



CYTAL-ALACCTA 2019  
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

## OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE PÉTALOS DE ROSAS

Sabrina Baibuch<sup>1,2,3</sup>, Paula Zema<sup>2</sup>, Julieta Gabilondo<sup>4</sup>, Laura Malec<sup>2</sup>, Carmen Campos<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Departamento de Industrias. Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Departamento Química Orgánica. Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup> CONICET - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Tecnología de Alimentos y  
Procesos Químicos (ITAPROQ). Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup>EEA INTA San Pedro. Ruta 9 km 170. Buenos Aires.

e-mail: [sabrinabaibuch@qo.fcen.uba.ar](mailto:sabrinabaibuch@qo.fcen.uba.ar)

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la optimización de las condiciones de extracción para maximizar la obtención de compuestos polifenólicos y con actividad antioxidante a partir de pétalos de rosas. Éstos se obtuvieron de viveros de la región de San Pedro, Provincia de Buenos Aires, seleccionándose para el estudio los cultivares *Malu (M)*, de color rosa y *Lovely Red (LR)*, de color rojo. Con el fin de evaluar distintas condiciones de extracción se aplicó un diseño experimental de superficie de respuesta (Diseño de Box-Behnken) en dos bloques, con tres factores experimentales a dos niveles y un punto central realizando un total de 30 experimentos por cultivar de rosa. Las variables y los niveles fueron: solvente de extracción (agua/etanol); temperatura (30, 90 °C) y tiempo (30, 120 min). Los pétalos fueron deshidratados por liofilización, molidos y tamizados. El contenido de polifenoles totales en los extractos se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu expresando el resultado en mg de ácido gálico (AG) / g muestra seca (ms). La evaluación de la actividad antioxidante se realizó a través de la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y los resultados se expresaron en mg de trolox / g ms. Todas las extracciones se realizaron por duplicado y las determinaciones por triplicado. Se aplicó el diseño experimental a los parámetros obtenidos y se calcularon las ecuaciones de los modelos predictivos. Se observó que el solvente fue la variable que afectó en forma más significativa la respuesta, presentando valores máximos en el rango cercano al nivel medio, agua/etanol 50:50, tanto para el contenido de fenoles totales como para la actividad antioxidante. Se observó además, que el aumento de temperatura maximizó la extracción de los compuestos analizados. El tiempo no ejerció un efecto significativo. Los valores más elevados para las condiciones de extracción ensayadas fueron: solvente agua/etanol 50:50 y temperatura 90 °C para cualquiera de los tiempos de extracción ensayados. El contenido de polifenoles obtenido fue de 202 mg AG / g ms para *LR* y 141,3 mg AG / g ms para *M*. En el caso de la actividad antioxidante, los valores para estas mismas condiciones fueron 544,6 mg trolox / g ms para la variedad roja y 339,6 mg trolox / g ms para la de color rosa. Además, se observó un muy buen ajuste entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Es de destacar que el contenido de polifenoles totales mostró una muy buena correlación con la actividad antioxidante, siendo los coeficientes de

determinación ( $R^2$ ) 0,98 (*M*) y 0,96 (*LR*). Los resultados comentados permiten concluir que los pétalos ensayados son una matriz rica en polifenoles y en compuestos con actividad antioxidante pudiéndose maximizar la extracción de dichos compuestos mediante la adecuada selección del solvente.

**Palabras claves:** pétalos de rosa, bioactivos, extracción, polifenoles, actividad antioxidante

## 1. Introducción

La demanda en la industria alimentaria y farmacéutica de compuestos bioactivos de fuentes naturales está en crecimiento ya que existe una tendencia a la disminución del consumo de aditivos sintéticos (Cunja y col., 2014). Se presta especial atención a la posible extracción de estos compuestos bioactivos a partir de fuentes no convencionales y al empleo de residuos agrícolas (Moure y col., 2001).

En la zona de San Pedro-Baradero es tradicional la producción de plantas de vivero, las cuales generan una gran cantidad de desechos. En particular, el cultivo de rosas (*Rosa sp.*) ocupa un lugar destacado en la organización productiva y comercial, cubriendo alrededor de 150 hectáreas de producción (Hansen, 2011). Se venden en maceta o a raíz desnuda. En el tiempo que lleva la obtención de una planta de tamaño comercial, se producen varias floraciones, las cuales se desechan, dejando el material a campo.

Los pétalos de flores comestibles son una fuente de compuestos polifenólicos que presentan entre otras propiedades, buena actividad antioxidante (Fernandes y col., 2017; Li y col., 2013; Li y col., 2014; Pires y col., 2018). En el grupo de investigación se han realizado previamente algunos trabajos en los que se ha verificado que las rosas de esta región presentan un alto contenido de polifenoles y compuestos con actividad antioxidante (Gabilondo y col., 2016).

El proceso de extracción de los polifenoles de la matriz en que se encuentren es una etapa clave para la obtención de los mismos (Cacace y Mazza, 2003). El método de extracción más utilizado es la extracción sólido-líquido (Alothman, Bhat y Karim, 2009), siendo el solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la relación sólido-líquido las variables que gobiernan dicho proceso (Bucić-Kojić y col., 2011).

La forma más conveniente para evaluar distintos factores y sus interacciones es realizar un diseño experimental de superficie de respuesta, a partir del cual se

disminuye la cantidad de experimentos y se facilita la interpretación de los resultados permitiendo la evaluación de las interacciones entre los factores estudiados (Bachir bey y col., 2014).

En base a lo comentado, este trabajo tuvo como objetivo optimizar las condiciones de extracción, empleando distintas combinaciones de etanol- agua, por diversos tiempos de contacto y a diferentes temperaturas, para maximizar la recuperación de compuestos polifenólicos y con alta actividad antioxidante a partir de dos cultivares de rosas de diferente color. También se evaluó la vinculación entre los polifenoles totales extraídos y la actividad antioxidante observada.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Se trabajó con dos cultivares de rosas (*Rosa sp.*): *Lovely Red (LR)* (color rojo) y *Malu (M)* (color rosa). Las flores con semejante estado de apertura se recolectaron en diciembre del año 2018 en viveros de la región de San Pedro. Los pétalos se retiraron de la flor en forma manual.

### **2.2. Deshidratación de muestras**

Los pétalos se deshidrataron por liofilización. Previo a dicho proceso se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h y luego se colocaron en un liofilizador Martin Christ Alpha 1-4 LD (Martin Christ, Alemania) por 48 h. Una vez deshidratados se molieron con un molinillo y se pasaron por un tamiz de malla n°20 A.S.T.M. Se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. Humedad**

La humedad final de los polvos se determinó mediante secado en estufa de vacío a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (método A.O.A.C. 920.151, 1990).

### **2.4. Diseño experimental**

Para evaluar el efecto del solvente ( $X_a$ ), la temperatura ( $X_b$ ), y el tiempo ( $X_c$ ) de extracción sobre la concentración de polifenoles totales y la actividad antioxidante en los dos cultivares se realizó un diseño factorial de Box- Behnken con tres factores a dos niveles en dos bloques. Se utilizaron tres puntos centrales por bloque para un total de 30 experimentos por cultivar de rosa. El orden de los experimentos fue aleatorizado. En la Tabla 1 se detallan los niveles empleados.

**Tabla 1.** Factores y niveles ensayados para la optimización de las condiciones de extracción

<b>Diseño de Box-Behnken</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Solvente</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	Xa (etanol: agua)	Xb (°C)	Xc (min)
<b>1</b>	100 :0	90	30
<b>0</b>	50:50	60	75
<b>-1</b>	0:100	30	120

## 2.5. Preparación de los extractos

Los pétalos se extrajeron con distintas proporciones de agua bidestilada y etanol absoluto en un baño termostatzado a diversas temperaturas y tiempos, según se detalla en el diseño experimental. Seguido a la extracción, el sobrenadante se separó del residuo sólido utilizando una centrífuga Eppendorf AG, 5804R (Eppendorf AG, Alemania) por 10 min a 4 °C y 6000 rpm. El pellet fue resuspendido en el solvente y luego centrifugado en las mismas condiciones. Se unieron los dos sobrenadantes llevando a volumen final con solvente. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

## 2.6. Determinación de polifenoles totales (PT)

Se determinó por el método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu a una alícuota del extracto diluido en el solvente de extracción, se le agregó agua bidestilada y luego de tres min se incorporó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 N. Se mantuvo 120 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro Perkin Elmer, UV/Vis Lamda 25 (Pekin Elmer, USA). Los resultados se expresaron como mg ácido gálico (AG) / g muestra seca (ms). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 2.7. Determinación de capacidad antioxidante (CA)

Se determinó mediante la reducción del radical DPPH· (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995). A 400 µl de extracto diluido se le agregaron 3,6 ml de solución de DPPH· 0,1 mM. Se mantuvo en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresaron en mg trolox / g ms. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

## 2.8. Análisis estadístico

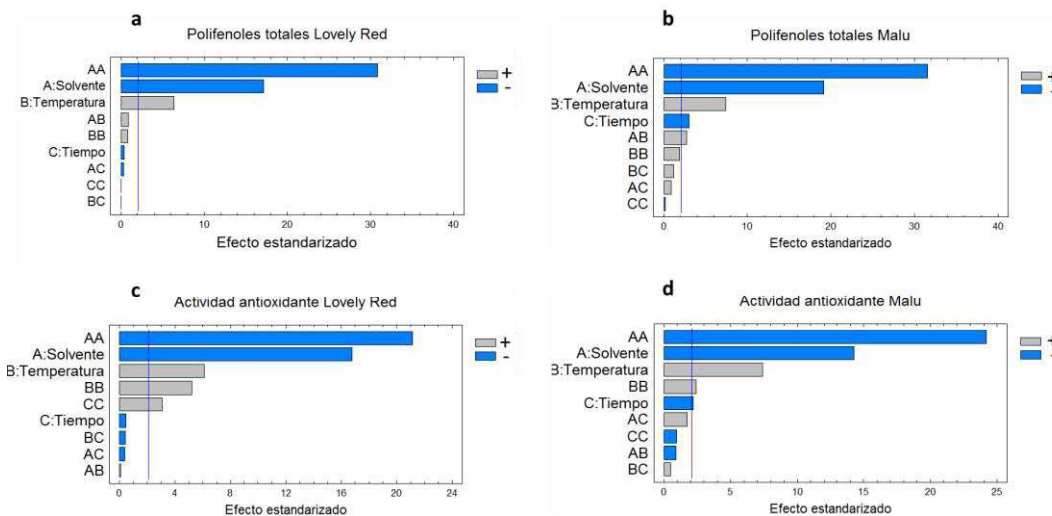
La creación del diseño factorial y el análisis de datos se realizaron mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Centurión XV, versión 15.02.05, Statpoint, Inc., USA). Los datos experimentales se ajustaron a un polinomio de segundo grado. La significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % ( $p \leq 0,05$ ).

La relación entre los PT y la CA fue caracterizada a través de una regresión lineal simple, en donde se calculó el coeficiente de correlación de Pearson con el Software Info Stat (Universidad de Córdoba).

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Diseño experimental

En la Figura 1 se observa que el solvente, tanto en su expresión lineal (A) como cuadrática (AA) así como la temperatura (B) fueron las variables que afectaron en forma significativa la extracción, tanto de los compuestos bioactivos en estudio como de la CA en ambos cultivares. El tiempo ejerció un efecto significativo de menor magnitud ya sea en su expresión lineal (C) o cuadrática (CC). En cuanto al solvente y al tiempo, el signo negativo asociado indica que una disminución en el contenido de etanol o un aumento en el tiempo favorece la extracción de PT y de la CA. Por el contrario, el signo positivo asociado al factor temperatura indica que el aumento de la misma favorece la extracción de los compuestos evaluados.



**Figura 1.** Diagrama de Pareto estandarizado de los factores estudiados y sus interacciones, donde A es el solvente, B la temperatura y C el tiempo de extracción según la respuesta analizada para PT (a en *Lovely Red* y b en *Malu*) y la CA (c en *Lovely Red* y d en *Malu*). Los valores que sobrepasan las líneas verticales dentro de cada gráfico se considera que tienen efecto significativo.

Se calcularon los coeficientes de regresión ajustados para los PT y la CA. Las ecuaciones de regresión ajustadas de acuerdo a las variables estudiadas para PT y CA en los cultivares *LR* y *M* que describen el modelo propuesto son:

$$Y_{PTLR} = 188,952 - 37,9875*X_a + 14,2238*X_b - 0,81625*X_c - 100,611*X_a^2 + 2,71375*X_a*X_b$$

$$Y_{PTM} = 122,33 - 26,9212*X_a + 10,3838*X_b - 4,2875*X_c - 65,1606*X_a^2 + 5,51375*X_a*X_b$$

$$Y_{CALR} = 418,44 - 124,999*X_a + 45,4069*X_b - 3,47937*X_c - 231,473*X_a^2 + 57,2281*X_b^2 + 33,6456*X_c^2$$

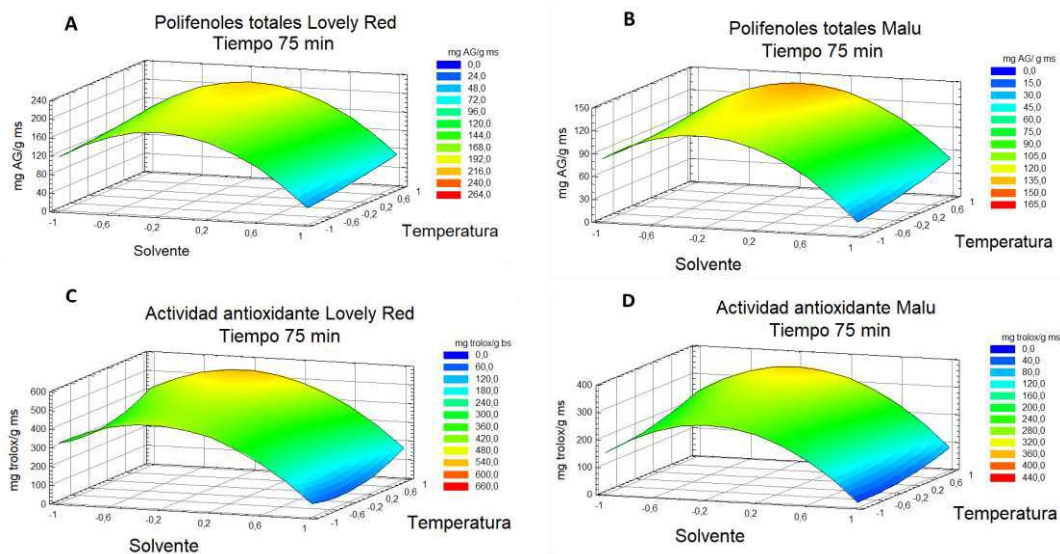
$$Y_{CAM} = 284,44 - 71,58*X_a + 37,1*X_b - 11,1175*X_c - 178,524*X_a^2 + 18,0762*X_b^2$$

En todas las ecuaciones la variable que presentó el mayor coeficiente es el solvente, el cual además ejerció un efecto significativo en su forma cuadrática. En todos los casos, el tiempo presentó el menor coeficiente de regresión y sólo en la CA de *LR* se manifestó la influencia del término cuadrático. La temperatura ejerció un efecto cuadrático sobre la CA. La interacción solvente temperatura solamente resultó significativa para los PT de ambos cultivares. Los análisis de varianza mostraron, para todos los casos, valores de  $R^2$  mayores a 98% y  $R^2$  ajustado superiores a 97% indicando que los datos ajustan adecuadamente con el modelo planteado.

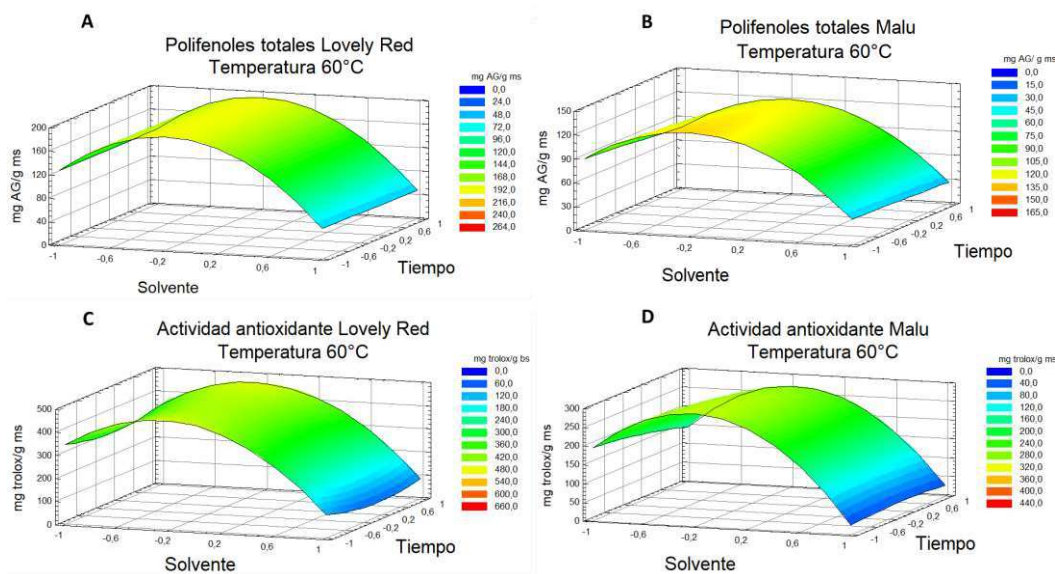
En base a las ecuaciones antes mencionadas se construyeron las superficies de respuesta a partir de las cuales se visualizan los efectos de la interacción de los factores en las respuestas estudiadas.

En las Figuras 2 y 3 se muestra la interacción entre el solvente y la temperatura y entre el solvente y tiempo, respectivamente, dejando la restante variable constante en su nivel central (75 min y 60 °C). En ambas Figuras, se pudo apreciar que para el solvente existe una región cercana al punto medio (etanol/agua, 50:50) en donde se maximiza la extracción de PT y de la CA en los dos cultivares de rosas. En estudios previos donde se analizó la CA de distintos compuestos vegetales se observó que la mezcla de solvente orgánico-agua resultó más eficiente para la extracción de dichos compuestos que sus respectivos solventes puros (Rababah y col., 2010). Esto se vincula con la influencia de la polaridad del solvente sobre la extracción (Moure y col., 2001; Alothman, Bhat y Karim, 2009), verificándose esta tendencia en los resultados obtenidos en este trabajo. Con respecto a la temperatura, se pudo apreciar que, independientemente de la presencia de una ligera curvatura, a los 90 °C se

maximiza la obtención de PT y la CA. El factor tiempo prácticamente no afectó la extracción.



**Figura 2.** Superficie de respuesta del diseño experimental evaluando la interacción entre el solvente y la temperatura al tiempo constante de 75 min: polifenoles totales (A *Lovely Red* y B *Malu*) y actividad antioxidante (C *Lovely Red* y D *Malu*).



**Figura 3.** Superficie de respuesta del diseño de Box-Behnken valorando la interacción entre el solvente y el tiempo a la temperatura de 60 °C: polifenoles totales (A *Lovely Red* y B *Malu*) y actividad antioxidante (C *Lovely Red* y D *Malu*).

A través de las ecuaciones de regresión se calcularon los niveles de los factores que permitirían optimizar la extracción de PT y la CA (Tabla 2). Para estos niveles, las concentraciones óptimas para PT serían 209,8 y 140,0 mg AG / g ms y para la CA, 578,2 y 352,0 mg trolox / g ms para *LR* y *M*, respectivamente. Es de destacar

que los valores antes mencionados resultaron próximos a los experimentales más altos obtenidos en las condiciones de extracción ensayadas los que fueron: 202 mg AG / g ms para *LR* y 141,3 mg AG / g ms para *M* (PT) y 544,6 mg trolox / g ms para la cultivar roja y 339,6 mg trolox / g ms para la de color rosa (*CA*). Los mismos se obtuvieron empleando como solvente agua/etanol 50:50 y a la temperatura de 90 °C para cualquiera de los tiempos de extracción ensayados.

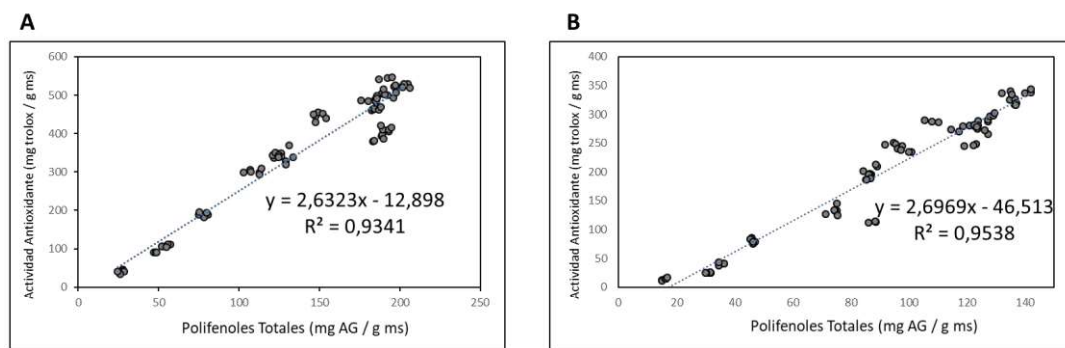
**Tabla 2.** Niveles y valores obtenidos para optimizar la extracción de polifenoles totales y compuestos con actividad antioxidante.

Cultivar	Polifenoles Totales		Actividad antioxidante	
	<i>Lovely Red</i>	<i>Malu</i>	<i>Lovely Red</i>	<i>Malu</i>
Solvente (agua:etanol)	60:40 (-0,2)*	60:40 (-0,2)*	65: 35 (-0,3)*	65: 35 (-0,3)*
Temperatura(°C)	90 (1)*	90 (1)*	90 (1)*	90 (1)*
Tiempo(min)	120 (-1)*	120 (-1)*	120 (-1)*	120 (-1)*

\*Entre paréntesis se presentan los niveles codificados.

Cabe destacar que el cultivar color rojo (*LR*) presentó mayor concentración de PT y *CA* en todas las condiciones ensayadas en comparación el cultivar rosa (*M*), situación que podría deberse a una posible relación entre el color y la capacidad antioxidante.

### 3.1 Análisis de correlación entre polifenoles totales y actividad antioxidante



**Figura 4.** Correlación entre PT y CA en los cultivares *Lovely Red* (A) y *Malu* (B).

Los polifenoles son los componentes mayoritarios de las plantas con actividad antioxidante, sin embargo, no son los únicos. En base a los resultados obtenidos de la correlación entre la concentración de PT y la CA, se pudo ver que en esta matriz y



bajo las condiciones ensayadas, éstos compuestos resultaron los principales responsables de la actividad antioxidante, presentando altos  $R^2$  para ambos cultivares de rosa (Figura 4) con coeficientes de Pearson de 0,96 y 0,98 para *LR* y *M*, respectivamente.

#### 4. Conclusiones

Los resultados mostraron que las rosas analizadas contienen una apreciable cantidad de compuestos fenólicos con CA, por lo que pueden ser consideradas como una prometedora fuente natural de los mismos. Los dos cultivares analizados respondieron de forma similar a las diversas condiciones ensayadas.

La elección de las condiciones adecuadas de extracción logró maximizar la obtención de los compuestos bioactivos de la matriz del pétalo. El solvente fue el factor que más afectó la respuesta, seguido por la temperatura, mientras que el tiempo no tuvo efecto significativo en las respuestas analizadas.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y a Adolfo Heguiabeheri de la Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro por haber colaborado con la cosecha y el traslado de las muestras.

#### 6. Referencias

- A.O.A.C., Association of the Official Analytical Chemists (1990). Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> Edición. Arlington, Virginia, USA.
- Alothman, M., Bhat, R., Karim, A.A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115 (3) 785–788.
- Bachir bey, M., Meziat, L., Benchikh, Y., Louaileche H. (2014). Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry* 162, 277–282.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Srećko, T., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 195-199.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from blackcurrants with aqueous ethanol. *Journal Food Science*, 72, 240–248.
- Cunja, V., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Schmitzer, V. (2014). Compound identification of selected rose species and cultivars: an insight to petal and leaf phenolic profiles. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 139, 157-166.

- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Saraiva, J.A., Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: a review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38-50.
- Gabilondo, J., Corbino, G., Schelegueda, L., Campos, C., Carduza, F., Langman, L.E., Soteras, T., Arroyo, L. (2016). Utilización de pétalos de rosa como insumo en la industria de alimentos. *Libro de trabajos completos, VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba, Argentina (CICYTAC 2016): Análisis físico-químico y sensoriales de los alimentos*. ISBN 978-987-45380-5-5.
- Hansen, L. (2011). Caracterización de los viveros de la zona de San Pedro (Buenos Aires). [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-lh\\_0802.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-lh_0802.pdf) Acceso: septiembre 2019.
- Li, A-N., Li, S., Li, H-B., Xu, D-P., Xu, X-R., Chen, F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods*, 6, 319-330.
- Li, S., Li, S-K., Gan, R-Y., Song, F-L., Kuang, L., Li, H-B. (2013) Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusion from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289-298.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72 (2), 145-171.
- Pires, T., Dias, M.I., Barros, L., Calhelha, R., Alves, M.J., Oliveira, B., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105: 580-588.
- Rababah, T.M, Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., Yang, W. (2010). Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. *Journal Food Science*, 75 (7), 626-632.
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.