

EFFECTO INHIBITORIO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE *HIBISCUS SABDARIFFA* LINN, EN LA OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)

Inhibitory effect of an aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn, on the oxidation of low-density lipoprotein (LDL)

Franklin Pacheco-Coello¹, Doralys Ramirez-Azuaje², Corymar Orosco-Vargas³, Ibis Pinto-Catari⁴, María Peraza-Marrero⁵

Resumen: **Introducción:** A nivel mundial el consumo *Hibiscus sabdariffa*, ha venido creciendo gracias a su contenido rico en compuestos bioactivos como flavonoides y antocianinas. Por medio de sus cálices ha sido utilizada para prevenir y tratar enfermedades degenerativas como el cáncer, anomalías cardiovasculares e hiperlipidemia. Objetivo: Evaluar el efecto antioxidante de un extracto de *H. sabdariffa*, por medio del ensayo de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) aisladas de plasma sanguíneo. **Métodos:** Se emplearon cálices deshidratados obtenidos de un cultivo propio, obteniendo un extracto acuso bajo condiciones similares a la forma de consumo habitual. Se determinó el contenido de fenoles totales empleando el método de Folin-Ciocalteu. Caracterizado el extracto se evaluó su actividad antioxidante por el ensayo de oxidación de LDL, obtenida de una muestra sanguínea de tres pacientes sin hiperlipidemia. **Resultados:** Se evidenció una inhibición de la oxidación de LDL estadísticamente significativa del extracto y su respectivo al control en cada una de las muestras ($p < 0,05$). **Conclusiones:** estos resultados respaldan que *H. sabdariffa*, es una alternativa real en el control de la hiperlipidemia y reducción de la oxidación de las LDL, responsable de la formación de la placa de ateroma a nivel de las arterias. Sin embargo el consumo de esta

¹ Docente Investigador. Laboratorio de Metales Pesados y Solventes y Orgánicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED-UC), Universidad de Carabobo, E-mail: pachecofranklin74@gmail.com

² Laboratorio de Biotecnología y Toxicológico “Saber Cell”. Caracas, Venezuela. E-mail: doralysramirez@gmail.com, Orcid: Orcid.org/0000-0002-4947-8027

³ Asistente de Investigación. Laboratorio de Metales Pesados y Solventes y Orgánicos, Universidad de Carabobo. Cpov04@gmail.com, Orcid: Orcid.org/0000-0002-3173-1004

⁴ Docente Investigador. Laboratorio de Metales Pesados y Solventes y Orgánicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED-UC), Universidad de Carabobo, E-mail: ibispintoc@gmail.com, Orcid: Orcid.org/0000-0002-9333-9147

⁵ Asistente de Investigación. Laboratorio de Metales Pesados y Solventes y Orgánicos, Universidad de Carabobo. E-mail: mmm1504peraza@gmail.com, Orcid: Orcid.org/0000-0001-5248-9854

planta debe hacerse bajo condiciones controlados y guiadas por especialistas a fin de obtener los resultados deseados.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*; Antioxidante; Fenoles, LDL.

Abstract: **Introduction:** Worldwide consumption *Hibiscus sabdariffa*, has been growing thanks to its high content rich in bioactive compounds such as flavonoids and anthocyanins. Through its calyces it has been used to prevent and treat degenerative diseases such as cancer, cardiovascular abnormalities, and hyperlipidemia. Objective: To evaluate the antioxidant effect of an extract of *H. sabdariffa*, by means of the low-density lipoprotein oxidation (LDL) assay. **Methods:** Dehydrated calyces obtained from an own culture were used, obtaining an acuso extract under conditions similar to the usual consumption. The total phenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method. Characterized the extract, its antioxidant activity was evaluated by the LDL oxidation test, obtained from a blood sample from three patients without hyperlipidemia. **Results:** A statistically significant inhibition of LDL oxidation of the extract and its respective control was evidenced in each of the samples ($p < 0.05$). **Conclusions:** these results demonstrate that *H. sabdariffa* is a real alternative in the control of hyperlipidemia and reduction of oxidation of LDL, responsible for the formation of atheroma plaque at the level of the arteries. However, the consumption of this plant must be done under controlled conditions and guided by specialists in order to obtain the desired results.

Key words: *Hibiscus sabdariffa*; Antioxidant; Phenols; LDL

INTRODUCCIÓN

Una de las plantas más atractivas y populares en el mundo es *Hibiscus sabdariffa*, perteneciente a la familia de las Malváceas y conocida en varias partes del mundo como rosa abisinia, roselle o flor de Jamaica (1). Los cálices son la parte principal de consumo y comercialización con un alto contenido de compuestos bioactivos (polifenoles) con amplia actividad biológica entre los que destacan los flavonoides y antocianinas (2-4). Los compuestos polifenólicos son un grupo cercano a 8.000

sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura. Entre los más importantes están los flavonoides, que poseen una estructura básica C6-C3-C6, las antocianinas, catequinas y epicatequinas (5-7).

Entre las diversas propiedades destacan su efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, hipoglicemiante, anticancerígeno y su conocida su capacidad de disminuir el perfil de lípidos séricos (8,9). Por otra parte lipoproteínas de baja densidad (LDL); es avalada por estudios epidemiológicos y de intervención como mejor predictor de la enfermedad cardiovascular y coronaria que el colesterol total (CT) (10-11) Sobre estas evidencias se han apoyado las guías de práctica clínica, donde se considera el LDL como el objetivo terapéutico principal y se establece en función del nivel de riesgo del paciente, un nivel objetivo definido (12).

Por lo expuesto anteriormente el propósito del estudio consistió en evidenciar evaluar el efecto inhibitorio de un extracto acuso de *H. sabdariffa*, empleando como modelo biológico las LDL aisladas de plasma sanguíneo de pacientes sin hiperlipidemia

MÉTODOS

Material vegetal:

Los cálices de *H. sabdariffa*, fueron obtenidos de plantaciones propias por los investigadores, ubicada específicamente en el sector Coropo, Santa Rita del estado Aragua Venezuela Junio-Diciembre de 2019. Estos fueron deshidratados y almacenado libre de humedad, hasta su análisis en el Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos de la Universidad de Carabobo, sede Aragua (Figuras 1 y 2).

Figuras 1 y 2. Material vegetal empleado en el estudio (cálices de *H. sabdariffa*)



Fuente: Elaboración de los autores

Extracto acuoso y muestra biológica:

Los extractos se prepararon con 2,5 g de cálices secos y 100 mL de agua destilada. Se dejó hervir por 15 min, se separó el líquido de los cálices por decantación y la extracción se repitió en las mismas condiciones por triplicado. Los extractos se filtraron con papel Whatman No. 4 y se aforó a 200 mL con agua destilada (13).

Se realizó la extracción sanguínea, previa asepsia y empleando un tubo de tapa morada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sellado al vacío con aguja vacuntainer. Estas muestras fueron obtenidas de tres pacientes ambulatorios que acudieron al Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos por exámenes de hematología completa y química sanguínea, a los cuales se les explicó el propósito de la investigación obteniendo así su consentimiento informado, aprobado por el consejo técnico y ética del Centro de Estudio en Salud de los Trabajadores (CEST-UC). Los tres participantes estaban en ayunas de menos 8 h, y se verificó que no presentaran hipercolesterolemia.

Determinación de fenoles totales:

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. 50 μL de muestra fueron adicionados a 125 μL del reactivo de Folin, y 400 μL de carbonato de sodio 7,1% (p/v), completándose con agua destilada hasta 1 mL. Este procedimiento se realizó por quintuplicado. Seguidamente se prepararon 5 patrones de concentración de 50, 100,150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$, a partir de una solución patrón madre de Ácido Gálico (fenol) de concentración 500 $\mu\text{g/mL}$. Por último realizó la lectura a 760 nm empleando el equipo de absorción molecular Génesis 20 (Thermo Scintific). Los resultados se expresaron como mg de GAE / g de material vegetal (MV) (14).

Ensayo de oxidación de LDL

Para evidenciar la inhibición de la oxidación de LDL se procedió de acuerdo a lo propuesto por Zhang y cols. 2001 y modificada por Ruiz y cols.2006 (7,8). Los tubos se agitaron con un vórtex y llevados a una temperatura de 2 °C durante 15 min, para luego se nuevamente agitados y centrifugados a 5000 rpm a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante que corresponde al plasma se transfirió volumétricamente a un tubo falcon estéril de 15 mL y se adicionó el reactivo precipitante (ácido fosfotúngstico 500 mM y cloruro de magnesio 500 mM) en relación 2:1 v/v con el plasma obtenido. El reactivo precipitante y el plasma se agitaron durante 2 min en vórtex y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante obtenido (LDL) se completó se con buffer de fosfatos 10 mM y 0,16 M de NaCl, pH 7,4 hasta 100 mL. Seguidamente se llevó a cabo la oxidación de las LDL que consistió en tomar 115 μL de solución de LDL, 100 μL de extracto acuoso con buffer de fosfatos, 235 μL de buffer de fosfatos salino y 50 μL de CuSO_4 100 μM , el cual actúa como oxidante de las LDL (control). La mezcla se agitó en vórtex durante 2 min y luego se incubó a 37 °C en agitación durante 8 h. Para detener la oxidación las muestras fueron transferidas por una columna de Sephadex G-50,

tomando 550 μL del eluido y 500 μL de ácido tricloroacético (ATA) 25 % *p/v*. Posteriormente se adicionaron 500 μL de ácido tiobarbitúrico 1% *p/v*. Se agitó nuevamente en vórtex durante 1 min y se incubó a 95 °C por 1 h en oscuridad. Posteriormente se dejó enfriar durante 1 h, en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se realizó una curva de calibración del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se utilizó como estándar 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) en concentraciones de 0,5 a 10 μM . Se midieron las absorbancias de las muestras y patrones y los resultados se expresados como μg TMP/100 g de MV (15,16).

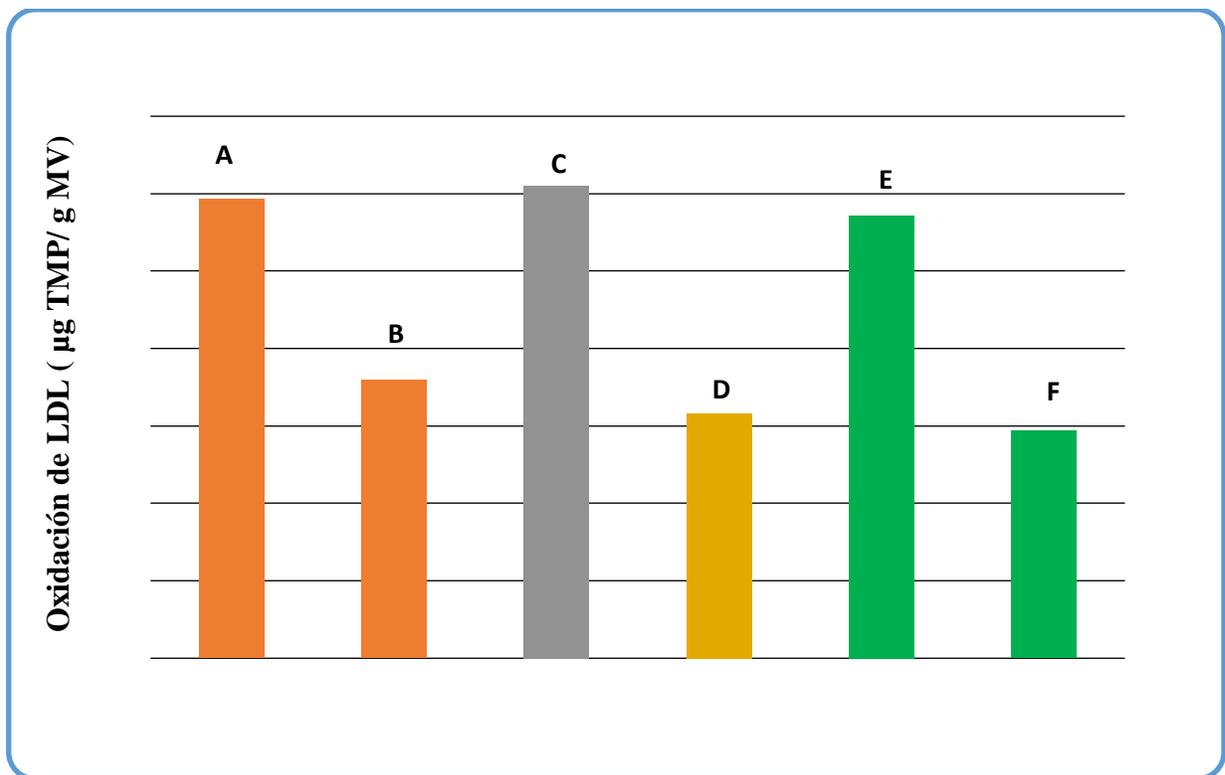
Análisis estadístico.

Todas las determinaciones de las muestras y de los controles se realizaron por triplicado. Para comparar cada efecto del extracto respecto a su control de cada paciente, se aplicó un análisis de varianza de dos vías con interacción (ANOVA), usando el programa Statistix 9.0 para Windows.

RESULTADOS

Previo a la evaluación de la actividad antioxidante, se determinó la concentración de fenoles totales del extracto, obteniendo una media de 9,81 mg de GAE / g de material vegetal (MV), semejante a lo reportado en diversos estudios de caracterización de este tipo de material vegetal. En relación al ensayo de oxidación de LDL, se evidenció que en todos ensayos hubo diferencia significativa cuando se comparó el extracto con su correspondiente control ($p = 0,034$: Extracto y Mp1-Control; $p = 0,026$: Extracto y Mp2-Control; $p = 0,029$: Extracto y Mp3-Control 3).

Figura 3. Efecto del extracto acuso de *H. sabdariffa* en la inhibición de la oxidación de LDL.



*Barras de igual color y letra diferente indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Mp = muestra paciente

Fuente: Elaboración de los autores

DISCUSIÓN

En este estudio se propuso evaluar la capacidad antioxidante de un extracto acuso de *H. sabdariffa* por medio de la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). En tal sentido se evidenció que para cada uno de los ensayos con las muestras obtenidas de pacientes sin hiperlipidemia, el extracto mostró una actividad inhibitoria comparable a lo reportado por otros estudios en los cuales han evaluado extractos como de té verde y de diversas frutas tropicales (17-20). A diferencia lo realizado en esta investigación, otros autores han evaluado *in vivo* el efectos hipolipemiente al suministrar extractos de *H. sabdariffa* cateterizados

y proporcionado en dosis controlados, evidenciado una disminución significativa no solo de las LDL, si no también del colesterol total, triglicérido (21-23).

Un aspecto importante a resaltar es que la capacidad antioxidante de cualquier extracto, sea cual sea su origen está condicionada por diversos factores como internos y externos que afectan la calidad y cantidad de los compuestos fenólicos en las plantas, como la diversidad genética (variedad y origen de la muestra), etapa de madurez, variables ambientales (intensidad de la luz, clima, temperatura, uso de fertilizantes) (13,24).

Por último, los reportes a nivel mundial sugieren que los compuestos fenólicos en *H. sabdariffa* proporcionan suficiente evidencia de que este tipo de extracto puede ser un coadyuvante en el tratamiento de la hiperlipidemia en personas con obesidad (25).

CONCLUSIONES

Es evidente que su alto contenido en fenoles totales esta relacionada con su capacidad antioxidante, en este caso en la inhibición de las LDL. Este estudio representa el primero en Venezuela que evalúa un extracto de *H. sabdariffa* a través de este método biológico, lo que impulsa a evaluar otros extractos y comparar así su efecto con lo hallado en esta investigación.

REFERENCIAS

1. Ghazala R, Rajni C. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. Biomedicine Pharmacothe. 2018; 102:575-6.
2. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységú L. Plant polyphenols: chemical properties biological activities, and synthesis. Angew Chem Int. 2011; 50,586-621

3. Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br J Nutr.*2005; 93,257-66.
4. Pacheco-Coello F, Ramirez-Azuaje D, Pinto-Catari I, Peraza-Marrero M, Orosco-Vargas C. propiedades de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), rica fuente de polifenoles. *Saber.* 2019; 31,44-55.
5. Gaviria C, Ochoa C, Sánchez N, Medina C, Lobo M, Galeano P Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw). *Blacpma.*2005; 8:519-28.
6. Choksi RB, Boylston WH, Rabek WR Widger JP. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim Biophys Acta.*2004; 168: 95-10
7. B. Rojano, K. Zapata, F Cortés, Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (curuba), *Rev Cubana Plantas Med.*2012; 17:408-19.
8. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L. A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.*2014; 165,424-43.
9. Jafarian S, Mortazavi A, Kenari R.S, Rad A. H. E. Total phenolic content & antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces extracts. *J. Appl. Microbiol.*2014; 9(9):165-169.
10. Van Deventer HE, Greg Miller W, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP et al. El colesterol no-HDL demuestra una mejor exactitud en el score de la clasificación del riesgo cardiovascular comparado con el colesterol LDL, directo o calculado, en una población dislipémica. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2011; 45(4):773-84.
11. Armas Rojas NB, de la Noval García R, Dueñas Herrera A, Castillo Nuñez JC, Suárez Medina R, Castillo Guzmán A. Estimación del riesgo cardiovascular mediante tablas de la Organización Mundial de la Salud. Área

- de salud “Héroes del Moncada”. 2011. Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc. 2014 [citado 15 Abr 2013]; 20(1).
12. Argüeso Armesto R, Díaz Díaz JL, Díaz Peromingo JA, Rodríguez González A, Castro Mao M, Diz Lois F. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. Galicia Clin. 2011; 72 (1):23-65
 13. Reyes-Luengas A, Salinas-Moreno Y, Ovando-Cruz M, Arteaga-Garibay R. Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. Agrobiencia. 2015;49: 277-90
 14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult.1965; 16 (3):144-158.
 15. Thaipong K, Boonprakob U, Cisneros L, Hawkins D. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. J Food Comp Anal.2005; 36(4): 254-257.
 16. Ruiz F, Giacomini M, Landaeta M, Bosch V. Susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad de plasma en escolares. Ana Vene Nutri. 2006; 19(1): 1-7.
 17. Albarrán G, Mendoza E, Beltrán J. M. Influence of concentration on the radiolytic decomposition of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in aqueous solution. Rev Colomb Quim. 2014; 43(3): 41-48.
 18. Bresciani L, Calani L, Cossu M, Mena P, Sayegh M, Ray S. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetable and berries. Pharma Nutrition. 2015; 3:11-19.
 19. Zhao CN, Tang GY, Cao S.Y. Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. Antioxidants.2019; 8(7): 200-15.
 20. Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. BJP.2017; 174, 1195–1208.

21. Gosain S, Ircchiaya R, Sharma P. Hypolipidemic effect of ethanolic extract from the leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. in hyperlipidemic rats. Acta Pol Pharm.2010; 67(2):179-4.
22. Ubani C, Joshua E, Oraeki N. Influence of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces on lipid profile of phenobarbitone induces wistar albino rats. J Phar Res.2010; 3(2):319-4.
23. Amiot M.J, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: A systematic review. Obes. Rev. 2016; 17, 573-586.
24. Pacheco-Coello F, Ramirez-Azuaje D, Pinto-Catari C, Peraza-Marrero M, Orosco-Vargas C. Comparación de compuestos fenólicos totales en cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. de Venezuela. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2019; 48 (3):1-10.
25. Herranz-López M, Olivares-Vicente M, Encinar J, Barrañón-Catalán E, Segura-Carretero A, Multi-Targeted Molecular Effects of Hibiscus sabdariffa Polyphenols: An Opportunity for a Global Approach to Obesity. Nutrients 2017; 907(9): 1-26