



## Hemolytic, antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts of calyx from roselle

## Actividad hemolítica, antimicrobiana y antioxidante de extractos acuosos de cálices de jamaica

López-Nahuatt, G.<sup>1</sup>, Sumaya-Martínez, M. T.<sup>2\*</sup>, Jiménez-Ruiz, E. I.<sup>2</sup>, Sánchez-Herrera, L. M.<sup>2</sup>, Bautista-Rosales, P. U.<sup>2</sup>, Medina-Carrillo, R. E.<sup>3</sup>, Guzmán-Ceferino, J.<sup>4</sup>.

Universidad Autónoma de Nayarit, <sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9, C.P. 63780. Xalisco, Nayarit; México; <sup>2</sup>Secretaría de Investigación y Posgrado; <sup>3</sup>Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Ciudad de la Cultura "Amado Nervo" S/N. C.P.63150, Tepic, Nayarit; México. <sup>4</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Teapa km 25. Ra. La Huasteca, 2<sup>a</sup> sec. C.P. 86298. Centro, Tabasco; México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** López-Nahuatt, G., Sumaya-Martínez, M. T., Jiménez-Ruiz, E. I., Sánchez-Herrera, L. M., Bautista-Rosales, P. U., Medina-Carrillo, R. E., Guzmán-Ceferino, J. (2020) Hemolytic, antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts of calyx from roselle. *Revista Bio Ciencias* 7, e995. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e995>



### ABSTRACT

The food industry around the world needs to replace artificial or synthetic additives with natural alternatives, due to consumer demand for natural food ingredients. In the search to propose alternatives that contribute to this problem and diversify the use of hibiscus in the food industry, the concentration of total phenolic compounds, total monomeric anthocyanins and the antioxidant activity of aqueous extracts of hibiscus calyxes of seven varieties, grown in the Mexican states of Nayarit, Oaxaca and Puebla, was evaluated. From these, the variety with the highest antioxidant activity was selected to determine the antimicrobial and hemolytic activity. The highest concentration of total phenolic compounds (TPC), total monomeric anthocyanins (TMA) and antioxidant

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 11<sup>th</sup> 2020.

Accepted/Aceptado: October 19<sup>th</sup> 2020.

Available on line/Publicado: November 18<sup>th</sup> 2020.

#### \*Corresponding Author:

María Teresa Sumaya-Martínez. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Boulevard Tepic-Xalisco S/N. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México. Phone +52 311 211 8800 Ext. 8851. E-mail: [teresumaya@hotmail.com](mailto:teresumaya@hotmail.com) <http://www.uan.edu.mx/>

### RESUMEN

La industria alimentaria alrededor del mundo tiene la necesidad de sustituir los aditivos artificiales o sintéticos por alternativas naturales, debido a la demanda de los consumidores de ingredientes alimentarios naturales. En la búsqueda de alternativas que coadyuven a esta problemática y diversificar el uso de la jamaica en la industria alimentaria se evaluó la concentración de compuestos fenólicos totales, antocianinas monoméricas totales y la actividad antioxidante de extractos acuosos de cálices de jamaica de siete variedades, cultivadas en los estados mexicanos Nayarit, Oaxaca y Puebla; de estas, se seleccionó la variedad con la mayor actividad antioxidante, para determinarle la actividad antimicrobiana y hemolítica. La mayor concentración de compuestos fenólicos totales (TPC), antocianinas monoméricas totales (TMA) y actividad antioxidante por diversos métodos (DPPH•, ABTS•+, FRAP y ORAC), la presentó el extracto de la variedad de jamaica 'cruza negra' de Nayarit, la cual a una concentración de 20,000 µg/mL promovió una reducción en la velocidad de crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* hasta en 51 % respecto al control. Por otra parte, la actividad hemolítica se

activity by various methods (DPPH•, ABTS•+, FRAP and ORAC) were presented by the extract of the 'cruza negra' variety of hibiscus from Nayarit, which at a concentration of 20,000 µg/mL promoted a reduction in the growth rate of an *Escherichia coli* strain by up to 51 % concerning the control. Also, hemolytic activity remained close to 1 % even at a concentration of 6000 µg TPC/mL. Therefore, it can be proposed the use of the aqueous extracts of calyces of hibiscus as a food additive of natural origin, antioxidant, bacteriostatic and very low hemolytic activity.

---

## KEY WORDS

---

Antioxidant activity, *E. coli* O157:H7, food additive, Hibiscus sabdariffa L.

---

## Introduction

The food industry in the European Union, the United States of America (USA) and other parts of the world trend to replace artificial or synthetic additives with natural alternatives. This action is generally driven by consumers who demand natural food ingredients (Harp & Barrows, 2015). The US FDA (Food and Drug Administration), whose main function is to ensure the safety of this type of food additives, defines them as materials that can be of animal, vegetable or mineral origin, which can be obtained by extraction or purification (Kendrick, 2016).

In recent years, bioactive compounds found in plants have many uses in the therapeutic, pharmaceutical and food industries. For example, dried calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) are commercially available and are harnessed by obtaining concentrated extracts that could be used in the food and pharmaceutical industries (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2015). In addition to their nutritional contribution, they contain various compounds, including polyphenols, of which anthocyanins, flavonoids and some organic acids stand out (Duarte-Valenzuela *et al.*, 2016; Galicia-Flores *et al.*, 2008; Mohd-Esa *et al.*, 2010).

Phenolic compounds of roselle have shown significant antioxidant activity, which in some cases is higher compared

mantuvo cercana al 1% aún con una concentración de 6000 µg de TPC/mL. Por lo anterior, se puede proponer el uso de los extractos acuosos de cálices de jamaica como un aditivo alimentario de origen natural, antioxidante y con muy baja actividad hemolítica, sin embargo, a las concentraciones evaluadas no mostraron actividad antimicrobiana.

---

## PALABRAS CLAVE

---

Actividad antioxidante, *E. coli* O157:H7, aditivo alimentario, *Hibiscus sabdariffa* L.

---

## Introducción

La industria alimentaria de la Unión Europea, los Estados Unidos de América (USA) y otras partes del mundo presentan la tendencia de sustituir los aditivos artificiales o sintéticos por alternativas naturales. Esta acción está impulsada en general por los consumidores quienes demandan ingredientes alimentarios naturales (Harp & Barrows, 2015). La FDA (Food and Drug Administration) de USA cuya principal función es asegurar la inocuidad de este tipo de aditivos alimentarios, los define como un material que puede tener origen animal, vegetal o mineral, estos pueden ser obtenidos por extracción o purificación (Kendrick, 2016).

En los últimos años los compuestos bioactivos que se encuentran en las plantas tienen muchos usos en las industrias terapéutica, farmacéutica y alimentaria. Por ejemplo, los cálices secos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) están disponibles comercialmente y se aprovechan obteniendo extractos concentrados que podrían usarse en las industrias alimentaria y farmacéutica (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2015). Estos además de su aporte nutricional, contienen diversos compuestos, entre ellos los polifenólicos, de los cuales destacan las antocianinas, los flavonoides y algunos ácidos orgánicos (Duarte-Valenzuela *et al.*, 2016; Galicia-Flores *et al.*, 2008; Mohd-Esa *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos de la jamaica han evidenciado importante actividad antioxidante, que en algunos casos es mayor comparada con otras especies vegetales reconocidas por su poder antioxidante, como las moras azules y los arándanos (Medina-Carrillo *et al.*, 2013; Reyes-Luengas *et al.*, 2015; Wolfe *et al.*, 2008). Así mismo,

to other plant species recognized for their antioxidant power, such as blueberries and bilberries (Medina-Carrillo *et al.*, 2013; Reyes-Luengas *et al.*, 2015; Wolfe *et al.*, 2008). Likewise, its antimicrobial activity has been evidenced when evaluated against bacterial species such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Vibrio cholerae* (Alshami & Alharbi, 2014a; Gómez-Aldapa *et al.*, 2017; Sulaiman *et al.*, 2014; Rangel-Vargas *et al.*, 2017ab). Therefore, extracts from roselle calyxes are considered to represent an alternative as a food additive that could prolong the shelf life of foods such as meat products (Bozkurt & Belibağlı, 2009; Higginbotham *et al.*, 2014a; Jung & Joo, 2013).

As mentioned before, food additives must be safe, in this context, there are reports of some cytotoxic activity of phenolic compounds, it is known that depending on the concentration they can present different activities, this depending on the type of tissue and the solvent used for its extraction (Stankovic *et al.*, 2012). The toxicity or cytotoxicity of total phenolic compounds affects human peripheral blood lymphocytes, as well as healthy human fetal lung fibroblasts and even cell damage in DNA (Goodenow *et al.*, 2020; Grujičić *et al.*, 2020).

Therefore, to propose the use of roselle calyxes as a food additive, this research aims to evaluate the concentration of bioactive compounds and the antioxidant activity of aqueous extracts of seven roselle varieties cultivated in three different locations and to select the best one to determine its antimicrobial and hemolytic activity.

## Material and Methods

### Vegetal material

In this research, we worked with calyxes of the varieties studied in the SAGARPA-CONACYT Project "Validation of varieties of *Hibiscus sabdariffa* L. with a high concentration of bioactive compounds, high yield and tolerant to diseases, determination of pests and diseases and innovation of agricultural machinery for sustainable production" (Table 1), which presented the best agricultural characteristics of yield, resistance to pathogens and pests. Dehydrated calyxes were received from three varieties of each of the three origins (Nayarit, Oaxaca and Puebla), which were cultivated during the

su actividad antimicrobiana se ha evidenciado al evaluarse contra especies bacterianas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Vibrio cholerae* (Alshami & Alharbi, 2014a; Gómez-Aldapa *et al.*, 2017; Sulaiman *et al.*, 2014; Rangel-Vargas *et al.*, 2017ab). Por lo cual, se considera que los extractos de cálices de jamaica representan una alternativa como aditivo alimentario que pudiera prolongar la vida de anaquel de alimentos como los productos cárnicos (Bozkurt & Belibağlı, 2009; Higginbotham *et al.*, 2014a; Jung & Joo, 2013).

Como se mencionó anteriormente, los aditivos alimentarios deben ser inocuos, en relación a esto, existen reportes de cierta actividad citotóxica de los compuestos fenólicos. Se sabe, que dependiendo de la concentración pueden presentar diferentes actividades, esto en función del tipo de tejido y del solvente utilizado para su extracción (Stankovic *et al.*, 2012). La toxicidad o citotoxicidad de los compuestos fenólicos totales afecta los linfocitos de sangre periférica humana, así como los fibroblastos de pulmón fetal humano sano, provocando daño celular en el DNA (Goodenow *et al.*, 2020; Grujičić *et al.*, 2020).

Por lo anterior, con la intención de proponer el uso de los cálices de jamaica como aditivo alimentario, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la concentración de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de extractos acuosos de siete variedades de jamaica cultivadas en tres localidades distintas y seleccionar la mejor para determinar su actividad antimicrobiana y hemolítica.

## Material y Métodos

### Material vegetal

En esta investigación se trabajó con cálices de las variedades estudiadas en el Proyecto SAGARPA-CONACYT "Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de compuestos bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable" (Tabla 1), que presentaron las mejores características agrícolas de rendimiento, resistencia a patógenos y plagas. Se recibieron los cálices deshidratados de tres variedades de cada una de las tres procedencias (Nayarit, Oaxaca y Puebla), que fueron cultivados durante el periodo julio a diciembre 2015, los cuales se almacenaron a -18 °C para evitar modificaciones o degradación química hasta realizar las extracciones.

**Table 1.**  
**Study varieties and origin of the samples.**

**Tabla 1.**  
**Variedades de estudio y procedencia de las muestras.**

| Provenance | Nayarit     | Oaxaca            | Puebla        |
|------------|-------------|-------------------|---------------|
|            | UAN 8       | UAN 8             | Rojo x morado |
| Varieties  | Cruza Negra | Tempranilla       | Cruza negra   |
|            | UAN 31      | Negra Quiviquinta | UAN 12        |

period July to December 2015. They were stored at -18 °C to avoid modifications or chemical degradation until the extractions were performed.

#### Preparation of extracts

For the extraction process the methodology proposed by Prenesti *et al.* (2007), was considered, which consisted in weighing 1 g of dried calyces in an analytical balance (Sartorius, BP 221S) and placed in reaction tubes, to which boiling distilled water was added until it was measured at 50 mL, then closed and incubated in a water bath with boiling water for 3 min. They were then placed in ice water at 0°C to drastically decrease the temperature and finish the extraction. The extracts were filtered through a PVDF membrane with a pore size of 0.22 µm and stored at -20 °C until analysis.

The concentration of total phenolic compounds and total monomeric anthocyanins were determined by triplicate, for the case of the antioxidant activity, this was done by four methodologies. From the results of these variables, it was chosen the variety with the higher content of bioactive compounds and better antioxidant capacity to perform the determination of antimicrobial and hemolytic activity.

#### Total Phenolic Compounds (TPC)

It was determined according to the method of Stintzing *et al.* (2005), which uses the reagent Folin-Ciocalteu. 100 µL of the extract were taken, 500 µL of Folin-Ciocalteu solution (1:10 in distilled water) and 400 µL of sodium carbonate solution (7.5 %) were added; then, the samples were mixed and incubated at room temperature for 30 min. Afterward, absorbance measurements were made at 765 nm in a multiple detection microplate reader (BioTek, Synergy HTX) with

#### Preparación de extractos

Para el proceso de extracción se consideró la metodología propuesta por Prenesti *et al.* (2007), la cual consistió en pesar 1 g de cálices secos en una balanza analítica (Sartorius, BP 221S) y se colocaron en tubos de reacción, a los que se le adicionó agua destilada en ebullición hasta que se aforó a los 50 mL, después se cerraron y fueron incubación a baño maría con agua en ebullición durante 3 min. Posteriormente, se colocaron en agua con hielo a 0°C para disminuir drásticamente la temperatura y terminar la extracción. Los extractos se filtraron mediante una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.22 µm y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Se determinó por triplicado la concentración de compuestos fenólicos totales, la concentración de antocianinas monoméricas totales y en el caso de la actividad antioxidante, esta se realizó por cuatro metodologías. A partir de los resultados de estas variables, se eligió a la variedad con mayor contenido de compuestos bioactivos y mejor capacidad antioxidante para realizar la determinación de actividad antimicrobiana y hemolítica.

#### Compuestos fenólicos totales (TPC)

Se determinó de acuerdo al método de Stintzing *et al.* (2005), el cual utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu. Se tomaron 100 µL de extracto, se le agregaron 500 µL de solución Folin-Ciocalteu (1:10 en agua destilada) y 400 µL de solución de carbonato de sodio (7.5 %); en seguida, las muestras se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido el tiempo se realizaron las mediciones de absorbancia a 765 nm en un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5. Los TPC se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (AGE)/g de cálices

Biotek Gen5 software. The TPC were expressed as mg gallic acid (AGE)/g dry weight (d.w.) equivalents, so it was compared with a gallic acid calibration curve from 0 to 400 mg/L.

#### Total Monomeric Anthocyanins (TMA)

The TMA were determined by spectrophotometry according to the protocol described by Giusti & Wrolstad (2001). 0.5 g of dry calyces were weighed on an analytical balance (Sartorius, BP 221S) and aqueous extractions were performed with 50 mL of distilled water during 3 h with continuous agitation and filtered in 0.22 µm PVDF membranes. For the analysis, 50 µL of the filtered solution were taken in two test tubes and mixed with 450 µL of the buffer solutions of pH 1.0 and pH 4.5 (dilution factor, Df=10). In both solutions, absorbance was measured at 520 and 700 nm wavelengths in a multiple detection microplate reader (BioTek, Synergy HTX) with the Biotek Gen5 program. The pigment concentration was calculated as mg delphinidin-3-glucoside (D3G)/g of calyces on d.w. with the following equation.

$$CA = \frac{A * Mw * Df * 1000}{\epsilon * l}$$

Where:

CA= Total monomeric anthocyanin concentration

Df= Dilution factor

A= Absorbance ( $A_{520}$  pH 1 –  $A_{700}$  pH 1) – ( $A_{520}$  pH 4.5 –  $A_{700}$  pH 4.5)

l= Path length of light in cell, in cm (0.64)

ε= Molar absorption coefficient, 27 481 L/(mol\*cm) for delphinidin-3-glucoside.

Mw= Molecular weight of delphinidin-3-glucoside (465.2 g\*mol<sup>-1</sup>).

base seca (d.w.), por lo que se comparó con una curva de calibración de ácido gálico de 0 a 400 mg/L.

#### Antocianinas monoméricas totales (TMA)

Las TMA se determinaron por espectrofotometría de acuerdo al protocolo descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, BP 221S) 0.5 g de cálices secos y se realizaron extracciones acuosas con 50 mL de agua destilada durante 3 h con agitación continua y se filtraron en membranas PVDF de 0.22 µm. Para el análisis se tomaron 50 µL de la solución filtrada en dos tubos de ensayo y se mezclaron con 450 µL de las soluciones amortiguadoras de pH 1.0 y pH 4.5 (factor de dilución, Df=10). En ambas soluciones se midió la absorbancia a longitudes de onda de 520 y 700 nm en un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5. La concentración del pigmento se calculó como mg delphinidina-3-glucósido (D3G)/g de cálices en d.w. con la siguiente ecuación.

Donde:

CA= Concentración de antocianinas monoméricas totales

Df= Factor de dilución

A= Absorbancia ( $A_{520}$  pH 1 –  $A_{700}$  pH 1) – ( $A_{520}$  pH 4.5 –  $A_{700}$  pH 4.5)

l= Longitud de paso de la luz en la celda, en cm (0.64)

ε= Coeficiente de absorción molar 27 481 L/(mol\*cm) para delphinidina-3-glucósido.

Mw= Peso molecular de la delphinidina-3-glucósido (465.2 g\*mol<sup>-1</sup>).

#### DPPH• Free Radical Scavenging

For this analysis, the methodology according to Morales and Jimenez-Perez (2001) was considered. The technique consisted of preparing a solution of DPPH• at a concentration of 7.4 mg/100 mL in ethanol, which was stirred for 10 min. Afterward, 100 µL of the roselle extracts were then placed in vials, 500 µL of the DPPH• solution were added to them and they were vigorously stirred, to let them react at room temperature during one hour. After that, the vials were centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes at room temperature; subsequently, the absorbance of the supernatant was measured at a wavelength of 520 nm in a multiple detection microplate

#### Atrapamiento del radical DPPH•

Para este análisis se consideró la metodología según Morales y Jiménez-Pérez (2001). La técnica consistió en preparar una solución de DPPH• a una concentración de 7.4 mg/100 mL en etanol, la cual se agitó por 10 min. Posteriormente se colocaron 100 µL de los extractos en viales, se les agregaron 500 µL de la solución de DPPH• y se agitaron vigorosamente, para dejar reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo, lo viales se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente; posteriormente, la absorbancia del sobrenadante se midió a una longitud de onda de 520 nm en un lector de microplacas de detección múltiple

reader (BioTek, Synergy HTX) with the Biotek Gen5 program. The free radical DPPH• scavenger capacity was obtained from a standard Trolox curve and the results were expressed in mg equivalent to Trolox (TE)/g of calyx d.w.

#### ABTS•+ Free Radical Scavenging

The scavenging capacity of the stable cation ABTS•+ was obtained with the technique of Re *et al.* (1999) and Kuskoski *et al.* (2005) after the reaction of ABTS•+ (7 mM) in potassium persulfate (2.45 mM), incubated at 4 °C in the dark for 16 h. Once the ABTS•+ radical was formed, it was diluted with ethanol until an absorbance value of 0.70 ( $\pm$  0.1) at 754 nm was obtained. 20  $\mu$ L of extract was added to 980  $\mu$ L of the ABTS•+ radical dilution. The absorbance was measured at 754 nm in a multiple detection microplate reader (BioTek, Synergy HTX) with the Biotek Gen5 program at 7 min of incubation. The ABTS•+ free radical scavenging capacity was determined with a standard ascorbic acid curve with concentrations of 0, 5, 10, 20 and 30 mg/100 mL and the results were expressed as mg equivalent to ascorbic acid (AAE)/g calyx d.w.

#### Ferric reducing activity power (FRAP)

It was determined by the method of Hinneburg *et al.* (2006). It consisted in taking an aliquot of 25  $\mu$ L of each extract, to be mixed with 63  $\mu$ L of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 63  $\mu$ L of potassium hexacyanoferrate [K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>] at 1 %. After a 30 min incubation at 50 °C, 63  $\mu$ L of 10 % trichloroacetic acid were added and left to incubate for 10 min at room temperature. Then 63  $\mu$ L were taken from the supernatant and 63  $\mu$ L of water and 12.5  $\mu$ L of 0.1 % ferric chloride were added, to perform absorbance measurements in a multiple detection microplate reader (BioTek, Synergy HTX) with the Biotek Gen5 program, which were performed at a wavelength of 700 nm. The capacity to reduce iron (III) was expressed as mg equivalent of ascorbic acid (AAE)/g of calyxes in d.w. For this, a standard curve of ascorbic acid was made at concentrations from 0 to 25 mg/100 mL.

#### Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

The methodology proposed by Held (2005) was applied to this determination. 25  $\mu$ L of the sample extract and 150  $\mu$ L of fluorescein at 75 nM were taken, these were allowed to react for 10 min at 37 °C and then 25  $\mu$ L

(BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5. La capacidad de atrapamiento del radical libre DPPH• se obtuvo a partir de una curva estándar de Trolox y los resultados se expresaron en mg equivalentes a Trolox (TE)/g de cálices d.w.

#### Atrapamiento del radical ABTS•+

La capacidad de atrapamiento del catión estable ABTS•+ se obtuvo con la técnica de Re *et al.* (1999) y Kuskoski *et al.* (2005) tras la reacción de ABTS•+ (7 mM) en persulfato de potasio (2.45 mM), incubado a 4 °C en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 ( $\pm$  0.1) a 754 nm. Se añadieron 20  $\mu$ L de extracto a 980  $\mu$ L de la dilución del radical ABTS•+. La absorbancia se midió a 754 nm en un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5 a los 7 min de incubación. La capacidad de atrapamiento de radical libre ABTS•+ se determinó con una curva estándar de ácido ascórbico con concentraciones de 0, 5, 10, 20 y 30 mg/100 mL y los resultados se expresaron como mg equivalentes a ácido ascórbico (AAE)/g cálices d.w.

#### Capacidad de reducción del ion Fe III a ion Fe II (FRAP)

Se determinó por el método de Hinneburg *et al.* (2006). Este consistió en tomar una alícuota de 25  $\mu$ L de cada extracto, para mezclar con 63  $\mu$ L de búfer de fosfato de sodio (0.2 M, pH 6.6) y 63  $\mu$ L de hexacianoferrato de potasio [K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>] al 1 %. Después de una incubación de 30 min a 50 °C se agregaron 63  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 10 % y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se tomaron 63  $\mu$ L del sobrenadante y se agregaron 63  $\mu$ L de agua y 12.5  $\mu$ L de cloruro férrico 0.1 %, para realizar las mediciones de absorbancia en un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5, la cuales se realizaron a una longitud de onda de 700 nm. La capacidad de reducir el hierro (III) se expresó como mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/g de cálices en d.w. Para lo cual se realizó una curva estándar de ácido ascórbico a concentraciones de 0 a 25 mg/100 mL.

#### Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

Para esta determinación se aplicó la metodología propuesta por Held (2005). Se tomaron 25  $\mu$ L del extracto de la muestra y 150  $\mu$ L de fluoresceína a 75 nM, estos se dejaron reaccionar durante 10 min a 37 °C y posteriormente

of AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) was added at a concentration of 75 mM and incubated at 37 °C. Fluorescence measurements were made every 60 s for 1 h using a multiple detection microplate reader (BioTek, Synergy HTX) with the Biotek Gen5 program. Each assay was carried out by triplicate and a calibration curve from 0 to 100 µmol of Trolox was made. The final ORAC values were expressed as µmol trolox equivalent (TE)/g of calyx d.w.

#### **Selection of the variety with the highest concentration of bioactive compounds**

After analyzing the concentration of bioactive compounds and the antioxidant activity of the extracts, the 'cruza negra' roselle, cultivated in the Mexican states Nayarit and Puebla, was chosen to carry out the analysis of the antimicrobial and hemolytic activity, with the purpose of detect differences related with the origin on these two variables.

#### **Antimicrobial activity by disk-diffusion agar**

The evaluation of antimicrobial activity was conducted based on the procedures of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2012). Concentrations of 20, 40 and 80 mg TPC/mL for the Nayarit sample and 15, 30 and 60 mg TPC/mL for the Puebla sample were evaluated. Ceftriaxone, which is a broad-spectrum antibiotic at a concentration of 30 µg/mL, was used as a positive control and sterile distilled water was used as a negative control.

The strains (Table 2) were reactivated in Muller-Hinton broth during 24 h at 37 °C, after that time, the bacterial concentration was adjusted to  $1.5 \times 10^8$  cells/mL by means of MacFarland scale 0.5 (Guzmán-Ceferino *et al.*, 2019). After adjusting the turbidity of the inoculum, 100 µL of the inoculum were transferred to Petri dishes with the already solidified Muller-Hinton Agar (MHA). Then, the disks impregnated with 15 µL of the corresponding treatment were placed. Incubation was carried out in an inverted position at 37 °C for 24 h. After 24 h, the inhibition halos were measured with a digital Vernier calibrator (Surtek), using light reflected on a black background. The diameters of the inhibition halos were translated into the resistant, intermediate, moderately sensitive or sensitive categories according to the interpretative criteria of the NCCLS tables (2012). The analyses were made by 6 repetitions.

se adicionaron 25 µL de AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidroclorado a una concentración de 75 mM y se incubó a 37 °C. Las mediciones de la fluorescencia se realizaron cada 60 s durante 1 h mediante un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HTX) con el programa Biotek Gen5. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y se realizó una curva de calibración de 0 a 100 µmol de Trolox. Los valores finales de ORAC se expresaron como µmol equivalentes de Trolox (TE)/g de cálices d.w.

#### **Selección de la variedad con mayor concentración de compuestos bioactivos**

Después de analizar la concentración de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de los extractos, se eligió la jamaica 'cruza negra', cultivada en Nayarit y en Puebla, para realizar el análisis de la actividad antimicrobiana y hemolítica, con el propósito de determinar si existía diferencia a causa de la procedencia sobre estas dos variables.

#### **Actividad antimicrobiana por difusión en agar**

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con base en los procedimientos de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2012). Se evaluaron las concentraciones de 20, 40 y 80 mg TPC/mL para la muestra de Nayarit y de 15, 30 y 60 mg TPC/mL para la muestra de Puebla. Como control positivo se utilizó ceftriaxona, que es un antibiótico de amplio espectro a una concentración de 30 µg/mL y como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

Las cepas (Tabla 2) se reactivaron en caldo Muller-Hinton durante 24 h a 37 °C, transcurrido ese tiempo, se ajustó la concentración bacteriana a  $1.5 \times 10^8$  células/mL mediante la escala MacFarland 0.5 (Guzmán-Ceferino *et al.*, 2019). Después de ajustar la turbidez del inóculo, se transfirieron 100 µL del mismo a cajas *Petri* con el agar Muller-Hinton (MHA) ya solidificado. En seguida se colocaron los discos impregnados con 15 µL del tratamiento correspondiente. La incubación se realizó en posición invertida a 37 °C durante 24 h. Al cabo de las 24 h se midieron los halos de inhibición con la ayuda de un calibrador Vernier digital (Surtek), utilizando luz reflejada sobre fondo negro. Los diámetros de los halos de inhibición se tradujeron a las categorías resistente, intermedio, moderadamente sensible o sensible de acuerdo a los criterios interpretativos de las tablas del NCCLS (2012). Los análisis se hicieron por 6 repeticiones.

**Table 2.**  
**Bacteria from the American Type Culture Collection (ATCC).**

**Tabla 2.**  
**Bacterias de colección American Type Culture Collection (ATCC).**

| Bacteria                       | ATCC code |
|--------------------------------|-----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 6538      |
| <i>Escherichia coli</i>        | 25922     |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i>   | 15442     |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | 10708     |
| <i>Escherichia coli</i>        | 11229     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | 700603    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | BAA-44    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>   | 29212     |

Based on the results of antimicrobial activity by agar diffusion, roselle extracts were evaluated on the growth kinetics of *E. coli*.

#### Effect of extracts on microbial growth kinetics

The inoculum was prepared from a strain of *Escherichia coli* O157:H7 at a concentration of  $10^5$  cells/mL in trypticase soy broth from which 200  $\mu$ L were taken and placed in the wells of a microplate, to which 50  $\mu$ L of the extract (Nayarit or Puebla) or sterile distilled water (control) was added as appropriate. Absorbance measurements were made at 600 nm in a microplate reader (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific). Measurements were performed every hour for 24 hours at 37 °C with low agitation 10 seconds before each measurement. With these data, a growth kinetic was constructed for each case (Rufián-Henares & Morales, 2008).

To establish the best antimicrobial activity, growth rate calculations were made as described by Madigan *et al.* (2003) as a function of generation time with the following equation.

$$n = (N_f - N_i / \log 2)$$

$$g = n/t$$

Where:

n= Number of generations

$N_i$ = Initial number of cells (log. cells/mL)

A partir de los resultados de la actividad antimicrobiana por difusión en agar, se evaluaron los extractos de jamaica sobre la cinética de crecimiento de *E. coli*.

#### Efecto de los extractos sobre la cinética de crecimiento microbiano

Se preparó un inóculo de una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 a una concentración de  $10^5$  células/mL en caldo soya tripticaseína de la cual se tomaron 200  $\mu$ L y se colocaron en los pocillos de una microplaca, a esto se les adicionó 50  $\mu$ L del extracto (Nayarit o Puebla) o agua destilada estéril (control) según correspondiera. Se realizaron las mediciones de absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific). Las mediciones se realizaron a cada hora durante 24 h a 37 °C con baja agitación 10 segundos antes de cada medición. Con estos datos, se construyó una cinética de crecimiento para cada caso (Rufián-Henares & Morales, 2008).

Para establecer la mejor actividad antimicrobiana se procedió a hacer los cálculos de velocidad de crecimiento según lo descrito por Madigan *et al.* (2003) en función del tiempo de generación con la siguiente ecuación.

Donde:

n= Número de generaciones

$N_i$ = Número inicial de células (log. células/mL)



$N_f$  = Final number of cells (log. cells/mL)

$g$  = Generation time (hours)

$t$  = Measurement time (hours)

$N_f$  = Número final de células (log. células/mL)

$g$  = Tiempo de generación (horas)

$t$  = Tiempo de la medición (horas)

### Hemolysis test

The methodology employed by Múzquiz-Ramos *et al.* (2013) was followed, using human blood (5 mL) that was extracted by puncture into the arm vein of healthy, non-smoking adult volunteers; the blood was collected in heparinized tubes (COVIDEN Monoject, with 0.05 mL of 15% EDTA). Concentrations of 1,000, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 and 10,000  $\mu\text{g}$  TPC/mL of aqueous extracts from calyxes of the roselle 'cruza negra' variety cultivated in the states of Nayarit and Puebla were evaluated. The assay procedure consisted in adding Alsever's solution, the extracts and the erythrocyte package in each test tube (avoiding cell damage). The mixture was then incubated at 37 °C for 60 min in a water bath. Finally, the tubes were centrifuged (Eppendorf, 5804R) at 3,000 g for 4 min at room temperature and 1 mL was taken from the supernatant to be read in a spectrophotometer (Hach, DR5000) at 415 nm. This analysis was done by triplicate. The hemolytic activity was expressed as a percentage.

### Prueba de hemólisis

Se siguió la metodología empleada por Múzquiz-Ramos *et al.* (2013), utilizando sangre humana (5 mL) que se extrajo por punción en la vena del brazo de adultos voluntarios, sanos, no fumadores; la sangre se recogió en tubos heparinizados (COVIDEN Monoject, con 0.05 mL de EDTA al 15 %). Se evaluaron las concentraciones de 1,000, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 y 10,000  $\mu\text{g}$  de TPC/mL de los extractos acuosos de cálices de jamaica 'cruza negra' cultivada en los estados de Nayarit y Puebla. El procedimiento del ensayo consistió en añadir en cada tubo de ensayo la solución de Alsever, los extractos y el paquete de eritrocitos (evitando provocar daño celular). A continuación, la mezcla se incubó a 37 °C por 60 min en baño de agua. Finalmente, los tubos se centrifugaron (Eppendorf, 5804R) a 3,000 g por 4 min a temperatura ambiente y del sobrenadante se tomó 1 mL para su lectura en un espectrofotómetro (Hach, DR5000) a 415 nm. Este análisis se hizo por triplicado. La actividad hemolítica se expresó en porcentaje.

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{\text{sample} - \text{negative control}}{\text{positive control} - \text{negative control}} * 100$$

Where:

Sample = Sample absorbance

Negative control = Negative control absorbance

Positive control = Positive control absorbance

Donde:

Sample = Absorbancia de la muestra

Negative control = Absorbancia del control negativo

Positive control = Absorbancia del control positivo

### Statistical analysis

The results of each of the assays are expressed as means  $\pm$  standard deviation, which were arranged in a completely randomized design to be analyzed by an analysis of variance (ANOVA) with a  $\alpha=0.05$ . When significant differences were found, the Tukey's honestly significant difference test (Tukey's HSD), was applied. All analyses were performed in IBM's SPSS statistical software version 20. With the exception of antimicrobial activity by agar diffusion where results did not allow statistical analysis and are expressed by inhibition halo size (mm).

In the evaluation of the antioxidant activity of the nine samples of roselle, each sample of roselle was considered as independent variables and the TPC, TMA, DPPH';

### Análisis estadístico

Los resultados de cada uno de los ensayos se expresan como medias  $\pm$  desviación estándar, los cuales se arreglaron en un diseño completamente al azar para analizarse mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un  $\alpha=0.05$ . Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de diferencias mínima significativa (HSD) de Tukey. Todos los análisis se realizaron en el software estadístico SPSS de IBM versión 20. Con la excepción de actividad antimicrobiana por difusión en agar donde los resultados no permitieron el análisis estadístico y se expresan por tamaño del halo de inhibición (mm).

En la evaluación de la actividad antioxidante de las nueve muestras de jamaica se consideró como variables independientes cada muestra de jamaica y como las

ABTS<sup>+</sup>, FRAP and ORAC as dependent variables. Additionally, Pearson correlation coefficient was established between each antioxidant activity against the concentration of TPC and TMA.

In the analysis of the effect of the extracts on the kinetics of microbial growth, it was considered as an independent variable the antimicrobial source (roselle 'cruza negra' extracts from Nayarit and Puebla), and as a dependent variable the speed of bacterial growth (calculated with the kinetics of bacterial growth).

In the hemolytic activity it was considered as independent variables the origins (Nayarit and Puebla) and the concentrations (1000, 2000, 4000, 6000, 8000 and 10000 µg TPC/mL of extract) and as dependent variable the percentage of hemolysis.

## Results and Conclusion

### Total Phenolic Compounds (TPC)

Significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) were found between the TPC content in the varieties and origins of the roselle calyces, as shown in Table 3. Results ranged from  $20.6 \pm 0.3$  to  $41.1 \pm 0.5$  mg AGE/g of calyces d.w. The 'cruza negra' roselle farmed in Nayarit presented higher TPC concentration, followed by 'negra quiviquinta' and 'tempranilla' varieties grown in Oaxaca. While 'rojo x morada' and 'UAN 12' cultivated in Puebla showed the lowest concentrations ( $p < 0.05$ ). This difference in TPC concentration may be due to soil and climatic conditions and to the production cycle of these varieties, since these characteristics influence the content of bioactive compounds as reported by Díaz-Aguilar (2016) and Rai *et al.* (2008).

These results are similar to those reported by Borrás-Linares *et al.* (2015), Sindi *et al.* (2014) and Bergmeier *et al.* (2014). In addition, it should be mentioned that the values reported here are higher than those found by Medina-Carrillo *et al.* (2015) and Díaz-Aguilar (2016) who worked with some of the varieties analyzed in this work.

### Total Monomeric Anthocyanins (TMA)

The concentration of TMA present in the aqueous extracts of roselle calyces from Nayarit, Oaxaca and Puebla are presented in Table 3, in which it is observed that significant statistical differences were found ( $p < 0.05$ ).

variables dependientes los TPC, TMA, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, FRAP y ORAC. Adicionalmente se establecieron los coeficientes de correlación de Pearson entre cada actividad antioxidante contra la concentración de TPC y TMA.

En el análisis del efecto de los extractos sobre la cinética de crecimiento microbiano, se consideró como variable independientemente la fuente antimicrobiana (extractos jamaica 'cruza negra' procedentes de Nayarit y Puebla) y como variable dependiente la velocidad de crecimiento bacteriana (calculada con la cinética de crecimiento bacteriano).

En la actividad hemolítica se consideró como variables independientes las procedencias (Nayarit y Puebla) y las concentraciones (1000, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 µg TPC/mL de extracto) y como variable dependiente el porcentaje de hemólisis.

## Resultados y Discusión

### Compuestos fenólicos totales (TPC)

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre el contenido de TPC de los cálices de jamaica de las variedades y de sus procedencias, como se observa en la Tabla 3. Los resultados oscilan entre  $20.6 \pm 0.3$  a  $41.1 \pm 0.5$  mg AGE/g de cálices d.w. La jamaica 'cruza negra' cultivada en Nayarit presentó mayor concentración de TPC, seguida por las variedades 'negra quiviquinta' y 'tempranilla' cultivadas en Oaxaca. Mientras que 'rojo x morada' y 'UAN 12' cultivadas en Puebla mostraron las menores concentraciones ( $p < 0.05$ ). Esta diferencia en la concentración de TPC se puede deber a las condiciones edafoclimáticas y al ciclo de producción del cultivo de esas variedades, ya que dichas características influyen el contenido de compuestos bioactivos según lo reportado por Díaz-Aguilar (2016) y Rai *et al.* (2008).

Estos resultados son similares a los reportados por Borrás-Linares *et al.* (2015), Sindi *et al.* (2014) y Bergmeier *et al.* (2014). Además, cabe mencionar que los valores aquí reportados son mayores a los encontrados por Medina-Carrillo *et al.* (2015) y Díaz-Aguilar (2016) quienes trabajaron con algunas de las variedades analizadas en este trabajo.

### Antocianinas monoméricas totales (TMA)

La concentración de TMA presentes en los extractos acuosos de cálices de jamaica procedentes de Nayarit, Oaxaca y Puebla se presenta en la Tabla 3, en la cual se observa que se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

The values fluctuated in an interval of  $0.4 \pm 0.2$  to  $9.3 \pm 0.8$  mg D3G/g of calyces d.w. The 'cruza negra' and 'UAN 31' varieties cultivated in Nayarit, as well as the 'cruza negra' and 'UAN 12' varieties cultivated in Puebla, did not show significant differences between them ( $p > 0.05$ ).

Medina-Carrillo *et al.* (2015) determined the TMA concentration of 'cruza negra', 'UAN 08' and 'UAN 31' varieties cultivated in Nayarit, reporting an average of 14.9, 4.0 and 11.2 mg D3G/g of calyces d.s. respectively. Díaz-Aguilar (2016) also determined TMA concentration (mg D3G/g of calyces d.w.) in 'cruza negra' and 'UAN 08' cultivated in Nayarit, reporting values of 10.6 and 3.5, respectively. In the varieties 'negra quiviquinta' and 'UAN 08' cultivated in Oaxaca, it reported 6.4 and 1.9 respectively, and for 'cruza negra' cultivated in Puebla, it found a TMA concentration of 7.3 mg D3G/g of calyces d.w. These results are higher than the ones reported in the present work, except for the cases 'UAN 08' from Oaxaca and 'cruza negra' from Puebla reported by Díaz-Aguilar (2016). According to Díaz-Aguilar (2016) and Rai *et al.* (2008), the difference in the TMA concentration can be due to the soil and climate conditions and to the production cycle of these varieties, since these characteristics influence the content of bioactive compounds. Frank *et al.* (2012) reported the concentration of delphinidin-3-glucoside in 2.4 mg/g of roselle calyces. On the other hand, Borrás-Linares *et al.* (2015) evaluated 25 varieties from different states of Mexico, finding a concentration of delphinidin from 0 to 35.3 mg/g of calyces, values that are similar to those found in this research.

#### DPPH• Free Radical Scavenging

With respect to the DPPH• radical scavenging capacity of the aqueous extracts of roselle calyces, significant statistical differences were found, the scavenging values were  $114.2 \pm 10.9$  to  $261.8 \pm 9.1$   $\mu\text{mol TE/g}$  of d.w. calyces. (Table 3). The 'cruza negra' roselle grown in Nayarit showed the highest scavenger capacity of the DPPH• radical, in second place 'UAN 31' also grown in Nayarit, followed by 'negra quiviquinta' from Oaxaca and 'cruza negra' from Puebla ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis showed a strong correlation with TPC ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.01$ ), while the correlation with TMA was weak and not significant ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.10$ ). The antioxidant activity of phenolic compounds is widely demonstrated. However, this activity depends largely on their chemical structure and not all have similar activities to eliminate several radicals (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012).

Los valores fluctuaron en un intervalo de  $0.4 \pm 0.2$  a  $9.3 \pm 0.8$  mg D3G/g de cálices d.w. Las variedades 'cruza negra' y 'UAN 31' cultivadas en Nayarit, así como las 'cruza negra' y 'UAN 12' cultivadas en Puebla, no presentaron diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ ).

Medina-Carrillo *et al.* (2015) determinaron la concentración de TMA de las variedades 'cruza negra', 'UAN 08' y 'UAN 31' cultivadas en Nayarit, reportando una media de 14.9, 4.0 y 11.2 mg D3G/g de cálices d.w., respectivamente. Díaz-Aguilar (2016) también determinó la concentración de TMA como mg D3G/g de cálices d.w. en 'cruza negra' y 'UAN 08' cultivadas en Nayarit, reportando valores de 10.6 y 3.5, respectivamente. En las variedades 'negra quiviquinta' y 'UAN 08' cultivadas en Oaxaca, reportó 6.4 y 1.9 respectivamente y para 'cruza negra' cultivada en Puebla encontró una concentración de TMA en 7.3 mg D3G/g de cálices d.w. Estos resultados son mayores a los reportados en el presente trabajo, excepto para los casos 'UAN 08' de Oaxaca y 'cruza negra' de Puebla del trabajo de Díaz-Aguilar (2016). Según lo reportado por Díaz-Aguilar (2016) y Rai *et al.* (2008), la diferencia en la concentración de TMA se puede deber a las condiciones edafoclimáticas y al ciclo de producción del cultivo de esas variedades, ya que dichas características influyen el contenido de compuestos bioactivos. Frank *et al.* (2012) reportaron la concentración de delfinidina-3-glucósido en 2.4 mg/g de cálices de jamaica. Por otra parte, Borrás-Linares *et al.* (2015) evaluaron 25 variedades procedentes de distintos estados de la república mexicana, encontrando una concentración de delfinidinas desde 0 a 35.3 mg/g de cálices, valores que son similares a los encontrados en esta investigación.

#### Atrapamiento del radical DPPH•

Con respecto a la capacidad de atrapamiento del radical DPPH• de los extractos acuosos de cálices de jamaica se encontraron diferencias estadísticas significativas, los valores de atrapamiento fueron de  $114.2 \pm 10.9$  a  $261.8 \pm 9.1$   $\mu\text{mol TE/g}$  de cálices d.w. (Tabla 3). La jamaica 'cruza negra' cultivada en Nayarit mostró la mayor capacidad de atrapamiento del radical DPPH•, en segundo lugar 'UAN 31' también cultivada en Nayarit, seguida por las variedades 'negra quiviquinta' de Oaxaca y 'cruza negra' de Puebla ( $p < 0.05$ ). El análisis de correlación evidenció una fuerte correlación con los TPC ( $r = 0.90$ ,  $p < 0.01$ ), mientras que la correlación con las TMA fue débil y no significativa ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.10$ ). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está ampliamente demostrada. Sin embargo, esta actividad depende en gran medida de su estructura química y no todas poseen actividades similares para eliminar diversos radicales (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2012).

Sindi *et al.* (2014) reported that aqueous extractions are better for evaluating DPPH• radical scavenging activity than extractions in formic acid, acidified methanol, 80 % methanol and 70 % ethanol. On the other hand, Borrás-Linares *et al.* (2015) report values of 27.4 ± 0.3 to 112 ± 8.0 μmol TE/g of dry calyces, lower interval than found here. This difference may be due to the fact that they used acidified ethanol (70 % ethanol with 0.1 % HCl) as solvent.

#### ABTS•+ Free Radical Scavenging

The ABTS•+ radical scavenging capacity of aqueous extracts from roselle calyces was found in the range of 19.8 ± 4.0 to 46.9 ± 5.4 mg AAE/g of calyces d.w; significant statistical differences were found (Table 3); however, the varieties 'cruza negra' and 'UAN 31' cultivated in Nayarit, 'tempranilla' and 'negra quiviquinta' from Oaxaca and 'cruza negra' from Puebla did not show significant

Sindi *et al.* (2014) reportaron que las extracciones acuosas son mejores para evaluar la actividad del atrapamiento del radical DPPH• frente a extracciones en ácido fórmico, metanol acidificado, metanol al 80 % y etanol al 70 %. Por otro lado, Borrás-Linares *et al.* (2015) reportan valores de 27.4 ± 0.3 a 112 ± 8.0 μmol TE/g de cálices secos, intervalo inferior al aquí encontrado. Dicha diferencia puede deberse a que utilizaron etanol acidificado (etanol al 70 % con 0.1 % de HCl) como solvente.

#### Atrapamiento del radical ABTS•+

La capacidad de atrapamiento del radical ABTS•+ de los extractos acuosos de cálices de jamaica se encontró en un intervalo de 19.8 ± 4.0 a 46.9 ± 5.4 mg AAE/g de cálices d.w; se encontraron diferencias estadísticas significativas (Tabla 3); sin embargo, las variedades 'cruza negra' y 'UAN 31' cultivadas en Nayarit, 'tempranilla' y 'negra quiviquinta' de

**Table 3.**

**Bioactive compounds and antioxidant activity of aqueous extracts from roselle calyces depending on the content of total polyphenolic compound and total monomeric anthocyanins.**

**Tabla 3.**

**Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos acuosos de cálices de jamaica dependientes del contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas monoméricas totales.**

| State of provenance | Varieties         | TPC <sup>w</sup>       | TMA <sup>x</sup>       | DPPH• <sup>y</sup>       | ABTS•+ <sup>z</sup>     | FRAP <sup>z</sup>       | ORAC <sup>y</sup>           |
|---------------------|-------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Nayarit             | Cruza negra       | 41.1 <sup>a</sup> ±0.5 | 9.3 <sup>a</sup> ±0.8  | 261.8 <sup>a</sup> ±9.1  | 46.9 <sup>a</sup> ±5.4  | 13.8 <sup>a</sup> ±0.2  | 256.8 <sup>a</sup> ±29.3    |
|                     | UAN 8             | 23.8 <sup>f</sup> ±0.2 | 3.3 <sup>cd</sup> ±0.3 | 154.5 <sup>e</sup> ±3.7  | 27.0 <sup>cd</sup> ±0.8 | 10.7 <sup>c</sup> ±0.5  | 198.4 <sup>abcd</sup> ±48.2 |
|                     | UAN 31            | 30.8 <sup>e</sup> ±0.3 | 8.6 <sup>a</sup> ±0.8  | 242.7 <sup>b</sup> ±14.8 | 42.7 <sup>ab</sup> ±7.9 | 12.4 <sup>ab</sup> ±0.2 | 242.4 <sup>ab</sup> ±47.7   |
| Oaxaca              | Tempranilla       | 32.6 <sup>c</sup> ±0.5 | 0.4 <sup>e</sup> ±0.2  | 177.0 <sup>d</sup> ±5.6  | 38.9 <sup>ab</sup> ±6.7 | 11.6 <sup>bc</sup> ±0.8 | 221.0 <sup>abc</sup> ±53.1  |
|                     | UAN 8             | 24.2 <sup>f</sup> ±0.3 | 4.7 <sup>bc</sup> ±0.6 | 126.0 <sup>g</sup> ±11.5 | 23.0 <sup>d</sup> ±1.2  | 06.9 <sup>d</sup> ±0.1  | 136.2 <sup>cd</sup> ±29.3   |
|                     | Negra Quiviquinta | 33.5 <sup>b</sup> ±0.2 | 2.0 <sup>de</sup> ±0.2 | 198.4 <sup>c</sup> ±8.3  | 40.7 <sup>ab</sup> ±4.4 | 12.3 <sup>ab</sup> ±0.2 | 203.0 <sup>abcd</sup> ±20.7 |
| Puebla              | rojo x morada     | 20.6 <sup>g</sup> ±0.3 | 5.6 <sup>b</sup> ±1.2  | 114.2 <sup>g</sup> ±10.9 | 19.8 <sup>d</sup> ±4.0  | 06.6 <sup>d</sup> ±0.2  | 112.9 <sup>d</sup> ±13.1    |
|                     | Cruza negra       | 31.6 <sup>d</sup> ±0.5 | 8.6 <sup>a</sup> ±0.3  | 197.9 <sup>c</sup> ±17.4 | 38.2 <sup>ab</sup> ±3.6 | 10.5 <sup>c</sup> ±0.2  | 154.1 <sup>bcd</sup> ±17.0  |
|                     | UAN 12            | 20.9 <sup>g</sup> ±0.2 | 7.8 <sup>a</sup> ±0.4  | 137.2 <sup>f</sup> ±4.1  | 33.4 <sup>bc</sup> ±7.8 | 06.7 <sup>d</sup> ±1.2  | 116.2 <sup>d</sup> ±19.4    |

<sup>w</sup> mg gallic acid equivalents / g of calyces in dry weight.

<sup>x</sup> mg delphinidine-3-glucoside equivalents / g of calyces in dry weight.

<sup>y</sup> μmol Trolox equivalents / g of calyces in dry weight.

<sup>z</sup> mg ascorbic acid equivalents / g of calyces in dry weight.

The results are expressed in means ± standard deviation (n=3). The different letters (a-g) in each column describe the groups between varieties with a significant difference according to Tukey's DMS test ( $p < 0.05$ ).

<sup>w</sup> mg equivalentes de ácido gálico / g de cálices en peso seco.

<sup>x</sup> mg equivalentes de delphinidina-3-glucósido / g de cálices en peso seco.

<sup>y</sup> μmol equivalentes de Trolox / g de cálices en peso seco.

<sup>z</sup> mg equivalentes de ácido ascórbico / g de cálices en peso seco.

Los resultados se expresan en medias ± desviación estándar (n = 3). Las diferentes letras (a-g) en cada columna describen los grupos entre variedades con una diferencia significativa según la prueba DMS de Tukey ( $p < 0.05$ ).

differences between them ( $p < 0.05$ ) and evidenced the better capacity of scavenging the ABTS<sup>•+</sup> radical with respect to the other varieties under study. Correlation analysis showed that TPC correlated moderately ( $r=0.76$ ,  $p < 0.01$ ) with this antioxidant activity, while the correlation was low with TMA and was not statistically significant ( $r=0.21$ ,  $p = 0.12$ ).

Monteiro *et al.* (2017) reported an interval of  $29.2 \pm 1.3$  to  $55.7 \pm 1.8$  mg ASA/100 mL, which are similar values to those reported in this research. Numerous studies agree that there is a positive correlation between antioxidant activity (anti-radical activity to DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>) and anthocyanin concentration. This effect can be related to the B-ring of delphinidin or cyanidin anthocyanins, since they have a strong ability to terminate the reaction chains of free radicals (Bergmeier *et al.*, 2014; Pérez-Ramírez *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2014). Therefore, the greater the amount of hydroxyl, the greater the antioxidant activity (Genskowsky *et al.*, 2015).

However, anthocyanins with their groups 3',4'-dihydroxy can quickly chelate metal ions that may be in the system to form stable anthocyanin-metal complexes which could be a plausible mechanism of the low correlation of TMA with antioxidant activity found in this study (Mahn *et al.*, 2012).

#### **Capacity to reduce the Fe (III) ion to Fe (II) (FRAP)**

The reduction capacity from Fe (III) to Fe (II) of the aqueous extracts from roselle calyxes is shown in Table 3, ranging from  $6.6 \pm 0.2$  to  $13.8 \pm 0.2$  mg AAE/g of d.w. The 'cruza negra' and 'UAN 31' roselle varieties cultivated in Nayarit and 'negra quiviquinta' from Oaxaca showed no differences between them, besides having the highest averages with respect to the other varieties in the study ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis shows that correlation is strong with TPC ( $r=0.88$ ,  $p < 0.01$ ), while with TMA there is no correlation ( $r= 0.0$ ,  $p = 0.97$ ).

Medina-Carrillo *et al.* (2015) reported an interval of  $6.0 \pm 0.1$  to  $19.8 \pm 0.2$  mg AAE/g of calyxes d.w. of roselle, values that are similar to those reported in the present work. Fernández-Arroyo *et al.* (2011) reported a higher FRAP activity in aqueous extracts of calyxes from roselle than olive leaves, attributing this effect to chlorogenic acid and its derivatives such as quercetin, myricetin and kaempferol, which have shown to have reducing properties.

Oaxaca y 'cruza negra' de Puebla no mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ) y evidenciaron la mejor capacidad de atrapamiento del radical ABTS<sup>•+</sup> respecto a las demás variedades en estudio. El análisis de correlación evidenció que los TPC se correlacionan moderadamente ( $r=0.76$ ,  $p < 0.01$ ) con esta actividad antioxidante, mientras que, la correlación fue baja con las TMA y no fue estadísticamente significativa ( $r= 0.21$ ,  $p = 0.12$ ).

Monteiro *et al.* (2017) reportaron un intervalo de  $29.2 \pm 1.3$  a  $55.7 \pm 1.8$  mg AAE/100 mL, los cuales son valores similares a los reportados en la presente investigación. Numerosos estudios concuerdan en que existe una correlación positiva entre la actividad antioxidante (actividad anti-radical al DPPH<sup>•</sup> y al ABTS<sup>•+</sup>) y la concentración de antocianinas. Este efecto puede relacionarse con el anillo B de las antocianinas delphinidina o cianidina, ya que estas presentan una fuerte habilidad para terminar las cadenas de reacción de los radicales libres (Bergmeier *et al.*, 2014; Pérez-Ramírez *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2014). Por lo que, a mayor cantidad de hidroxilos mayor actividad antioxidante (Genskowsky *et al.*, 2015).

Sin embargo, las antocianinas con sus grupos 3',4'-dihidroxi pueden quelar rápidamente los iones metálicos que pudieran estar en el sistema para formar complejos estables de antocianina-metal lo cual podría ser un mecanismo plausible de la baja correlación de las TMA con la actividad antioxidante encontrada en este estudio (Mahn *et al.*, 2012).

#### **Capacidad para reducir el ión Fe (III) a Fe (II) (FRAP)**

La capacidad de reducción del Fe (III) a Fe (II) de los extractos acuosos de cálices de jamaica se muestra en la Tabla 3, osciló entre  $6.6 \pm 0.2$  a  $13.8 \pm 0.2$  mg AAE/g de cálices d.w. Las jamaicas 'cruza negra' y 'UAN 31' cultivadas en Nayarit y 'negra quiviquinta' de Oaxaca no mostraron diferencias entre sí, además de tener las medias más altas respecto a las otras variedades en el estudio ( $p < 0.05$ ). El análisis de correlación muestra que esta es fuerte con los TPC ( $r=0.88$ ,  $p < 0.01$ ), mientras que, con las TMA no hay correlación ( $r= 0.0$ ,  $p = 0.97$ ).

Medina-Carrillo *et al.* (2015) reportaron un intervalo de  $6.0 \pm 0.1$  a  $19.8 \pm 0.2$  mg AAE/g de cálices d.w. de jamaica, valores que son similares a los reportados en el presente trabajo. Fernández-Arroyo *et al.* (2011) reportaron una mayor actividad de FRAP en extractos acuosos de cálices de jamaica que las hojas de oliva atribuyendo este efecto al ácido clorogénico y sus derivados como quercetina, miricetina y kaempferol, los cuales han demostrado tener propiedades reductoras.

### Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

The oxygen radical absorption capacity of aqueous extracts from roselle calyces was found in the range of  $112.9 \pm 4.5$  to  $256.8 \pm 29.3$   $\mu\text{mol TE/g}$  of d.w. calyces. (Table 3). The 'cruza negra' and 'UAN 31' calyces grown in Nayarit show the highest averages. However, they were only statistically different from the 'red x purple' and 'UAN 12' varieties grown in Puebla, as well as with UAN 08 from Oaxaca ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis showed that correlation was moderate with TPC ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.01$ ), while no correlation was found with TMA ( $r = 0.02$ ,  $p = 0.88$ ). Wu *et al.* (2004) reported oxygen radical scavenging capacity at 94.6, 62.2, 35.8, 19.4, 10.0, and 8.8  $\mu\text{mol TE/g}$  for blueberries, strawberries, avocado, mango, and banana, respectively. While Wolfe *et al.* (2008) reported 83.9, 96.2, 83.5, 13.4, 11.6 and 5.65  $\mu\text{mol TE/g}$  for the same fruits. ORAC values for blueberries, bilberries, and strawberries are similar to some of the roselle varieties reported here.

The fact of not finding a correlation between TMA and ORAC, could be related to the basis of the ORAC technique, which is based on the capacity of an antioxidant to neutralize free radicals by the donation of a hydrogen atom (HAT mechanism "Hydrogen Atom Transfer") (Prior *et al.*, 2015), while anthocyanins base their antioxidant capacity on the donation or transfer of an electron to the previously oxidized molecule, known as the SET (Single Electron Transfer) mechanism (Pérez-Ramírez *et al.*, 2015; Prior *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2014).

### Antimicrobial activity by agar diffusion

In the case of the extracts from roselle calyces, only inhibition halos were found for the concentration of 80 mg TPC/mL of the extract from Nayarit calyces in the *Escherichia coli* strain. While, for ceftriaxone, inhibition halos were identified in most cases, except for *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* strains. According to the NCCLS interpretation tables, the 7 mm inhibition halo of the 80 mg TPC/mL concentration of the extract of calyces from Nayarit is considered as resistant. That is, *Escherichia coli* bacteria are resistant to that concentration of extract and would not be recognized as a substance with antimicrobial activity at that concentration.

Alshami and Alharbi (2014b) reported the antimicrobial effect of roselle calyx extracts on *E. coli* and *K. pneumoniae* from recurrent urinary tract infections using a concentration of 100 mg/mL in 80 % methanol. Sulaiman *et al.* (2014) compared the antimicrobial activity of *Hibiscus*

### Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno de extractos acuosos de cálices de jamaica se encontró en un intervalo de  $112.9 \pm 4.5$  a  $256.8 \pm 29.3$   $\mu\text{mol TE/g}$  de cálices d.w. (Tabla 3). Los cálices de jamaica 'cruza negra' y 'UAN 31' cultivadas en Nayarit muestran las medias más altas. Sin embargo, solo fueron diferentes estadísticamente a las variedades 'rojo x morada' y 'UAN 12' cultivadas en Puebla, así mismo con la UAN 08 de Oaxaca ( $p < 0.05$ ). Del análisis de correlación se observó que esta era moderada con los TPC ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.01$ ), mientras que, con las TMA no se encontró correlación ( $r = 0.02$ ,  $p = 0.88$ ). Wu *et al.* (2004) reportaron la capacidad de absorción de radicales de oxígeno en 94.6, 62.2, 35.8, 19.4, 10.0 y 8.8  $\mu\text{mol TE/g}$  para arándanos, moras azules, fresas, aguacate, mango y plátano, respectivamente. Mientras que Wolfe *et al.* (2008) reportaron 83.9, 96.2, 83.5, 13.4, 11.6 y 5.65  $\mu\text{mol TE/g}$  para los mismos frutos. Los valores de ORAC en las moras azules, los arándanos y las fresas son similares a algunas de las variedades de jamaica aquí reportadas.

El hecho de no encontrar correlación entre las TMA y la ORAC, podría estar relacionado con el fundamento de la técnica ORAC, el cual está basado en la capacidad de un antioxidante de neutralizar radicales libres por la donación de un átomo de hidrógeno (mecanismo HAT "Hydrogen Atom Transfer") (Prior *et al.*, 2015), Mientras que, las antocianinas basan su capacidad antioxidante en la donación o transferencia de un electrón a la molécula previamente oxidada, conocido como mecanismo SET (Single Electron Transfer) (Pérez-Ramírez *et al.*, 2015; Prior *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2014).

### Actividad antimicrobiana por difusión en agar

En el caso de los extractos de cálices de jamaica solo se encontraron halos de inhibición para la concentración de 80 mg TPC/mL del extracto de cálices de Nayarit en la cepa *Escherichia coli*. Mientras que, para la ceftriaxona se identificaron halos de inhibición en la mayoría de los casos, con excepción de las cepas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Según las tablas de interpretación de la NCCLS, el halo de inhibición de 7 mm de la concentración de 80 mg TPC/mL del extracto de cálices de jamaica de Nayarit es considerado como resistente. Es decir, la bacteria *Escherichia coli* es resistente a esa concentración de extracto y no sería reconocida como una sustancia con actividad antimicrobiana a esa concentración.

Alshami y Alharbi (2014b) reportaron el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de jamaica sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* de infecciones recurrentes en el tracto urinario usando una concentración de 100 mg/mL en metanol al 80 %. Sulaiman *et al.* (2014) compararon la actividad antimicrobiana la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) contra *Escherichia coli*,

*sabdariffa* against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, using concentrations of 25 to 200 mg/mL, finding the most effective at 100 and 200 mg/mL, even being better than streptomycin against *P. aeruginosa*.

On the other hand, Bamoniri *et al.* (2010) and Kossah *et al.* (2011) report that Gram-negative bacteria are usually more resistant to the effect of antibacterial compounds because they possess an external lipid membrane for additional protection to the cytoplasmic membrane. Therefore, in this trial it could be necessary a higher concentration of phenolic compounds to exert antimicrobial action.

It has been found that the most common antimicrobial compounds in roselle are hibiscus acids, hydroxycitric acid, chlorogenic acid among other phenolic compounds (Borrás-Linares *et al.*, 2015; Portillo-Torres *et al.*, 2019). These phenolic compounds interfere with cell membrane function as they interact with membrane proteins inducing alteration of their structure. Alterations of cell membrane functions are related to electron transport, nutrient absorption, protein and nucleic acid synthesis, and enzymatic activity (Bajpai *et al.*, 2008; Hayek *et al.*, 2013).

Furthermore, it has been stated that the antimicrobial activity of phenolic compounds depends on concentration: at low concentration, phenols inhibit microbial enzymatic activity, while at high concentrations they induce protein denaturation (Hayek *et al.*, 2013).

Concerning the influence of phenolic structure on antimicrobial activity, it has also been shown that functional groups such as hydroxyl groups, promote electron delocalization and can act as proton exchangers, lowering the pH gradient across the cytoplasmic membrane of bacterial cells. This causes a decrease in the driving force of protons, depletion of the TFA reserve and then cell death (Gyawali & Ibrahim, 2014; Ultee *et al.*, 2000).

#### Effect of extracts on microbial growth kinetics

Figure 1 shows the *in vitro* antimicrobial activity of the aqueous extracts of *H. sabdariffa* calyxes of the "cruza negra" variety from two sources (Nayarit and Puebla), which have a bacteriostatic effect, that is, the extracts reduce the growth rate without causing cell death.

In the case of the sample without aqueous extract of roselle (control), the exponential phase of growth starts after

*Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, usando concentraciones de 25 a 200 mg/mL, encontrando las más efectivas en 100 y 200 mg/mL, incluso siendo mejores que la estreptomycin contra *P. aeruginosa*.

Por otra parte, Bamoniri *et al.* (2010) y Kossah *et al.* (2011) reportan que las bacterias Gram negativas suelen ser más resistentes al efecto de los compuestos antibacterianos debido a que poseen una membrana lipídica externa de protección adicional a la membrana citoplasmática. Por lo cual, en este ensayo pudo ser necesario una mayor concentración de compuestos fenólicos para ejercer la acción antimicrobiana.

Se ha encontrado que los compuestos antimicrobianos más comunes en la jamaica son los ácidos hibisco, ácido hidroxycítrico, ácido clorogénico entre otros compuestos fenólicos (Borrás-Linares *et al.*, 2015; Portillo-Torres *et al.*, 2019). Estos compuestos fenólicos interfieren con la funcionalidad de la membrana celular a medida que interactúan con las proteínas de membrana induciendo la alteración de su estructura. Las afectaciones de las funciones de la membrana celular están relacionadas con el transporte de electrones, la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y la actividad enzimática (Bajpai *et al.*, 2008; Hayek *et al.*, 2013).

Además, se ha afirmado que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos depende de la concentración: a baja concentración, los fenoles inhiben la actividad enzimática microbiana, mientras que a altas concentraciones inducen la desnaturalización de las proteínas (Hayek *et al.*, 2013).

Con respecto a la influencia de la estructura fenólica sobre la actividad antimicrobiana, también se ha demostrado que los grupos funcionales tales como los grupos hidroxilo, promueven la deslocalización de electrones y pueden actuar como intercambiadores de protones, disminuyendo el gradiente de pH a través de la membrana citoplásmica de las células bacterianas. Esto provoca la disminución de la fuerza motriz del protón, el agotamiento de la reserva de TFA y a continuación, la muerte celular (Gyawali & Ibrahim, 2014; Ultee *et al.*, 2000).

#### Efecto de los extractos sobre las cinéticas de crecimiento microbiano

En la Figura 1 se presenta la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos acuosos cálices de *H. sabdariffa* de la variedad "cruza negra" de dos procedencias (Nayarit y Puebla), los cuales presentan un efecto bacteriostático, es decir, los extractos, reducen la velocidad de crecimiento sin causar muerte celular.

En el caso de la muestra sin extracto acuoso de jamaica (control), la fase exponencial de crecimiento se inicia

the second hour and ends in the eighth. This effect was diminished with the application of roselle extracts, where the bacterial growth speed is reduced in 51.43 % with the extract of the variety cultivated in Nayarit and in 35.24 % for the one cultivated in Puebla, evidencing that there is a statistical difference between treatments ( $p < 0.05$ ).

The bacteriostatic properties of hibiscus calyces were studied by Alshami and Alharbi (2014b), these researchers reported that this activity could be due to the content of phenolic compounds, which intervene in the synthesis of vital enzymes for bacteria. Higginbotham *et al.* (2014b) found that aqueous roselle extracts were effective in reducing the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains at concentrations of 60 mg/mL and 40 mg/mL, higher concentrations than those used in this study.

#### Hemolysis tests

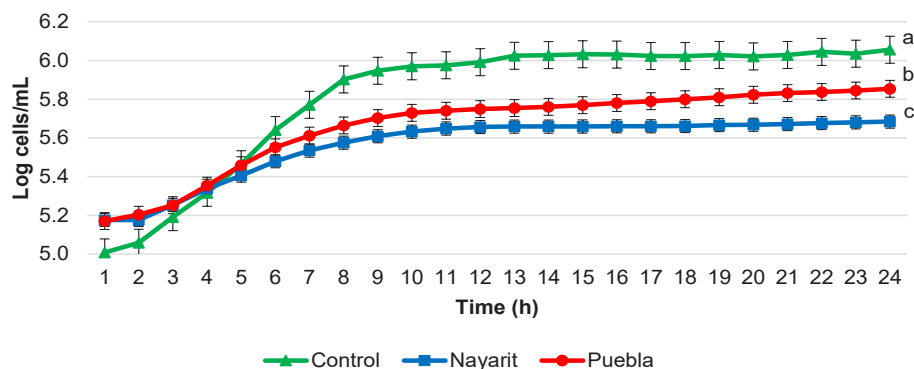
The hemolytic activity of the aqueous extracts from roselle calyces are presented in Figure 2. In the results of the percentage of hemolysis, statistical differences between the extracts and between the concentrations in each treatment (Nayarit and Puebla) were found ( $p < 0.05$ ). In the concentrations of 1,000, 6,000, 8,000 and 10,000  $\mu\text{g}$  TPC/mL of extract, the hemolytic activity was significantly

después de la segunda hora y termina en la octava. Este efecto se vio disminuido con la aplicación de los extractos de jamaica, donde la velocidad de crecimiento bacteriano se reduce en un 51.43 % con el extracto de la variedad cultivada en Nayarit y en un 35.24 % para la cultivada en Puebla, evidenciando que existe diferencia estadística entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Las propiedades bacteriostáticas de los cálices de jamaica fueron estudiadas por Alshami y Alharbi (2014b) estos investigadores reportaron que esta actividad puede deberse al contenido de compuestos fenólicos, los cuales intervienen en la síntesis de enzimas vitales para las bacterias. Por su parte, Higginbotham *et al.* (2014b) encontraron que los extractos acuosos de jamaica eran efectivos para la reducción del crecimiento de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 60 mg/mL y 40 mg/mL, concentraciones mayores a las usadas en este estudio.

#### Pruebas de hemólisis

La actividad hemolítica de los extractos acuosos de cálices de jamaica se presentan en la Figura 2. En los resultados del porcentaje de hemólisis se encontraron diferencias estadísticas entre los extractos y entre las concentraciones en cada tratamiento (Nayarit y Puebla) ( $p < 0.05$ ). En las concentraciones de 1,000, 6,000, 8,000 y 10,000  $\mu\text{g}$  TPC/mL de extracto, la actividad hemolítica fue significativamente



**Figure 1. Bacteriostatic effect of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces on *E. coli* O157:H7**  
The results are expressed in means (markers)  $\pm$  standard deviation (bars on markers) ( $n=5$ ). The different letters (a-c) describe the groups with significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments due to their bacterial growth rate according to the Tukey DMS test.

**Figura 1. Efecto bacteriostático de los extractos acuosos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre *E. coli* O157:H7.**

Los resultados son expresados en medias (marcadores)  $\pm$  desviación estándar (barras sobre marcadores) ( $n=5$ ). Las letras diferentes (a-c) describen los grupos con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos por su velocidad de crecimiento bacteriana según la prueba de DMS de Tukey.



different ( $p < 0.05$ ) between treatments. The hemolysis percentage of roselle extract from Puebla was 10.8 % higher than Nayarit at the concentration of 6,000  $\mu\text{g TPC/mL}$  extract. In contrast, in the concentrations 1,000, 8,000 and 10,000  $\mu\text{g TPC/mL}$  of extract, the calyxes of roselle from Nayarit showed higher hemolysis than the Puebla treatment in 12.7, 10.3 and 0.3 % respectively.

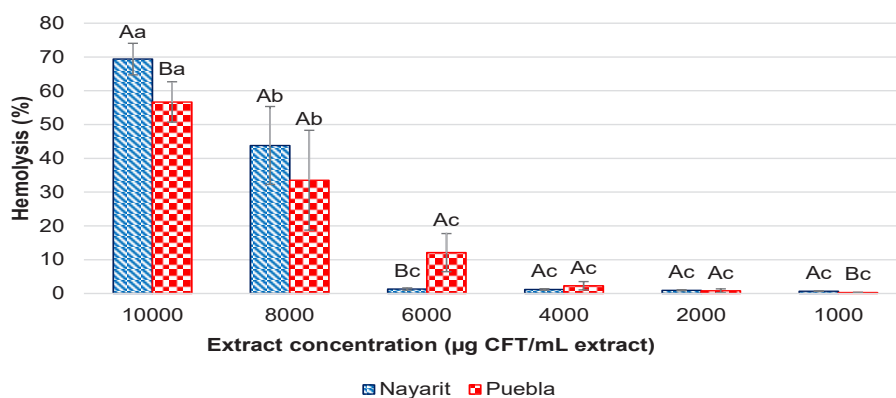
Within each treatment (Nayarit and Puebla) the percentage of hemolysis was directly proportional to the concentration of  $\mu\text{g TPC/mL}$  of the extract, up to 6000  $\mu\text{g TPC/mL}$  for Nayarit and 4000  $\mu\text{g TPC/mL}$  for Puebla, after these concentrations up to 1000  $\mu\text{g TPC/mL}$  the percentage of hemolysis showed no difference ( $p > 0.05$ ).

Hassan *et al.* (2010) report that hemolytic activity can be used to identify saponins in plant extracts, since they form pores in the cell membranes. However, they could not establish that this same mechanism was related to antimicrobial activity. Top *et al.* (2017) studied the hemolytic activity of some triterpenoid saponins from *Cephalaria balancea*, found that these saponins showed a strong

diferente ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. El porcentaje de hemólisis del extracto de jamaica proveniente de Puebla fue 10.8 % más alto que Nayarit en la concentración de 6,000  $\mu\text{g TPC/mL}$  de extracto. A diferencia de esto, en las concentraciones 1,000, 8,000 y 10,000  $\mu\text{g TPC/mL}$  de extracto, los cálices de jamaica procedentes de Nayarit mostraron mayor hemólisis que el tratamiento Puebla en un 12.7, 10.3 y 0.3 % respectivamente.

Dentro de cada tratamiento (Nayarit y Puebla) el porcentaje de hemólisis fue directamente proporcional a la concentración de  $\mu\text{g TPC/mL}$  del extracto, hasta los 6000  $\mu\text{g TPC/mL}$  para Nayarit y los 4000  $\mu\text{g TPC/mL}$  para Puebla, después de estas concentraciones hasta los 1000  $\mu\text{g TPC/mL}$  el porcentaje de hemólisis no presentó diferencias ( $p > 0.05$ ).

Hassan *et al.* (2010) reportan que la actividad hemolítica puede ser usada para identificar saponinas en los extractos de plantas, ya que éstas forman poros en las membranas celulares. Sin embargo, ellos no pudieron establecer que este mismo mecanismo estuviese relacionado con la actividad antimicrobiana. Top *et al.* (2017) estudiaron la actividad hemolítica de algunas saponinas triterpenoides de *Cephalaria balancea*, encontraron que estas saponinas mostraron una fuerte actividad hemolítica sobre eritrocitos



**Figure 2. Hemolytic effect of different concentrations of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyxes.**

The results are expressed in means (columns)  $\pm$  standard deviation (error bars) ( $n=3$ ). Different capital letters (A-B) in a concentration describe the significant differences between treatments according to the ANOVA ( $p < 0.05$ ). Different lowercase letters (a-c) within a treatment describe the significant differences between concentrations according to Tukey's DMS tests ( $p < 0.05$ ).

**Figura 2. Efecto hemolítico de diferentes concentraciones de extractos acuosos de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L.**

Los resultados son expresados en medias (columnas)  $\pm$  desviación estándar (barras de error) ( $n=3$ ). Las letras mayúsculas diferentes (A-B) describen las diferencias significativas entre tratamientos según el ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las letras minúsculas diferentes (a-c) describen las diferencias entre concentraciones dentro de cada tratamiento según la prueba de DMS de Tukey ( $p < 0.05$ ).

hemolytic activity on human erythrocytes (approximately 85 %), they conclude like Voutquenne *et al.* (2008), that the hemolytic activity depends on the number of sugar units in the saponin chain, the higher number of sugar units in the chain the lower the radius of hemolysis.

From the above, and in conjunction with the obtained results presented above, it can be said that saponins do not form an important part of the phenolic compounds present in the aqueous extracts of hibiscus or if some are present, they may have enough sugars in their chain, which reduces the radius of hemolysis. This is important because it leaves a precedent about the low toxicity of these extracts, so they could be used at high concentrations as a food additive.

Peter *et al.* (2017) in their study implemented an extract of roselle at a concentration of 440 µg of calyces/mL as a treatment for malaria-derived anemia (malaria) in adults aged 18 to 50 years in Mkuranga District (Tanzania). Using doses of 1,000 to 2,000 mL/day, these authors report that there was evidence to support the safe use of the extract as a human herbal supplement. The iron and organic acids contained in the *H. sabdariffa* L. extract showed the potential for improving hematopoietic parameters. In addition, the results presented in this research provide a benchmark for the concentrations of hibiscus calyces that can be safely consumed in the human diet.

## Conclusion

In general, the extracts of the roselle varieties from Nayarit state presented a higher content of bioactive compounds and greater antioxidant activity. Of these, the extract of the 'cruza negra' roselle variety showed the highest content of total monomeric anthocyanins and the highest antioxidant activity due to the total polyphenols and low hemolytic activity. However, the extracts evaluated did not show antimicrobial activity at the concentrations tested. The above allows proposing roselle extracts as an alternative of potential use as a food ingredient, in particular, it is considered that it could prolong the shelf life and improve the sensory properties such as color and smell of meat products, besides the characteristics described here also its feasibility lies in the ease of obtaining the extract with little technology and low impact on the environment.

humanos (85 % aproximadamente), concluyen al igual que Voutquenne *et al.* (2008), que la actividad hemolítica depende del número de unidades de azúcares en la cadena de la saponina, a mayor número de unidades de azúcar en la cadena menor será el radio de hemólisis.

De lo anterior, y en conjunto con los resultados presentados anteriormente, se puede decir que las saponinas no forman parte importante de los compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de jamaica o de haber algunas presentes, pueden tener suficientes azúcares en su cadena, lo cual reduce el radio de hemólisis. Esto es importante ya que deja un precedente sobre la baja toxicidad de estos extractos, por lo que podrían utilizarse a altas concentraciones como aditivo alimentario.

Peter *et al.* (2017) en su estudio implementaron un extracto de jamaica a una concentración de 440 µg de cálices/mL como tratamiento contra la anemia derivada de la malaria (paludismo) en adultos de 18 a 50 años del Distrito de Mkuranga (Tanzania). Estos autores utilizaron dosis de 1,000 a 2,000 mL/día, reportan que hubo evidencia para apoyar el uso seguro del extracto como suplemento herbal para humanos. El hierro y los ácidos orgánicos contenidos en el extracto de *H. sabdariffa* L. mostraron potencial para mejorar los parámetros hematopoyéticos. Además, los resultados presentados en esta investigación, proveen de un referente sobre las concentraciones de cálices de jamaica que pueden consumirse de forma inocua en la dieta humana.

## Conclusión

En general, los extractos de las variedades provenientes del estado de Nayarit mostraron un mayor contenido en compuestos bioactivos y mayor actividad antioxidante. De estas, el extracto de jamaica 'cruza negra' presentó el mayor contenido de antocianinas monoméricas totales y la mayor actividad antioxidante debido a los polifenoles totales y una baja actividad hemolítica, Sin embargo, los extractos evaluados no mostraron actividad antimicrobiana a las concentraciones evaluadas. Lo anterior permite proponer los extractos de jamaica como una alternativa de uso potencial como ingrediente en un alimento, en particular, se considera que podría prolongar la vida de anaquel y mejorar las propiedades sensoriales como el color y olor de productos cárnicos, además de las características aquí descritas también su factibilidad radica en la facilidad de la obtención del extracto con poca tecnificación y bajo impacto al medio ambiente.

## References

- Alshami, I. & Alharbi, A. E. (2014a). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of *Candida albicans* isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2): 104–108. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60217-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60217-3)
- Alshami, I. & Alharbi, A. E. (2014b). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* extract against uropathogenic strains isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4): 317–322. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60581-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60581-8)
- Bajpai, V. K., Rahman, A., Dung, N. T., Huh, M. K. and Kang, S. C. (2008). In vitro Inhibition of Food Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria by Essential Oil and Leaf Extracts of *Magnolia liliiflora* Desr. *Journal of Food Science*, 73(6), M314–M320. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00841.x>
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F. J. and Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. From Iran. *Food Chemistry*, 122(3): 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.009>
- Bergmeier, D., Berres, P.H.D., Filippi, D., Bilibio, D., Bettiol, V.R. and Priamo, W.L. (2014). Extraction of total polyphenols from hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) and waxweed/"sete-sangrias" (*Cuphea carthagenensis*) and evaluation of their antioxidant potential. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(3): 545-551. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i3.19093>
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Román, D., Palmeros-Suárez, P.A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J.F. and Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>
- Bozkurt, H. & Belibağlı, K. B. (2009). Use of rosemary and *Hibiscus sabdariffa* in production of kavurma, a cooked meat product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7): 1168–1173. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3570>
- Cid-Ortega, S. & Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11): 6859–6869. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9>
- Díaz-Aguilar, D. (2016). Actividad antioxidante de cálices deshidratados de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) cultivadas en los Estados de Puebla, Oaxaca, Colima y Nayarit. Tesis para la obtención del título de maestría. Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. <http://bibliotecas.uan.mx/index.php/maestrian-interinstitucional-en-agricultura-prottegida/item/4643-actividad-antioxidante-de-calices-deshidratados-de-variedades-de-jamaica-hibiscus-sabdariffa-l-cultivadas-en-los-estados-de-puebla-oaxaca-colima-y-nayarit>
- Duarte-Valenzuela, Z. N., Zamora-Gasga, V. M., Montalvo-González, E. and Sáyo-Ayerdi, S. G. (2016). Caracterización nutricional de 20 variedades mejoradas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivadas en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3), 199–206. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/39-3.html>
- Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A. and 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(5): 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>
- Frank, T., Netzel, G., Kammerer, D.R., Carle, R., Kler, A., Kriesel, E., Bitsch, I., Bitsch, R. and Netzel, M., 2012. Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous extract and its impact on systemic antioxidant potential in healthy subjects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (10): 2207–2218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5615>
- Galicia-Flores, L. A., Salinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B. M. and Sanchez-Feria, C. (2008). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 14 (2): 121-129. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2007.01.005>
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A. and Viuda-Martos, M. (2015). Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *LWT - Food Science and Technology*, 64(2): 1057–1062. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.026>

- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C. and Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT*, 47(2): 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.020>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gómez-Aldapa, C., A. Portillo-Torres, L., Villagómez, R., Rangel Vargas, E., Tellez, A., M. Cruz-Gálvez, A. and Castro-Rosas, J. (2017). Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers on strawberries. *Journal of Food Safety*, e12378. <https://doi.org/10.1111/jfs.12378>
- Goodenow, D., Emmanuel, F., Berman, C., Sahyouni, M. and Richardson, C. (2020). Bioflavonoids cause DNA double-strand breaks and chromosomal translocations through topoisomerase II-dependent and -independent mechanisms. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 849, 503144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503144>
- Grujičić, D., Marković, A., Vukajlović, J. T., Stanković, M., Jakovljević, M. R., Ćirić, A., Djordjević, K., Planojević, N., Milutinović, M. and Milošević-Djordjević, O. (2020). Genotoxic and cytotoxic properties of two medical plants (*Teucrium arduini* L. and *Teucrium flavum* L.) in relation to their polyphenolic contents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 852, 503168. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503168>
- Guzmán-Ceferino, J., Cobos-Puc, L. E., Sierra-Rivera, C. A., Contreras-Esquivel, J. C., Durán-Mendoza, T. and Silva-Belmares, S. Y. (2019). Partial characterization of the potentially bioactive protein fraction of potencialmente bioactiva de *Solanum marginatum* L. f. *Polibotánica*, 137–151. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.10>
- Gyawali, R. & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Harp, B. P. & Barrows, J. N. (2015). 4 - US regulation of color additives in foods, in: Scotter, M.J. (Ed.), *Colour Additives for Foods and Beverages*, Woodhead Publishing Series in *Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 75–88. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00004-0>
- Hassan, S. M., Haq, A. U., Byrd, J. A., Berhow, M. A., Cartwright, A. L. and Bailey, C. A. (2010). Hemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry*, 119 (2): 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.066>
- Hayek S. A., Gyawali R. and Ibrahim S. A. (2013). Antimicrobial natural products, en A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex, Badajoz, España, Vol.2. pp. 910-921.
- Held, P. (2005). Performing oxygen radical absorbance capacity assays with Synergy HT. ORAC antioxidant tests. Application Note. [https://www.biotech.com/resources/docs/ORAC\\_Assay\\_Application\\_Note.pdf](https://www.biotech.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf)
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M. and Stewart, C. N. (2014b). Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, 77(2): 262–268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-313>
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M. and Stewart, C. N. (2014a). Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 40, 274–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.011>
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H. J. and Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97: 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.028>
- Jung, E. & Joo, N. (2013). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology. *Meat Science*, 94(3): 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.02.008>
- Kendrick, A. (2016). 7 - Coloring Aqueous Food Types, in: *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. Woodhead Publishing, 163–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00007-5>
- Kossah, R., Zhang, H. and Chen, W. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control*, 22: (1), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.002>

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25(4):726-732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Madigan, M. T., Martinko J. M. and Parker, J. (2003). Crecimiento microbiano. En: *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Pearson. EUA. 142-145.
- Mahn, A., Zamorano, M., Barrientos, H. and Reyes, A. (2012). Optimization of a process to obtain selenium-enriched freeze-dried broccoli with high antioxidant properties. *LWT*, 47(2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.017>
- Medina-Carrillo, R. E., Madrigal-Santillan, E., Machuca-Sanchez, M. L., Balois-Morales, R., Jimenez-Ruiz, E. I., Valadez-Vega, C., Morales-Gonzalez, J. A., and Sumaya-Martínez, M. T. (2015). Free radical scavenging properties and their relationship with bioactive compounds content of dehydrated calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 10: 1203–1210. <https://doi.org/10.5897/AJAR2014.9253>
- Medina-Carrillo, R. E., Sumaya-Martínez, M. T., Machuca-Sánchez, M. L., Sánchez-Herrera, L. M., Balois-Morales, R. and Jiménez-Ruiz, E. I. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22(5): 41–44. <https://revistas.unah.edu.cu/index.php/rcta/article/view/254>
- Mohd-Esa, N., Hern, F. S., Ismail, A. and Yee, C. L. (2010). Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, 122 (4): 1055–1060. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.074>
- Monteiro, M. J. P., Costa, A. I. A., Fliedel, G., Cissé, M., Bechoff, A., Pallet, D., Tomlins, K. and Pintado, M. M. E. (2017). Chemical-sensory properties and consumer preference of hibiscus beverages produced by improved industrial processes. *Food Chemistry*, 225: 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.127>
- Morales, F. J. & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72: 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00239-9)
- Múzquiz-Ramos, E. M., Cortés-Hernández, D. A., Escobedo-Bocardo, J. C., Zugasti-Cruz, A., Ramírez-Gómez, X. S. and Osuna-Alarcón, J. G. (2013). In vitro and in vivo biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 1035–1041. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4862-0>
- Pérez-Ramírez, I. F., Castaño-Tostado, E., Ramírez-de León, J. A., Rocha-Guzmán, N. E. and Reynoso-Camacho, R. (2015). Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Food Chemistry*, 172, 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.126>
- Peter, E. L., Rumisha, S. F., Mashoto, K. O., Minzi, O. M. and Mfinanga, S. (2017). Efficacy of standardized extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in improving iron status of adults in malaria endemic area: A randomized controlled trial. *Journal of Ethnopharmacology*, 209, 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.037>
- Portillo-Torres, L. A., Bernardino-Nicanor, A., Gómez-Aldapa, C. A., González-Montiel, S., Rangel-Vargas, E., Villagómez-Ibarra, J. R., González-Cruz, L., Cortés-López, H. and Castro-Rosas, J. (2019). Hibiscus Acid and Chromatographic Fractions from Hibiscus Sabdariffa Calyces: Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 8(4): 218. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040218>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.063>
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods, Natural Antioxidants* 18, Part B, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Rai K. N., Godwa C. L. L., Reddy B. V. S. and Sehgal S. (2008). Adaption and Potential Uses of Sorghum a Pearl Millet in Alternative and Health Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 340-352. India. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00049.x>
- Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C. A., Falfan-Cortes, R. N., Rodríguez-Marín, M. L., Godínez-Oviedo, A., Acevedo-Sandoval, O. A. and Castro-Rosas, J., 2017a. Attachment of 13 Types of Foodborne Bacteria to Jalapeño and Serrano Peppers and Antibacterial Effect of Roselle Calyx Extracts, Sodium Hypochlorite, Colloidal Silver, and

- Acetic Acid against These Foodborne Bacteria on Peppers. *Journal of Food Protection*, 80(3): 406–413. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-269>
- Rangel-Vargas, E., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Gómez-Aldapa, C. A., Falfán-Cortés, R. N., Segovia-Cruz, J. A., Salas-Rangel, L. P. and Castro-Rosas, J. (2017b). Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant salmonella serotypes isolated from coriander. *Journal of Food Safety*, 37 (2). <https://doi.org/10.1111/jfs.12320>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reyes-Luengas, A., Y. Salinas-Moreno, M. E. Ovando-Cruz, R. I. Arteaga-Garibay, and M. D. Martínez-Peña. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49 (3): 277–290. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1146>
- Rufián-Henares J. A. & Morales F. J. (2008). Microtiter plate-based assay for screening antimicrobial activity of melanoidins against *E. coli* and *S. aureus*. *Food Chemistry*, 111(4): 1069–1074. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.027>
- Sindi, H. A., L. J. Marshall and M. R. A. Morgan. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*, 164: 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Mihailovic, V., Topuzovic, M. and Solujic, S. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(2): 117–122. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.010>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. and Felker, P. (2005). Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2): 442–451. <https://doi.org/10.1021/jf048751y>
- Sulaiman, F. A., Kazeem, M. O., Waheed, A. M., Temowo, S. O., Azeez, I. O., Zubair, F. I., Adeyemi, T. A., Nyang, A. and Adeyemi, O. S. (2014). Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. *Journal of Taibah University for Science*, 8 (4): 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.05.004>
- Top, H., Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A. and Kirmizigul, S. (2017). Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae*. *Phytochemistry*, 137: 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.015>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A. and Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174: 233–238. <https://doi.org/10.1007/s002030000199>
- Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G. and Men-Oliver, L. (2008). Structure-activity relationships of hemolytic saponins. *Pharm. Biol.*, 40 (4): 253-262. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.4.253.8470>
- Wolfe, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q. and Liu, R. H. (2008). Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (18): 8418–8426. <https://doi.org/10.1021/jf801381y>
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. and Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12): 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>