

Obtención de un extracto rico en antocianinas a partir de flor de majagua (*Talipariti Elatum S.W.*)

Obtaining an extract rich in anthocyanins from the flower of majagua (*Talipariti Elatum S.W.*)

Alberto Fernández-Perez, Dairon Iglesias-Guevara, Rocio Cartaya-Quintero y José Ariel Arencibia-Sánchez^a.

^a Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600, La Habana, Cuba. jarencibia1995@gmail.com

Recibido: 12 de octubre de 2019;

Aceptado: 28 de abril de 2020;

RESUMEN

Se obtuvo un extracto hidroalcohólico a partir de los pétalos de la flor de la majagua (*Talipariti elatum S.W.*) rico en antocianinas, para lo cual se optimizó el proceso de extracción en función del contenido total de polifenoles y antocianinas teniendo como factores el etanol (% v/v) y el tiempo de extracción. Las condiciones óptimas de extracción se correspondieron con 79 % (v/v) de etanol y 12 h como tiempo de extracción. El extracto hidroalcohólico optimizado presentó contenidos de polifenoles totales y antocianinas de 12 034 mg ácido gálico/L y 10 mg/L, respectivamente. En el extracto optimizado se identificaron metabolitos como: terpenos y esteroides, azúcares reductores, mucílagos, polifenoles (antocianinas, flavonoides y taninos). El extracto presentó un color rojizo-naranja en correspondencia con las antocianinas más probables en este: pelargonidina, cianidina y peonidina, así como algunas de sus variantes glicosídicas.

Palabras clave: flor de majagua; *Talipariti elatum S.W.*; extracto hidroalcohólico; antocianinas; polifenoles.

ABSTRACT

A hydroalcoholic extract was obtained from the petals of the flower of majagua (*Talipariti elatum S.W.*) rich in anthocyanins, for which the extraction process was optimized according to the total content of polyphenols and anthocyanins, with ethanol as a factor (% v/v) and the extraction time. The optimal extraction conditions corresponded with 79% v/v of ethanol and 12h as the extraction time. The optimized hydroalcoholic extract showed of total polyphenols and anthocyanins of 12034mg gallic acid/L and 10mg/L, respectively. In the optimized extract, metabolites were identified as: terpenes/steroids, reducing sugars, mucilages, polyphenols (anthocyanins, flavonoids and tannins). The extract presented a reddish-orange color in correspondence with the most probable anthocyanins in it: pelargonidin, cyanidin and peonidin, as well as some of its glycosidic variants.

Keywords: majagua flower; *Talipariti elatum S.W.*; hydroalcoholic extract; anthocyanins; polyphenols..

INTRODUCCIÓN

Los extractos vegetales son una rica y compleja fuente de principios activos, dentro de los cuales podemos encontrar extractos que poseen un alto contenido de antocianinas (pigmentos naturales más difundidos en el reino vegetal), aunque con sus limitaciones en el plano tecnológico debido a su solubilidad, su dificultad para igualar el matiz deseado, incompatibilidad con la matriz del alimento y la estabilidad del color con respecto al pH, luz y oxígeno (Jiménez, 2008)

Recientemente su estudio ha tomado importancia no solo debido a su actividad antioxidante, sino también a sus posibles beneficios para la salud humana, ya que se ha relacionado su consumo con la reducción de la incidencia de enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Cacace y Mazza, 2003; Kraft *et al.*, 2005).

La flor de majagua (*Talipariti elatum* S.W.) es una fuente importante de compuestos bioactivos, tales como: ácidos orgánicos, fitosteroles y fenoles, dentro de las cuales se encuentran las antocianinas. El contenido fenólico en las flores consiste principalmente de flavonoides como la gossypitrina, derivados glicosilados de la quercetina, que han mostrado ser potentes antioxidantes, neuroprotectores, antimicrobianos, secuestradores de radicales libres y agentes que contribuyen a la acción anticancerígena y cardioprotector (Márquez *et al.*, 1999; González *et al.*, 2016). Por lo antes expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo obtener un extracto rico en antocianinas y polifenoles a partir la flor de majagua (*Talipariti elatum* S.W.).

MATERIALES Y METODOS

Las flores de majagua fueron recolectadas manualmente entre octubre y noviembre de 2018 en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Se seleccionaron las que presentaron las mismas características de estado vegetativo, tamaño, color y ausencia de manchas, grietas y alteraciones morfológicas visibles provenientes de hongos y parásitos. Posteriormente se realizó la identificación botánica de la especie, para ello, la misma se herborizó y registró (No.90077) en el herbario “Johannes Bisse” (HAJB) de la Universidad de La Habana. Los pétalos fueron separados del pistilo y sometidos a congelación (-32 °C) para su posterior uso.

Se empleó el programa Design Expert 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.) para el diseño experimental y procesamiento de los extractos hidroalcohólicos de la flor de la majagua, de forma tal que el extracto seleccionado presentara los mayores contenidos de antocianinas monoméricas totales (CAM) y contenido de polifenoles totales (CPT). Se utilizó el método de optimización numérica a través de una superficie respuesta IV Óptimo, generando un modelo matemático que describiera las variaciones de estas variables en cada uno de los extractos.

El porcentaje de etanol (A) y tiempo de extracción (B) fueron los factores evaluados, mientras que el CPT y CAM, fueron las variables respuesta, además se incluyó como variable control el pH de los extractos. El número total de combinaciones, definidas por el software, fue de 12 corridas incluyendo cuatro réplicas. El grado de ajuste de los datos experimentales, a los modelos sugeridos, se evaluó mediante los parámetros p, R² y falta de ajuste.

Los extractos se prepararon manteniendo una relación 1:2 (m/v), la solución alcohólica se acidificó con un 5 % de ácido cítrico. La maceración se llevó a cabo en zaranda a 200 s^{-1} (25 - 30 °C). Al término del tiempo de extracción, las mezclas resultantes se filtraron al vacío (MLW, Mod. 2DSE4, Hamburgo, Alemania) con papel de filtro Whatman cualitativo estándar 2° (Whatman International Ltd., Kent, Inglaterra, Ø= 150 mm).

La cuantificación de los polifenoles totales, se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por François-Haugrin *et al.* (2016). Se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Rayleigh UV-1601, China). Se empleó el ácido gálico (sustancia patrón) para la curva de calibración a concentraciones entre los 100 y 500 mg/L. Además, se realizó un ensayo en blanco con 50 µL de agua destilada empleando las mismas condiciones para el ensayo realizado a la muestra. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico / L de extracto.

El CAM se determinó según el método de pH diferencial propuesto por (Lee *et al.*, 2005) y se expresó como cianidina-3-glucosa con un coeficiente de extinción molar de 26 900 L/cm mol y masa molar de 449,2 g mol⁻¹. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias a 510 y 700 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh UV-1601, China).

Al extracto hidroalcohólico optimizado (EHO) de flor de majagua se le corroboró la posible presencia de metabolitos secundarios mediante un tamizaje fitoquímico siguiendo la metodología propuesta por (Miranda y Cuellar, 2000). Además, se le determinó el pH, empleando un pH metro BASIC 20⁺ (Crison, España) según Miranda y Cuellar (2000). Todas las lecturas se realizaron por triplicado.

También se le determinó el CPT y CAM según las metodologías utilizadas anteriormente.

El contenido de sólidos totales del EHO se determinó por gravimetría indirecta por volatilización, empleando una balanza termo gravimétrica (Sartorius Mod. MA-40, Alemania) a 105 °C hasta masa constante, la densidad mediante picnómetro de tubo capilar (Miranda y Cuellar, 2000), el índice de refracción en un refractómetro (Abbe, Argentina) con corrección de temperatura (Miranda y Cuellar, 2000) y espectro de absorción en la región del visible (400-700 nm), según Harborne y Williams (1995).

La determinación del color del EHO se realizó mediante el método espectrofotométrico según las recomendaciones de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, 1986). Se realizó la transformación al espacio uniforme CIE L* a* b*. Se empleó el iluminante D65 y un ángulo visual del observador normal de 10° (CIE, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se puede observar que los mayores CPT y CAM se obtuvieron en la corrida 7, lo cual puede estar dado por el hecho de que esta corrida se corresponde con el mayor tiempo de extracción y el empleo de etanol al 83,38 % (v/v). Los menores CPT y CAM fueron obtenidos en la corrida 6, con menor tiempo de extracción y empleando etanol al 79,13 %. En cuanto a las corridas 4, 10, 11 con igual mezcla hidroalcohólica (65 % v-v) a medida que aumentó el tiempo de extracción se incrementaron las variables estudiadas, lo cual habla de la

posible influencia del tiempo de extracción en dichas respuestas, aunque los valores variaron en menor orden para el contenido total de antocianinas. Los mayores valores de CPT y CAM se lograron entre 10 y 12 h como tiempo de extracción, para disoluciones hidroalcohólicas entre 70 y 86 % (v/v). Los CAM para las diferentes corridas experimentales presentaron variaciones entre 5 y 8 mg/L aproximadamente, resultados estos que pudiesen ser significativos a la hora de determinar los rendimientos a nivel industrial.

A pesar de que las antocianinas son compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides y estos a su vez a ese gran grupo que son los polifenoles, no se encontró relación alguna entre el contenido de polifenoles totales y el contenido total de antocianinas, por lo que evidentemente en los extractos hay presencia de otros grupos de compuestos incluyendo polifenoles no antocianínicos que reaccionan con el reactivo de Follin.

La Tabla 2 muestra la significación del análisis de varianza de la regresión y de los coeficientes estimados para las variables de respuesta. En ambos casos (CPT y CAM), se observa que el modelo cuadrático resultó significativo con un nivel de confianza del 95 %, siendo el porcentaje de etanol (A) y su homólogo cuadrático (A^2) quienes influyeron significativamente sobre el CAM. Para el CPT, se tubo entonces que el tiempo de extracción (B) y del término cuadrático del porcentaje de etanol fueron los que resultaron significativos. El estadígrafo R^2 indicó que el modelo ajustado explica el 82,72 % de la variabilidad del CPT y el 81,78 % de la del CAM.

Pulido *et al.* (2002) se refieren a que la validez del análisis de varianza queda sujeto a que se cumplan los supuestos del modelo. En ambos casos (CPT y CAM), la distribución de los residuos de los modelos evaluados siguió una distribución normal, con una varianza constante e independencia entre las corridas realizadas.

Al analizar los coeficientes de la ecuación para el CPT, se tiene que el término del tiempo de extracción tiene mayor influencia sobre la variable dependiente, seguido del término cuadrático del porcentaje de etanol. De acuerdo al signo de los coeficientes de la ecuación, el CPT aumenta a medida que aumenta el tiempo de extracción. Mientras que, al analizar los coeficientes de la ecuación para el CAM, se tiene que el término etanol (%) tiene mayor influencia, seguido de su término cuadrático. De acuerdo al signo de los coeficientes, el contenido total de antocianinas aumenta a mayor porcentaje de etanol. Las ecuaciones de los modelos para los CPT y CAM se muestran a continuación:

$$\text{CPT} = 12360,79 + 410,00A + 998,94B - 48,46AB - 2807,43A^2 + 63,65B^2$$

$$\text{CAM} = 7,28 + 0,74A + 0,43B - 0,40AB - 1,08A^2 + 0,30B^2$$

Castillo (2016) demostró que el etanol (% v-v) influye significativamente en el CAM durante el proceso de obtención de un extracto rico en antocianinas a partir del cerezo negro, coincidiendo con lo encontrado en la presente investigación.

Para la optimización numérica del proceso de extracción se emplearon como restricciones los intervalos, ya evaluados, de las variables independientes (% etanol y tiempo de extracción) y maximizaron las variables respuestas para lograr los mayores valores CPT y CAM. Una vez que se tuvo el modelo debidamente ajustado y validado, se procedió a explorar la superficie

descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta. El programa arrojó 2 soluciones optimizadas que cumplieran con las restricciones, se escogió la solución de mayor conveniencia estadística (0,947) que además presentó los mayores CPT (13431,1 mg/L) y CAM (8,039 mg/L), que correspondió con un 78,77 % etanol y 12 h como tiempo de extracción. Por tanto, se recomienda que para obtener un extracto rico en CAM y CPT a partir de la flor de majagua se debe de trabajar con estas condiciones.

En el tamizaje fitoquímico realizado al EHO, además de los compuestos fenólicos, se pudo comprobar la presencia triterpenos y esteroides, azúcares reductores y mucílagos, resultados que coinciden con lo reportado en la literatura para extractos elaborados a partir de mezclas hidroalcohólicas (Márquez *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2017) En el caso de las quinonas y mucílagos, no se tuvo certeza de su presencia, resultado que fue similar al encontrado por Márquez *et al.* (1999).

La Tabla 3 muestra los resultados de los indicadores físicos y químicos evaluados al EHO. Los valores correspondientes al CPT resultaron ser inferiores al obtenido mediante la optimización numérica, mientras que el obtenido para el CAM resultó ser superior. Estas diferencias en los resultados están condicionadas fundamentalmente por los propios errores arrojados por el modelo, ya que el coeficiente R^2 aunque mostró un buen ajuste, no fue capaz de explicar el 100 % de los errores.

El porcentaje de sólidos totales (4,34 %) estuvo ligeramente por debajo de lo reportado (5,57 %) por Márquez (1999), lo cual pudiera deberse fundamentalmente que estos emplearon una mezcla hidroalcohólica (50 % v-v) y un método de extracción (percolación) diferentes al empleado en la presente investigación. La densidad relativa (0,929) fue similar a la reportada (0,955) por Gutiérrez *et al.* (2017), mientras que el índice de refracción (1,5863) fue ligeramente superior al reportado (1,365) por estos mismos autores. La evaluación de las coordenadas cromáticas (Tabla 3) permitió determinar que el color del EHO se debió principalmente a la contribución roja relacionada con el valor positivo del componente a^* y, en menor proporción, a la contribución amarilla correspondiente al valor positivo del componente b^* ; la combinación de estos con la luminosidad y la elevada cromaticidad (C^*) evidenció un color rojo con tonalidades naranja intenso. El color del extracto fue similar a lo reportado por Quiala (2013) y Gutiérrez *et al.*, (2017), en ambos casos los autores reportan un extracto traslúcido de color rojo con tonalidades ámbar.

Debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta, lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos. Sus espectros de absorción se caracterizan por tener dos bandas separadas; una en la región visible entre 465 y 550 nm y otra más pequeña alrededor de 275 nm (Giusti y Wrolstad, 2001). Es así como se pueden identificar las antocianinas por su absorción en la región visible (Andersen y Francis, 2004).

En el espectro visible (**Fig. 1**) se pudo observar la complejidad del extracto al mostrar importantes niveles de absorbancia entre los 400 y 570 nm. De acuerdo con el rango en que las antocianinas absorben en el visible y unido a que estas poseen coloraciones rojizas (las cuales se encuentran con ángulos de matiz desde 0° hasta 60°), las antocianinas más probables en el extracto pudiesen ser: pelargonidina, cianidina y peonidina (incluyendo sus

variantes o-glicosiladas) quienes además de presentar bandas de absorción en cuanto a la expresión del color, concuerdan con el matiz (h°) del extracto (rojizo-naranja).

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales y antocianinas de los extractos de flor de majagua.

Corridas	Etanol (%)	Tiempo de extracción (h)	CPT mg/L	CAM mg/L
1	76,25	7,36	12741,5	6,9764
2	90,00	4,00	10038,9	7,6094
3	74,25	10,56	12905,7	7,8673
4	65,00	12,00	9623,5	6,2424
5	76,25	7,36	11859,4	7,6106
6	79,13	4,00	10145,8	6,8446
7	83,38	12,00	13780,8	8,1661
8	76,25	7,36	12286,1	6,6924
9	90,00	9,32	9109,51	6,3094
10	65,00	4,00	8350,0	5,0069
11	65,00	8,20	9609,3	5,7383
12	90,00	9,32	10349,5	7,2704

Tabla 2. Análisis de varianza de los modelos codificados para el contenido de polifenoles totales y antocianinas.

Fuente	CPT	CAM
	Valor p	Valor p
Modelo cuadrático	0,0275	0,0318
A	0,3340	0,0133
B	0,0439	0,1093
AB	0,9311	0,2202
A ²	0,0035	0,0176
B ²	0,9261	0,4304

A: % Etanol, B: Tiempo de extracción.

Tabla 3. Indicadores físicos y químicos del extracto hidroalcohólico optimizado de flor de majagua (n = 3)

Parámetros	Media \pm Desviación estándar
pH	3,1 \pm 0,07
Sólidos totales (% m/m)	4,34 \pm 0,1
Polifenoles totales (mg/L)	12034,3 \pm 496
Antocianinas monoméricas totales (mg/L)	10,0 \pm 0,6
Densidad relativa (g/mL)	0,929 \pm 0,0005
Índice de refracción	1,5863 \pm 0,003
L*	35,1
a*	59,9
b*	43,5
C*	74,0
h°	35,9

L*: luminosidad; a*: componente rojo-verde; b*: componente amarillo-azul; C*: cromaticidad; h°: matiz.

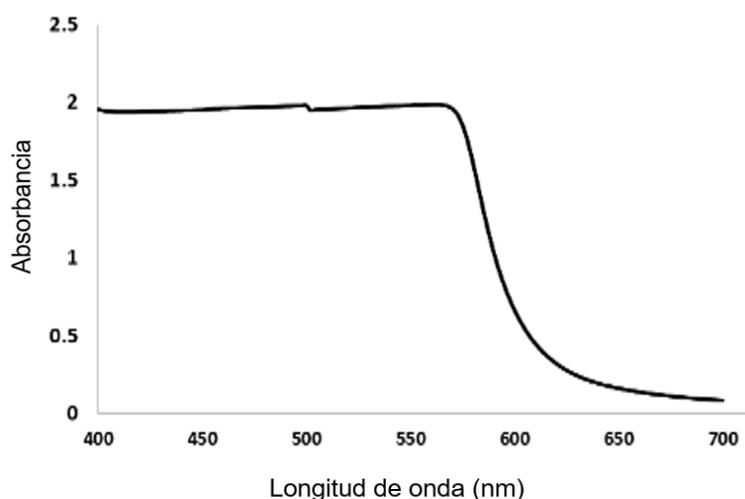


Fig. 1. Espectro de absorción del extracto hidroatólico optimizado de la flor de majagua

CONCLUSIONES

Se obtuvo un extracto rico en antocianinas (10 mg / L) y polifenoles (12034 mg / L) a partir la flor de majagua (*Talipariti elatum* S.W.) utilizando un tiempo de extracción de 12 h y un porcentaje de etanol de 79 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andersen, O. & Francis, G. (2004). Techniques of pigment identification. En K. Davies, (Ed.), *Plant Pigments and Their Manipulation* (pp. 293-341). Londres: Editorial Blackwell Publishing.
- C. I. E. (1986). *Colorimetry. 2nd edition*. Publication CIE No. 15.2, Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage, Vienna.
- C. I. E. (1995). *Industrial Colour-diference Evaluation (Technical Report)*. Publication CIE No. 116, Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage, Vienna.
- Cacace, J. E., Mazza G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*; 68(1), 240-248.
- Castillo, Y. E. (2016). *Optimización del proceso de extracción hidroatólica de antocianinas a partir de pulpa de cerezo negro (Syzygium cumini L.)*. (Tesis en opción al Título en Licenciatura en Ciencias Alimentarias). Universidad de La Habana. Cuba.

- François-Haugrin, F., Monan, M., Nossin, E., Smith-Ravin, J., & Marcelin, O. (2016). Antioxidant activity of an isomer of gossypitrin (gossypetin-3'-O-glucoside) isolated in the petals of *Talipariti elatum* Sw., and determination of total phenolic content of the total flower. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 5(5), 200-208.
- Giusti, M. & Wrolstad, R. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV visible spectroscopy. En: Wrolstad RE, Ed. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, 1-13.
- González, J., Cuéllar, A., Monan, M., Nossin, E., & François-Haugrin, F. (2016). Pharmacognostical and phytochemical studies of flowers from *Talipariti elatum* Sw. *International Journal of Engineering Research & Science*; 2, 69-74.
- Gutiérrez, Y., Welch, W., Scull, R., García, V.; y Delgado, L. (2017). Propuesta de una formulación semisólida a partir de un extracto hidroalcohólico de *Talipariti elatum* S.W. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*; 3(2), 1-12.
- Jiménez, A. E. (2008). *Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la extracción de colorante a partir de la flor del Árbol de majagua (Hibiscus elatus)*. (Tesis en opción al Título en Ingeniería de Proceso). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Kraft, T. F. B., Schmidt, B. M., Yousef, G. G., Knight, C. T., Cuendet, M., Kang, Y. H., & Lila, M. A. (2005). Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science*; 70(3), 159-166.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *JAOAC Int*; 88(5), 1269-78.
- Márquez, I., Cuéllar, A., Martínez, J., Alemán, A., Lora, J., & Vélez, H. (1999). Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus* S.W. *Revista Cubana de Farmacia*; 33(2), 127-131.
- Miranda, M., & Cuellar, A. (2000). *Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Universidad de La Habana.
- Pulido, H. G., De la Vara, R., González, P. G., Martínez, C. T., & Pérez, M. D. C. T. (2002). *Análisis y diseño de experimentos 2da Edición*. New York, NY, USA: Editorial McGraw-Hill.
- Quiala, Z. O. (2013). *Estudio de los compuestos fenólicos presentes en las flores de la especie Talipariti elatum S.w. y control de calidad de su extracto fluido*. (Tesis presentada en opción al Título de Máster en Química Farmacéutica). Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.