



## Combining ability of the antioxidant activity in extracts of jamaica calyces

### Aptitud combinatoria de la actividad antioxidante de extractos de cálices de jamaica

Ruelas-Hernández, P.G\*, Aguilar-Castillo, J.A., Sumaya-Martínez, M.T.,  
López-Guzmán, G.G., Juárez-Rosete, C.R., Valdivia-Bernal, R., Sánchez-Herrera, M.L.

Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura,  
km 9 Carretera Tepic-Compostela, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

#### ABSTRACT

*Hibiscus sabdariffa* calyces present a significant percentage of phenolic compounds with high antioxidant capacity in its composition, and these appear to be associated with the prevention of diseases generated by oxidative stress and cardiovascular problems. These qualities may be increased through genetic improvement; the estimation of genetic parameters is useful in making decisions in an improvement program. The aim of this study was to determine the general combining ability (GCA), specific (SCA) and heterosis of the antioxidant activity of extracts from hibiscus calyces. China (1) Reina (2) and Huajicori Creole (3) varieties and three single crosses (2x1, 2x3 and 3x1) were used. Four measurement methods were used: total phenolic compounds (TPC), the antioxidant activity was determined by the methods: chelating activity (CA), DPPH • and ABTS • +. A completely randomized design was used with three repetitions and an average comparison test (Tukey, 0.05) was performed. The diallelic analysis showed statistical differences ( $p < 0.01$ ) in the variation sources of crosses, GCA and SCA. The highest significant GCA effects ( $p < 0.01$ ) were shown by China for TPC, DPPH • and ABTS • +, whereas for SCA crosses 2x3 showed positive effects ( $p < 0.01$ ) and the rest

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 5<sup>th</sup> 2014.

Accepted/Aceptado: April 2<sup>nd</sup> 2014.

#### RESUMEN

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* presentan en su composición un porcentaje importante de compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante; estos, parecen estar asociados con la prevención de enfermedades generadas por estrés oxidativo y problemas cardiovasculares. Estas cualidades es posible incrementarlas por medio del mejoramiento genético; la estimación de parámetros genéticos son útiles en la toma de decisiones en un programa de mejoramiento. El objetivo de este estudio fue determinar la aptitud combinatoria general (ACG), específica (ACE) y heterosis de la actividad antioxidante de extractos de cálices del hibisco. Se utilizaron las variedades China (1), Reina (2) y Criolla de Huajicori (3) y sus tres cruza simples (2x1, 2x3 y 3x1). Se emplearon cuatro métodos de determinación: Compuestos fenólicos totales (CFT), la actividad antioxidante se determinó mediante los métodos: actividad quelante (AQ), DPPH• y ABTS•+. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y se realizó prueba de comparación de medias (Tukey, 0.05). El análisis dialélico mostró diferencias estadísticas ( $p < 0.01$ ) en las fuentes de variación de cruza, ACG y ACE. Los mayores efectos significativos de ACG ( $p < 0.01$ ) fueron mostrados por China para CFT, DPPH• y ABTS•+, en tanto que para ACE, la cruza 2x3 mostró efectos positivos ( $p < 0.01$ ) y el resto expresó va-

#### \*Corresponding Author:

Pablo German Ruelas-Hernandez, Profesor-Investigador, Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, km 9 Carretera Tepic-Compostela, C.P. 63780, Xalisco Nayarit, México. Phone: +52(311) 211 0128, E-mail: pablogerman82@hotmail.com

expressed negative values. In the average tests, China presented the highest values for TPC, DPPH• and ABTS•+ with  $306.4 \pm 34.1$  (GAE mg L<sup>-1</sup>),  $1,598.8 \pm 88.8$  (μmol ET L<sup>-1</sup>) and  $269.6 \pm 6.7$  (AE/100 mL) respectively. Expressions of heterosis were not found. The samples did not show CA. For future genetic improvement studies, the use of selection methods is recommended.

lores negativos. En la prueba de medias China presentó los más altos valores para CFT, DPPH• y ABTS•+ con  $306.4 \pm 34.1$  (EAL mg L<sup>-1</sup>),  $1,598.8 \pm 88.8$  (μmol ET L<sup>-1</sup>) y  $269.6 \pm 6.7$  (EA/100 mL) respectivamente. No hubo expresiones de heterosis. Las muestras no mostraron AQ. Para futuros trabajos de mejoramiento genético se recomienda el empleo de métodos de selección.

---

## KEY WORDS

---

*Hibiscus sabdariffa*, antioxidant activity, dialelic analysis, heterosis.

---



---

## PALABRAS CLAVE

---

*Hibiscus sabdariffa*, actividad antioxidante, análisis dialelico, heterosis.

---

### Introduction

Jamaica is an autogamous plant that belongs to the Malvaceae family. Its calyces are commercially appreciated because of their wide uses ranging from the elaboration of flavored water, jelly and paste, to their red-colored extracts that are used in the food and pharmaceutical industries (Galicia *et al.*, 2007).

*Hibiscus sabdariffa* calyces are compound by a high percentage of dietetic fiber as well as a high antioxidant capacity (Sáyago and Goñi, 2010); calyces contain acids (tartaric, citric and malic), glucose compounds and phenolic contents such as anthocyanins (Wong *et al.*, 2007); phenolic contents seem to be associated with the prevention of diseases generated by oxidative stress and cardiovascular problems (Salazar-González *et al.*, 2012).

Extracts obtained from their calyces have been attributed several medicinal properties such as diuretic effects, choleretics, blood pressure reduction, intestinal peristalsis stimulation, astringent, digestive, emollient and sedative actions (Duke *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Al-Baghdadi, 2011). Currently, knowing the antioxidant capacity and contents of consumed food is of great interest for experts in health and nutrition (Huang *et al.*, 2005).

The antioxidant activity in this species can be increased by genetic improvement; characterization of progenitors by its general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) allows the establishment of adequate strategies and techniques in order to estimate genetic parameters and establish the most suitable genetic improvement from a particular characteristic (Hallauer and Miranda,

### Introducción

La Jamaica es una planta autógena perteneciente a la familia de las Malváceas. Sus cálices son apreciados comercialmente, ya que son parte de la dieta alimenticia en la elaboración de aguas frescas, gelatinas y ates, también a partir de estos se pueden obtener extractos de color rojo con aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica (Galicia *et al.*, 2007).

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* presentan en su composición un porcentaje importante de fibra dietética así como una elevada capacidad antioxidante (Sáyago y Goñi, 2010); los cálices contienen ácidos (tartárico, cítrico y málico), compuestos glucósidos y componentes fenólicos como antocianinas (Wong *et al.*, 2007); los compuestos fenólicos parecen estar asociados con la prevención de enfermedades generadas por estrés oxidativo y problemas cardiovasculares (Salazar-González *et al.*, 2012).

A los extractos que se obtienen a partir de sus cálices se le han atribuido diferentes propiedades medicinales como efectos diuréticos, coleréticos, reducción de la presión arterial, estimulación del peristaltismo intestinal, acción astringente, digestiva, emoliente y sedativa (Duke *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Al-Baghdadi, 2011). Actualmente es de gran interés para expertos en salud y nutrición el conocer la capacidad antioxidante y componentes de los alimentos que se consumen (Huang *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante que presenta esta especie es posible incrementarla por medio del mejoramiento genético; la caracterización de los progenitores por su aptitud combinatoria general (ACG) y aptitud combinatoria específica (ACE) permite establecer las estrategias y técnicas adecuadas para estimar parámetros genéticos y el método de mejoramiento genético más adecuado de un carácter en particular (Hallauer y Miranda, 1981); esto, en especies alógamas y

1981) in allogamous and autogamous species. Diallelic crosses are simple crosses that can be made among elements of a basic compound of  $p$  progenitor lines (Griffing, 1956).

GCA is considered to be associated to the genic action of the additive type and SCA to the no additive type – dominance and overdominance- (Falconer, 1972). The progenies of crosses ( $F_1$ ) produce information about progenitors by measuring on it interest characters.

The objective of this study was to estimate the effects of GCA, SCA and heterotics in the antioxidative activity of extracts of calyces of “jamaica” in three varieties and its progenies ( $F_{1s}$ ).

## Materials and Methods

### Genotypes used

Calyces obtained in a diallelic cross between three varieties of jamaica: Chinese, Reina and Creole, and their three direct crosses ( $F_{1s}$ ) were used. Crosses were performed in the 2008 season in the Agriculture School in Xalisco, Nayarit, and in the 2009 season they were established in Huajicori, Nayarit, Mexico.

### Sample preparation

This work was developed in the laboratories of the Technological Unit of Food in the State University of Nayarit in June, 2010. The sample was prepared from dry calyces taken from ten plants of each genotype. From each plant, three random calyces were taken, which were mixed. The content of humidity in the sample was standardized using a drying oven for 48 hours at 60 °C and they were posteriorly grounded.

The extract was obtained by taking 1 g of each of the samples, it was then added with 100 mL of distilled water at boiling point and were submerged in a recipient with boiling water for three minutes.

### Determination of total phenolic compounds (TPC)

The TPC analysis was determined based in the procedure described by Stintzing (2005) using the Folin-Ciocalteu reactive and gallic acid as standard. The results were expressed in miligrams from the equivalent of gallic acid (EGA) per liter (EGA mg L<sup>-1</sup>).

autógamas. Las cruas dialélicas son las cruas simples que pueden lograrse entre los elementos de un conjunto básico de  $p$  líneas progenitoras (Griffing, 1956).

La ACG se considera asociada a la acción génica de tipo aditivo y la ACE a la de tipo no aditivo (dominancia y sobredominancia (Falconer, 1972). La progenie de las cruas ( $F_1$ ) produce información sobre los progenitores al medir sobre ella los caracteres de interés.

El objetivo del presente estudio fue estimar los efectos de ACG, ACE y heteróticos de la actividad antioxidante de extractos de cálices de jamaica de tres variedades y la de sus progenies ( $F_{1s}$ ).

## Materiales y Métodos

### Genotipos usados

Cálices obtenidos en un cruzamiento dialélico entre tres variedades de jamaica, China, Reina y Criolla y sus tres cruas directas ( $F_{1s}$ ) fueron utilizadas, los cruzamientos fueron realizados en el temporal del 2008 en la Unidad Académica de Agricultura en Xalisco, Nayarit, y en el temporal del 2009 se establecieron en la localidad de Huajicori, Nayarit, México.

### Preparación de la muestra

El trabajo fue desarrollado en los laboratorios de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit en el mes de Junio del 2010. La muestra se preparó a partir de cálices secos provenientes de diez plantas de cada genotipo, de cada planta fueron tomados tres cálices al azar los cuales fueron mezclados, el contenido de humedad de la muestra se estandarizó utilizando un horno de secado por un tiempo de 48 horas a 60 °C para posteriormente ser molidos.

La obtención del extracto se realizó tomando 1 g de cada una de las muestras, al que se le agregaron 100 mL de agua destilada a ebullición y fueron sumergidos en un recipiente con agua en estado de ebullición por un tiempo de tres minutos.

### Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

El análisis de CFT se determinó en base al procedimiento descrito por Stintzing (2005) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalente de ácido gálico (EAG) por litro (EAG mg L<sup>-1</sup>).

**Antioxidant activity DPPH•(radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)**

Antiradical activity was determined according to the reported procedure by Morales and Jimenez-Perez (2001), with slight modification. One aliquot of each sample (100  $\mu\text{L}$ ) was added to 500  $\mu\text{L}$  of a solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) at a concentration of 74  $\text{mg L}^{-1}$  in ethanol. From the mixes, 200  $\mu\text{L}$  were placed in a 96-well microplate, measuring absorbance immediately (time zero) at 520 nm using a spectrophotometer Synergy HT Bio Tek. The evaluation of the antiradical activity for the samples was measured in terms of decrease of absorbance at 520 nm from the ethanolic solution DPPH• produced by the effect of each compound as a result of its capacity to donate a hydrogen in order to give the reduced form of DPPH•. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as standard. Antiradical activity for every compound was determined in  $\mu\text{mol}$  equivalent of trolox/liter ( $\mu\text{mol ET L}^{-1}$ ).

**Antioxidative activity ABTS•+ (2,2' azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)**

For the assay ABTS•+, the procedure was performed by using the suggested method by Re (2000) with some modifications. The main solution included 7 mM ABTS•+ and  $\text{K}_2\text{SO}_8$  2.45 mM. The working solution was then prepared mixing two solutions in equal amounts allowing them to react during 16 h at 4 °C in total darkness. After that, the solution was dissolved in water to obtain an absorbance of 0.8 units at 754 nm using the spectrophotometer. ABTS•+ solutions were prepared per day for every assay. Samples of 20  $\mu\text{L}$  were mixed with 980  $\mu\text{L}$  of ABTS•+ solution during 10 min. Then, absorbance was measured for 7 minutes reading every minute at 754 nm, using the micro-spectrophotometer. The standard linear curve was among 0 and 300  $\text{mg}/100 \text{ mL}$  of ascorbic acid. The results are expressed in  $\text{mg}$  of equivalent of ascorbic acid/100 mL (EA/100 mL).

**Chelating activity (CA)**

The method described by Gulcin *et al.*, (2003) was used with slight modifications from Chen *et al.*, (2003). Samples of 100  $\mu\text{L}$  were placed in vials. Afterwards, 50  $\mu\text{L}$  of  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 nM) and 450  $\mu\text{L}$  of methanol; it was agitated with vortex at room temperature and left for 5 minutes. Then, 200  $\mu\text{L}$  of ferrosin were added, repeating agitation with vortex and leaving it at room temperature for 10 min. Absorbance was read at a wavelength of 562 nm in a microplate reader. Deionized water was used as control.

**Actividad antioxidante DPPH• (radical 1,1-Difenil-2-picril hidracilo)**

La actividad antirradical se estimó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001), con modificación. Una alícuota de cada muestra (100  $\mu\text{L}$ ) se añadió a 500  $\mu\text{L}$  de una solución de 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH•) a una concentración de 74  $\text{mg L}^{-1}$  en etanol. Después de 1 h de reacción se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 520 nm usando un lector de microplacas Synergy HT marca Biotek. La evaluación de la actividad antirradical para las muestras se midió en términos de disminución de la absorbancia a 520 nm de la solución etanólica DPPH• producida por el efecto de cada compuesto como resultado de su capacidad para donar un lugar de hidrógeno para dar la forma reducida de DPPH•. Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) fue usado como estándar. La actividad antirradical para cada compuesto fue determinada en  $\mu\text{mol}$  de equivalente de trolox/litro ( $\mu\text{mol ET L}^{-1}$ ).

**Actividad antioxidante ABTS•+ (ácido 2,2' azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)**

Para el ensayo ABTS•+, el procedimiento fue el método sugerido por Re (2000) con algunas modificaciones. La solución madre incluyó 7 mM ABTS•+ y 2.45 mM de  $\text{K}_2\text{SO}_8$ . La solución de trabajo fue preparada mezclando ambas soluciones en una proporción 1:0.5 (v/v), permitiéndoles reaccionar durante 16 h a 4 °C en oscuridad total. Posteriormente, la solución se diluyó en agua para obtener una absorbancia de 0.8 unidades a 754 nm utilizando el espectrofotómetro. Se prepararon soluciones al día de ABTS•+ para cada ensayo. Muestras de 20  $\mu\text{L}$  se dejaron reaccionar con 980  $\mu\text{L}$  de solución de ABTS•+ durante 10 min. A continuación se midió absorbancia por 7 minutos tomando lectura cada minuto a 754 nm utilizando un lector de microplacas. La curva lineal estándar fue entre 0 y 300  $\text{mg}/100 \text{ mL}$  de ácido ascórbico. Los resultados se expresan en  $\text{mg}$  de equivalente de ácido ascórbico/100 mL (EA/100 mL).

**Actividad quelante (AQ)**

Se utilizó el método descrito por Gulcin *et al.*, (2003) con ligeras modificaciones Chen *et al.*, (2003). Muestras de 100  $\mu\text{L}$  se colocaron en viales. Posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 nM) y 450  $\mu\text{L}$  de metanol, se agitó con vortex a temperatura ambiente dejando en reposo durante 5 minutos; a continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de ferrozina, repitiendo la agitación con vortex y dejando en reposo a temperatura ambiente por 10 min. Se leyó absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en un lector de microplacas. Se utilizó agua desionizada como blanco de control.

### Experimental design

For every method, an experimental design was used randomly. Each sample was analyzed by triplicate considering each as a repetition.

### Dialelic Analysis

The behavior of hybrids ( $F_{1s}$ ) and progenitors was evaluated based in the model I method II of diallelic analysis, which uses progenitors and simple direct crosses, proposed by Griffing (1956). Lineal model was:  $Y_{ijk} = \mu + g_i + g_j + S_{ij} + e_{ijk}$ ;  $i, j = 1, \dots, p$ ;  $k = 1, \dots, r$ , where:  $Y_{ijk}$  is the observed value of the cross with progenitors  $i$  and  $j$  in repetition  $k$ ;  $\mu$  is the average effect of all observations;  $g_i$  the general combining ability effect of the progenitor  $i$ ;  $S_{ij}$  represented the specific combining ability effect of the cross  $i \times j$ , and  $e_{ijk}$  the experimental error. The data were analyzed with the computer program DIALLEL (Burrow and Coors, 1994). In order to determine the statistical significance of the GCA and SCA effects,  $F$  test was used. In order to compare the differences between the effect, DMS test was used in base of  $t$ , and calculating the standard error in accordance to Kang (1994).

GCA/SCA ratio was calculated by taking directly the values of the medium squares in order to establish the proportion between effects. The estimation of heterosis was made based in formula  $H = ((F_1 - VPM) / VPM) \times 100$ ; where:  $F_1$  is the average value of the cross,  $VPM$  is the progenitor's value of higher value. In order to statistically differentiate genotypes for each of the methods, an average comparison test based in Tukey (0.05) was made, using the computer program Statistical Analysis System (SAS, 2002).

## Results and Discussion

### Dialelic Analysis

Excepting CA, since the samples did not show this activity, the results showed significant statistical differences ( $p \leq 0.01$ ) among the crosses averages in the three remaining evaluation methods (Table 1); both GCA and SCA showed significant statistical differences ( $p < 0.01$ ), which suggests that the genic additive action as well as the no additive action were manifested in the expression of the antioxidant activity and in the concentration of total phenolic compounds (TPC). Nevertheless, values shown in Table 2 of the relation GCA/SCA, GCA values are higher,

### Diseño experimental

Para cada método se utilizó un diseño experimental completamente al azar, cada muestra fue analizada por triplicado considerando cada una como una repetición.

### Análisis dialélico

El comportamiento de los híbridos ( $F_{1s}$ ) y progenitores se evaluó con base en el análisis dialélico modelo I, método II, el cual utiliza progenitores y cruza simples directas propuesto por Griffing (1956), el modelo lineal fue:  $Y_{ijk} = \mu + g_i + g_j + S_{ij} + e_{ijk}$ ;  $i, j = 1, \dots, p$ ;  $k = 1, \dots, r$ , donde:  $Y_{ijk}$  es el valor observado de la cuza con progenitores  $i$  y  $j$  en la repetición  $k$ ;  $\mu$  es el efecto medio de todas las observaciones;  $g_i$  fue el efecto de aptitud combinatoria general del progenitor  $i$ ;  $S_{ij}$  represento el efecto de aptitud combinatoria específica de la cruza  $i \times j$  y  $e_{ijk}$  el error experimental. Los datos fueron analizados con el programa para computadora DIALLEL (Burrow y Coors, 1994). Para determinar la significancia estadística de los efectos de ACG y ACE se utilizó la prueba de  $F$ ; para comparar las diferencias entre los efectos se utilizó la prueba de DMS en base a  $t$  y calculando el error estándar de acuerdo con Kang (1994).

El cociente de ACG/ACE se calculó tomando directamente los valores de los cuadrados medios para establecer la proporción entre los efectos. La estimación de heterosis se realizó en base a la fórmula  $H = ((F_1 - VPM) / VPM) \times 100$ ; donde:  $F_1$  es el valor promedio de la cruza,  $VPM$  es el valor del progenitor de mayor valor. Para diferenciar estadísticamente genotipos para cada uno de los métodos, se realizó una prueba de comparación de medias en base a Tukey (0.05) utilizando el programa para computadoras Statistical Analysis System (SAS, 2002).

## Resultados y Discusión

### Análisis dialélico

Con excepción para AQ ya que las muestras no mostraron esta actividad, los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre las medias de las cruza en los tres métodos de evaluación restantes (Tabla 1); para ACG y ACE ambas mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ), lo que sugiere que tanto la acción génica aditiva como la no aditiva se manifestaron en la expresión de la actividad antioxidante y en la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT). Sin embargo, los valores mostrados en el Tabla 2 de la relación ACG/ACE, son mayores los

therefore additive effects were more important for the expression of these characteristics.

Antioxidant activity is related with the content of anthocyanins. Tsai *et al.*, (2002) reported that from the total of antioxidant activity of the extracts of jamaica calyces, 51 % is due to anthocyanins and 24 % to other phenolic compounds in the solution. On the other hand, Ruiz *et al.*, (2008) found a positive correlation ( $r=0.72$ ) between antioxidant activity and anthocyanin content in corn grain studies. Ruelas *et al.*, (2008) found similar results regarding high values of GCA in the anthocyanin concentration of jamaica, where the effects of the genic additive action were the ones with major importance.

#### General Combining Ability (GCA)

Values for effects of GCA showed a potential estimation of the progenitors to transfer some of these characteristics to their descendants. The highest significant positive effects ( $p\leq 0.01$ ) were shown by China for TPC and for both determination methods of antioxidant activity. Values of the obtained effects by Reina and Creole were significant negative ( $p\leq 0.01$ ), except TPC and DPPH• where Reina obtained  $p\leq 0.05$ .

de ACG por lo que los efectos aditivos fueron más importantes para la expresión de estas características.

La actividad antioxidante está relacionada con el contenido de antocianinas, Tsai *et al.*, (2002) reportaron que del total de la actividad antioxidante de extractos de cálices de jamaica, el 51 % se debe a las antocianinas y un 24 % a otros compuestos fenólicos en la solución. Por otra parte, Ruiz *et al.*, (2008) en estudios en granos de maíz encontraron una correlación positiva ( $r=0.72$ ) entre actividad antioxidante y contenido de antocianinas; Ruelas *et al.*, (2008) encontraron resultados similares en valores altos de ACG en la concentración de antocianinas en cálices de jamaica, en donde los efectos de la acción génica aditiva fueron los que tuvieron la mayor importancia.

#### Aptitud combinatoria general (ACG)

Los valores de los efectos para ACG mostraron una estimación del potencial de los progenitores para transmitir algunas de estas características a sus descendientes; los mayores efectos positivos significativos ( $p\leq 0.01$ ) fueron mostrados por China para CFT y para ambos métodos de determinación de la actividad antioxidante. Los valores de los efectos obtenidos por Reina y Criolla fueron negativos significativos ( $p\leq 0.01$ ), con excepción en CFT y DPPH• en donde Reina obtuvo una  $p\leq 0.05$ .

**Table 1.**  
Average squares of dialytic analysis and total phenolic contents (TPC) and antioxidant activity obtained from two determination methods (DPPH• and ABTS•+) in ex-

**Tabla 1.**  
Cuadrados medios del análisis dialítico y significancia de compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante obtenida a partir de dos métodos de determinación (DPPH• y ABTS•+) en extractos de cálices de jamaica.

Sources of variation	G. L.	Methods		
		TPC (EAG mg L <sup>-1</sup> )	DPPH• (μmol ET L <sup>-1</sup> )	ABTS•+ (EA/100 mL)
Repetitions	2	4074.3	7404.1	53.7
Genotypes	5	7293.1**	177574.7**	5065.3**
GCA	2	11847.2**	263861.6**	7274.2**
SCA	3	4257.1**	120050.2**	3592.7**
Error	10	509.3	3830.8	171.7
Total	17			
r <sup>2</sup>		0.89	0.95	0.93
C. V. (%)		10.9	5.5	7.03

Significance, \*  $p\leq 0.05$  and \*\* $p\leq 0.01$  respectively.

Significancia, \*  $p\leq 0.05$  y \*\* $p\leq 0.01$  respectivamente.

### Specific Combining Ability (SCA)

Values shown by SCA (Table 2) pointed the behavior of each of the crosses; Reina x China (2x1) expressed significant negative effects ( $p \leq 0.01$ ) in the antioxidant activity of both methods, the same for TPC, with only one  $p \leq 0.05$ . The cross Reina x Criolla (2x3) showed significant positive effects ( $p \leq 0.01$ ) in antioxidant activities (DPHH•), in the remaining resulted with non-significant statistical values. Finally, Criolla x Creole (3x1) expressed the highest negative significant effects ( $p \leq 0.01$ ) for all methods.

### Aptitud combinatoria específica (ACE)

Los valores mostrados por ACE (Tabla 2) señalaron el comportamiento de cada una de las cruza; Reina x China (2x1), expresó efectos negativos significativos ( $p \leq 0.01$ ) en la actividad antioxidante en ambos métodos, igualmente para CFT solo con una  $p \leq 0.05$ . La cruza Reina x Criolla (2x3) mostró efectos positivos significativos ( $p \leq 0.01$ ) en actividad antioxidante (DPHH•) en el resto resultó con valores estadísticos no significativos. Finalmente Criolla x China (3x1) expresó los mayores valores negativos significativos ( $p \leq 0.01$ ) para todos los métodos.

**Table 2.**  
Effects for GCA, SCA, significance and relation GCA/SCA in total phenolic contents and antioxidant activity evaluated by two determination methods in extracts of Jamaica calyces.

**Tabla 2.**  
Efectos para ACG, ACE, significancia y relación ACG/ACE en compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante evaluada por dos métodos de determinación en extractos de cálices de jamaica.

Methods <sup>†</sup>	GCA			SCA			GCA/SCA
	Progenitors			Crosses <sup>††</sup>			
	China	Reina	Creole	2 X 1	2 X 3	3 X 1	
TPC	32.2**	-12.7*	-19.4**	-31.3*	21.3 <sub>ns</sub>	-38.6**	2.78 : 1
DPPH•	147.6**	-38.6*	-109.0**	120.2**	104.7**	-239.9**	2.19 : 1
ABTS•+	25.4**	-12.1**	-13.1**	-29.4**	7.7 <sub>ns</sub>	-35.8**	2.02 : 1

<sup>†</sup>TPC (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL). <sup>††</sup>China (1), Reina (2), Creole (3). Significance, \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  respectively.

<sup>†</sup>CFT (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL). <sup>††</sup>China (1), Reina (2), Criolla (3). Significance, \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  respectivamente.

### Heterosis

SCA effects have a relation with the heterosis expressions (dominance and overdominance), which were reflected in the percentages obtained in both TPC and antioxidant activity (DPPH• y ABTS•+ methods). All crosses expressed negative percentages (Table 3); that is, they did not exceed the average value of the progenitor with the highest value, excepting the cross Reina x Creole (2 x 3) which resulted with positive value but with an insignificant percentage (1.87 %).

### Heterosis

Los efectos de ACE tienen relación con las expresiones de heterosis (dominancia y sobredominancia), mismos que se reflejaron en los porcentajes obtenidos tanto en CFT y actividad antioxidante (métodos DPPH• y ABTS•+). Todas las cruza expresaron porcentajes negativos (Tabla 3); es decir, no rebasaron el valor medio del progenitor de mayor valor, con excepción de la cruza Reina x Criolla (2 x 3) que resultó con valor positivo, pero con un porcentaje insignificante (1.87 %).

**Table 3.**  
Percentages of heterosis in total phenolic compounds and two determination methods of antioxidant activity obtained in extracts of jamaica calyces.

**Tabla 3.**  
Porcentajes de heterosis en compuestos fenólicos totales y dos métodos de determinación de actividad antioxidante obtenidos en extractos de cálices de jamaica.

Methods†	Heterosis in crosses (%)		
	Reina x China	Reina x Creole	Creole x China
TPC	-14.2	1.87	- 20.4
DPPH•	- 8.1	- 0.15	- 23.8
ABTS•+	-15.3	-1.4	-19.3

†TPC (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL).

‡CFT (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL).

#### Test of average comparison

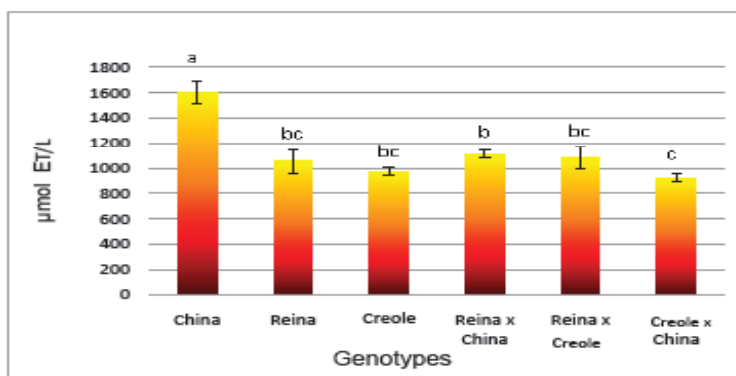
##### Antioxidant activity DPPH•

Flavonoid compounds are directly related to antioxidant activity, which was evaluated through the reaction of free radicals DPPH• reduction, which is the widely used method for the determination of this activity (Prior *et al.*, 2005). Obtained values in the antioxidant activity of extracts of calyces from China, Reina, Creole and their crosses (F<sub>1s</sub>) measured by the DPPH• method showed statistical differences between the genotypes with the formation of four statistically equal groups (Figure 1). The highest values were shown by China with 1598.9 ± 88.8 μmol ET/L (Table 4). Galicia-Flores (2007) reported that the China variety presented high activity as a result of a major anthocyanin concentration in its calyces. Although these values were not seen in the progenies where China was the common progenitor, since the cross Creole x China showed the lowest values (922.2 ± 33.6 μmol ET L<sup>-1</sup>).

#### Prueba de comparación de medias

##### Actividad antioxidante DPPH•

Los compuestos flavonoides están directamente relacionados con la actividad antioxidante, la que fue evaluada por medio de la reacción de reducción de radicales libres DPPH• el cual es el método más ampliamente utilizado para la determinación de esta actividad (Prior *et al.*, 2005). Los valores obtenidos de la actividad antioxidante de los extractos de cálices de las variedades China, Reina, Criolla y sus cruza (F<sub>1s</sub>) medidas por el método DPPH• mostraron diferencias estadísticas entre los genotipos con la formación de cuatro grupos estadísticamente iguales (Figura 1); los más altos valores fueron mostrados por China con 1598.9 ± 88.8 μmol ET/L (Tabla 4). Galicia-Flores (2007) reportaron que la variedad China presentó alta actividad como resultado de una mayor concentración de antocianinas en sus cálices; aunque estos valores no se reflejaron en las progenies donde China fue el progenitor común, ya que la cruce Criolla x China mostró los valores más bajos (922.2 ± 33.6 μmol ET L<sup>-1</sup>).



**Figure 1.** Antioxidant activity DPPH•. Average values and standard deviation of genotypes. Columns with the same letters are statistically the same (Tukey 0.05).

**Figura 1.** Actividad antioxidante DPPH•. Valores medios y desviación estándar de genotipos. Columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).



### Antioxidant activity ABTS<sup>•+</sup>

The ABTS<sup>•+</sup> method is used to determine the capacity of an antioxidant to capture free radicals. Radical ABTS<sup>•+</sup> is one of the most used and is considered to be a high sensibility, quick and stable method (Morales *et al.*, 2001). The antioxidant activity measured by the ABTS<sup>•+</sup> methods and total phenolic compounds (Figures 2 and 3) was significantly high for the China, with values of  $269.6 \pm 6.7$  (EA/100 mL) and  $306.4 \pm 34.1$  (EAG mg L<sup>-1</sup>) respectively (Table 4). There was a significant correlation between total phenolic compounds and antiradical activity measured by DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> methods.

### Actividad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>

El método ABTS<sup>•+</sup> es un método usado para determinar la capacidad de un antioxidante para capturar radicales libres, el radical ABTS<sup>•+</sup> es uno de los más aplicados, y es considerado un método de alta sensibilidad, rápido y estable (Morales *et al.*, 2001). La actividad antioxidante medida por el método ABTS y la concentración de compuestos fenólicos totales (Figuras 2 y 3) fue significativamente alta por la variedad China con valores de  $269.6 \pm 6.7$  (EA/100 mL) y  $306.4 \pm 34.1$  (EAG mg L<sup>-1</sup>) respectivamente (Tabla 4). Existió una correlación significativa entre compuestos fenólicos totales y la actividad antirradical medida por los métodos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>.

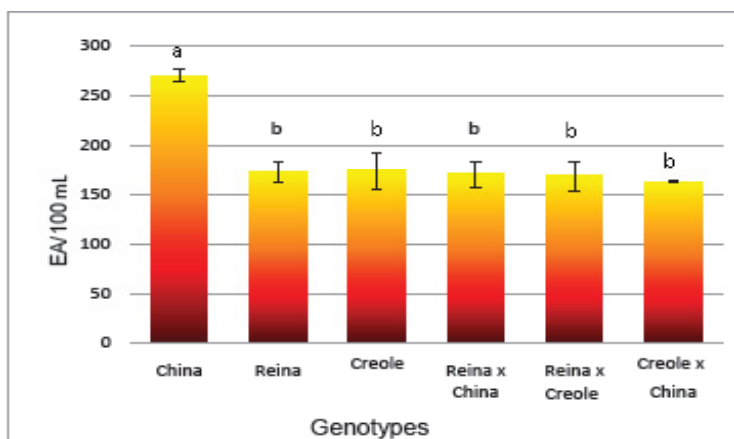


Figure 2. Antioxidant activity ABTS<sup>•+</sup>. Average values and standard deviation of genotypes. Columns with the same letters are not significantly different (Tukey < 0.05).

Figura 2. Actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>. Valores medios y desviación estándar de genotipos. Columnas con las mismas letras no presentan diferencias significativas (Tukey < 0.05).

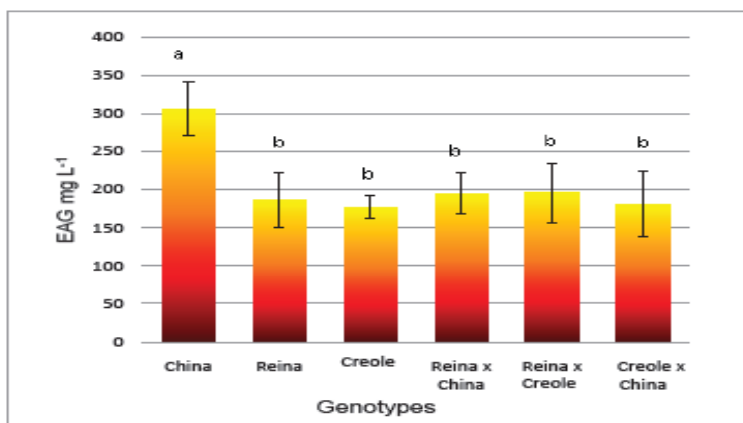


Figure 3. Total Phenolic Compounds (TPC). Average values and standard deviation of genotypes. Columns with the same letters are not significantly different (Tukey 0.05).

Figura 3. Compuestos Fenólicos Totales (CFT). Valores medios y desviación estándar de genotipos. Columnas con las mismas letras no presentan diferencias significativas (Tukey 0.05).

**Table 4.**  
Average values and standard deviation obtained in the determination of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (DPPH• y ABTS•+) in extracts of jamaica calyces.

**Tabla 4.**  
Valores medios y desviación estándar obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante (DPPH• y ABTS•+) en extractos de cálices de jamaica.

Method†	Progenitors			Crosses††		
	China	Reina	Creole	2x1	2x3	3x1
TPC	306.4±34.1	186.3±35.4	176.6±14.7	195±26.3	196±38.69	181±42.3
DPPH•	1598.8±88.8	1053.8±89.8	973±32.6	1112.2±30.7	1080.5±86.4	922.2±33.6
ABTS•+	269.6±6.7	172.7±9.8	173.7±19.1	170±12.7	168.5±15.6	162.4±1.3

†TPC (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL). ††Cruzas: (1)=China, (2)= Reina, (3)=Creole.

†CFT (EAG mg L<sup>-1</sup>), DPPH• (μmol ET L<sup>-1</sup>), ABTS•+ (EA/100 mL). ††Cruzas: (1)=China, (2)= Reina, (3)=Criolla.

## Conclusions

The diallelic crossing in *Hibiscus sabdariffa* allowed knowing that the TPC characters and antioxidant activity in additive effects were the ones that had major importance. The progenitor that showed better GCA was China for TPC and antioxidant activity, the analysis of comparing averages coincided with the highest values for the same genotype. Hybrid combinations did not show transcendent expressions of heterosis. For genetic improvement in this character, selection methods are suggested.

## Conclusiones

El cruzamiento dialélico en *Hibiscus sabdariffa* permitió conocer que los caracteres de CFT y actividad antioxidante en los efectos aditivos fueron los que tuvieron la mayor importancia. El progenitor que mostró mejor ACG fue China para CFT y actividad antioxidante, el análisis de comparación de medias coincidió con los más altos valores para este mismo genotipo. Las combinaciones híbridas no mostraron expresiones sobresalientes de heterosis. Para mejoramiento genético en este carácter se sugieren los métodos de selección.

## References

- Al-Baghadi, R.J.T. 2011. Physiological effects of roselle calyces extract in some blood parameters in laying hens. *Journal of veterinary medicine* 10(1): 54-58.
- Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E.S., et al. 2003. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of agriculture and food chemistry* 51: 5472-5477.
- Burrow, M.D. and Coors, J.G. 1994. DIALLEL: A microcomputer program for the simulation and analysis of diallel crosses. *Agronomy journal* 86: 154-158.
- Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin MJ, duCellier, J. and Duke, P.A.K. 2003. CRC Handbook of medicinal spices. CRC Press. Boca Raton London New York Washington, D.C. 360 pp.
- Falconer, D.S. 1981. Introducción a la genética cuantitativa. 2ª edición: New York: Editorial Logman Inc, 430 pp.
- Galicia-Flores, L.A., Salinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B.M. and Sánchez-Feria, C. 2007. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo serie horticultura* 14(2): 121-129.
- Griffing, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian journal biology science* 1956; 9: 463-493.

- Gulcin, I., Buyukokuroglu, M.E. and Kufrevioglu, O.I. 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal pineal research* 34(4): 278-281.
- Hallauer, A.R. and Miranda, J.B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press. Ames, Iowa 268-368.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(6): 1841-1856.
- Kang, M.S. 1994. Applied quantitative genetics. M. S. Kang Publisher. Baton Rouge. LA. 157 pp.
- Morales, F.J. and Jiménez-Pérez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Journal agriculture and food chemistry* 72: 119-125.
- Prior, R.L., Wu, X. and Shaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agriculture and foods chemistry* 53: 4290-4302.
- Re, R., Pelligrini, 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.
- Ruelas-Hernández, P.G., Caro-Velarde, F.J., Pérez-González, R. and Valdivia-Bernal, R. 2008. Aptitud combinatoria y heterosis en un cruzamiento dialélico en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Chapingo serie horticultura* 14(3): 325-330.
- Ruiz-Torres, N.A., Rincón-Sánchez, F., Hernández-López, V.M., Figueroa-Cárdenas, J.D. and Loarca-Piña, M.G.F. 2008. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Revista fitotecnia mexicana* 31(3): 29-34.
- Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F.T., Ortega-Regues, A.E. and Guerrero-Beltrán, J.A. 2012. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. *Ciencia e investigación agraria* 39(1): 79-90.
- Sáyago, S.G. and Goñi A.I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L.: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 60(1): 79-84.
- Statistical Analysis System (SAS). 2002. The SAS system for windows 9.0. SAS Institute, Inc. N. C. USA.
- Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., et al. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp) clones. *Journal agriculture and food chemistry* 72: 119-125.
- Tsai, G.P., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. and Jordan, B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food research international* 35: 351-356.
- Wong, P., Yusof, S., Ghazali, H.M. and Che-Man, Y.B. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and food science* 32: 68-73.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Ruelas-Hernández, P.G., Aguilar-Castillo, J.A., Sumaya-Martínez, M.T., López-Guzmán, G.G., Juárez-Rosete, C.R., Valdivia-Bernal, R., Sánchez-Herrera, M.L. (2014). Combining ability of the antioxidant activity in extracts of jamaica calyces. *Revista Bio Ciencias* 3(1): 28-38. <http://editorial.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/114/89>

