, these extracts exhibited about 35% more effect than methanol and 65% higher than observed with the aqueous. The MIC was $6.67 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and MBC of $7.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ethanolic extracts Criolla de Oaxaca. Alma blanca showed the lowest polyphenol content and the largest Criolla de Oaxaca. However, the percentage of titratable acidity was the opposite. The polyphenol content clearly does not explain the response of the antimicrobial activity between genotypes. However, do not discard the possibility that these compounds may be influencing.

Keywords: MIC, MCB, pH, *Salmonella*, Phenolic compounds, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un miembro de la familia Malvaceae. En México se cultiva principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit; el principal productor es el estado de Guerrero, que aporta más de la mitad de la producción total (SIAP, 2008).

La jamaica es de importancia en México por los diversos usos potenciales que tiene, es utilizada para elaborar concentrados, jugos, mermeladas, jaleas, helados, harinas, licor, entre otros tipos de productos. Además, se le atribuyen diversas propiedades, entre las más investigadas se encuentran las medicinales, por sus compuestos fitoquímicos (Onyenekwe *et al.*, 1999; Li Thomas, 2002; Salleh *et al.*, 2002; Duke *et al.*, 2003; Hirunpanich *et al.*, 2005).

En la actualidad la demanda de alimentos inocuos es una necesidad creciente en los consumidores, debido a la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con microorganismos patógenos, tal es el caso de *Salmonella* sp., que causa la gastroenteritis humana, *S. typhimurium* es muy frecuente en muchos países (Francis & O'Beirne, 1999), a su vez *S. choleraesuis* es un microorganismo que puede transmitirse de los cerdos a los humanos (Cheng-Hsun *et al.*, 2002).

El interés de conocer compuestos antimicrobianos de origen natural, es una de las alternativas para asegurar la inocuidad de los alimentos. En algunas plantas y especias se les atribuyen la característica de tener actividad antimicrobiana en contra de patógenos vegetales y de humanos (Brandi *et al.*, 2006). Investigadores han realizado diversos trabajos en varias partes del mundo sobre la actividad antibacteriana de plantas, principalmente las que se asocian con propiedades

medicinales (Arora y Kaur 1999; Perumal 1999; Jeevan, 2004; Ríos y Recio 2005, Olaleye 2007; Liasu y Ayandele, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010). Estos estudios, se han evaluado con diferentes solventes como metanol, etanol, hexano, acetona, agua, cloroformo, entre otros (Muthuvelan y Balaji, 2008).

La jamaica es una de las plantas con presencia de compuestos antimicrobianos, en cálices deshidratados (Fernández *et al.*, 1996; Aziz *et al.* 1998; Metwali, 2003; Keh-sen *et al.* 2005; Garcia *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007; Olaleye 2007; Che-Yi y Mei-Chin, 2009; Wong *et al.*, 2010).

Las propiedades antimicrobianas presentes en las plantas se ven influenciadas por varios factores como el genotipo, el ambiente, época de cosecha, el almacenamiento, procedimientos de extracción de las sustancias, ubicación geográfica y la altitud entre otros (Brandi *et al.*, 2006), en consecuencia, la comparación de resultados es más difícil.

Existen una gama de fitoquímicos con propiedades antimicrobianas, en general los polifenoles (Tajkarimi *et al.*, 2010), entre ellos algunos ácidos fenólicos (Beuchat, 2001). Además de flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005) y proantocianidinas como catequinas y epicatequinas (Ikigai *et al.*, 1993; Friedman, 2007; Kuete *et al.* 2008).

1.2. Objetivos generales

- ✓ Determinar la actividad antimicrobiana de diferentes genotipos y extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa L.*) en el crecimiento de cepas de *Salmonella* sp., y evaluar el potencial antimicrobiano de raíz, tallo, hojas, semilla y cápsula con extractos acuosos del genotipo Tecoanapa.

- ✓ Determinar la Concentración Mínima inhibitorio (CMI) del material con más efecto antimicrobiano de los genotipos con coloración roja.

- ✓ Evaluar las propiedades como pH, Brix y Acidez titulable. Así como evaluar las antocianinas totales, fenoles solubles totales, proantocianidinas y ácidos fenólicos del extracto con mayor poder antimicrobiano.

1.3. Literatura citada

- Arora D.S., Kaur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents* 3:257–262.
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A., Abo-Zaid M.A.1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93: 43–54.
- Beuchat, L.R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: *Microbial Food Contamination*. Wilson CL,S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. Chap. 11: 149-169.
- Brandi G., Amagliani G., Schiavano G. F., De Santi M., and Sisti M. 2006. Activity of Brassica oleracea leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69: 2274–2279.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Che-Yi C., Mei-Chin Y. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 201-206.
- Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., Ducellier J., Duke P. A. 2003. *Handbook of medicinal species*. CRC Press LLc. New York, USA. 348 p.
- Fernandez M.A., Garcia M.D., Saenz M.T. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 26: 11–14.

- Francis G. A. and O'Beirne T. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34: 1-22.
- Friedman, M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 116–134.
- Garcia V. M. N., Rojas G., Zepeda L. G, Aviles M., Fuentes M., Herrera A., Jimenez E. 2006. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants *Pharmaceutical Biology* 44: 297-300.
- Hirunpanich V.; Utaipat A., Morales N. P., Bunyaphatsaea N., Sato H., Herunsalee A., Suthinsisang C. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus Sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat lowdensity lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 481-484.
- Ikigai H. Nakae T. Hará Y. Shimamura T. 1993. Bactericidal catechin damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1147: 132-136.
- Jeevan R. A. 2004. In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 3:353–357.
- Kang P. S., Seok J. H., Kim Y. H, Eun J. S., Oh S. H. 2007. Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation *Food Science and Biotechnology* 16: 409-414.

- Keh-sen Liu, Shyh-ming Tsao, Mei-chin Yin. 2005. In vitro Antibacterial Activity of Roselle Calyx and Protocatechuic Acid. *Phytother. Res* 19: 942–945.
- Kuete, V., Tsafack Mbaveng, A., Tsaffack, M., Penlap Beng, V., Etoa, F. X., Nkengfack, A. E. 2008. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersamaengleriana* (Melianthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 115:494–501.
- Li Thomas S. C. 2002. Chinese and related north American herbs. *Phytopharmacology and Therapeutic values*. CRS Press. New York, USA. 589p.
- Liasu, M.O. y Ayandele, A. A .2008. Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Tithonia diversifolia* and *Bryum Coronatum* Collected from Ogbomoso, Oyo State. Nigeria. *Advances in Natural and Applied Sciences* 2: 31-34.
- Metwali, M. R. 2003. Study of antimicrobial potencies of some Yemeni medicinal plants *Egyptian Journal of Microbiology* 38: 105-114.
- Muthuvelan B., Balaji R. R. 2008. Studies on the efficiency of different extraction procedures on the anti microbial activity of selected medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24:2837–2842.
- Olaleye M.T., 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1: 009-013.
- Onyenekwe P.C., Ajani E.O., Ameh D.A., Gamaniel K.S. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously

- hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function* 17: 199–206.
- Onyenekwe P.C., Ajani E.O., Ameh D.A., Gamaniel K.S. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function* 17: 199–206.
- Perumal S.R. 1999. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology* 66:235–240.
- Rios J.L., Recio M.C. 2005. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*) and *Diospyros mespiliformis* L. (*Ebenaceae*) leaf extracts on rat skeletal muscle cells. *Journal of Ethnopharmacology* 22:80–84
- Salleh M.N., Runnie I., Roach P.D., Mohamed S., Abeywardena M.Y. 2002. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3693–3697.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2008. Base de datos electrónica: www.siap.gob.mx. Consultada en el año 2010.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A, Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199–1218.
- Wong S.K., Lim Y.Y., Chan E.W.C. 2010. Evaluation of Antioxidant, Anti-tyrosinase and Antibacterial Activities of Selected *Hibiscus* Species. *Ethnobotanical Leaflets* 14: 781-96.

CAPITULO I.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE CALICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN SEROTIPOS DE *Salmonella*.

¹Morales Cabrera Mercedes, ¹Hernández Morales Javier, ²Leyva Rúelas Gabriel,
³Castro Rosas Javier, ⁴Salinas Moreno Yolanda

¹Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. ²Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. ³Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Hidalgo. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Laboratorios de Calidad.

RESUMEN

En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de cálices deshidratados de *Hibiscus sabdariffa* L., con los solventes etanólicos, metanólicos y acuosos (frío y caliente) en *S. typhimurium* (ATCC14028) y *S. choleraesuis* (ATCC10708), por el método difusión en agar, así mismo, se analizó en otras partes de la planta de jamaica como en hoja, raíz, tallo, cápsula y semillas en extractos acuosos en caliente, con plantas del genotipo de Tecoanapa. Además, se determinó la CMI y CMB por el método de dilución y se analizó la influencia del pH en la actividad antimicrobiana. Todos los extractos de los cálices mostraron actividad antimicrobiana contra *Salmonella*. El efecto antimicrobiano fue variable; los extractos de la variedad Alma blanca (cálices verdes), presentaron el mayor efecto antimicrobiano (diámetros de inhibición de 12.5 a 19.5 mm) sobre ambos serotipos de *Salmonella*. Los extractos de las estructuras (hojas, raíz, tallo, cápsula y semillas) evaluadas no mostraron ninguna respuesta antimicrobiana. La CMI fue de 6.67 mg·mL⁻¹ y la CMB de 7.7 mg·mL⁻¹ de los extractos etanólicos de Criolla de Oaxaca. El pH de los extractos influyó de manera significativa (p>0.05) en el efecto antimicrobiano.

Palabras clave: CMI, CMB, pH, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACT OF CALYCES OF ROSELLE

(*Hibiscus sabdariffa* L.) IN SEROTYPES OF *Salmonella*.

¹Morales Cabrera Mercedes, ¹Hernández Morales Javier, ²Leyva Rúelas Gabriel,
³Castro Rosas Javier, ⁴Salinas Moreno Yolanda

ABSTRACT

In this study, we evaluated the antimicrobial activity of extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces dehydrated with solvents ethanol, methanol and aqueous (cold and hot) on *S. typhimurium* (ATCC14028) and *S. choleraesuis* (ATCC10708), by the agar diffusion method, also, discussed in other parts of the plant in Jamaica and in leaf, root, stem, capsule and seeds in hot water extracts, with plants of genotype Tecoanapa. In addition, we determined the MIC and MBC for the dilution method and analyzed the influence of pH on antimicrobial activity. All extracts showed antimicrobial activity calyces against *Salmonella*. The antimicrobial effect was variable extracts the variety Alma blanca (calyx green) showed the highest antimicrobial effect (inhibition diameters of 19.5 mm de12.5) on both serotypes of *Salmonella*. Extracts of the structures (leaves, root, stem, capsule and seeds) showed no response evaluated antimicrobial. The MIC was 6.67 mg.mL⁻¹ and MBC of 7.7 mg.mL⁻¹ ethanolic extracts Criolla de Oaxaca. The pH of the extracts significantly influenced ($p > 0.05$) in the antimicrobial effect.

Keywords: MIC, MBC, pH, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*.

1. INTRODUCCIÓN

Existen reportes que más de 1340 plantas producen compuestos químicos que poseen actividad antimicrobiana. Se han descrito alrededor de 30 000 sustancias con esta propiedad, encontrándose en: flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Estos compuestos se han aislado y utilizado en diversos campos, como en la industria alimenticia (Burt, 2004).

Diversos autores (Fernández *et al.*, 1996; Aziz *et al.*, 1998; Metwali, 2003; Keh-sen *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007; Che-Yi & Mei-Chin, 2009) han evaluado el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), donde compuestos fenólicos se han relacionado como responsables de esta actividad. Por otra parte, Keh-sen *et al.* (2005) han evaluado el proceso de inhibición sobre el crecimiento de: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* entre otros. Además, Aziz *et al.* (1998) compararon la actividad antimicrobiana del ácido protocatecuico y extractos del cáliz de la jamaica, se concluyó que este ácido juega un papel importante en este proceso.

Factores como el genotipo de la planta, el ambiente, época de cosecha, el almacenamiento, procedimientos de extracción de las sustancias, ubicación geográfica y la altitud entre otros influyen en las propiedades antimicrobianas de las sustancias vegetales (Brandi *et al.*, 2006). Sin embargo, otros autores señalan que aun no está bien definida la influencia de los factores antes mencionados sobre las características antimicrobianas de los compuestos químicos de las plantas (Silva *et al.*, 2007; Proestos *et al.*, 2008).

Un aspecto importante a considerar en la extracción de las sustancias antimicrobianas de los vegetales es el tipo de solvente utilizado (Kang *et al.*, 2007). Hatil & Moneer (2006), encontraron que los extractos acuosos y etanólicos de cálices de *H. sabdariffa* L. presentaron mayor efecto antimicrobiano para la mayoría de las bacterias analizadas. Sin embargo, en ocasiones la susceptibilidad individual de cada cepa bacteriana o bien de un género o especies también influye en el efecto antimicrobiano de una planta. Hatil & Moneer (2006), observaron que los extractos metanólicos de cálices de *H. sabdariffa* L. presentaron el menor efecto antimicrobiano para la mayoría de las bacterias analizadas en comparación con el efecto observado con extractos etanólicos y acuosos; no obstante, el metanólico fue el más efectivo contra *Streptococcus pneumoniae*.

No existen reportes científicos que definan la actividad antimicrobiana de las variedades o genotipos de jamaica cultivadas en México, por tal motivo, los objetivos del presente estudio fueron: i) determinar el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de jamaica de cinco genotipos cultivados en México, sobre dos serotipos de *Salmonella* y determinar la actividad antimicrobiana así como de las estructuras de la planta del genotipo de Tecoaapa (raíz, tallo, hojas, semillas, cápsula); ii) determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del material con más efecto antimicrobiano de los genotipos con coloración roja.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Origen del material vegetal

Se obtuvieron 2 kg de cálices deshidratados de cinco genotipos de jamaica, proveniente de los estados de Guerrero (Tecoanapa), Nayarit (Huajicori), Puebla (Chiautla) y Oaxaca (Criolla de Oaxaca y Alma blanca), de la cosecha de diciembre de 2010, directamente con los productores en cada región.

2.2. Sitio experimental

Esta fase experimental consistió en obtener los extractos de los cálices de cada uno de los genotipos de jamaica y las pruebas de inhibición sobre el crecimiento de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*. Este análisis se realizó en las instalaciones de la Facultad de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hgo. Méx.

2.3. Diseño experimental y listado de tratamientos.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 21 tratamientos y cuatro repeticiones. El listado de tratamientos se detalla en el Cuatro 1.

Cuadro 1. Listado de tratamientos para el análisis de la actividad antimicrobiana

Número de tratamientos	Extractos (Genotipo – tipo de solvente)
1	Alma blanca – Etanol
2	Alma blanca – Metanol
3	Alma blanca – Acuoso en caliente
4	Alma blanca – Acuoso en frío
5	Criolla de Oaxaca – Etanol
6	Criolla de Oaxaca – Metanol
7	Criolla de Oaxaca – Acuoso en caliente
8	Criolla de Oaxaca – Acuoso en frío
9	Huajicori – Etanol
10	Huajicori – Metanol
11	Huajicori – Acuoso en caliente
12	Huajicori – Acuoso en frío
13	Chiautla– Etanol
14	Chiautla – Metanol
15	Chiautla – Acuoso en caliente
16	Chiautla – Acuoso en frío
17	Tecoanapa – Etanol
18	Tecoanapa – Metanol
19	Tecoanapa – Acuoso en caliente
20	Tecoanapa – Acuoso en frío
21	Solución salina al .85 % , ajustado a pH de 1.53

La evaluación de la influencia del pH en extractos de jamaica sobre la actividad antimicrobiana se analizó mediante un diseño experimental cuadro latino, con tres repeticiones.

2.4. Preparación de los extractos

2.4.1. Preparación de los extractos metanólicos y etanólicos

De cada genotipo, en una balanza semianalítica (AE ADAM modelo AQT-1500) se pesaron de manera aséptica 25 g de cálices secos de jamaica. Después se colocaron por separado en frascos de vidrio estériles de un 1 L de capacidad, donde a una serie de cinco frascos se agregaron 400 mL de etanol al 96 % y a otra serie de cinco se les adicionaron 400mL de metanol G. A., los frascos se cerraron herméticamente y se almacenaron en oscuridad a temperatura del laboratorio por tres días, agitando los frascos en forma manual una vez por día, para favorecer el proceso de extracción. Después de este tiempo, la fase líquida se filtró (papel Whatman No. 4) a vacío. Los extractos filtrados se concentraron en un rotaevaporador (BÜCHI Vacuum Controller modelo V-800). Para eliminar restos de los disolventes (etanol y metanol), los concentrados se colocaron en una estufa (LAB-LINE modelo AMBI-HI-LOW CHAMBER) de incubación por 24 h a $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Al final, de estos extractos se prepararon diluciones acuosas al 10 % (p/v).

2.4.2. Preparación del extracto acuoso en caliente y frío

La preparación de los extractos de cálices de jamaica, para su consumo se realiza de dos formas en general i) se someten a temperatura de ebullición y ii) sin la aplicación de calor, solo se dejan reposar en condiciones de refrigeración. Bajo estos dos esquemas se realizó este análisis, para obtener diferencias en la eficiencia de la extracción de los compuestos antimicrobianos.

Con este propósito, de cada material vegetal se pesaron asépticamente 10 g de cálices secos, y se adicionó agua destilada estéril, hasta formar una dilución 1:10

(p/v), después se sometieron a ebullición por 10 min. Para los extractos acuosos en frío se realizó el mismo procedimiento excepto la ebullición, el almacenamiento se realizó por tres días en refrigeración (4 °C).

Al final, se determinó el pH a todos los extractos obtenidos, con un potenciómetro marca Thermo electron (Modelo Orion 3-Star).

2.5. Obtención de la cepa

Se trabajó con dos cepas de *Salmonella typhimurium* (ATCC14028) y *Salmonella choleraesuis* (ATCC10708), de las colecciones de American Type Culture Collection (ATCC).

2.6. Preparación del inóculo

Para el crecimiento de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis* se inocularon mediante asadas tubos de ensaye con caldo tripticaseína de soya incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ de 18 a 24 h, hasta obtener una población de 1×10^9 UFC·mL⁻¹. A partir de esta densidad de células se preparó una dilución 1:10 (v/v) para hacer las pruebas de inhibición.

2.7. Pruebas de inhibición de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis* en presencia de los extractos de jamaica

Esta prueba consistió en inocular las cepas de *Salmonella* sp. (100 µL de una concentración 1×10^8 UFC·mL⁻¹) en placas petri con agar nutritivo con rifampicina (0.09 mg·mL⁻¹), para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Posteriormente, se agregaron 10 µL de cada uno de los extractos vegetales (tratamientos), incluyendo el testigo (Cuadro 1). Para cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones. Después de dejar reposar los cultivos por 30 min a

temperatura ambiente del laboratorio, para permitir la absorción de los extractos en el agar, estos se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 h. al final se midió el diámetro de cada uno de los halos de inhibición en las placas.

2.8. Pruebas de inhibición de *S. typhimurium* en otras partes de la planta de jamaica

Los extractos acuosos en caliente de hojas, raíz, tallo, cápsula y semilla (enteras y molidas con un mortero), se prepararon de la misma manera que los cálices de jamaica (1:10 p/v).

2.9. Influencia del pH de los extractos del genotipo de Criolla de Oaxaca sobre la actividad antimicrobiana

Por facilidad de manejo, se trabajó con un extracto acuoso en caliente de Criolla de Oaxaca. Se colocaron en tubos de ensaye 5 mL del extracto, se varió el pH (1.98, 3, 4, 5, 6, 7) con NaOH al 10 %. Se inocularon con la cepa *S. typhimurium* (50 μL de una concentración $1 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), se agitaron por 10 s, después se tomó 1 mL (extracto + inóculo) al $t = 0$ y al $t = 30$ min (Cuadro 2), se cultivó por el método vertido en placa, las placas se incubaron a $35^\circ\text{C} \pm 1$ durante 48 h, al final se realizó un conteo; como testigo se usó solución salina a 0.85 % con la misma variación del pH de los extractos, el cual se ajustó con HCl al 10 %. Se realizaron por triplicado.

2.10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca.

La CMI y CMB se determinaron por el método de dilución (NCCLS, 2002), se usaron tubos con caldo tripticaseína de soya, como medio base, más el extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca que tuvo mayor efecto antimicrobiano ante las cepas analizadas y con mayor demanda en el mercado. Al medio base se agregó el extracto etanólico de la siguiente manera: 1:50, 1:100; 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450, 1:500, 1:550, 1:600, 1:650, 1:700, 1:1750, 1:800, 1:850, 1:900, 1:950 y 1:1000 v/v, las diluciones se prepararon por cuadruplicado y la densidad de inóculo de *S. typhimurium* fue de 10 µL de 1×10^5 UFC·mL⁻¹, para todas las diluciones, se incubaron los cultivos a 35 °C ± 1 por 48 h. El crecimiento bacteriano se determinó de manera visual a contra luz comparando la turbidez con los siguientes testigos i) caldo de tripticaseína de soya inoculado con *S. typhimurium* y ii) caldo de tripticaseína de soya más el extracto sin bacterias. Con el ensayo anterior, se encontró que la CMI y la CMB estaban dentro del rango de 1:100 a 1:150, por este razón, se prepararon nuevas diluciones con el propósito de definir con mayor exactitud los valores de CMI y CMB. Las diluciones fueron 1:100, 1:110, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150 v/v y se incubaron a las mismas condiciones. Enseguida, por cada dilución se prepararon cuatro placas petri con agar nutritivo (Bioxion) que fueron inoculadas con 1 mL de la dilución correspondiente y se incubaron a 35 °C ± 1, por 48 h. Para definir el

valor CMB se consideró aquella dilución donde no se presentó crecimiento y para la CMI se utilizó la inmediata menos concentrada.

2.11. Análisis de resultados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un experimento completamente al azar con todos los datos obtenidos, con una comparación de medias correspondiente a cada ANOVA por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SAS system, versión 9.0 (SAS Institute, 2005).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. pH de los extractos

Los valores de pH de los extractos de cálices de jamaica se encontraron en un rango de 1,53 a 2,38 como se muestra en el Cuadro 3. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0,05$) entre los genotipos evaluados, los extractos etanólicos y metanólicos de la variedad Alma blanca resultaron tener los valores más bajos en comparación con los otros genotipos.

El pH de los extractos acuosos de jamaica fueron inferiores a lo reportado por Fasoyiro *et al.* (2005) y Prenesti *et al.* (2007), donde obtuvieron valores de pH superiores a 2,7 y 3,1 respectivamente, trabajando con la misma planta y solvente. Pero el pH de los extractos acuosos del genotipo de Chiauatla fueron similares con lo obtenido Ramirez-Rodrigues *et al.* (2011) tuvieron pH de 2,31 a 2,37.

Cuadro 2. Variación del pH de los cinco genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en los diferentes extractos.

Genotipos	Extractos (1:10 p/v).			
	Et	Mt	Acc	Acf
[¶] Alma blanca	1.53 f*	1.67 d,e,f	2.36 a	2.38 a
[¶] Criolla de Oaxaca	1.88 c,d	1.79 d,e	2.02 b,c	2.21 a,b
[¥] Huajicori	1.75 d,e,f	1.88 c,d	2.23 a,b	2.24 a,b
[§] Chiautla	1.63 e,f	1.81 c,d,e	2.31 a	2.35 a
[†] Tecoanapa	1.67 d,e,f	1.76 d,e	2.24 a,b	2.30 a
CV				4.37
DMS				0.23

*Medias con distinta letra entre columnas y filas son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$); CV: coeficiente de variación; DMS: diferencia mínima significativa; [¶] Provenientes de Oaxaca; [¥] Nayarit; [§]Puebla; [†]Guerrero; Et: extracto etanólico; Mt: metanólico; Acc; acuoso en caliente; Acf: acuoso en frío.

El pH es un factor fundamental en los extractos de plantas, debido a que puede afectar de manera directa la actividad antimicrobiana de estas (Brandi *et al.*, 2006). Abu-Tarboush (1994), concluyó que el grado de inhibición que presentan los extractos de jamaica se debe principalmente a su bajo pH, además de otros compuestos inhibidores presentes, pero aun no se han confirmado con claridad. Sin embargo la presencia de estos inhibidores puede ser afectada por el pH. Un ejemplo, es el caso de las antocianinas, estas son estables a pH inferior a 3 (Brouillard, 1982). Por otro lado, la gran mayoría de los microorganismos utilizados para la búsqueda de plantas con propiedades antimicrobianas no soportan pH

menores a 3; en el caso de *Salmonella* el intervalo de pH para su crecimiento se encuentra entre 4,1 y 9,0 (Francis & O'Beirne, 1999; Cheng-Hsun *et al.*, 2002).

3.2. Pruebas de inhibición de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis* en presencia de los extractos de jamaica

Se comprobó que los extractos de cálices de jamaica poseen actividad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*. El grado de inhibición es variable, dependiendo del genotipo de la planta, como se muestra en el Cuadro 3 y 4, donde el análisis estadístico indica diferencias significativas ($\alpha=0,05$). Dentro de los genotipos que se evaluaron, la variedad Alma blanca, mostró mayor grado de inhibición sobre *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*, este genotipo presenta cálices verdes, en contraste con los genotipos Criolla de Oaxaca, Huajicori, Chiautla y Tecoanapa, cuyos cálices son rojos.

En general, se han realizado diversos trabajos en el mundo sobre la actividad antimicrobiana en plantas, principalmente aquellas que se han utilizado con propiedades medicinales (Arora & Kaur, 1999; Jeevan, 2004; Liasu & Ayandele, 2008; Olaleye, 2007; Rios & Recio, 2005; Tajkarimi *et al.*, 2010). Específicamente sobre jamaica, algunos trabajos reportan que posee diversas sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de microorganismos (Che-Yi & Mei-Chin, 2009; Garcia *et al.*, 2006; Hatil & Moneer, 2006; Kang *et al.*, 2007; Keh-sen *et al.*, 2005; Metwali, 2003; Olaleye, 2007; Wong *et al.*, 2010). Sin embargo, es complicado realizar comparaciones entre los resultados obtenidos ya que las metodologías, tipo de solventes y microorganismos varían en cada trabajo, pero sí

hay coincidencias, debido a que varios autores concluyen que los cálices de jamaica tienen acción antimicrobiana, por ejemplo, Metwali (2003) hizo estudios sobre actividad antimicrobiana por el método de dilución, con 20 especies diferentes de plantas, entre ellas la jamaica contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* y encontró que los extractos de cálices jamaica mostraron mayor inhibición en *S. aureus* y *E. coli*. Así mismo, otros autores han tenido similares resultados con *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis*, entre otros (Keh-sen *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana de los extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con *S. tiphymurium*.

Genotipos	Diámetro de los halos de inhibición (mm)							
	Et		Mt		Acc		Acf	
Alma blanca	19.5	a*	12.7	b	12.5	b	--	
Criolla de Oaxaca	11.0	c,b	8.0	c,d,e	8.2	c,d,e	7.0	e,f
Huajicori	10.5	c,b,d	8.5	c,d,e	7.5	d,e,f	4.5	f,g
Chiautla	8.7	c,d,e	8.5	c,d,e	4.5	f,g	0.7	h
Tecoanapa	8.2	c,d,e	7.7	c,d,e,f	2.7	g,h	1.5	g,h
Testigo	--		--		--		--	--
CV							18.24	
DMS							3.69	

*Medias con distinta letra entre columnas y filas son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0,05$); CV: coeficiente de variación; DMS: diferencia mínima significativa; Et: extracto etanólico; Mt: metanólico; Acc; acuoso en caliente; Acf: acuoso en frío).

Se ha comprobado que existe variabilidad en el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas según el tipo de solvente utilizado (metanol, etanol, hexano, acetona, agua, cloroformo, etc.), ya que estos presentan diferentes polaridades que influyen en la eficiencia de extracción de sustancias con propiedades antimicrobianas (Muthuvelan & Balaji, 2008). Este mismo comportamiento se encontró en el presente trabajo, donde se observaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0,05$) según el tipo de solvente utilizado en la obtención de los extractos de los cálices de jamaica. Los extractos obtenidos con etanol mostraron mayor actividad antimicrobiana en las cepas de *Salmonella*, independientemente del genotipo de jamaica. El diámetro de los halos de inhibición de estos extractos fueron 35 % superiores a los halos de inhibición producidos por los extractos metanólicos y 65 % más a los obtenidos por extractos acuosos en frío, cuando se evaluaron con *S. typhimurium*. Este comportamiento fue semejante cuando se utilizó como microorganismo prueba a *S. choleraesuis* (Cuadro 4). Resultados similares fueron reportados en otros trabajos (Parekh & Chanda, 2007; Packia & Shenbagaraman, 2011), donde concluyeron que los solventes etanol y metanol resultaron ser más eficientes para la extracción de compuestos antimicrobianos en comparación con los acuosos. También Hatil & Moneer (2006), cuando evaluaron tres especies de plantas entre ellas cálices de jamaica, con los mismos solventes utilizados en esta investigación, también encontraron que el mejor solvente fue el etanol, seguido por el acuoso, empleando como microorganismos prueba a *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Por su parte Wong *et al.* (2010) reportaron halos de inhibición con un diámetro de 8 mm en

extractos de jamaica preparados con metanol sobre *S. choleraesuis*, este resultado es inferior a los que se enlistan en el Cuadro 5, para este mismo solvente y microorganismo.

Cuadro 4. Actividad antimicrobiana de los genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con los diferentes extractos con *S. choleraesuis*.

Genotipos	Diámetro de los halos de inhibición (mm)								
	Et		Mt		Acc		Acf		
Alma blanca	15.2	b*	18.7	a	12.5	b,c	--		
Criolla de Oaxaca	13.0	b, c	10.2	c,d	6.7	e f,g,h	5.0	h,i	
Huajicori	13.0	b, c	8.7	d,e,f	5.5	f,g,h,i	5.2	g,h,i	
Chiautla	9.7	c,d,e	8.5	d,e,f,g	4.2	h,i	0.7	J	
Tecoanapa	9.0	d,e	9.0	d,e	3.2	i,j	3.2	i,j	
Testigo	--		--		--		--		
CV								15.33	
DMS								3.26	

*Medias con distinta letra entre columnas y filas son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$);

CV: coeficiente de variación; DMS: diferencia mínima significativa; Et: extracto etanólico (temperatura ambiente); Mt: metanólico (temperatura ambiente); Acc; acuoso en caliente (temperatura de ebullición); Acf: acuoso en frío (temperatura de refrigeración 4 ± 1 °C).

Los microorganismos presentan diferente sensibilidad a los compuestos antimicrobianos. En este experimento se presentaron diferencias en cuanto a la sensibilidad a los extractos de jamaica entre *S. tiphymurium* y *S. choleraesuis*, en

esta última, el tamaño de los diámetros de inhibición fue mayor y más evidente cuando se probaron con extractos etanólicos (Cruadro 3 y 4), resultados similares se han encontrado en extractos de otras plantas para inhibir el crecimiento de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*, entre las que se mencionan están: *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina*, *Zingiber officinale*, *Myristica fragrans*, *Thymus vulgaris* entre otras (Babayi *et al.*, 2004; Mahida & Mohan, 2007; Sung-Youn *et al.*, 2011).

3.3. Pruebas de inhibición de *S. typhimurium* con otras partes de la planta de jamaica

De acuerdo con Burt, (2004) se conocen más de 1340 plantas con compuestos antimicrobianos, mismos que pueden encontrarse en diferentes partes de las plantas como son cálices (Olaleye, 2007) en jamaica, flores, tallo (Omonkhelin, *et al.*, 2007) en *Kigelia africana*, semillas, hojas, frutos y raíces (Ceylan and Fung, 2004; Holley *et al.*, 2005; Tajkarimi *et al.*, 2010). En jamaica, se ha encontrado actividad antimicrobiana en los cálices, con diferentes tipos de solventes. Sin embargo, en el presente trabajo, en el análisis realizado con raíz, tallo, hojas, semillas (enteros y molidas) y cápsula del genotipo de Tecoaapa en extractos acuosos en caliente, no se observó actividad antimicrobiana, ya que no hubo formación de halos de inhibición.

3.4. Influencia del pH de los extractos acuosos del genotipo Criolla de Oaxaca sobre la actividad antimicrobiana

El estudio tuvo la finalidad de conocer si la actividad antimicrobiana se debe a posibles sustancias presentes en los cálices, o al bajo pH, ya que es una característica de los extractos de la jamaica. *Salmonella* sp. no soporta pH menores de 4 (Francis y O'Beirne, 1999); sin embargo, en el presente estudio realizado en el genotipo Criolla de Oaxaca, hubo desarrollo de la bacteria con los extractos acuosos en caliente con un de pH 3; no así con los extractos de un pH de 1.98 y en el testigo, transcurridas 48 h de incubación, al tiempo de exposición 0 min y 30 min. A pH 3 y tiempo de exposición de 0 min, no se observó desarrollo bacteriano a las 24 h, por lo tanto, al transcurrir las 48 h se realizó el conteo; en el extracto fue de 438 UFC·mL⁻¹ y en el testigo de 1174 UFC·mL⁻¹; se mostró inhibición en el extracto, puesto que las colonias fueron más pequeñas en comparación con el testigo. Al tiempo 30 min, en el extracto resultaron 325 UFC·mL⁻¹ y en el testigo 582 UFC·mL⁻¹ se observó mayor inhibición en el extracto. Al hacer un análisis estadístico con los datos, se obtuvo una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el testigo y el extracto. Cabe mencionar que a pH de 4, 5, 6, 7 no se encontró diferencia significativa, aún así se observaron valores menores que el testigo. El extracto mostró actividad antimicrobiana, sin embargo, depende del pH (Abu-Tarboush, 1994; Kasetsart, 2000; Lis-Balchin *et al.*, 2003).

3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca.

La CMI se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento de un microorganismo después de un periodo de incubación, generalmente es de 16 a 24 h; sin embargo, cuando se manejan microorganismos patógenos se recomiendan periodos de incubación más largos (NCCLS, 2002; Davidson *et al.*, 2005;). La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que elimina a más del 99.9 % de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (24 horas), también conocida como la concentración mínima letal (CML) (Isenberg, 1999; NCCLS, 2002).

Para el análisis de la CMI y la CMB se utilizó el extracto etanólico del genotipo Criolla de Oaxaca, aunque no fue el genotipo con mayor actividad antimicrobiana, pero si el segundo. La razón por la cual se eligió, es por la demanda que tiene en el mercado, ya que se prefieren genotipos con cálices de color rojo. En el presente estudio los resultados obtenidos de la CMI resultó de $6.57 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la CMB fue de $7.70 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ evaluados con *S. typhimurium*, estos valores no coinciden con otros autores, tal es caso de Chomnawang *et al.* (2005) mencionan valores de la CMI de 2.5 y $0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* respectivamente, para la CMB obtuvieron de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en extractos de jamaica de Tailandia. Los resultado obtenidos por Olaleye (2007) se encuentran en un rango de 0.3 ± 0.2 a $1.3 \pm 0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la CMI, con extractos

metanol-agua (4:1) de jamaica sobre *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogens*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* spp. fluorescentes. La variabilidad en los resultados, se puede atribuir a los diferentes microorganismos, los tipos de solventes, además de la metodología de extracción. Sin embargo, los estudios coinciden que los cálices de jamaica tienen capacidad antimicrobiana ante varios microorganismos.

4. CONCLUSIONES

Los extractos de los cálices de jamaica inhibieron el crecimiento de *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*, la respuesta a la inhibición fue diferente en función del genotipo de la planta, pH, tipo de solvente utilizado, para la extracción. En cuanto al genotipo, los extractos obtenidos de la variedad Alma blanca inhibieron en mayor medida el crecimiento de las cepas de *Salmonella*. En contraste, los extractos acuosos en frío provenientes del genotipo de Chiautla mostraron menor grado de inhibición en las cepas evaluadas. Por otra parte, los extractos etanólicos tuvieron el mayor efecto antimicrobiano. Finalmente, *S. choleraesuis* tuvo mayor sensibilidad que extractos que *S. typhimurium* con los extractos evaluados. Las otras partes de la planta evaluada (raíz, tallo, hojas, semilla, cápsulas) no presentaron actividad antimicrobiana en extractos acuosos en caliente.

5. LITERATURA CITADA

Abu-Tarboush H. M. 1994. Antibacterial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and its relation to pH. Egyptian Journal of Food Science 22: 317 – 322.

- Arora D.S. y Kaur J.1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agentes 3:257–262.
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A., Abo-Zaid M.A.1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios 93: 43–54.
- Brandi G., Amagliani G., Schiavano G. F., De Santi M., and Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. Journal of Food Protection 69: 2274–2279.
- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In: Anthocyanins as food colors (pp. 1–38). P. Markakis (Ed.), New York: Academic Press.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.
- Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. 2004. Antimicrobial activity of spices. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 12: 1–55.
- Cheng-Hsun C., Tsu-Lan W., Lin-Hui S., Chishih C., Ju-Hsin C., An-Jing K., Maw-Sheng C., Tzou-Yien L.2002. The Emergence in Taiwan of Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype *Choleraesuis*. The New England Journal of Medicine 346:413-419.
- Che-Yi C., and Mei-Chin Y. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. Foodborne Pathogens and Disease 6: 201-206
- Chomnawang M. T., Surassmo S., Nukoolkarn V. S., Gritsanapan W.2005. Antibacterial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. Journal of Ethnopharmacology 101:330-333.

- Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. 2005. Antimicrobials in food. 3ra. ed. CRC Press Taylor & Francis Group. New York. Pp. 660-677.
- Fasoyiro S.B., Babalola S.O., and Owoyibo T. 2005. Chemical composition and sensory quality of fruit-flavoured roselle (*Hibiscus sabdariffa*) drinks. World Journal of Agricultural Sciences 1: 161-164
- Fernández M.A., Garcia M.D., Saenz M.T. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. Journal of Ethnopharmacology 26: 11–14.
- Francis G. A. and O'Beirne T. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science and Technology 34: 1-22.
- Garcia V. M. N., Rojas G., Zepeda L. G, Aviles M., Fuentes M., Herrera A., Jimenez E. 2006. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants Pharmaceutical Biology 44: 297-300.
- Hatil H. E. and Moneer F. M. 2006. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaerococcus suaveolens* var. *suaveolens* against upper respiratory tract pathogens Sudan Journal of Medical Science 1:121-126.
- Holley, R. A., & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, 22: 273–292.
- Isenberg D. H. 1999. Tests To Assess Bactericidal Activity. Antimicrobial Susceptibility Testing Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington; 5: 1-14.

- Jeevan R. A. 2004. In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 3:353–357.
- Kang P. S., Seok J. H., Kim Y. H, Eun J. S., Oh S. H. 2007. Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation *Food Science and Biotechnology* 16: 409-414.
- Keh-sen L., Shyh-ming T., Mei-chin Y. 2005. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research*, 19, 942–945.
- Liasu, M.O. & Ayandele, A. A. 2008. Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Tithonia diversifolia* and *Bryum Coronatum* Collected from Ogbomoso, Oyo State. Nigeria. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2, 31-34
- Lis-Balchin M., Steyrl H., Krenn E. 2003. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. *Phytotherapy Research* 17:60–65.
- Mahida, Y., and Mohán, J. S. S. 2007. Screening of plants for their potential antibacterial activity against *Staphylococcus* and *Salmonella* spp. *Natural Product Radiance*, 6, 301-305
- Metwali, M. R. 2003. Study of antimicrobial potencies of some Yemeni medicinal plants *Egyptian Journal of Microbiology* 38: 105-114.

- Muthuvelan B. y Balaji R. 2008. Studies on the efficiency of different extraction procedures on the anti microbial activity of selected medicinal plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2837–2842.
- NCCLS. 2002. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne,PA.
- Olaleye M.T., 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1: 009-013.
- Omonkhelin, J.O., K.I.O. Eric and O. Osohon, 2007. Antifungal and antibacterial Activities of the ethanolic and aqueous extract of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) stem bark, *African Journal of Biotechnology*, 6: 1677-1680.
- Packia, J. S. J. and Shenbagaraman, S. 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the selected green leafy vegetables. *International Journal of PharmTech Research*, 3, 148-152.
- Parekh, J. and Chanda, S. V. 2007. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turkish Journal of. Biology*, 31, 53-58.
- Prenesti E., Berto S., Daniele P.G., Toso S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* 100: 433–38

- Proestos C., Boziaris I., Kapsokefalou S. M., & Komaitis M. 2008. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology* 46: 151–156.
- Ramirez-Rodrigues M. M., Plaza M. L., Azeredo A., Balaban M. O., Marshall M. R. 2011. Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science* 76:428-435.
- Rios J.L. y Recio M.C.2005. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells. *Journal of Ethnopharmacology* 22:80–84
- SAS. 2005. Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, versión 9.1. Carey, N.C.
- Silva F. G., Oliveira C. B. A., Pinto J. E. B. P., Nascimento V. E., Santos S. C., Seraphin J. C.2007. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 18: 990–997.
- Sung-Youn, K., Dong-Hyun, K., Jin-Ki, K., Yong-Geun, H., Hwang, J. Y., Taewan, K., & Seon-Ho, L. (2011). Antimicrobial Activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science*, 76, 41-46.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A, Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199–1218

Wong S.K., Lim Y.Y., Chan E.W.C. 2010. Evaluation of Antioxidant, Anti-tyrosinase and Antibacterial Activities of Selected *Hibiscus* Species. Ethnobotanical Leaflets 14: 781-96.

CAPITULO II.

CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.).

¹Morales Cabrera Mercedes, ¹Hernández Morales Javier, ²Leyva Rúelas Gabriel,
³Castro Rosas Javier, ⁴Salinas Moreno Yolanda

¹Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. ²Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. ³Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Hidalgo. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Laboratorios de Calidad.

RESUMEN

En la actualidad, diversos trabajos se han realizado sobre la caracterización fenólica en extractos de jamaica, sin embargo, en este estudio se buscó la relación de los polifenoles con la actividad antimicrobiana que presentaron los cinco genotipos de *Hibiscus sabdariffa* L. Se determinó contenido de antocianinas, fenoles solubles totales, proantocianidinas y ácidos fenólicos por HPLC en extractos etanólicos, así como acidez titulable y °Brix. El genotipo Criolla de Oaxaca mostró el mayor contenido de fenoles totales solubles, así como de proantocianidinas. Mientras que la variedad Alma blanca mostró valores menores; resultados similares se obtuvieron con el contenido de antocianinas ya que con Alma blanca se obtuvo un valor muy bajo (15.6 mg/kg) en tanto el genotipo Criolla de Oaxaca se obtuvo el valor más alto (1499.3 mg/kg). Sin embargo, con porcentaje de acidez titulable sucedió lo contrario. Cabe mencionar, que los genotipos antes mencionados presentaron mayor efecto antimicrobiano. El ácido fenólico de mayor abundancia fue el clorogénico, encontrándose en un rango de 593.9 a 1500.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Las cantidades de ácido protocatecuico fueron pequeñas en la variedad Alma Blanca (86.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y en el genotipo Chiautla (81.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en comparación con las obtenidas con los genotipos Huajicori (139.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Tecoaapa (135.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Palabras clave: Antocianinas, Proantocianidinas, Ácidos fenólicos, HPLC.

PHENOLIC CHARACTERIZATION OF ETHANOL EXTRACTS OF ROSELLE

(*Hibiscus sabdariffa* L.)

¹Morales Cabrera Mercedes, ¹Hernández Morales Javier, ²Leyva Rúelas Gabriel,
³Castro Rosas Javier, ⁴Salinas Moreno Yolanda

ABSTRACT

Actually, several studies have been conducted on the characterization of phenolic extracts, however, this study sought the relationship of polyphenols with antimicrobial activity that had the five genotypes of *Hibiscus sabdariffa* L. Anthocyanin content was determined, total soluble phenolics, proanthocyanidins and phenolic acids in ethanolic extracts by HPLC and titratable acidity and ° Brix. Criolla de Oaxaca genotype showed the highest content of total soluble phenolics and proanthocyanidins. While the variety Alma blanca showed lower values, similar results were obtained with anthocyanins and Alma blanca that was a very low value (15.6 mg / kg) in both genotype Criolla de Oaxaca highest value obtained (1499.3 mg / kg). However, titratable acidity percentage opposite happened. It is worth mentioning that the aforementioned genotypes showed higher antimicrobial effect. The most abundant phenolic acid was chlorogenic, being in a range of 593.9 to 1500.5 µg.g⁻¹. The amounts were small protocatechuic acid in the variety Alma blanca (86.2 µg.g⁻¹) and Chiautla genotype (81.0 µg.g⁻¹) compared with those obtained with Huajicori genotypes (139.7 µg.g⁻¹) and Tecoanapa (135.1 µg.g⁻¹).

Keywords: Anthocyanins, proanthocyanidins, phenolic acids, HPLC.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen diversos compuestos químicos con capacidad antimicrobiana (Tajkarimi *et al.*, 2010), principalmente polifenoles (Nychas, 2003). Los compuestos fenólicos se agrupan en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Dentro de los flavonoides se encuentran las antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles (Luthria, 2006). Se han identificado más de 8000 fitoquímicos fenólicos con una diversidad estructural y polaridad de origen vegetal (Luthria, 2006), conocidos como potentes antioxidantes, antimicrobianos y defensores naturales contra patógenos de las plantas (Nychas, 2003; Prenesti *et al.*, 2007).

Algunos compuestos fenólicos se han identificado con propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, los ácidos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico, *p*-coumárico, ferúlico, ácido protocatecuico que inhiben *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* por lo que pueden retardar la invasión microbiana, además, la putrefacción de frutas y vegetales (Beuchat, 2001). También se han reportado con propiedades antimicrobianas los flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005) y proantocianidinas como catequinas, epicatequinas (Ikigai *et al.*, 1993; Friedman, 2007; Kuete *et al.* 2008). Los cálices de jamaica contienen diversos compuestos fenólicos que han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes (Wang *et al.*, 2000), medicinales (Hou *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006) y la actividad antimicrobiana. La evaluación de estas propiedades se han hecho con extractos con el uso de diferentes solventes, como metanol, etanol y acuoso (Olaleye 2007; Che-Yi y Mei-Chin, 2009). La actividad antimicrobiana de los cálices de jamaica se atribuye a polifenoles tipo antocianinas (Fernández *et al.* 1996; Kang, *et al.*,

2007). También, el ácido protocatecuico puede contribuir a dicha actividad (Aziz *et al.*, 1998). Existen investigaciones sobre la caracterización fenólica de jamaica para analizar contenido de antocianinas, fenoles solubles totales y ácidos fenólicos, con diferentes propósitos, la mayoría con extractos acuosos (Prenesti *et al.*, 2005; Juliani *et al.*, 2009; Fernández-Arroyo *et al.*, 2011). Sin embargo, el presente trabajo se realizó con extractos etanólicos de cálices de jamaica. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización fenólica de los extractos con mayor actividad antimicrobiana de cinco genotipos de jamaica: antocianinas totales, fenoles solubles totales, ácidos fenólicos por HPLC y proantocianidinas para conocer si existe relación de estos compuestos con las propiedades antimicrobianas, además, la acidez titulable, cuantificación de sólidos recuperados y sólidos solubles totales (°Brix).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se obtuvieron 2 kg de cálices deshidratados de cinco genotipos de jamaica, proveniente de los estados de Guerrero (Tecoanapa), Nayarit (Huajicori), Puebla (Chiautla), Oaxaca (Criolla de Oaxaca y Alma blanca) de la cosecha 2010, directamente con los productores de cada región.

2.2. Sitio experimental

La caracterización fenólica del extracto etanólico se realizó en el Laboratorio de calidad de cultivos del Campo Experimental “Valle del México”, que pertenece al

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de Méx..

2.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 tratamientos y cuatro repeticiones en todas las variables analizadas.

2.4. Preparación de los extractos etanólicos y cuantificación de sólidos recuperados

De cada genotipo, se pesaron 12 g de cálices secos de jamaica, y después se colocaron por separado en matraces de 500 mL de capacidad, donde a una serie de cinco matraces se agregaron 200 mL de etanol al 96 %, los matraces se cerraron herméticamente y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente por tres días. Los matraces se agitaron de manera manual una vez por día, para favorecer el proceso de extracción. Después de este tiempo, la fase líquida se filtró (papel Whatman No. 4) a vacío. Los extractos filtrados se concentraron en un rotaevaporador (marca Heidolph instruments, modelo Laborata 4010 digital). Para eliminar restos del disolvente (etanol) los concentrados se colocaron en una estufa de incubación por 24 h a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Después se colocaron en un desecador, y se pesaron (extracto + matraz); en seguida se resuspendió el sólido en 10 mL de agua grado HPLC, pasándolos a matraces aforados. Posteriormente el matraz donde se encontraba el extracto se lavó, y se colocó en la estufa a 130°C durante 1 h, para obtener su peso

constante. El peso contaste del matraz se restó al peso del extracto + matraz para obtener finalmente la cantidad de sólidos obtenidos de cada genotipo.

2.5. Sólidos solubles totales (°Brix)

Los sólidos solubles totales, se determinaron a partir de los 10 mL de los extractos etanólicos aforados, con dos diluciones (1:10 y 1:25 v/v). Con la dilución de 1:25 v/v se determinó el porcentaje de °Brix con un refractómetro (ATAGO, modelo N1). El análisis se realizó por cuadruplicado.

2.6. Acidez titulable

La determinación de la acidez titulable se realizó de acuerdo a la AOAC (1984), preparando las muestras según las indicaciones para soluciones ligeramente coloreadas. Este análisis se hizo a partir de la dilución (1:25 v/v) utilizada para la cuantificación de °Brix. La titulación se llevó a cabo con NaOH 0.0974 N usando el pH de vire de la fenolftaleína (8.3 - 8.6) como punto final de la titulación. El cálculo se expresó como porcentaje del ácido cítrico. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

2.7. Cuantificación de antocianinas

Se midió la absorbancia con el uso de un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis de los extractos etanólicos con una dilución 1:100 (v/v), previamente centrifugado a 4000 rpm durante 5 min. La absorbancia de la muestra se obtuvo a una longitud de onda de 530 nm, de acuerdo con lo descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Los datos se expresaron en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, para la calibración del equipo se utilizó como blanco agua destilada. Los análisis se realizaron por cuadruplicado.

2.8. Cuantificación de fenoles solubles totales

Se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Singleton y Rossi (1965); se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis del extracto etanólico a una longitud de onda de 760 nm. En este caso, se requirió realizar una dilución 1:200 (v/v) para obtener valores de absorbancia menores de 0.8. El contenido de fenoles solubles totales se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ácido gálico. Los análisis se realizaron por cuadruplicado.

2.9. Cuantificación de proantocianidinas

La extracción se realizó a partir de una muestra molida, usando un molino marca IKA modelo MF 10, equipado con una malla de 0.5 mm. Se pesaron 500 mg de muestra en peso seco y se le agregaron 20 mL de acetona: agua desionizada: ácido acético (75:24.5:0.5 v: v: v), se zonificó durante 30 min, después se agitó durante 1 h, en seguida se centrifugó a 4000 rpm por 12 min, por último se filtró y se aforó nuevamente a 20 mL. El análisis se realizó según lo descrito por Wallace y Giusti, (2010). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis a 640 nm. Para la cuantificación se elaboró una curva patrón a partir de catequina y los resultados se expresaron en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de muestra seca.

2.10. Análisis de ácidos fenólicos por HPLC

De cada genotipo, se pesaron 3.125 g de cálices secos de jamaica, y después se colocaron por separado en matraces de 150 mL de capacidad, donde a una serie de cinco matraces se agregaron 150 mL de etanol al 96 %, los matraces se

cerraron herméticamente y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente por tres días. Los matraces se agitaron de manera manual una vez por día, para favorecer el proceso de extracción. Después de este tiempo, la fase líquida se filtró (papel Whatman No. 4) a vacío. Los extractos filtrados se concentraron en un rotaevaporador (Heidolph instruments, modelo Laborata 4010 digital) hasta obtener 5 mL, este se aforó a un volumen final de 20 mL con agua destilada, y en seguida se procedió a realizar la extracción de las fracciones de ácidos fenólicos libres, glucosilados y esterificados, se utilizó el método de Bakan *et al.* (2003), partiendo del extracto etanólico. El análisis cromatográfico de las tres fracciones de ácidos fenólicos se hizo por el método descrito por Glowniak *et al.* (1996), con un cromatógrafo Perkin-Elmer serie 200, con una bomba cuaternaria con degasificador, un detector de UV/Vis con arreglo de diodos y un automuestreador. Se usó una columna analítica Hypersil ODS.2 (250 x 46 mm) con tamaño de partícula de 5 μm . Como fase móvil se empleó una mezcla de metanol: ácido acético: agua (25:1:75 v: v: v) a un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El tiempo de corrida fue de 22 min. La detección de ácidos fenólicos se realizó a 254 y 320 nm, manteniendo la columna a 30 °C. Se prepararon curvas patrón de los ácidos: caféico, clorogénico, ferúlico, gálico, protocatecuico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico, salicílico, siríngico y vanílico (Sigma, St. Louis, MO), se usó como disolvente la solución de fase móvil.

2.11. Análisis de resultados

Con los datos obtenidos en la caracterización fenólica se hizo un análisis de varianza (ANOVA), bajo un diseño experimental completamente al azar, con una

comparación de medias correspondiente a cada ANOVA por el método de Tukey ($\alpha=0.05$), con el paquete estadístico SAS system, versión 9.1 (SAS Institute, 2005).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Sólidos recuperados en los extractos etanólicos.

Los sólidos recuperados, después de la extracción durante 3 días en etanol variaron entre 2.64 y 4.26 g. Los genotipos Chiautla y Alma Blanca fueron los que presentaron los valores más bajos resultando estadísticamente iguales ($\alpha=0.5$), en tanto que el mayor correspondió al genotipo Criolla de Oaxaca, con mejor rendimiento en la extracción con el disolvente etanol (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sólidos recuperados en el extracto etanólico en genotipos de los cálices de jamaica.

Genotipos	Sólidos recuperados en los extractos etanólicos (g) a partir de 12 g en peso seco de cálices de jamaica
Criolla de Oaxaca	4.26 a
Huajicori	3.55 a,b
Tecoanapa	3.02 b,c
Alma blanca	2.89 b, c*
Chiautla	2.64 c
CV	5.29
DMS	0.77

*Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p\leq 0.05$); CV: coeficiente de variación; DMS: diferencia mínima significativa.

3.2. Acidez titulable y sólidos solubles totales (°Brix).

La acidez puede contribuir al efecto bacteriostático (Prenesti *et al.*, 2007), por consiguiente se determinó en extractos etanólicos de los 5 genotipos, donde resultó con mayor porcentaje de acidez el genotipo Criolla de Oaxaca, seguida de Tecoanapa y Huajicori, los valores más bajos son Chiautla y Alma blanca que fueron estadísticamente iguales (Cuadro 2).

Cuadro 2. °Brix y acidez titulable en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L).

Genotipo	°Brix (%)	Acidez titulable (%)
[¶] Alma blanca	1.97 d*	6.46 c*
[¶] Criolla de Oaxaca	3.05 a	10.62 a
[¥] Huajicori	2.82 b	7.39 b
[§] Chiautla	2.02 d	6.33 c
[†] Tecoanapa	2.45 c	7.89 b
CV	2.69	3.05
DMS	0.15	0.53

*Medias con distinta letra entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$); CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa; [¶] Provenientes de Oaxaca; [¥] Nayarit; [§] Puebla; [†] Guerrero

La acidez de los extractos se relaciona con la cantidad de ácidos que se encuentran en estos, en los cálices de jamaica reportan como ácidos principales al oxálico y el succínico (Fasoyiro *et al.*, 2005), además pueden encontrarse el cítrico, ascórbico, málico y esteárico (Hirunpanich *et al.*, 2005).

Los sólidos solubles totales en los extractos etanólicos variaron en un rango de 1.97 a 3.05 °Brix, el más alto correspondió al genotipo de Criolla de Oaxaca y el bajo es Alma blanca (Cuadro 2). Los resultados mostraron una relación directa con los valores de los sólidos recuperados (Cuadro 1).

Las variables evaluadas en este trabajo se basaron en extractos etanólicos, la comparación de los resultados obtenidos con otros trabajos publicados es difícil, debido a que la gran mayoría de los estudios se basan en extractos acuosos; además, la preparación de estos es muy variada.

3.3. Cuantificación de antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos fenólicos naturales presentes en los cálices de jamaica. La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, ha sido de relevancia para el uso de los fitoquímicos en suplementos alimenticios o nutraceuticos. Las antocianinas se suelen extraer con disolventes como metanol o etanol, agregando una cantidad pequeña de ácido con el fin de obtener la formación del catión flavilio que es estable en medios ácidos (Métivier *et al.*, 1980; Pifferi y Vaccari, 1983) y también en agua sometiendo a ebullición

(Tsai *et al.*, 2002). En este estudio se determinó la concentración de las antocianinas en los extractos etanólicos de los cinco genotipos de jamaica.

Los resultados mostraron una variación en un rango de 15.6 a 1499.3 mg·kg⁻¹ entre los genotipos (Figura 1). El cultivar Alma blanca de cálices verdes presentó el valor más bajo, ya que prácticamente no tiene antocianinas esto era de esperarse debido a la coloración de los cálices. Los resultados obtenidos conciden con lo informado por otros autores con relación a los valores en cálices verdes y calices rojos (Juliani *et al.*, 2009; Christian y Jackson, 2009).

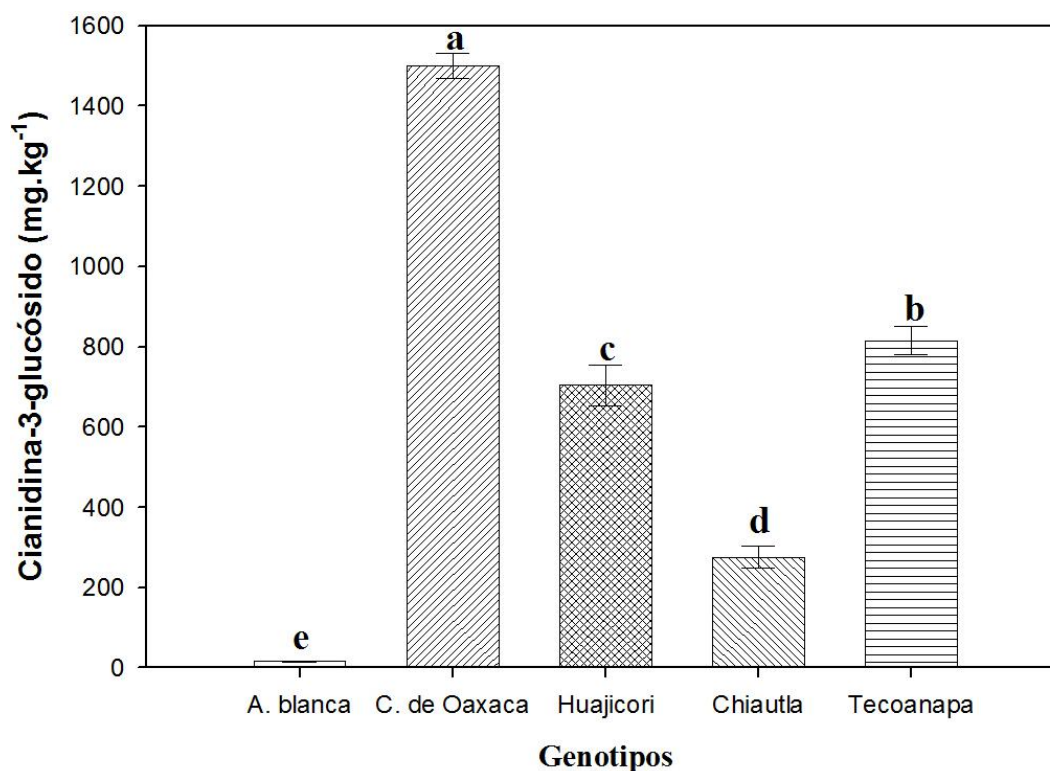


Figura 1. Contenido promedio de antocianinas, en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes.

De los genotipos con coloración roja, Criolla de Oaxaca sobresalió en el contenido de antocianinas. El análisis estadístico con un $\alpha=0.05$, mostró diferencias significativas en todos los genotipos.

La mayoría de los trabajos publicados sobre contenido de antocianinas de jamaica, se refieren a extractos acuosos (Prenci *et al.*, 2005; Juliani *et al.*, 2009; Fernández-Arroyo *et al.*, 2011). Los valores encontrados en este estudio son bajos en comparación con los obtenidos por Juliani *et al.* (2009) a partir de extractos acuosos. El agua como solvente para la extracción de estos compuestos influye en la estabilidad y la reactividad de las antocianinas (Markakis, 1982).

Christian y Jackson (2009) reportan un rango de 0.02 a 3.45 mg·g⁻¹ al evaluar el contenido de antocianinas en diferentes etapas de madurez a partir de extractos etanólicos, con valores altos en la primera etapa de madurez (prefloración) en una variedad de cálices oscuros. Con las variedades de cálices claros y verdes los resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo con los genotipos evaluados. Es importante mencionar que la variabilidad de los resultados en los trabajos se debe a las variedades utilizadas (Hassanein *et al.*, 2005; Christian y Jackson, 2009; Juliani *et al.*, 2009) entre otros factores.

3.4. Cuantificación de fenoles solubles totales

La composición fenólica total, es expresada en microgramos por gramo de peso seco, los resultados oscilaron entre 3252.3 y 7338.5 µg·g⁻¹. En general el contenido de fenoles solubles totales de genotipos con cálices rojos Huajicori y Criolla de Oaxaca, fueron los más altos en comparación con Alma blanca de cálices verdes. Sin embargo, esta variedad resultó estadísticamente igual con el genotipo Chiautla de cálices rojos (Figura 2). Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Dentro de los flavonoides se

encuentran las antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles (Luthria, 2006).

Los reportes del contenido de fenólicos en extractos acuosos son de $14.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Pin-Der y Gow-Chin, 1997), valores superiores en comparación con los resultados obtenidos con extractos etanólicos en este estudio.

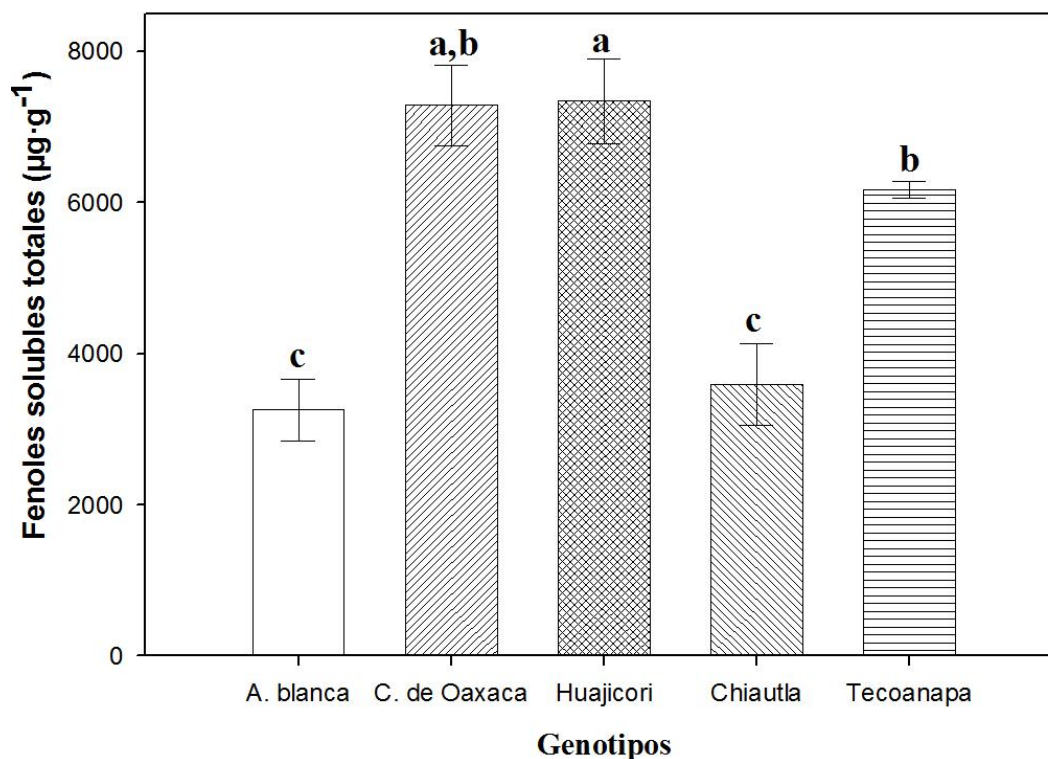


Figura 2. Contenido promedio de fenoles solubles totales, en extractos etanólicos de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes.

Los valores de fenoles solubles totales fueron más bajos que los mencionados por Christian y Jackson (2009) quienes también utilizaron etanol como disolvente de extracción y encontraron una variación de contenido fenólico promedio de 4.73 a $23.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en 3 variedades analizadas, entre ellas una de cálices verdes, en diferentes etapas de madurez.

Juliani *et al.* (2009) analizaron el contenido de fenoles en 56 muestras de jamaica, usaron como disolvente de extracción una solución de metanol acuoso al 50 %. Los valores obtenidos variaron de 1.1 al 3.3 % de fenoles solubles totales. Los valores obtenidos del contenido de antocianinas y fenoles solubles totales, en este trabajo fueron bajos comparados con lo publicado con otros autores. Aparentemente no se observa ninguna relación de la actividad antimicrobiana con el contenido de antocianinas, así como con el contenido de fenoles solubles totales.

3.5. Cuatificación de proantocianidinas

Las proantocianidinas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (PAs) también llamados taninos condensables, son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles tales como catequinas y epicatequinas. En los alimentos de origen vegetal, las PAs se presentan como mezclas de oligómeros y polímeros (Prieur *et al.*, 1994).

La concentración más elevada de PAs se presentó en el genotipo Criolla de Oaxaca, seguida de Tecoaapa, Huijicori, Chiautla, finalmente Alma blanca (Figura 3). Ikigai *et al.*(1993); Tagun *et al.* (2004) describen que las PAs poseen actividad antimicrobiana, sin embargo, estos compuestos tienen mayor actividad frente a las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas, afectando a la bicapa lipídica de la membrana. Con base en esta información y con los resultados obtenidos en este estudio es probable que el genotipo Criolla de Oaxaca tenga una eficiente actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram-positivas, por su alto contenido de proantocianidinas.

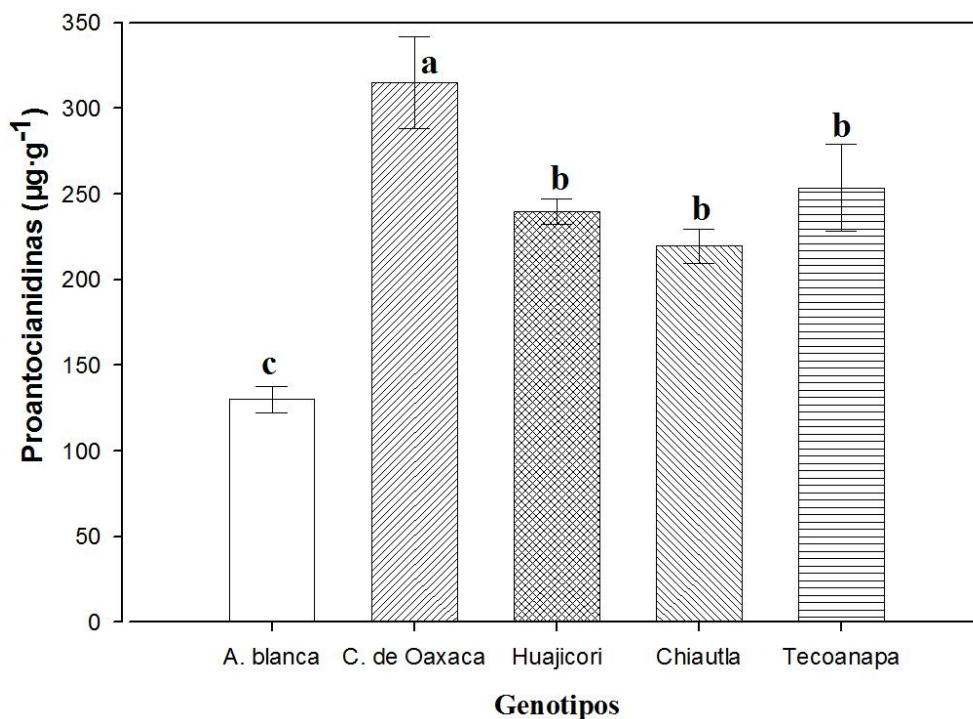


Figura 3. Contenido promedio de proantocianidinas de los genotipos de jamaica. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes.

3.6. Análisis de ácidos fenólicos

La fracción de ácidos fenólicos libres (45.2 a 55.3 %), fue la más abundante en los genotipos analizados, seguida de la fracción de glucosilados (8.3 a 11.2 %) y la de esterificados (3.4 a 7.0 %). El contenido más elevado de ácidos fenólicos libres se presentó en los genotipos Criolla de Oaxaca, Huajicori y Tecoanapa; el menor la tuvieron Alma blanca y Chiautla (Figura 4.)

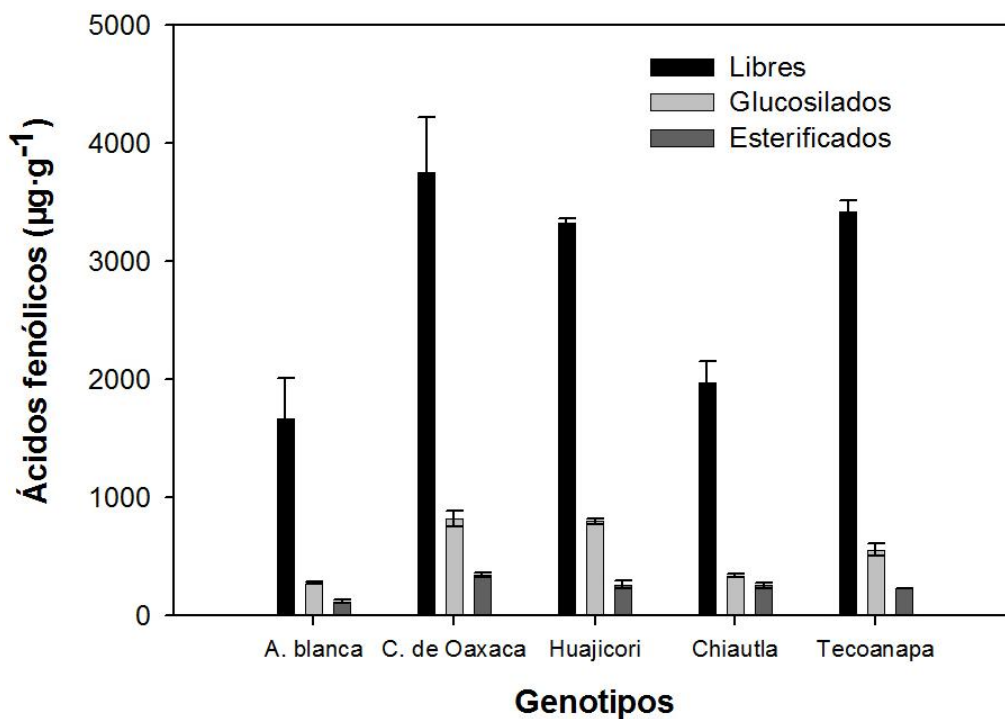


Figura 4. Contenido promedio de las fracciones de ácidos fenólicos contenidos en cinco muestras de extractos etanólicos de cálices de jamaica

3.7. Análisis de ácidos fenólicos por HPLC

Se identificaron y cuantificaron 10 diferentes ácidos fenólicos. En la fracción de ácidos fenólicos libres, el ácido clorogénico fue el que se encontró en mayor cantidad; los ácidos *p*-cumárico y salicílico no se detectaron en ninguno de los genotipos en esta fracción. Al igual que en la fracción de ácidos fenólicos libres, en la fracción de ácidos fenólicos glucosilados el ácido más abundante fue el clorogénico; en esta fracción no se detectaron los ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico y salicílico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido promedio de ácidos fenólicos ($\mu\text{g/g}$) del extracto etanólico de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de cinco genotipos.

Genotipos	G	P	C	$p\text{-H}$	V	Ca	Si	$p\text{-C}$	F	Sa									
Libres																			
Alma blanca	46.9	c	65.2	b	405.3	C	6.3	c	62.5	b	68.3	a	15.2	c	ND	ND	ND		
C.de Oaxaca	59.9	b	85.8	a	231.9	D	ND		24.3	c	ND		64.7	b	ND	612.6	A	ND	
Huajicori	60.9	b	95.5	a	988.5	A	14.6	a	64.0	b	59.8	b	62.1	b	ND	159.3	B	ND	
Chiautla	207.6	a	65.0	b	374.8	C	12.2	c	31.1	c	50.1	c	71.1	b	ND	85.1	C	ND	
Tecoanapa	65.7	b	95.2	a	729.6	B	13.6	b,a	73.7	a	55.5	b,c	111.4	a	ND	ND		ND	
DMS	8.9		11.1		80.3		1.6		8.9		8.1		13.1						
Glucosilados																			
Alma blanca	17.3	c	13.8	c,d	279.4	C	ND		17.9	b	9.2	d,c	6.9	c	ND	ND		ND	
C.de Oaxaca	13.6	d	8.8	c,d	657.4	A	ND		57.2	a	47.3	a	12.6	b	ND	ND		ND	
Huajicori	14.1	d	15.7	b	442.3	B	ND		9.9	b	31.5	b	ND		ND	ND		ND	
Chiautla	38.1	a	8.7	d	212.0	c,d	ND		12.4	b	7.4	d	6.4	c	ND	ND		ND	
Tecoanapa	18.8	b	25.8	a	162.2	D	ND		21.3	b	13.1	c	36.8	a	ND	ND		ND	
DMS	1.5		4.9		88.3				12.5		4.7		4.2						
Esterificados																			
Alma blanca	34.5	b	7.2	b	10.6	C	ND		16.4	b	10.4	b	6.9	c	8.8	c	14.5	a	29.9
C.de Oaxaca	10.4	d	17.4	a	44.7	c,b	ND		ND		6.6	c	ND		32.1	a	14.9	a	ND
Huajicori	17.4	c	28.5	a	69.7	A	ND		31.3	a	30.0	a	11.2	b	ND	ND		ND	
Chiautla	44.8	a	7.3	b	7.1	C	ND		16.1	b	9.5	b	36.2	a	5.5	d	14.1	a	34.9
Tecoanapa	34.0	b	14.1	a	75.8	A	ND		ND		6.3	c	ND		19.3	b	ND		ND
DMS	5.9		4.5		6.7				2.5		2.1		2.3		3.3				

Medias con distinta letra dentro de columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha \leq 0.05$); DMS: diferencia mínima significativa; ND: no detectable; G: Gálico; P: Protocatecuico; C: Clorogénico; $p\text{-H}$: $p\text{-Hidroxibenzoico}$; V: Vanílico; Ca: Caféico; Si: Siríngico; $p\text{-C}$: $p\text{-Cumárico}$; F: Ferúlico; Sa: Salicílico.

El contenido de ácidos fenólicos analizados por el HPLC tuvieron el mismo comportamiento con los analizados por el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Singleton & Rossi (1965) en cada fracción. Los ácidos fenólicos libres fueron los más abundantes en los extractos etanólicos de los cinco genotipos

analizados. En cuanto a las cantidades los valores obtenidos por HPLC fueron un poco más bajos debido a que algunos picos no se pudieron identificar y por tanto no se cuantificaron.

Los ácidos fenólicos se han reportado como agentes antimicrobianos en diversas plantas y en miel de las abejas (Fontana *et al.*, 2000; Sivakami y Rupasinghe, 2007). Para el caso de la jamaica según Liu *et al.* (2002); Ali *et al.* (2003); Keh-sen *et al.* (2005) es el ácido protocatecuico el agente más importante. Huang *et al.* (2009) mencionan como ácido predominante en la jamaica al protocatecuico, lo que no coincide con lo obtenido en el presente trabajo con los diferentes genotipos de jamaica ya que éste se encontró en cantidades pequeñas. Alma blanca ($86.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Chiautla ($81.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) obtuvieron los valores más bajos mientras que los más altos fueron los genotipos de Huajicori ($139.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Tecoanapa ($135.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). De acuerdo a Ramirez-Rodrigues *et al.* (2011) el contenido de ácido protocatecuico en cálices frescos de jamaica que en calices deshidratados, mientras que el ácido gálico solo está presente es estos últimos. Estos mismos autores encontraron una mayor cantidad de ácido gálico que ácido protocatecuico, lo que coincide con lo obtenido en este estudio con el genotipo Chiautla. Esto era de esperarse en virtud de que en ambos casos las muestras de cálices de jamaica provenían del estado de Puebla México. Aunque ellos trabajaron con extractos acuosos en caliente y en frío, mientras que en esta investigación se hizo con extractos etanólicos.

Beltrán-Debóna *et al.* (2010) encontraron al ácido clorogénico como uno de los más abundantes en extractos acuosos de jamaica. En este estudio, se encontró la misma tendencia. Los valores del contenido de ácido clorogénico fueron los más

altos y oscilaron entre 593.9 a 1500.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, en comparación con los demás ácidos fenólicos analizados en los cinco genotipos. Estos resultados coinciden con los obtenidos con otros autores Gassama-Dia *et al.* (2004); Segura-Carretero *et al.* (2008); Fernández-Arroyo *et al.* (2011).

Los ácidos fenólicos encontrados ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, en la mayoría de los casos se obtuvieron en concentraciones muy bajas e incluso en algunos genotipos no se detectaron. No obstante, el genotipo Criolla de Oaxaca, en la fracción de fenoles libres se obtuvo una concentración elevada de (612.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Con la identificación y cuantificación de estos ácidos fenólicos no se pudo dar una explicación con relación a la respuesta antimicrobiana obtenida en los diferentes genotipos. Resultados similares obtuvieron Bendini *et al.* (2006) al realizar estudios sobre la relación entre los componentes fenólicos, la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana en cinco especies de *Passiflora* spp.

4. CONCLUSIONES

Los compuestos identificados y cuantificados tales como las antocianinas, fenoles solubles totales, así como las proantocianidinas y ácidos fenólicos, no explican de manera clara la respuesta de la actividad antimicrobiana de los diferentes genotipos, sin embargo, no se debe descartar la posibilidad estos compuestos influyan de alguna manera en la actividad antimicrobiana de los cálices de jamaica. El contenido del ácido clorogénico en los extractos de los cinco genotipos fue el más abundante en comparación con los demás ácidos fenólicos identificados.

5. LITERATURA CITADA

- Ali B. H., Mousa H. M., El-Mougy S. 2003. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hi-biscus sabdariffa* L. on paracetamolinduced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research* 17: 56–59.
- AOAC. 1984. Association Of Official Analytical Chemist Inc. Official Methods of Analysis. 12a Ed. St. Paul Minnesota, USA.
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A., Abo-Zaid M.A.1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93: 43–54.
- Bakan B., Bily A. C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogene B. J. R. and Richard-Molard D. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2826-2831.
- Beltrán-Debóna R., Alonso-Villaverde C., Aragonés G., Rodríguez-Medina I., Rull A., Micol V., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Camps J., Joven J. 2010. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* cálices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* 17: 86–191.
- Bendini A., Cerretani L., Pizzolante L., Toschi T. G, Guzzo F., Ceoldo S., Marconi A. M. F. An-dreetta, M. Levi. 2006. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. Extracts. *European Food Research and Technology* 223: 102–109

- Beuchat, L.R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: Microbial Food Contamination. Wilson CL, S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. Chap. 11: 149-169.
- Chang, Y.C., Huang, K. X., Huang, A. C., Ho, Y. C., Wang, C. J. 2006. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. Food and Chemical Toxicology.44,1015–1023
- Che-Yi C., Mei-Chin Y. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. Foodborne Pathogens and Disease 6: 201-206
- Christian, R.K.; Jackson, J. C. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. Journal of Food Composition and Analysis 22:663-667.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343–356.
- Fasoyiro, S.B.; Ashaye, O.A.; Adeola, A. And Samuel, F.O. 2005. Chemical and storability of fruit-flavoured (*Hibiscus sabdariffa*) drinks. World Journal of Agricultural Sciences 1: 165-168.
- Fernández M.A., Garcia M.D., Saenz M.T. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. Journal of Ethnopharmacology 26: 11–14.
- Fernández-Arroyo S., Rodríguez-Medina I. C., Beltrán-Debón R., Pasini F., Joven J., Micol V., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in

vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract.
Food Research International 44:1490–1495.

Fontana J. D., Passos M., Los Santos M. H. R., Fontana C. K., Oliveira B. H and Schause L. 2000. Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography, and bactericidal action. *Chromatographia* 52: 147-151.

Friedman, M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51:116–134.

Galicia-Flores., L. A., Salinas- Moreno. Y., Espinoza-García, B. M. y Sánchez-Feria, C. 2008. Caracterización Físicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 : 121-129.

Gassama-Dia, Y.K., Sané, D. and Ndoye, M. 2004. Direct genetic transformation of *Hibiscus sabdariffa* L. *African Journal of Biotechnology* 3: 226-228.

Glowniak, K, Zgórk, G., Kozyra, M. 1996. Solid Phase Extraction and reversed-phase high HPLC of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *Journal of Chromatography A*.730: 25-29.

Hassanein R. A., Khattab H. K. I., El-Bassiouny H. M. S. and Sadak M. S. 2005. Increasing the active constituents of sepals of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) plant by applying gibberellic acid and benzyladenine. *Journal of Applied Sciences* 1: 137-146.

Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales, N.P.; Bunyapraphatsaea, N.; Sato, H., Herunsalee, A. And Suthinsisang, C. 2005. Antioxidant effect of

aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 481-484.

Hou, D.X., Tong, X., Terahara, N., Luo, D., Fujii, M. 2005. Delphinidin-3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440:101–109.

Huang, C. N., Chan, K. C., Lin, W. T., Su, S. L., Wang, C. J. and Peng, C. H. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration Induced by High Glucose a Mechanism Involves Connective Tissue Growth Factor Signals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 3073-3079.

Ikigai H. Nakae T. Hará Y. Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1147: 132-136.

Juliani H. R., Welch C.R., Wu Q., Diouf B., Malainy D., And Simon J. E. 2009. Chemistry and Quality of *Hibiscus (Hibiscus sabdariffa)* for Developing the Natural Product Industry in Senegal. *Journal of Food Science* 74:113-121.

Kang P. S., Seok J. H., Kim Y. H, Eun J. S., Oh S. H. 2007. Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation. *Food Science and Biotechnology* 16: 409-414.

Keh-sen L., Shyh-ming T., Mei-chin Y. 2005. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research* 19: 942–945

- Kuete, V., Tsafack Mbaveng, A., Tsaffack, M., Penlap Beng, V., Etoa, F. X., Nkengfack, A. E. 2008. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 115:494–501.
- Liu C. L., Wang J. M., Chu C. Y., Cheng M. T., Tseng T. H. 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40: 635–641.
- Luthria, D.L. 2006. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2266-2272.
- Markakis P. 1982. "Anthocyanins as food colors". Academic Press, New York.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., and Clydesdale, F.M. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.* 45:1099-1100.
- Nychas, G.J.E., P.N., Skandamis, C.C., Tassou. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Roller S. (Ed.). CRC Press. Washington, D.C. Chap. 9: 177-199.
- Olaleye, M.T., 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1: 009-013.
- Pifferi, P.G. Y A. Vacarri. 1983. The anthocyanins of sunflower; II. A study of the extraction process. *J. Food Technol.* 18:629-638.
- Pin-Der D.y Gow-Chin Y. 1997. Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chemistry* 60: 639-645.

- Prenesti, E., Berto, S., Daniele, P. G., Toso, S. 2005. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* 100: 433–438.
- Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P.G. And Toso, S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry* 100: 433–438.
- Prieur C, Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M.1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36:781-784.
- Ramirez-Rodrigues M. M., Plaza M. L., Azeredo A., Balaban M. O., Marshall M. R. 2011. Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science* 76:428-435.
- SAS. 2005. Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, versión 9.1. Carey, N.C.
- Segura-Carretero, A., Puertas-Mejía, M. A., Cortacero-Ramírez, S., Beltrán, R., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Dinelli, G. and Fernández-Gutiérrez, A. 2008. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis* 29: 2852-2861.
- Singleton V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.

- Sivakami M., and Rupasinghe H. P. V. 2007. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5: 81–85.
- Tagun T, Tanaka T, Kouno I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27:1965-1969.
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A, Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199–1218.
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. and Jordan B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, Vol. 35: 351-356.
- Wallace C., and Giusti M.M. 2010. Evaluation of parameters that affect the 4 dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. *Journal of Food Science*. 75:619-625.
- Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P., & Tseng, T. H. 2000. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 411–416.