

Control de calidad farmacobotánico y fitoquímico de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)

Laura V. Vivas Leguizamón, Marcelo L. Wagner, Rafael A. Ricco*

Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (C1113AAB) C.A.B.A. República Argentina.

* Autor a quien dirigir correspondencia: raricco@ffyb.uba.ar

Resumen

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae), conocida como “hibisco” y “flor de Jamaica”, es empleada en la elaboración de té y de bebidas refrescantes libres de cafeína. La infusión es empleada como diurética, carminativa, colerética y laxante. El objetivo del trabajo fue determinar los parámetros farmacobotánicos y fitoquímicos (polifenoles) aplicables al control de calidad en un laboratorio de baja complejidad. Se analizaron muestras comerciales de flores de hibisco. Se realizaron disociados leves, infusiones y extractos hidroalcohólicos. El análisis microscópico permitió determinar la presencia de: epidermis con estomas anomocíticos; tricomas eglandulares cónicos; tricomas flexuosos; tricomas glandulares no capitados; tricomas glandulares capitados; tráqueas espiraladas; fibroesclereidas y drusas. Perfil de antocianos: se caracterizó por la presencia de dos bandas principales correspondientes a delphinidina-3-glucosilxilósido y cianidina-3-glucosilxilósido. En algunas muestras se detectó una tercera banda, de menor intensidad, que correspondería a cianidina-3-glucósido. Cuantificación de fenoles: las infusiones presentaron valores entre 6,27 a 14,84 EAG (equivalentes de ácido gálico: mg de ácido gálico/g mat. seco). Los extractos hidroalcohólicos entre 8,70 a 19,56 EAG. Cuantificación de antocianos: las infusiones presentaron valores entre 0,25 a 5,95 ECG (equivalentes de cianidina-glucósido: mg de cianidina-3-glucósido/g mat. seco). Los extractos hidroalcohólicos entre 0,40 a 7,80 ECG. Cuantificación de flavonoides: las infusiones presentaron valores entre 0,45 a 1,30 ER (equivalentes de rutina: mg de rutina/g mat. seco). Los extractos hidroalcohólicos, entre 0,50 a 1,35 ER. Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos: las infusiones presentaron valores entre 2,35 a 7,60 EAC (equivalentes de ácido clorogénico: mg de ácido clorogénico/g mat. seco). Los extractos hidroalcohólicos, entre 3,95 a 8,80 EAC. Las técnicas empleadas constituyen un punto de partida para la validación de los diferentes parámetros empleados en el control de calidad de muestras y extractos de hibisco, aplicables en un laboratorio de baja complejidad.

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae): Pharmacobotanic and phytochemical quality control

Summary

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae), known as “Hibiscus” and “Jamaica flower” is used in the preparation of tea and caffeine-free soft drinks. The infusion is used as diuretic, carminative, choleric and laxative. The objective of this research was to determine the pharmacobotanic and phytochemical (polyphenols) parameters that apply to quality control in a low complexity laboratory. Commercial samples of Hibiscus flowers were

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa* - análisis microscópico - polifenoles.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* - microscopic analysis - polyphenols.

analyzed. Soft dissociations, infusions and hydroalcoholic extracts were performed. Microscopic analysis showed the presence of: epidermis with anomocytics stomata; eglandular conical trichomes; eglandular flexuous trichomes; glandular non-capitate trichomes; glandular capitate trichomes, spiral tracheae; fibrosclereids and cluster crystals of calcium oxalate. Anthocyanins profile was characterized by the presence of two major bands corresponding to delphinidin-3-glucosylxyloside and cyanidin-3-glucosylxyloside. In some samples a band of lower intensity was detected, corresponding to cyanidin-3-glucoside. Phenol quantification: infusions showed levels between 6.27 to 14.84 AGE (acid gallic equivalents: mg gallic acid/g dry material), and hydroalcoholic extracts from 8.70 to 19.56 AGE. Anthocyanin quantification: infusions showed levels between 0.25 to 5.95 CGE (cyanidin-glucoside equivalents: mg cyanidin-3-glucoside/g dry material), and hydroalcoholic extracts from 0.40 to 7.80 CGE. Flavonoid quantification: infusions showed levels between 0.45 to 1.30 RE (rutin equivalents: mg rutin/g dry material), and hydroalcoholic extracts from 0.50 to 1.35 RE. Hydroxycinnamic acid quantification: infusions showed levels between 2.35 to 7.60 CAE (chlorogenic acid equivalents: mg chlorogenic acid/g dry material), and hydroalcoholic extracts from 3.95 to 8.80 CAE. The techniques used are a starting point for the validation of the different parameters used in the quality control of samples and extracts of *Hibiscus*, applicable in a low complexity laboratory.

Introducción

Hibiscus sabdariffa L., perteneciente a la familia Malvaceae, es conocida popularmente como “hibisco”, “rosa de Jamaica”, “rosa de Abisinia” o “flor de Jamaica”.

Es un subarbusto, anual, que puede alcanzar de 1 a 3 metros de altura. Presenta un tallo robusto y de color rojizo, que tiene hojas trilobadas, de 7 a 10 cm de diámetro, alternas en el tallo. La flor es de color rojo, de 3 a 4 cm de largo, formada por 4 o 5 pétalos. El cáliz y el epicáliz son carnosos y de color rojo intenso, y constituye la parte que se emplea de esta especie.

Se usa en la elaboración de té (“té de Jamaica”) y en la preparación de bebidas refrescantes libres de cafeína. Es común hallarlo formando mezclas con otras especies en la elaboración de tisanas. Es usado además, como aromatizante ácido y como colorante en jaleas, mermeladas, salsas y vinos, debido a su contenido de antocianos.

En lo que respecta al uso etnomédico, los cálices y las flores de hibisco, bajo la forma de infusión, son empleados como diurético, carminativo, colerético, laxante suave, entre otras aplicaciones (Alonso, 2004; Sáyago y col., 2010).

Respecto de las actividades farmacológicas reconocidas para los extractos de “hibisco” podemos citar: su acción sobre el sistema cardiovascular, actuando como hipotensor (Mojiminiyi y col., 2007; Ajay y col., 2007); diurético (Alarcón Alonso y col., 2012; Gurrola-Díaza y col., 2010; Mozaffari y col., 2009; Herrera y col., 2007); hipolipemiente

(Hirunpanicha y col., 2006; Fernández Arroyo y col., 2011) e hipoglucemiante (Yi-Sun y col., 2013).

El objetivo de este trabajo es determinar los parámetros farmacobotánicos y fitoquímicos (polifenoles, antocianos) aplicables al control de calidad de las muestras y los extractos de “hibisco” en un laboratorio de baja complejidad.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras comerciales compuestas por los cálices y los epicálices de las flores de “hibisco” (Foto 1).

Foto 1.- *Hibiscus sabdariffa*



Material vegetal analizado: cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

Análisis farmacobotánico

Comprende dos tipos de análisis: las descripciones macroscópicas y el estudio de los caracteres organolépticos (color, sabor, olor) de las muestras vegetales; mientras que los análisis microscópicos son la observación de los disociados y la micrometría de los elementos celulares (microscopía cuantitativa).

Se realizaron disociados leves con el objeto de determinar los caracteres microscópicos relevantes empleados en el análisis del control de calidad de las muestras comerciales. El método de disociado leve consiste en someter el material vegetal a la acción de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %, durante 5 min, a ebullición. Luego se enfría y se lava el material disociado con agua destilada y se observa con el microscopio.

Se realizó, además, un estudio de microscopía cuantitativa, que consistió en la medición de los elementos celulares relevantes. El disociado se observó mediante el empleo de microscopía de campo claro. Esta técnica ha sido seleccionada debido a su facilidad de ejecución, al poco tiempo de desarrollo y a la economía, factores indispensables en un laboratorio de baja complejidad.

Análisis fitoquímico

Sobre el material vegetal seleccionado se llevaron a cabo las extracciones correspondientes. Para cada extracto se determinó su perfil cromatográfico y se cuantificaron los fenoles totales, los antocianos, los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos.

Obtención del extracto acuoso (infusión)

Se realizaron infusiones al 5 % según la Farmacopea Nacional Argentina (VI edición). Se colocaron 5 g de las hojas pulverizadas en un erlenmeyer con tapa, se adicionaron 100 ml de agua destilada hirviendo y se dejó actuar durante 20 min. Luego se filtró, y el residuo se lavó con agua destilada hasta obtener un volumen final de 100 ml de extracto.

Obtención del extracto original etanólico (EOE)

Se partió de 5 g de material seco y molido. La extracción se llevó a cabo con 100 ml de etanol acuoso al 50 %, a 4 °C, durante 24 h. Posteriormente se filtró y se descartó el marco.

Cuantificación de fenoles totales

Se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Makkar y col. (1993). Alícuotas (50 µl) de los extractos fueron transferidas a tubos de ensayo, y se llevó el volumen a 500 µl con agua desionizada. A continuación, se adicionaron 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %; a los 40 minutos se midió la absorbancia a 725 nm; Se realizó una curva de calibración con ácido gálico; El contenido de los fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (EAG: mg ácido gálico/g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de antocianos

Se realizó mediante la técnica de cuantificación por espectroscopía diferencial, según una modificación de la técnica de Lee y col. (2005). Una alícuota del EEA se diluyó con 10 partes de una solución buffer KCl pH 1,0. Se realizaron las lecturas a 510 nm y 700 nm. Luego se efectuaron nuevamente las lecturas en buffer acetato de sodio pH 4,5. Se calcularon las diferencias de absorbancia:

$$(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

y se expresaron los contenidos de antocianos como equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG: mg de cianidina-3-glucósido/g material seco).

Cuantificación de flavonoides

(Adaptación de las técnicas de Woisky y Salatino, 1998; Chang y col., 2002).

Se mezcló 0,5 ml del extracto con 1,5 ml de etanol 95 %. Se agregaron posteriormente 0,1 ml de una solución acuosa de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v) y 0,1 ml de una solución acuosa 1 M de acetato de sodio. Se llevó a un volumen final de 5 ml con agua destilada y la mezcla se dejó reposar por 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 415 nm. Se realizó una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresó como equivalentes de rutina (ER: mg rutina/g material seco).

Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos

(Modificación del método de Dao y Friedman, 1992).

Alícuotas de 50 μ l del extracto se llevaron a volumen (2 ml) con etanol absoluto. Se determinó la absorbancia a 328 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco).

Perfil de antocianos

Se llevó a cabo mediante la realización de cromatografías en TLC de Sílica Gel empleando como fase móvil el sistema de solventes acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).

Se empleó como testigo un extracto constituido por glicósidos de cianidina y pelargonidina (cianidina-3-glucósido, cianidina-3-ramnosilglucósido, pelargonidina-3-glucósido, pelargonidina-3-ramnosilglucósido).

Resultados

Análisis farmacobotánico

Análisis macroscópico

El material vegetal analizado consta de los cálices (constituido por 5 sépalos) y epicálices (calículos) secos de las flores, que se presentan conservados o triturados; color rojo-morado intenso; sabor dulce y olor característico. Cuando se presentan enteros, su longitud promedio es de 30 mm.

En la observación macroscópica, en ninguno de los materiales analizados se detectó la presencia de material extraño.

Análisis microscópico

El estudio microscópico llevado a cabo sobre los disociados leves permitió detectar la presencia de:

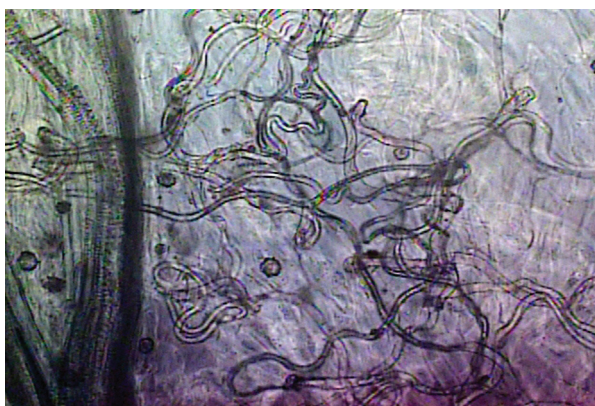
1. Epidermis con estomas; se observan principalmente estomas del tipo anomocítico. Los estomas tienen tamaños comprendidos entre 25 - 35 μ m (Foto 2).
2. Pelos eglandulares unicelulares flexuosos (Foto 3).
3. Pelos eglandulares cónicos unicelulares, de pared gruesa, con longitudes comprendidas entre 100-1.000 μ m (Foto 4).
4. Pelos eglandulares unicelulares finos (500-900 μ m) (Foto 5).
5. Pelos glandulares pluricelulares no capitados (150-200 μ m) (Foto 6).

Foto 2.- *Hibiscus sabdariffa*



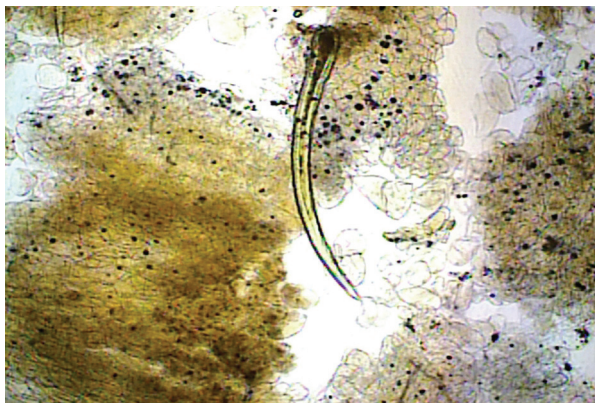
Epidermis con estomas anomocíticos (35 μ m). Aumento 400x.

Foto 3.- *Hibiscus sabdariffa*



Pelos eglandulares unicelulares flexuosos. Aumento 200x.

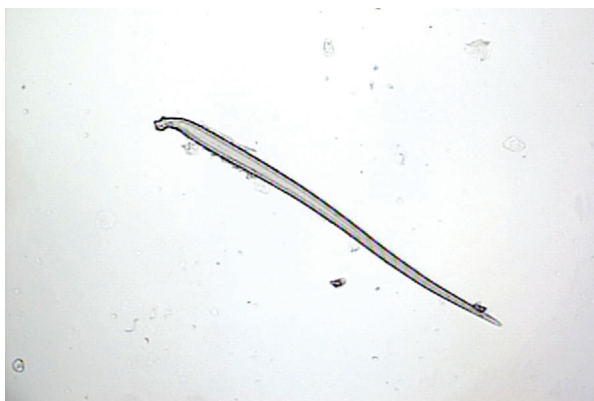
Foto 4.- *Hibiscus sabdariffa*



Pelo eglandular cónico, grueso, unicelular (500 μ m). Aumento 100x.

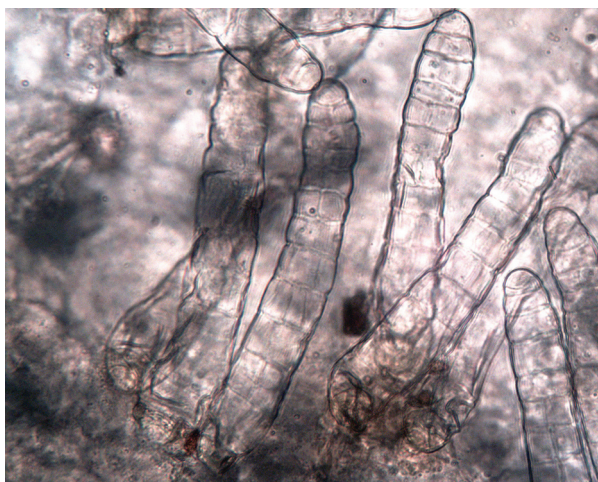
6. Pelos glandulares capitados de pie unicelular y cabeza pluricelular (60-90 μm) (Foto 7).
7. Drusas con tamaños comprendidos entre 15 y 30 μm (Foto 8).
8. Tráqueas espiraladas, fibroesclereidas (750-1.000 μm , Foto 9) y fibras.

Foto 5.- *Hibiscus sabdariffa*



Pelo eglandular unicelular fino (750 μm). Aumento 100x.

Foto 6.- *Hibiscus sabdariffa*



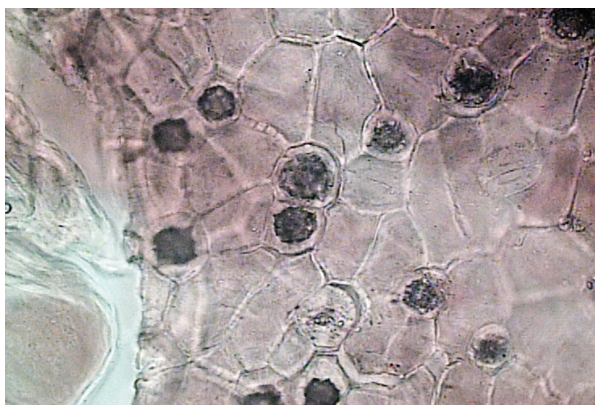
Pelos glandulares pluricelulares no capitados (200 μm). Aumento 400x.

Foto 7.- *Hibiscus sabdariffa*



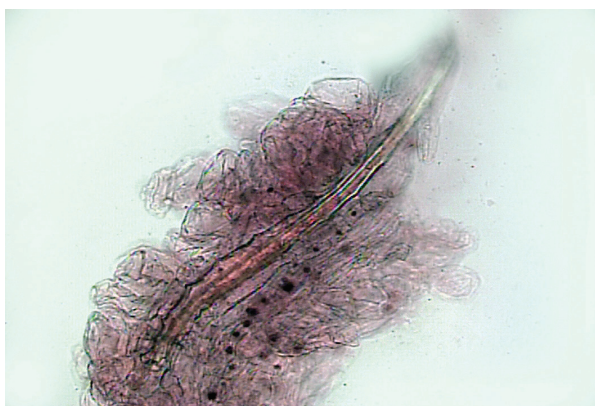
Pelo glandular capitado de pie unicelular y cabeza pluricelular (80 μm). Aumento 400x.

Foto 8.- *Hibiscus sabdariffa*



Drusas (20 - 30 μm). Aumento 400x.

Foto 9.- *Hibiscus sabdariffa*

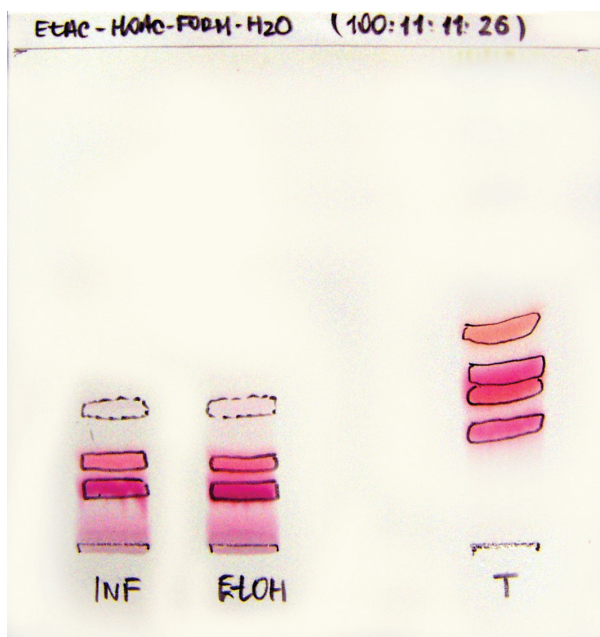


Fibroescleroida (900 μm). Aumento 100x.

Análisis fitoquímico

Perfil cromatográfico. El perfil cualitativo de antocianos se caracteriza por la presencia de dos bandas principales que muestran valores de Rf entre 0,17 y 0,24. Estas bandas corresponderían a los pigmentos del finidina-3-glucosilxilósido y cianidina-3-glucosilxilósido, compuestos informados en la bibliografía como los antocianos predominantes. En algunas muestras se detectó una banda de menor intensidad, con valor de Rf 0,36, que correspondería a cianidina-3-glucósido según los valores registrados por la bibliografía (Wagner y Bladt, 1996) (Foto 10).

Foto 10.- *Hibiscus sabdariffa*

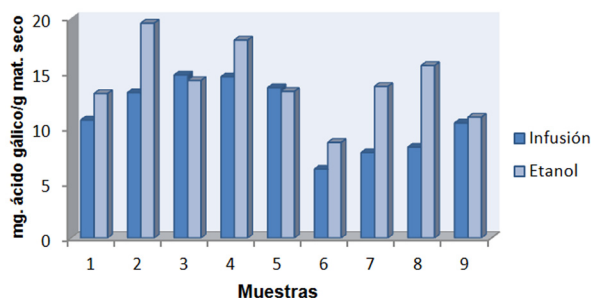


Perfil de antocianos. TLC Sílica Gel. Observación a la luz natural.

Cuantificación de fenoles totales

Las infusiones presentaron valores comprendidos entre 6,27- y 14,84 EAG, con valor promedio de 11,10 EAG. Los extractos hidroalcohólicos, entre 8,70 y 19,56 EAG, con valor promedio de 14,18 EAG. (Gráfico 1).

Gráfico 1.- Cuantificación de fenoles totales

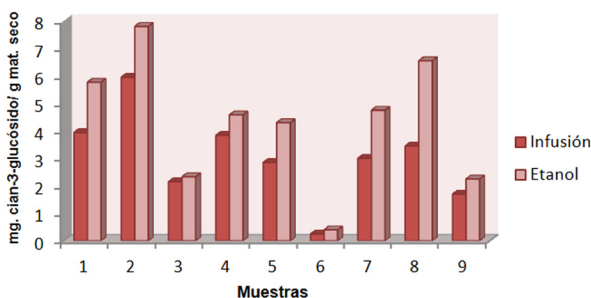


Valores expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG: mg ácido gálico/g material seco)

Cuantificación de antocianos

Las infusiones presentaron valores comprendidos entre 0,25 y 5,95 ECG, con valor promedio de 3,01 ECG. Los extractos hidroalcohólicos, entre 0,40 y 7,80 ECG, con valor promedio de 4,30 ECG. (Gráfico 2).

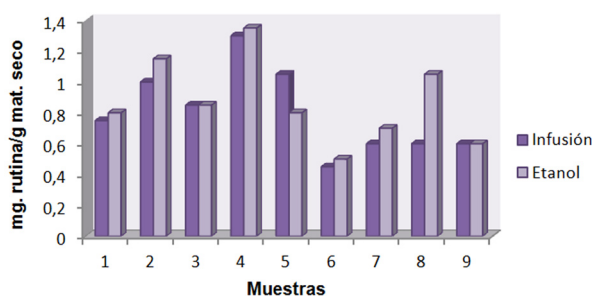
Gráfico 2.- Cuantificación de antocianos totales



Valores expresados como equivalentes de cianidina-3-glucósido (ECG: mg de cianidina-3-glucósido/g material seco)

Cuantificación de flavonoides

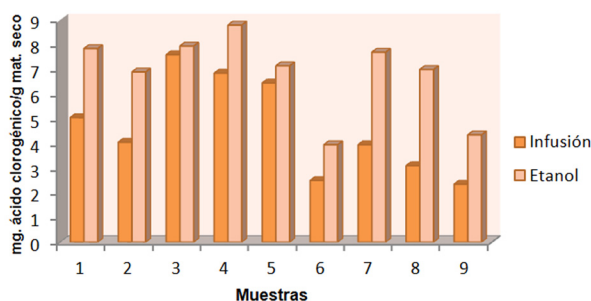
Las infusiones presentaron valores comprendidos entre 0,45 y 1,30 ER, con valor promedio de 0,80 ER. Los extractos hidroalcohólicos, entre 0,50 y 1,35 ER, con valor promedio de 0,87 ER. (Gráfico 3).

Gráfico 3.- Cuantificación de flavonoides totales

Valores expresados como equivalentes de rutina (ER: mg rutina/g material seco)

Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos

Las infusiones presentaron valores comprendidos entre 2,35 y 7,60 EAC, con valor promedio de 4,66 EAC. Los extractos hidroalcohólicos, entre 3,95 y 8,80 EAC, con valor promedio de 6,85 EAC (Gráfico 4).

Gráfico 4.- Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales

Valores expresados como equivalentes de ácido clorogénico (EAC: mg de ácido clorogénico/g material seco)

Discusión

En lo que respecta al análisis farmacobotánico, si bien los elementos detallados se presentaron en todas las muestras analizadas, la frecuencia de aparición no era la misma para las muestras estudiadas.

Además, la distribución de los pelos no se presenta en forma homogénea en el material vegetal estudiado. Pudo observarse que los pelos eglandulares se presentaron en mayor medida en la parte media de los cálices, mientras que los glandulares se hallaron principalmente en el tercio inferior de los cálices, en la zona comprendida por el epicáliz (calículo).

Se destaca la presencia de un desarrollo filamentosos en una de las muestras analizadas (N° 7), cuyas características morfológicas son afines con *Curvularia* sp. (Ascomycota), dadas las características de sus hifas, los esporangióforo y las esporas.

En el análisis fitoquímico del perfil de polifenoles todas las muestras presentaron un perfil cualitativo similar, constituido por dos bandas principales correspondientes a glicósidos de delphinidina y cianidina. Además, en determinados materiales, pudo detectarse una tercera banda correspondiente a un glicósido de cianidina (Foto 10). Estos resultados son concordantes con datos observados en la bibliografía (Wagner y Bladt, 1996).

Es significativo destacar que la intensidad de las bandas no ha sido la misma para todos los materiales analizados, lo que sugiere una variación de tipo cuantitativo, que se verifica posteriormente en la determinación del contenido de antocianos. Si bien la mayoría de las muestras analizadas se presentaron no trituradas, esta técnica cobra valor cuando el material vegetal se encuentra triturado o en polvo, ya que la presencia de bandas (compuestos) diferentes a las observadas detectaría la presencia de material ajeno al “hibisco”.

En lo que respecta al análisis cuantitativo, para todos los metabolitos analizados los extractos hidroalcohólicos presentaron mayores concentraciones que las infusiones; corresponde a los flavonoides la menor diferencia observada entre estos extractos (Gráficos 1, 2, 3 y 4).

Pudo observarse también una notable variación cuantitativa de los metabolitos analizados (Gráficos 1, 2, 3 y 4), lo que evidencia diferentes calidades de productos, datos que permitirán la selección de determinados materiales vegetales, con el objeto de su posterior empleo en la realización de extractos de “hibisco”.

Si bien el “hibisco” es empleado principalmente bajo la forma de infusión, la realización de extractos hidroalcohólicos presentaría una alternativa interesante como fuente de compuestos bioactivos, con especial interés en los antocianos, dadas sus reconocidas propiedades antioxidantes.

Conclusiones

Las técnicas empleadas son de fácil y rápida realización y de bajo costo, aplicables en laboratorios de baja complejidad. Permiten obtener información relevante, y constituyen un punto de partida para la validación de los diferentes parámetros empleados en el análisis del control de calidad de muestras y extractos de hibisco.

Agradecimientos

Con subsidio UBA 20020100100459 (Programación Científica 2011-2014).

Referencias bibliográficas

- Ajay, M.; Chai, H.J.; Mustafa, A.M.; Gilani, A.H.; Mustafa, M.R. (2007). "Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces". *Journal of Ethnopharmacology* 109: 388-393.
- Alarcón Alonso, J.; Zamilpa, A.; Alarcón Aguilar, F.; Herrera Ruiza, M.; Tortoriello, J.; Jiménez, E. (2012). "Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract". *Journal of Ethnopharmacology* 139: 751-756.
- Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Corpus, Rosario: 592-596.
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C. (2002). "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods". *Journal Food Drug Anal* 10: 178-182.
- Dao, L.; Friedman, M. (1992). "Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry". *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40: 2152-2150.
- Fernández Arroyo, S.; Rodríguez Medina, I.C.; Beltrán Debón, R.; Pasini, F.; Segura Carretero, A.; Fernández Gutiérrez, A. y col. (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.
- Gurrola Diaza, C.M.; García, P.M.; Sánchez, S.; Troyo, R.; Andrade, I.; Gómez, J.F. (2010). "Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSSy)". *Phytomedicine* 17(7): 500-505.
- Herrera, A.; Miranda, J.; Vila, P.; Herrera, S.; Jiménez, J.E.; Zamilpa, A. y col. (2007). "Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial". *Planta Medica* 73(1): 6-12.
- Hirunpanicha, V.; Utaipata, A.; Moralesb, N.P.; Bunyaphatsarac, N.; Satod, H.; Herunsalee, A. y col. (2006). "Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats". *Journal of Ethnopharmacology* 103: 252-260.
- Lee, J.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E. (2005). "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study". *Journal of the AOAC International* 88(5): 1269-1278.
- Makkar, H.P.S.; Bluemmel, M.; Borowy, N.K.; Becker, K. (1993). "Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods". *Journal of the Science Food and Agriculture* 61: 161-165.
- Mojiminiyi, F.B.O.; Dikko, M.; Muhammad, B.Y.; Ojobor, P.D.; Ajagbonna, O.P.; Okolo, R.U. y col. (2007). "Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*". *Fitoterapia* 78: 292-297.
- Mozaffari, H.; Jalali, B.A.; Afkhami, M.F.; Noori, F.M. (2009). "The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes". *Journal of Human Hypertension* 23: 48-54.
- Sáyago Ayerdi, S.G.; Goñi, I. (2010). "*Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60 (1):79-84.
- Wagner, H.; Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Berlin: 281-287.
- Woisky, R.G.; Salatino, A. (1998). "Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control". *Journal of Apicultural Research* 37(2): 99-105.

Yi Sun, Y.; Chien, H.; Chau, W.; Yi, L.; Mu, C.; Chiung, P. (2013). "Polyphenols of *Hibiscus sabdariffa* improved diabetic nephropathy via

regulating the pathogenic markers and kidney functions of type 2 diabetic rats". *Journal of Functional Foods* 5(2): 810-819.