



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tepic

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Tepic, Nayarit, 24/Junio/2019

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
No. Oficio CMCA 2019-19

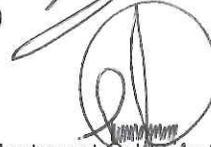
**M.C. Luz del Carmen Romero Islas**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **Yulliana Vázquez González** con número de control G17400101, cuyo título es **"Extracción de fenoles de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), mediante métodos emergentes: caracterización y actividad antifúngica"** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

  
Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto  
(Vocal suplente)

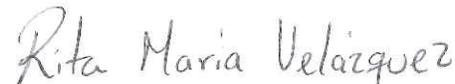
  
Dr. Pedro Ulises Rosales Bautista  
(Vocal)

  
Dr. Juan Arturo Ragazzo Sánchez  
(Secretario)

  
Dra. Montserrat Calderón Santoyo  
(Presidente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica*

  
**Dra. Rita María Velázquez Estrada**  
**Presidente del Consejo de Maestría en Ciencias en Alimentos**

c.c.p. Expediente



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country C.P. 63175  
Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401 e-mail: info@ittec.edu.mx  
www.tecnm.mx | www.ittec.edu.mx



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

*Instituto Tecnológico de Tepic*

Tepic, Nay., a 25 de Junio de 2019  
DEPI-025-683-2019

**C. YULIANA VÁZQUEZ GONZÁLEZ  
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos Tecnológicos, dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de **Maestría en Ciencias en Alimentos** denominado **“Extracción de fenoles de hoja de jaca (Artocarpus heterophyllus Lam) mediante métodos emergentes: caracterización y actividad antifúngica”**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la **Impresión** del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

**“Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu”**

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS  
JEFA DIVISION DE EST. DE POSG. E INVEST.**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

agvl\*\*





TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**EXTRACCIÓN DE FENOLES DE HOJA DE JACA (*Artocarpus heterophyllus*  
Lam.), MEDIANTE MÉTODOS EMERGENTES: CARACTERIZACIÓN Y  
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

por:

I.I.A YULIANA VÁZQUEZ GONZÁLEZ

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN ALIMENTOS**

Director: Dra. Montserrat Calderón Santoyo  
Co-Director: Dr. Juan Arturo Ragazzo Sánchez

Tepic, Nayarit

Agosto, 2019

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme las fuerzas para esquivar cada uno de los obstáculos que se presentaron en mi camino y por haber puesto a cada una de las personas que me apoyaron para llegar a esta etapa de mi vida.

Al **Instituto Tecnológico de Tepic**, porque en sus instalaciones me forjé como estudiante de maestría, etapa que me aportó muchos conocimientos en diferentes contextos.

A la **Dra. Montserrat**, por su apoyo y enseñanza como directora del proyecto, al **Dr. Juan Arturo** por sus observaciones y aportes al mismo, al **Dr. Ulises** y a la **Dra. Rosi**, por sus correcciones puntuales que aportaron al presente proyecto.

Agradezco a **CONACyT**, por la beca otorgada, con número 478498 para la realización del presente proyecto.

Con respeto

Yuliana Vázquez González

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Laureano Vázquez Suriano** y **Teresa González Herrera**, por haberme dado la vida y por sus sabios consejos, en particular a mi papi, por brindarme esa confianza desde pequeña, que de alguna manera me ha dado la seguridad para ir en busca de nuevas metas, a mi mami por su apoyo incondicional y su educación, ambos me condujeron a llenarme de cualidades que hoy agradezco, por las alegrías vividas en cada una de las convivencias familiares, son las personas más importantes en mi vida.

A mis hermanos **Ángel** y **Fabián**, por sus consejos y apoyo que siempre me brindaron, además a cada momento en el que me recuerdan que me quieren y me extrañan, hacen que mi día sea especial.

A mi sobrino **Emanuel R. Cigarroa Avendaño**, por todas sus alegrías que me ha compartido desde su infancia hasta la actualidad, eres mi principal inspiración.

A la **Ing. Gabriela Lara** y familia, quiénes me brindaron confianza desde el primer momento que llegué a su hogar, han sido personas que han marcado mi formación profesional.

Al **Dr. Víctor Pacheco**, por su motivación y apoyo para continuar con mi educación profesional.

En general a mis amigos, **Edwin, Anely, Miriam, Maricarmen, Adriana, Surelys, Laura**, quiénes me regalaron momentos gratos, compañía y motivación durante esta etapa importante de mi vida.

Con amor y cariño

Yuliana Vázquez González

## RESUMEN

Vázquez-González, Yuliana. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Agosto, 2019. Extracción de fenoles de hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), mediante métodos emergentes: caracterización y actividad antifúngica. Directora: Calderón-Santoyo, Montserrat, Co-Director: Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo.

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), es uno de los principales frutos tropicales que se cosechan y exportan en el estado de Nayarit. Recientemente, se demostró que la hoja de jaca es rica en compuestos antifúngicos como fenoles, flavonoides y taninos, éstos podrían mejorar la vida de anaquel de frutos afectados por enfermedades postcosecha. Adicionalmente, es de interés el uso de tecnologías emergentes de extracción que sustituyan al uso de métodos convencionales y que, eviten pérdidas de estos compuestos mediante reacciones de oxidación o condensación.

El objetivo de esta investigación fue evaluar tres métodos emergentes de extracción, para la obtención de compuestos fenólicos a partir de la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivadas en el estado de Nayarit.

Se realizó el acondicionamiento de las hojas de jaca, la primera etapa consistió en la extracción de compuestos fenólicos, se consideró una relación 1:10 (p/v), como solvente una solución etanol-agua 8:2 (v/v), se realizó la aplicación de microondas (EAM [600, 900 y 1200 W durante 1, 2 y 3 min]), ultrasonido (EAU [15, 30 y 45 min a 42 kHz]) y alta presión hidrostática (APH [150, 200 y 250 MPa durante 10, 15 y 20 min]), el extracto obtenido se caracterizó cualitativa y cuantitativamente (fenoles solubles totales [FST], taninos totales [TT] y flavonoides totales [FT]). La segunda etapa consistió en la evaluación antifúngica *in vitro* de los extractos fenólicos obtenidos frente a *C. gloeosporioides* aislados de mango y *P. italicum* aislado de limón, utilizando concentraciones de 0.5, 2 y 5 mg/ml. La tercera etapa consistió en el fraccionamiento del extracto total con 6 solventes de diferente polaridad, cada una de las fracciones se caracterizó cualitativa y cuantitativamente, a la par se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* frente a los hongos antes mencionados y finalmente se caracterizaron por HPLC-DAD-ESI-MS.

Se obtuvo un extracto fenólico de color marrón con un rendimiento másico del 25%, el contenido más alto de FST y TT, fue de  $164\pm 16.71$  y  $94\pm 0.63$  mg EAG/g BS respectivamente, cantidad que fue obtenida con EAM, 900 W, 3 min, en contraste, el mayor contenido de FT fue de  $20\pm 0.89$  mg ER/g BS, obtenido mediante APH, 200 MPa, 15 min. Por otro lado, el extracto fenólico obtenido por APH mostró un % de inhibición promedio mayor ( $49.59\pm 4.62\%$  y  $25.73\pm 11.67\%$  [ $p>0.05$ ]) frente a *C. gloeosporioides* y *P. italicum* respectivamente, en comparación con la EAM. Respecto al fraccionamiento del extracto total, el extracto obtenido con etanol (EtEx), mostró el mayor porcentaje de inhibición frente a *C. gloeosporioides* ( $83.78\pm 1.25\%$ ), mientras que para *P. italicum* fue el extracto obtenido con metanol ( $66.45\pm 5.92\%$ ). Se identificó la presencia de quercentina, ácido clorogénico, cítrico y cafeico, los cuales interfieren principalmente en la respiración de hongos.

La Alta Presión Hidrostática fue el mejor método de extracción al evaluar la actividad antifúngica de los extractos, además la extracción selectiva permitió incrementar la actividad antifúngica de estos compuestos, lo que quiere decir que la hoja de jaca puede ser considerada como fuente viable para la extracción de compuestos con actividad antifúngica frente a los hongos estudiados.

**Palabras clave:** hoja de jaca, extractos fenólicos, métodos emergentes de extracción, actividad antifúngica.

## ABSTRACT

Vázquez-González, Yuliana. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Agosto, 2019. Extraction of phenols from Jack fruit leaf (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), by emerging methods: characterization and antifungal activity. Directora: Calderón-Santoyo, Montserrat, Co-Director: Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo.

The jack fruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) is the principal tropical fruit in Nayarit. In recent times, it was shown the leaf's jack fruit is rich in antifungal compounds as phenols, flavonoids and tannins, these compounds could improve the shelf life of other fruits, this fruit are affected by postharvest diseases. Additionally, the use of emerging technologies for extraction replace the use of the conventional methods, in order to avoid losses of these compounds through oxidation or condensation reactions.

The aim of the investigation was to evaluate three emerging methods of extraction, to the obtained of phenolic compounds from jack fruit leaf (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivated in Nayarit.

Conditioning of jack fruit leaf was done, the first stage consisted in the extraction of phenolic compounds, a ratio 1:10 was considered (p/v), as solvent ethanol:water 8:2 (v/v), the application of microwaves was performed (MAE [600, 900 and 1200 W by 1, 2 and 3 min]), ultrasound (UAE [15, 30 and 45 min at 42 kHz]) and high hydrostatic pressure (HHP [150, 200 and 250 MPa for 10, 15 and 20 min]), the extract obtained was characterized qualitative and quantitatively (total soluble phenols [TSP], total tannins [TT] and total flavonoids [TF]). In the second stage was evaluated *in vitro* antifungal activity of the phenolic extracts against *C. gloeosporioides* from mango and *P. italicum* from lemon, concentrations of 0.5, 2 and 5 mg/ml were used. The third stage was consisted in the fractionation of total extract with 6 solvents of different polarities, qualitative and quantitatively was evaluated each fraction, additionally, the antifungal activity *in vitro* to fungal was evaluated, and finally a characterization by HPLC-DAD-ESI-MS was done.

A phenolic extract brown color with a mass performance of 25% was obtained, the higher content of TSP and TT, was  $164 \pm 16.71$  and  $94 \pm 0.63$  mg GAE/g DB respectively, obtained with MAE, 900 W, 3 min, on the other hand, the higher content of TF was  $20 \pm 0.89$  mg RE/g DB, by HHP, 200 MPa, 15 min. Otherwise, the phenolic extract obtained by HHP showed a percentage higher of inhibition ( $49.59 \pm 4.62\%$  and  $25.73 \pm 11.67\%$  [ $p > 0.05$ ]) against *C. gloeosporioides* and *P. italicum* respectively, in comparison with the MAE. Regarding fractionation of total extract, the extract obtained with ethanol, showed the higher percentage of inhibition against *C. gloeosporioides* ( $83.78 \pm 1.25\%$ ). In the case of *P. italicum*, the higher inhibition ( $66.45 \pm 5.92\%$ ) was obtained with methanol extract. Quercetin, chlorogenic, citric and caffeic acids were identified, these compounds interfere principally in the fungus's respiration.

The high hydrostatic pressure was the best method of extraction to evaluate the antifungal activity of the extracts, furthermore the selective extraction allowed to increase the antifungal activity of these compounds. Then, the jack fruit leaf can be considered as a viable source to extraction of antifungal compounds against studied fungus.

**Key words:** jack fruit leaf, phenolic extracts, emerging methods of extraction, antifungal activity.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	II
<b>DEDICATORIAS</b>	III
<b>RESUMEN</b>	IV
<b>ABSTRACT</b>	V
<b>LISTA DE CUADROS</b>	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES .....	4
2.1    Generalidades de la jaca .....	4
2.1.1    Taxonomía.....	4
2.1.2    Descripción .....	4
2.1.3    Producción de jaca en el estado de Nayarit .....	5
2.2    La hoja de jaca.....	6
2.2.1    Usos y aplicaciones de la hoja de jaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.)	6
2.3    Compuestos bioactivos en extractos vegetales .....	7
2.3.1    Compuestos bioactivos en hoja de jaca .....	7
2.3.2    Compuestos fenólicos .....	8
2.4    Residuos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos .....	9
2.5    Extracción de compuestos bioactivos .....	10
2.5.1    Extracción por métodos emergentes .....	10
2.5.1.1    Extracción Asistida por Microondas .....	11
2.5.1.2    Extracción Asistida por Ultrasonido.....	11
2.5.1.3    Extracción por Altas Presiones Hidrostáticas.....	12
2.6    Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	13
2.6.1    Ensayo de Folin-Ciocalteu .....	13
2.6.2    Agentes de control biológico.....	14
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN .....	16
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS .....	18
4.1    Objetivo general.....	18

4.2	Objetivos específicos .....	18
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....		20
5.1	Características del material biológico.....	21
5.2	Preparación de materia prima .....	21
5.3	Primera etapa .....	21
5.3.1	Métodos de extracción.....	21
5.3.1.1	Microondas.....	21
5.3.1.2	Ultrasonido .....	21
5.3.1.3	Altas Presiones Hidrostáticas.....	22
5.3.2	Análisis cualitativo de compuestos extraídos de la hoja de jaca .....	22
5.3.2.1	Terpenoides y esteroides .....	22
5.3.2.2	Fenoles y taninos .....	22
5.3.2.3	Flavonoides.....	23
5.3.2.4	Saponinas .....	23
5.3.2.5	Antraquinonas.....	23
5.3.3	Análisis cuantitativo de compuestos extraídos de la hoja de jaca .....	23
5.3.3.1	Fenoles solubles totales.....	23
5.3.3.2	Taninos totales.....	24
5.3.3.3	Flavonoides totales .....	24
5.3.4	Análisis estadístico .....	25
5.4	Segunda etapa.....	26
5.4.1	Ensayo <i>in vitro</i> de los extractos fenólicos .....	26
5.5	Tercera etapa.....	27
5.5.1	Fraccionamiento de extracto fenólico total de hoja de jaca .....	27
5.5.2	Ensayo <i>in vitro</i> de fracciones obtenidas de hoja de jaca .....	28
5.5.2.1	Inhibición de crecimiento micelial.....	28
5.5.2.2	Inhibición de germinación de esporas.....	28
5.5.3	Identificación de compuestos en el extracto fenólico total y en las fracciones por HPLC-DAD-ESI-MS .....	29
5.5.4	Análisis estadístico .....	29
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31

6.1	Primera etapa .....	31
6.1.1	Métodos de extracción.....	31
6.1.2	Caracterización del extracto. ....	32
6.1.3	Curvas de calibración .....	33
6.1.4	Contenido de Fenoles Solubles Totales (FST) en hojas de jaca por tres métodos de extracción .....	34
6.1.5	Contenido de Taninos Totales (TT) en hojas de jaca por tres métodos de extracción.....	37
6.1.6	Contenido de Flavonoides Totales (FT) en hojas de jaca por tres métodos de extracción .....	38
6.2	Segunda etapa.....	41
6.2.1	Ensayos <i>in vitro</i> de extractos fenólicos.....	41
6.2.1.1	Pruebas <i>in vitro</i> frente a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	41
6.2.1.2	Pruebas <i>in vitro</i> frente a <i>Penicillium italicum</i> .....	43
6.3	Tercera etapa.....	46
6.3.1	Fraccionamiento del extracto fenólico total de hoja de jaca .....	46
6.3.1.1	Análisis cualitativo .....	47
6.3.1.2	Análisis cuantitativo.....	48
6.3.2	Ensayo <i>in vitro</i> de fracciones obtenidas .....	49
6.3.2.1	Inhibición de crecimiento micelial.....	49
6.3.2.2	Inhibición de germinación de esporas.....	54
6.3.3	Identificación de compuestos en el extracto fenólico total y en las fracciones por HPLC-DAD-ESI-M .....	59
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....		63
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA .....		65

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación botánica de jaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	4
Cuadro 2. Clasificación de fenoles y ejemplos de ellos.....	8
Cuadro 3. Diseño experimental para EAM .....	25
Cuadro 4. Diseño experimental para EAU .....	25
Cuadro 5. Diseño experimental para APH .....	26
Cuadro 6. Análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos .....	33
Cuadro 7. Muestras de ecuaciones y valores de R <sup>2</sup> de las curvas de calibración.	33
Cuadro 8. Análisis fitoquímico de las fracciones .....	48
Cuadro 9. Efecto de los extractos totales y de las fracciones en la inhibición de germinación de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> .....	56
Cuadro 10. Efecto de los extractos totales y de las fracciones en la inhibición de germinación de esporas de <i>P. italicum</i> .....	58
Cuadro 11. Identificación tentativa de metabolitos secundarios en fracciones obtenidas de la hoja de jaca usando HPLC-DAD-ESI-MS; indicando presencia (+) o ausencia (-) de estos metabolitos.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de jaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	5
Figura 2. Hojas de jaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	6
Figura 3. Estructura química del grupo fenol .....	8
Figura 4. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo FC .....	13
Figura 5. Extracto de hoja de jaca .....	31
Figura 6. Solubilidad de FST en agua y en Et:Ag (8:2 v/v).....	34
Figura 7. Contenido de FST en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción.....	35
Figura 8. Contenido de Taninos Totales en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción.....	37
Figura 9. Contenido de Flavonoides Totales en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción. ....	40
Figura 10. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> utilizando el extracto obtenido por EAM (900W-2min).....	41
Figura 11. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> utilizando el extracto obtenido por APH (200MPa-15min) .....	42
Figura 12. Inhibición de crecimiento micelial de <i>P. italicum</i> utilizando el extracto obtenido por EAM (900W-2min).....	44
Figura 13. Inhibición de crecimiento micelial de <i>P. italicum</i> utilizando el extracto obtenido por APH (200MPa-15min).....	45
Figura 14. Estructura de 5,7 dihidroxiflavonoide .....	45
Figura 15. Fracciones obtenidas a partir del extracto total de hoja de jaca.....	47
Figura 16. Cuantificación de FST, FT y TT en los extractos de diferente polaridad .....	49
Figura 17. Evaluación <i>in vitro</i> de cada fracción frente a <i>C. gloeosporioides</i> .....	50
Figura 18. Inhibición de 3 fracciones frente a <i>C. gloeosporioides</i> .....	51
Figura 19. Evaluación <i>in vitro</i> de cada fracción frente a <i>P. italicum</i> .....	52
Figura 20. Ejemplo de extracción selectiva .....	53
Figura 21. Esporas germinadas de <i>C. gloeosporioides</i> (Control).....	55
Figura 22. Espora de <i>C. gloeosporioides</i> en presencia del MeEx a las 24 h de estudio. ....	55
Figura 23. Esporas germinadas de <i>P. italicum</i> (Control).....	57
Figura 24. Espora de <i>P. italicum</i> en presencia del AcEx a las 24 h de estudio. ....	57

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para varios investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés. Actualmente, existe una demanda del sector alimentario, por la búsqueda de materiales antifúngicos de origen natural que sean menos tóxicos y cuyos métodos de producción sean amigables con el medio ambiente, por ejemplo, mediante la extracción de compuestos activos de interés provenientes de hierbas, plantas, algunas especias, inclusive, a partir de algunos residuos agroindustriales usando técnicas no convencionales de extracción.

Se ha reportado que durante la producción de alimentos de origen vegetal se pueden estimar pérdidas hasta del 40% del total cosechado, éstas varían entre el tipo de producto, áreas y tiempos de producción. De acuerdo a investigaciones realizadas se ha reportado que estos residuos pueden ser fuente de metabolitos secundarios, algunos de los metabolitos que pueden estar presentes en los extractos vegetales, son terpenoides, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, alcaloides, saponinas, entre otros. En la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) se ha reportado la presencia de algunos de ellos, los cuales se han caracterizado por tener actividades antioxidantes, antiinflamatorias y en particular actividades antimicrobianas y antifúngicas. Los compuestos que se han destacado por presentar estas características son los compuestos fenólicos, estos son sustancias químicas que poseen uno o más anillos aromáticos y un sustituyente hidroxilo, siendo estos los principales en presentar una mayor inhibición antibacteriana y antifúngica.

El uso de extractos de plantas puede ser una opción viable para sustituir las medidas actuales del control de hongos, basadas en las propiedades antifúngicas y su baja o nula toxicidad que tales extractos presentan.

Numerosas técnicas de extracción se pueden aplicar para la obtención de compuestos fenólicos, sin embargo, surge la necesidad de emplear nuevas tecnologías de extracción que sean más eficientes y que ostenten un impacto ambiental mínimo, en comparación con métodos convencionales, los cuales pueden contribuir a la contaminación del medio ambiente con la generación de residuos tóxicos.

Nayarit es uno de los principales estados a nivel nacional en la producción de jaca, generando en las épocas de poda, grandes cantidades de hojas que son llamadas generalmente “residuos o subproductos” y tomando en cuenta que pueden ser materia prima de interés para la obtención de compuestos bioactivos, se plantea el siguiente objetivo general: evaluar tres métodos no convencionales de extracción, para la obtención de fenoles a partir de la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivadas en el estado de Nayarit.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la jaca

La especie *Artocarpus heterophyllus* Lam., es una fruta tropical originaria de la India y crece extensivamente en el Sureste Asiático, es uno de los cultivos más exóticos debido al sabor y tamaño de los frutos (Swami y cols., 2012).

#### 2.1.1 Taxonomía

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) tiene la siguiente clasificación botánica:

Cuadro 1. Clasificación botánica de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

JACA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Nombre científico:	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.
Nombre común:	Jaca, Jack fruit, Jackier
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Rosales
Familia:	Moraceae
Género	<i>Artocarpus</i>
Especie	<i>Heterophyllus</i>

Fuente: (Ojeda, 2015)

#### 2.1.2 Descripción

De acuerdo con el SIAP (2017) los arboles (Fig. 1) llegan a medir de 10 a 15 metros de altura con corteza rugosa y asurcada cuando es adulto, las hojas son de color verde oscuro brillante con el envés más claro, son largas y su forma es lobulada en ramas jóvenes y ovalada en ramas adultas, tienen superficie correosa y vistosa, generalmente miden de 20 cm de largo por 12 cm de ancho (Ojeda, 2015).



Figura 1. Árbol de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Los frutos (Fig. 1) son compuestos o agregados, de pequeños a muy grandes con un peso promedio de 11 kg (Goldense, 2016). Estos frutos se componen de grandes bulbos de color amarillo con sabor a “banano” rodeando un núcleo central, cada bulbo encierra una semilla lisa y ovalada de color blanco, por lo regular miden de 2 a 4 cm de largo y 1,25 a 2 cm de ancho, la cantidad de semillas varía de un fruto a otro, va desde 100 a 500 (Crane y Balerdi, 2000).

### **2.1.3 Producción de jaca en el estado de Nayarit**

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) el estado de Nayarit se considera como uno de los principales productores a nivel nacional de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), específicamente en los municipios de San Blas y Compostela, seguidos por el municipio Martínez de la Torre (SIAP, 2017). La producción de jaca en México aumentó aproximadamente 10 mil toneladas entre el año 2011 y 2016, exportando 16 mil 798 toneladas de jaca principalmente a Estados Unidos en el 2016, lo que representó 90.3% de la producción nacional (SIAP, 2017).

## 2.2 La hoja de jaca

Los árboles de jaca se podan a partir del segundo año, estos deben ser podados una o dos veces durante la primavera y el verano hasta la primera rama lateral, para que el árbol se haga más compacto y el crecimiento vertical sea más lento, a medida que los árboles crecen, las ramas que crecen hacia arriba deben eliminarse y las copas entresacarse al final de la estación de cosecha, ya que esto incrementará la penetración de la luz en las copas, aumentando la producción de los frutos (Crane y Balerdi, 2000).

### 2.2.1 Usos y aplicaciones de la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Las hojas de jaca (Fig. 2) se han utilizado para activar la producción de leche en mujeres y animales, también es utilizado como antihelmíntico para el tratamiento de infestaciones por lombrices e inclusive, la ceniza de hoja se llega a utilizar para el tratamiento de úlceras y heridas, además de tener actividad antidiabética (Khan y cols., 2003; Jaiswal, 2012), las hojas y los tallos son utilizadas para el tratamiento de asma, anemia, dermatitis, diarrea y tos (Jaiswal, 2012). Además en algunos municipios del estado de Nayarit se ha utilizado como forraje para ganado bovino. Sin embargo, los usos antes mencionados son mínimos por lo que es necesario buscar alternativas que contribuyan a la reducción de estos residuos orgánicos.



Figura 2. Hojas de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

## **2.3 Compuestos bioactivos en extractos vegetales**

Los compuestos bioactivos influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos. Estos componentes se encuentran en general en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal y en alimentos ricos en lípidos (Chalé y cols., 2014). Los metabolitos secundarios son conocidos por su capacidad de proteger las plantas de diversas condiciones ambientales. Las condiciones adversas, entre ellas, el estrés estimula la producción o liberación de metabolitos secundarios; estos metabolitos aseguran su mecanismo de defensa (Siddiqui y Bansal, 2017).

Los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana que pueden estar presentes en los extractos vegetales son terpenoides, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, alcaloides y saponinas (Rodríguez-Maturino y cols., 2015).

Los extractos obtenidos de material vegetal pueden ser una opción viable para sustituir el uso de compuestos químicos para el control de hongos, basada en las propiedades antifúngicas de tales extractos, debido a su baja o nula toxicidad y en la poca permanencia en el ambiente que estos presentan (Rodríguez-Maturino y cols., 2015).

### **2.3.1 Compuestos bioactivos en hoja de jaca**

Las especies de *Artocarpus* son ricas en compuestos fenólicos incluyendo terpenoides, flavonoides, arilbenzofuranos, estilbenoides, lignanos y jacalin (Hakim, 2010; Saha, y cols., 2015), en particular los extractos de hojas, corteza y tallos poseen compuestos bioactivos útiles con actividad antituberculosa, antiplaquetaria, antiartrítica, antivirales, antifúngica y antibacteriana (Jaiswal, 2012); respecto a la actividad antibacteriana, algunos extractos han mostrado un amplio espectro contra *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Micrococcus roseus*, *Streptococcus faecalis* por mencionar algunos y, para la actividad antifúngica, dos lecitinas encontradas en *Artocarpus integrifolia* y *Artocarpus incisa* presentaron inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium moniliformae* en una concentración de 2.25 mg/mL (Jaiswal, 2012).

### 2.3.2 Compuestos fenólicos

De acuerdo con Badui (2013), los compuestos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y un sustituyente hidroxilo (Fig. 3); éstos a su vez clasificados en dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) quienes tienen un solo anillo aromático mientras que el segundo grupo, los flavonoides (antocianinas y taninos), poseen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico.

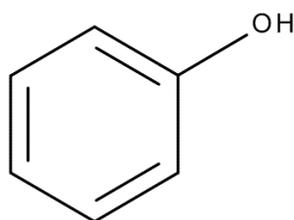


Figura 3. Estructura química del grupo fenol

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener actividad antimicrobiana; estos metabolitos secundarios tienen la ventaja de ser rápidamente degradados en el suelo, generalmente no presentan efecto tóxico en mamíferos y pueden ser empleados en los sistemas de agricultura orgánica y sustentable (Rodríguez-Maturino y cols., 2015). La cantidad y tipos de compuestos fenólicos presentes en un alimento, varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y condiciones de almacenamiento (Siddiqui y Bansal, 2017).

Los fenoles pueden encontrarse en distintas clasificaciones, dependiendo de su complejidad química, pueden agruparse en  $C_6$ ,  $C_6-C_n$ ,  $C_6-C_n-C_6$ , siendo  $n \leq 3$  (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de fenoles y ejemplos de ellos

Estructura química	Tipo	Ejemplo de polifenol
$C_6$	Fenol simple	Eugenol
$C_6-C_1$	Ácido fenólico	Ácido gálico
	Ácido benzoico	Ácido elágico

$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables	
$C_6-C_2$	Ácido fenil acético	
$C_6-C_3$	Ácido hidroxicinámico	Ácido cafeico
	Cumarinas	Ácido ferúlico
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós	
$C_6-C_1- C_6$	Benzofenonas	
	Xantonas	
$C_6-C_2- C_6$	Estilbenos	Resveratrol
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides	Antocianinas
		Flavonoles
		Flavonas
		Flavanonas
		Isoflavonas
	Chalconas	Flavanoles
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianinas	

Fuente:(García y cols., 2015)

## 2.4 Residuos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos

La cadena de procesamiento de los alimentos de origen vegetal genera grandes cantidades de residuos agroindustriales, el problema al que se enfrentan estos residuos es que no existe una clara conciencia ambiental para su posterior tratamiento, además de la falta de capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final (Saval, 2012).

Existe una fuente extensa de investigaciones realizadas donde confirman que muchos residuos agroindustriales podrían servir como una fuente potencial para la extracción de compuestos bioactivos y así evitar que una cantidad considerable de este tipo de residuos se convierta en contaminantes del suelo y agua subterránea.

## **2.5 Extracción de compuestos bioactivos**

La extracción es la etapa más importante en el aislamiento de compuestos bioactivos, ya que, es el proceso donde se obtiene el compuesto de interés, cuyas características y/o propiedades se confieren a los pasos de extracciones convencionales que incluyen calentamiento, ebullición o reflujo, en los cuales, se produce una pérdida de compuestos debido a fenómenos de ionización, hidrólisis u oxidación durante el procedimiento (Wang y Weller, 2006).

En los últimos años se propusieron con éxito algunas técnicas novedosas para la extracción de compuestos bioactivos, las cuales consisten en acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de disolventes orgánicos y aumentar la sostenibilidad; a la vez que, se mejora la recuperación de compuestos de interés (Francisco y Rodríguez, 2010).

De acuerdo con Saini y Keum (2018) es recomendable realizar algunos pre-tratamientos antes de la extracción debido a que algunas estructuras que conforman las células son dinámicas, complejas y rígidas, lo cual constituye un obstáculo para que el solvente pueda penetrar a través de la célula, es por ello que se pueden aplicar pre-tratamientos físicos, químicos, enzimáticos y/o biológicos para facilitar una extracción eficiente de los compuestos de interés (Mezzomo y cols., 2011).

Por otro lado también se debe considerar el consumo de energía, la toxicidad del solvente a utilizar, temperatura, estabilidad del metabolito, entre otros (Saini y Keum, 2018).

### **2.5.1 Extracción por métodos emergentes**

Actualmente existen métodos emergentes de extracción tales como: extracción asistida por microondas (EAM), extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción mediante pulsos eléctricos y la extracción por altas presiones hidrostáticas (APH) por mencionar algunos, pueden ser menos costosos, simples y rápidos, además, requieren una cantidad mínima de solventes y algunos no necesitan de energía térmica, lo que permite una mayor estabilidad del compuesto de interés, por otro lado; algunos de estos métodos emergentes en comparación a

los convencionales podrían causar degradación térmica o alguna isomerización *cis-trans* del compuesto, incluso algunos también requieren que el tamaño de partícula sea pequeño ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ) tal es el caso de la extracción mediante líquidos presurizados, así como también, algunos son difíciles de aplicar a grandes volúmenes (Saini y Keum, 2018).

Dentro de estas técnicas, cabe destacar a la EAM (Duan y cols., 2015), EAU (Azuola y Vargas, 2007) y la extracción por APH.

#### **2.5.1.1 Extracción Asistida por Microondas**

Se ha demostrado que la EAM es un método de extracción emergente, rápido y eficiente, que se desarrolló para extraer analitos de matrices sólidas, en particular, metabolitos secundarios de materia vegetal (Duan y cols., 2015).

La energía de microondas es una radiación no ionizante que produce movimiento molecular por migración de iones y rotación de moléculas con dipolos permanentes en líquidos, que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia (Duan y cols., 2015).

Esto contribuye a que las condiciones de reacción sean menos severas sin alterar sus estructuras moleculares, los tiempos de reacción más cortos y se obtengan rendimientos más altos (Ruiz, 2012), sin embargo; si llegase a haber un incremento en el tiempo de extracción podría causar efectos negativos en el compuesto como una degradación térmica (Saini y Keum, 2018).

De acuerdo con Hiranvarachat y Devahastin (2014) se puede utilizar un proceso alternativo de radiación intermitente de microondas, haciendo uso combinado de menor potencia de microondas y volumen de solvente.

#### **2.5.1.2 Extracción Asistida por Ultrasonido**

La EAU es un enfoque innovador en el que se puede mejorar la eficiencia de un proceso de extracción debido a las ondas de sonicación, que desencadenan la producción de cavitación con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal y mejoran la resistencia a la solubilidad del medio de extracción o solvente como etanol (Ghafoor y cols., 2009; Ghafoor y cols., 2011).

El rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido se debe a la propagación de ondas de ultrasonido, resultando fuerzas de cavitación, donde las burbujas explotan y generan presiones localizadas causando el rompimiento del tejido celular y mejorando la exclusión de sustancias celulares en el solvente (Goula y cols., 2017). Además, se ha observado que el uso de la EAU puede mejorar la recuperación de los compuestos fenólicos de los materiales vegetales (Ghafoor y Choi, 2009). Se ha encontrado que la EAU es más eficiente, económica y sencilla que los métodos de extracción convencionales (Al-Juhaimi y cols., 2015), incluso, que algunos métodos de extracción emergentes como la EAM, por lo cual se considera su viabilidad industrial (Azuola y Vargas, 2007).

### **2.5.1.3 Extracción por Altas Presiones Hidrostáticas**

En el método de APH, generalmente se aplican condiciones de presión entre 100 y 1000 MPa y a temperatura ambiente por tiempos relativamente cortos, donde el material se mezcla con un solvente de extracción el cual es sometido a un sellado mediante vacío (Huang y cols., 2013).

Los efectos de la presión sobre el comportamiento de los sistemas bioquímicos se rigen por dos principios fundamentales, el primero, de Henri Le Chatelier el cual postula que todo fenómeno que va acompañado de una disminución, se ve favorecido por la presión y viceversa; y el principio de B. Pascal, en donde menciona que la presión ejercida en cualquier punto de un fluido es la misma en todas las direcciones independientemente del volumen y de la geometría del producto (Trespacios, 2007).

La tecnología APH como un método de extracción, fue estudiada por primera vez en el 2004, y se descubrió que efectivamente acortaba el tiempo de extracción e incrementaba la eficiencia del proceso (Huang y cols., 2013).

Las APH ya se han utilizado con éxito para extraer antocianinas de piel de uva (Corrales y cols., 2009), pectina de piel de naranja (Guo y cols., 2012), ginsenósidos de ginseng Panax (Shin y cols., 2010), polifenoles de hoja de té verde (Xi y cols., 2009) y lupeol del fruto de jaca (Ruiz-Montañez y cols., 2014).

Pinela y cols., (2018) lograron obtener condiciones óptimas de APH para la extracción de compuestos fenólicos a  $t=3.1$  min,  $P=600$  MPa, Solvente=100% etanol y obtuvieron  $64.68 \pm 2.97$  mg/g de extracto.

## 2.6 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

### 2.6.1 Ensayo de Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en distintos tipos de extractos vegetales. El reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), está conformado por ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo, y es a partir de la mezcla de ambos ácidos que se producen iones de molibdato y tungsteno. La reacción se lleva a cabo en condiciones básicas (pH 10), con la finalidad de que se genere un ion fenolato que reduce al FC mediante la reducción de  $Mo^{6+}$  a  $Mo^{5+}$  que presenta una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (Slinkard y Singleton, 1977), cuya intensidad es medida para determinar el contenido de fenoles (Chen y cols., 2015) (Fig. 4).

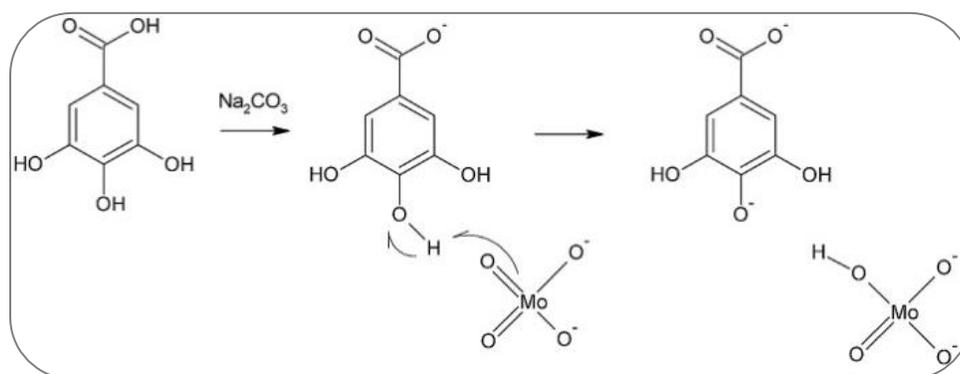


Figura 4. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo FC

Se trata de un método preciso y sensible, que es susceptible a modificaciones, fundamentalmente en lo que concierne, a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García y cols., 2015).

### **2.6.2 Agentes de control biológico**

La principal forma de control de los hongos causantes de podredumbres en frutas y vegetales es mediante la aplicación de fungicidas químicos (Rodríguez-Maturino y cols., 2015) sin embargo, la presencia de hongos patógenos resistentes a la acción de los fungicidas derivados de síntesis química, aunado a un creciente interés en alternativas con bajos riesgos toxicológicos, que no produzcan efectos residuales indeseables en especies endógenas y la necesidad de contar con alimentos inocuos (Sharma y cols., 2009) ha llevado a la búsqueda de medidas alternativas que minimicen el uso de agroquímicos, que a su vez reduzcan la presencia de hongos causantes de enfermedades en frutas y vegetales.

Entre las alternativas para reducir la presencia de hongos en la etapa de poscosecha se ha contemplado el uso de extractos vegetales; los cuales se obtienen a partir de plantas o parte de ellas (raíces, tallos, hojas y ramas) con diferentes métodos de extracción y algunos solventes como agua, etanol, hexano, metanol, entre otros (Pérez, 2012).

### **CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN**

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), es uno de los principales frutos tropicales que se cosechan y exportan en el estado de Nayarit, sin embargo, los árboles llegan a alcanzar alturas que no facilitan la recolección de los frutos, lo cual provoca, una poda continua que genera residuos agrícolas tanto de ramaje y follaje, que no son aprovechados. Recientemente, se demostró que la especie de jaca es rica en compuestos antimicrobianos como son fenoles, flavonoides, taninos y alcaloides que podrían mejorar la vida de anaquel de otros frutos. Hasta donde se sabe, existen escasos reportes en la literatura sobre la extracción de compuestos fenólicos provenientes de la hoja de jaca y por consiguiente, exista un aprovechamiento de dichos residuos agroindustriales generados. Adicionalmente, en ésta investigación, es de especial interés el uso de tecnologías alternativas de extracción que sustituyan al uso de tecnologías convencionales y al mismo tiempo, evaluar el método eficaz en la obtención de compuestos antifúngicos, que posteriormente puedan emplearse para mejorar la vida de anaquel de los frutos, que se ve afectada, por enfermedades poscosecha y por ende, pérdidas económicas. Por último, es importante mencionar que estas pérdidas económicas en la producción de frutos tropicales alcanzan hasta un 40% y son provocadas por microorganismos fitopatógenos que deterioran la vida útil de los frutos. Para el control de dichas enfermedades, se utilizan cada vez dosis más altas y repetidas de fungicidas químicos, dejando residuos tóxicos indeseables tanto para el medio ambiente como para el consumo humano. Aunado a la creciente demanda en el uso de nuevos compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, que sean efectivos y a su vez, inocuos, en este trabajo se pretende obtener compuestos seguros tanto para el medio ambiente como para productores y consumidores.

## **CAPÍTULO 4. OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar tres métodos emergentes de extracción, para la obtención de compuestos fenólicos a partir de la hoja de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) de árboles cultivados en el estado de Nayarit.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar los métodos de extracción emergentes (microondas, ultrasonido y altas presiones hidrostáticas) para la evaluación del mejor método en la extracción de compuestos fenólicos a partir de hoja de jaca.
2. Caracterizar cualitativa y cuantitativamente los extractos fenólicos obtenidos por microondas, ultrasonido y altas presiones hidrostáticas.
3. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos obtenidos frente a algunos hongos fitopatógenos.
4. Evaluar el efecto de fracciones obtenidas mediante solventes de diferente polaridad a partir de hoja de jaca, sobre la inhibición *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium italicum*.
5. Identificar los compuestos presentes en el extracto total y en las fracciones obtenidas mediante HPLC-DAD-ESI-MS.

## **CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de esta investigación se realizó en 3 etapas, siendo el material biológico las hojas de jaca jóvenes y maduras.

La primera etapa consistió en determinar el método de extracción más eficiente, en conjunto se caracterizó cualitativa y cuantitativamente el extracto fenólico, evaluando Fenoles Solubles Totales (FST), Taninos Totales (TT) y Flavonoides Totales (FT).

La segunda etapa consistió en el ensayo *in vitro* del extracto fenólico evaluando su actividad antifúngica frente a *Penicillium italicum* aislado de limón Persa (*Persian lime*) y *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de mango Kent (*Mangifera indica*).

La tercera etapa consistió en el fraccionamiento del extracto fenólico total con 6 solventes de diferente polaridad, a la par se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* frente a los hongos antes mencionados y finalmente se caracterizaron los extractos totales y las fracciones por HPLC-DAD-ESI-MS.

## **5.1 Características del material biológico**

Para el desarrollo de la investigación, se realizó la recolección de la muestra mediante un muestreo aleatorio simple de hojas de jaca jóvenes y maduras, estas se obtuvieron del municipio de Santa María del Oro, Nayarit; fueron seleccionadas respecto a su calidad visual.

## **5.2 Preparación de materia prima**

Las hojas de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos, enseguida se lavaron con agua destilada estéril, se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se deshidrataron en una estufa de secado Nova Tech a 40 °C durante 24 horas, por último se pulverizaron y tamizaron con un tamaño de malla de 150 µm con el fin de tener distribuciones de tamaño homogéneas para su utilización en los posteriores métodos de extracción que se aplicaron (Munir y cols., 2018).

## **5.3 Primera etapa**

### **5.3.1 Métodos de extracción**

#### **5.3.1.1 Microondas**

La extracción se realizó utilizando un horno de microondas convencional marca Whirlpool con 10 niveles de potencia (desde 10% hasta 100%, siendo la mínima 120 W y la máxima 1200 W), equipado con un temporizador digital. Se pesaron 2 g de muestra y se mezclaron con 20 mL de una solución de etanol: agua (Et:Ag) en una relación 8:2 (v/v) a 10 °C en un vaso de precipitado, después de mezclar, el vaso se irradió en el dispositivo de microondas a 600, 900 y 1200 W durante 1, 2 y 3 min.

#### **5.3.1.2 Ultrasonido**

La extracción se realizó con un baño ultrasónico (Kendal, modelo CD-4820), para lo cual se homogenizaron 2 g de muestra con 20 mL de una solución de Et:Ag en una

relación 8:2 (v/v) a 10 °C en un vaso de precipitado, posteriormente se aplicaron ondas sónicas durante 15, 30 y 45 min a una frecuencia de 42 kHz.

### **5.3.1.3 Altas Presiones Hidrostáticas**

La extracción se realizó con un equipo de altas presiones hidrostáticas modelo CIP42260 (Avure Autoclave Systems, Eri PA USA), se pesaron 2 g de muestra y se mezclaron con 20 mL de Et:Ag en una relación 8:2 (v/v) a 10 °C, se empacaron al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad (FoodSaver) empleando un sistema de sellado al vacío (FoodSaver modelo V38305) y consecutivamente se presurizó a 20 °C con presiones de 150, 200 y 250 MPa y a 10, 15 y 20 min (Rodríguez y cols., 2015; Ruíz, 2012).

Después de aplicar los diferentes métodos de extracción, las muestras se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 minutos, posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se filtró usando papel filtro estéril (Millipore) con un tamaño de poro de 45 µm, el filtrado obtenido se colocó en un evaporador rotatorio a 40 °C para eliminar el solvente y por último, las muestras se almacenaron a -18 °C hasta su posterior uso (Duan y cols., 2015).

## **5.3.2 Análisis cualitativo de compuestos extraídos de la hoja de jaca**

### **5.3.2.1 Terpenoides y esteroides**

En un tubo de ensayo se añadieron 300 µL de extracto fenólico, a este se le agregó 1 mL de cloroformo y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%, se generó una fase café-rojiza en la parte superior del tubo lo cual indicó la presencia de terpenoides (Edeoga y cols., 2005).

### **5.3.2.2 Fenoles y taninos**

En un tubo de ensayo se añadieron 300 µL de extracto fenólico, a este se le agregaron 100 µL de FeCl<sub>3</sub> al 10%, la aparición de un precipitado azul con tonalidades verdes a grises indicó la presencia de fenoles y taninos (Edeoga y cols., 2005).

### **5.3.2.3 Flavonoides**

En un tubo de ensayo se agregaron 300  $\mu$ L de extracto fenólico, a este se le adicionó 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10% y 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98%, el color amarillo que se generó cuando entró en contacto con el amoniaco desapareció generando tonalidades cafés a negras (Edeoga y cols., 2005).

### **5.3.2.4 Saponinas**

En un tubo de ensayo se añadieron 300  $\mu$ L de extracto fenólico, a este se le agregaron 2 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente (agua-extracto) durante 10 segundos, la aparición de espuma fue persistente y estable lo que indicó la presencia de saponinas (Edeoga y cols., 2005).

### **5.3.2.5 Antraquinonas**

En un tubo de ensayo se añadió 1 mL de benceno, posteriormente se le añadió 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10% y 300  $\mu$ L de extracto fenólico, la aparición de un color rosa, rojo o violeta en la fase baja del amoniaco indicó la presencia de antraquinonas.

Los resultados de ambos análisis aplicados se expresaron con abundancia (+++), presencia (++) , poca presencia (+) o ausencia (-) del compuesto que se evaluó.

## **5.3.3 Análisis cuantitativo de compuestos extraídos de la hoja de jaca**

### **5.3.3.1 Fenoles solubles totales**

El contenido de FST se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Isaza y cols. (2005), 1 mL de cada extracto fenólico se diluyó 1/100, se tomó 1 mL de las diluciones anteriores y se le agregó 0.8 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), se homogenizó y posteriormente se le agregaron 0.2 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % y se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada, se homogenizaron los matraces y se dejaron reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos (García y cols., 2015). Transcurrido este tiempo las muestras se leyeron en un lector de microplacas (BioTek modelo Synergy/HTX multi-mode reader) a 760 nm. Las estimaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Los resultados se obtuvieron previos a la elaboración de una curva patrón utilizando ácido gálico como estándar expresándose los resultados en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de hoja de jaca en base seca (BS) (Loizzo y cols., 2010).

*FST (mg EAG/g hoja de jaca BS) Ec. (1)*

$$= Z \left( \frac{mg}{mL} \right) * vol. total en matraz aforado (mL) * \frac{vol. solvente usado (mL)}{peso seco de muestra usada}$$

*Z = concentración del valor obtenido de la curva de calibración*

### 5.3.3.2 Taninos totales

El contenido de TT se determinó por la técnica propuesta por Tambe y Bhambar (2014), 1 mL de cada extracto obtenido fue añadido a un matraz de 25 mL que contenía 7.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), se le agregó 1 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 35% y se llevó a un volumen de 25 mL con agua destilada, se homogenizaron los matraces y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo las muestras se leyeron en un lector de microplacas a 725 nm (Ojwang y cols., 2017). Las estimaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se obtuvieron previos a la elaboración de una curva patrón utilizando ácido gálico como estándar, expresados como mg EAG / g de hoja de jaca en base seca.

*TT (mg EAG/g hoja de jaca BS) Ec. (2)*

$$= Concentración \left( \frac{mg}{mL} \right) * vol. total en matraz aforado (mL) * \frac{vol. solvente usado (mL)}{peso seco de muestra usada}$$

### 5.3.3.3 Flavonoides totales

En un tubo de ensayo de añadió 0.1 mL de cada extracto fenólico de jaca y 1.4 mL de agua desionizada, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo de flavonoides previamente preparado (133 mg de AlCl<sub>3</sub> y 400 mg de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> en 100 mL de solvente constituido por 70 mL de metanol, 25 mL de agua destilada y 5 mL de ácido acético), se dejó reposar la mezcla durante 30 min en oscuridad, transcurrido este tiempo, las muestras se leyeron en un lector de microplacas a 430 nm. Las estimaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se obtuvieron

previos a la elaboración de una curva patrón utilizando rutina como estándar, expresados como mg de rutina (R) / g de hoja de jaca en base seca (Maksimovic y cols., 2005).

$$FT \text{ (mg ER/g hoja de jaca BS)} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$= \text{Concentración} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * \frac{\text{vol. solvente usado (mL)}}{\text{peso seco de muestra usada}}$$

### 5.3.4 Análisis estadístico

Para esta primera etapa, para la EAM se empleó un diseño experimental factorial  $3^2$ , en donde los factores fueron tiempo y potencia con 3 niveles (1, 2 y 3 min y 600 W, 900 W y 1200 W respectivamente) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño experimental para EAM

Tratamiento de extracción	Potencia (W)	Tiempo (minutos)	Código
EAM	1200	3	M1200-3
EAM	1200	2	M1200-2
EAM	1200	1	M1200-1
EAM	900	3	M900-3
EAM	900	2	M900-2
EAM	900	1	M900-1
EAM	600	3	M600-3
EAM	600	2	M600-2
EAM	600	1	M600-1

Para la EAU se utilizó un diseño unifactorial en donde se declaró un solo factor (tiempo) con tres niveles (15, 30 y 45 minutos) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental para EAU

Tratamiento de extracción	Potencia (Hz)	Tiempo (minutos)	Código
EAU	42	15	U45
EAU	42	30	U30
EAU	42	45	U15

Para la extracción por APH se usó un diseño experimental factorial 3<sup>2</sup>, en donde los factores fueron tiempo y presión con 3 niveles (10, 15 y 20 min y 100, 200 y 300 MPa, respectivamente) (Cuadro 5). Esta primera etapa se realizó por triplicado.

Cuadro 5. Diseño experimental para APH

Tratamiento de extracción	Condiciones (MPa)	Tiempo (minutos)	Código
APH	250	20	A250-20
APH	250	15	A250-15
APH	250	10	A250-10
APH	200	20	A200-20
APH	200	15	A200-15
APH	200	10	A200-10
APH	150	20	A150-20
APH	150	15	A150-15
APH	150	10	A150-10

Se realizó un análisis de varianza y pruebas LSD de Fisher (Least Significant Difference) donde se evaluó diferencia entre las medias de los tratamientos utilizando el software STATISTICA 10. Una  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## 5.4 Segunda etapa

### 5.4.1 Ensayo *in vitro* de los extractos fenólicos

Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos fenólicos obtenidos por APH, 200 MPa, 15 min, EAM, 900 W, 2 min y EAU, 42 kHz, 30 min, frente a *C. gloeosporioides* y *P. italicum* aislados de los frutos tropicales mencionados anteriormente, utilizando las siguientes concentraciones: 0.5, 2 y 5 mg de extracto liofilizado / mL.

Se preparó medio de cultivo PDA, se colocaron 19 mL de PDA en tubos cónicos Falcon de 50 mL, posteriormente se esterilizaron y se dejaron enfriar a 40 °C, cuando esta temperatura se alcanzó, se vertió en cada tubo 1 mL de extracto correspondiente a las concentraciones anteriormente mencionadas y se homogenizaron en un Vortex (Genie 2, DAIGGER), posteriormente el contenido de

cada tubo se vertió en cajas de Petri estériles y se dejó solidificar, se utilizaron 2 controles, el primer control fueron cajas con PDA más crecimiento micelial y el segundo control fueron cajas con 19 mL de PDA más 1 mL de extracto correspondiente a las diferentes concentraciones (González-Estrada y cols., 2018). Una vez obtenidas las cajas de Petri a las diferentes concentraciones; en el centro de la misma se colocaron discos de PDA de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial activo de los hongos anteriormente mencionados y se incubaron a 28 °C. Se midió el diámetro de crecimiento durante 7 días a 28 °C (Ochoa-Fuentes, y cols., 2012; Quintero-Mora, y cols., 2008). El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ec. (4)

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

donde:

dc= crecimiento micelial del control en cm

dt= crecimiento micelial del tratamiento en cm

## 5.5 Tercera etapa

### 5.5.1 Fraccionamiento de extracto fenólico total de hoja de jaca

El fraccionamiento de hoja de jaca se llevó a cabo con un equipo de altas presiones hidrostáticas, 30 g de muestra se mezclaron por separado con 5 diferentes solventes iniciando desde el índice de polaridad más bajo hasta el más alto, llevando el siguiente orden, hexano (HeEx), etanol (EtEx), acetato de etilo (AcOEx), acetona (AcEx), metanol (MeEx) y agua (AgEx) cada uno se empacó al vacío y consecutivamente se presurizó a 20 °C a una presión de 200 MPa durante 15 minutos (Rodríguez y cols., 2015; Ruíz, 2012), posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4,500 rpm por 10 minutos y los sobrenadantes se filtraron usando papel filtro estéril Millipore con un tamaño de poro de 45 µm. El filtrado obtenido se evaporó y se almacenó a -18 °C hasta su posterior uso (Eloff y cols., 2017).

## **5.5.2 Ensayo *in vitro* de fracciones obtenidas de hoja de jaca**

### **5.5.2.1 Inhibición de crecimiento micelial**

Se evaluó la inhibición de crecimiento micelial de fracciones obtenidas de hoja de jaca (HeEx, EtEx, AcOEx, AcEx, MeEx y AgEx) frente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium italicum*, utilizando las concentraciones antes mencionadas (0.5, 2 y 5 mg de extracto liofilizado / mL), siguiendo la metodología reportada anteriormente con algunas modificaciones (González-Estrada y cols., 2018).

### **5.5.2.2 Inhibición de germinación de esporas**

La inhibición de germinación de esporas fue determinada de acuerdo a González-Estrada y cols., (2017) con algunas modificaciones, previo al experimento *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium italicum* fueron cultivados en PDA durante 7 días a 28 °C. Se añadieron 10 mL de solución salina estéril que contenía Tween 80 (0.1% v/v) a cada placa para recuperar las esporas, las suspensiones de las mismas se hicieron frotando la superficie de agar con un asa Drigalsky estéril. Después, la suspensión se filtró con una gasa estéril y se recuperó en un tubo cónico estéril. La concentración de esporas se ajustó a  $1 \times 10^5$  esporas / mL por recuento microscópico en cámara Neubauer, en 8 mL de caldo papa dextrosa (PDB por sus siglas in inglés) se agregaron 160  $\mu$ L de suspensión de esporas del hongo ( $1 \times 10^5$  esporas / mL) y 400  $\mu$ L de cada extracto a diferentes concentraciones (0.5, 2 y 5 mg / mL). Los tubos se incubaron en un agitador rotatorio a 110 rpm a 28 °C; la tasa de germinación de los hongos se determinó microscópicamente midiendo el porcentaje de germinación de los hongos durante 8 h para ambos hongos, en muestras de aproximadamente 200 esporas. Se consideraron las esporas germinadas cuando la longitud del tubo germinal fue igual o mayor al diámetro de la espora inicial (Yao y cols., 2004). Se usó como control tubos con PDB sin extracto. Se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente ecuación (Angulo-Escalante y cols., 2009).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Número de esporas control} - \text{Número de esporas tratamiento}}{\text{Número de esporas control}} \times 100$$

### 5.5.3 Identificación de compuestos en el extracto fenólico total y en las fracciones por HPLC-DAD-ESI-MS

Los compuestos fenólicos fueron separados del extracto de hoja de jaca y de cada fracción usando un sistema Agilent HPLC 1260/ espectroscopia MS 6100 (Agilent Technologies, CA, USA), el cual consiste en una desgasificadora, un inyector automático y una bomba binaria equipada con una columna analítica Poroshell 120 EC-C18 (250 x 4.6 mm, un tamaño de poro 5  $\mu\text{m}$ ) de Agilent Technologies. Un gradiente de elución fue programado usando como fase móvil A, agua acidificada (0.6% ácido acético, v/v) y como fase móvil B, acetonitrilo, el gradiente cambió de acuerdo a las siguientes condiciones: 0 min, 95%B; 1 min, 5%B; 2 min, 10%B; 3 min, 15%B; 4 min, 20%B; 5 min, 25%B; 6 min, 30%B; 7 min, 40%B; 8 min, 50%B; 9 min, 60%B; 10 min, 70%B; 11 min, 80%B; 12 min, 100%B; 13 min, 5%B. La velocidad de flujo fue de 0.30 mL min<sup>-1</sup> a lo largo del gradiente, el volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  y los espectros de UV se registraron de 200 a 600 nm usando el detector DAD. Los parámetros de análisis se realizaron usando modos de iones positivos con espectros en un rango de 50 a 1100 m/z; un capilar de voltaje, 4000 V; una temperatura de secado, 210 °C; flujo de gas de secado, 8 L min<sup>-1</sup>; y una presión de gas nebulizante, 29 psi (López-Cobo y cols., 2014).

### 5.5.4 Análisis estadístico

Para ambos ensayos se realizó un diseño experimental unifactorial, siendo un sólo factor (concentración de extracto fenólico extraído) con tres niveles (0.5, 2 y 5 mg / mL). Esta tercera etapa se realizó por triplicado.

Se realizó un análisis de varianza y pruebas LSD (Least Significan Difference) para evaluar diferencia entre las medias de los tratamientos utilizando el software STATISTICA 10. Un  $P < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa.

## **CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Primera etapa

#### 6.1.1 Métodos de extracción

Los metabolitos secundarios son conocidos por su capacidad para proteger a las plantas de condiciones ambientales adversas. La producción o liberación de metabolitos secundarios es estimulada por condiciones de estrés, tales como las altas y bajas temperaturas, sequías, suelos altamente salinos, falta o exceso de nutrientes por ejemplo la deficiencia de hierro mejora la producción de fenoles (Siddiqui y Bansal, 2017).

Se obtuvieron extractos fenólicos acuosos de color marrón a verde claro como se muestra en la Fig. 5, con un rendimiento del 25 %, este resultado difiere con lo mostrado por Pérez (2012) quien obtuvo extractos etanólicos de Orégano, Gobernadora y Damiana mediante ultrasonido para su aplicación en recubrimientos comestibles para controlar podredumbre gris en fresa y obtuvieron un rendimiento del  $42.66 \pm 15.44$ ,  $46.66 \pm 9.95$  y  $42.66 \pm 2.41$  mg EAG / g BS respectivamente.



Figura 5. Extracto de hoja de jaca

Esto pudiera deberse a diferentes factores como lo reportado por Awuor (2017) y Chandrasekara (2010) quienes sugieren que la extracción de compuestos fenólicos puede variar de acuerdo a diferentes factores. Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de tamaño de partícula (cuando se cambió de 100-200  $\mu\text{m}$  a 500-850  $\mu\text{m}$ ) afectó significativamente el contenido de fenoles, flavonoides y actividad

antioxidante en residuos de piel de cebolla (Munir y cols., 2018), mostrando una reducción de 99.72 a 26.22 mg EAG/g BS, de 16.62 a 4.37 mg EQ/g BS y de 157.64 a 66.52 mM ETrolox /g BS, respectivamente. Esto debido a que al aumentar el tamaño de partícula, el solvente está menos en contacto con la matriz.

Asimismo, estos elementos evaluados se afectaron a medida que se aumentó el pH, lo que indicó que se extrajeron más compuestos fenólicos en condiciones ácidas, puesto que los compuestos fenólicos son de naturaleza ácida y en condiciones alcalinas fuertes puede haber reacciones de sustitución (Buchner y cols., 2006), por otro lado Khuwijitjaru y cols., (2013), reportó que a medida que se aumentaba la temperatura, el contenido de fenoles disminuyó, puesto que los fenoles son sensibles al calor.

Otro factor importante son las condiciones inherentes del cultivo, una de ellas es la altitud puesto que juega un rol importante en la calidad del material vegetal, se demostró que el contenido de fenoles en té negro varió al evaluar esta especie proveniente de diferentes regiones (Ojwang y cols., 2017).

### **6.1.2 Caracterización del extracto.**

La primera etapa consistió en la evaluación de los extractos acuosos obtenidos con la aplicación de ultrasonido, microondas y altas presiones hidrostáticas con las diferentes condiciones establecidas, estos extractos se caracterizaron cualitativa y cuantitativamente; para ello se determinó la presencia de fenoles solubles totales, taninos, terpenoides y flavonoides (Cuadro 6), para su posterior cuantificación; la presencia de estos compuestos coincide con lo reportado por Hakim (2010) y Hakim y cols. (2006) quienes también reportaron la presencia de estos metabolitos secundarios en especies del género *Artocarpus*.

Cuadro 6. Análisis fitoquímico de los extractos hidroalcológicos

Compuestos químicos	Reacción	Resultados		
		EAM 900 W, 2 min	EAU 42 kHz, 30 min	APH 200 MPa, 15 min
Flavonoides	NH <sub>4</sub> OH y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	+++	+++
Saponinas	---	++	++	+++
Esteroides	CHCl <sub>3</sub> y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	+++	-
Terpenoides	CHCl <sub>3</sub> y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	+++	-
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++	+++
Fenoles	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++	+++
Antraquinonas	NH <sub>4</sub> OH y C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	+	+	++

(+++) abundancia (++) presencia (+) poca presencia (-) ausencia

### 6.1.3 Curvas de calibración

Las lecturas de densidad óptica (D.O.) de las diferentes concentraciones de los estándares (ácido gálico y rutina) fueron usadas para la construcción de curvas de calibración, las gráficas obtenidas para la determinación del contenido de FST, TT y FT mostraron valores de R<sup>2</sup> de 0.9992, 0.9904 y 0.9935, respectivamente (Cuadro 7). Los valores obtenidos de la curva de calibración fueron usados para cuantificar el contenido de FST, TT y FT presentes en las hojas de jaca por los tres métodos de extracción empleados.

Cuadro 7. Muestras de ecuaciones y valores de R<sup>2</sup> de las curvas de calibración.

Curva Estándar	Ecuación	Valor R <sup>2</sup>
FST	y= 9.5564x	0.9992
Taninos Totales	y= 0.0165x	0.9904
Flavonoides Totales	y= 1.9943x	0.9935

#### 6.1.4 Contenido de Fenoles Solubles Totales (FST) en hojas de jaca por tres métodos de extracción

El contenido de FST en hoja de jaca mediante los tres métodos de extracción se muestra en la Fig. 7; el contenido fenólico más alto fue de  $164 \pm 6.29$  EAG / g BS, cantidad que fue obtenida por EAM a una potencia intermedia de 900 W durante un tiempo de 3 minutos, estos resultados coinciden con lo reportado por Dahmoune y cols. (2015) quienes consideraron un rango de 1 a 5 minutos de tiempo de irradiación para la obtención de rendimientos máximos de compuestos fenólicos a partir de hojas de *Myrtus communis* L., la recuperación de FST fue de  $162.49 \pm 16.95$  mg EAG / g BS. En contraste, este resultado difiere de lo obtenido por Ojwang y cols. (2017), quienes evaluaron fitoquímicamente hojas, ramas y raíces de jaca, utilizando maceración durante 24 h y obtuvieron un porcentaje inferior de FST (30.92-37.39 mg/g BS) en comparación a los obtenidos en el presente estudio, esto se le atribuyó directamente al método de extracción, dada que, cuando se aplican las microondas se aumenta la presión interna, debido a la alta presión de vapor dentro de las células de las muestras, acelerando la ruptura celular.

Cabe destacar que este rendimiento podría deberse también al tipo de solvente utilizado ya que de acuerdo con Alara y cols. (2018) a mayores concentraciones de etanol aumentó el rendimiento de FST (hasta en un 40% v/v). Además hubo un rendimiento significativo cuando se mezcló con agua, dado que los compuestos fenólicos son solubles en etanol acuoso (Muñiz-Márquez y cols., 2013). Esta afirmación puede sustentarse en el hecho de que en el presente estudio, cuando se realizó la prueba de solubilidad se pudo observar que al disolver el extracto liofilizado en agua aún quedaban partículas suspendidas, mientras que al disolver el extracto liofilizado en Et:Ag (8:2 v/v) se mostró una mayor solubilidad como se muestra en la Fig. 6.



Figura 6. Solubilidad de FST en agua y en Et:Ag (8:2 v/v)

No obstante, a potencias de 600 W y 1200 W se redujeron los rendimientos. Es probable que a 600 W, puede deberse a la poca absorción de energía de microondas por parte de la muestra que no fue suficiente para romper la membrana y facilitar la extracción de los FST (Bouras y cols., 2015; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). Asimismo la reducción en la concentración de FST a 1200 W, se le atribuyó a una posible descomposición térmica de compuestos fenólicos, puesto que a niveles más altos de potencia, las microondas promueven el movimiento de partículas debido a la migración de iones y la rotación de moléculas con dipolos permanentes en líquidos (Deo y cols., 2015; Duan y cols., 2015).

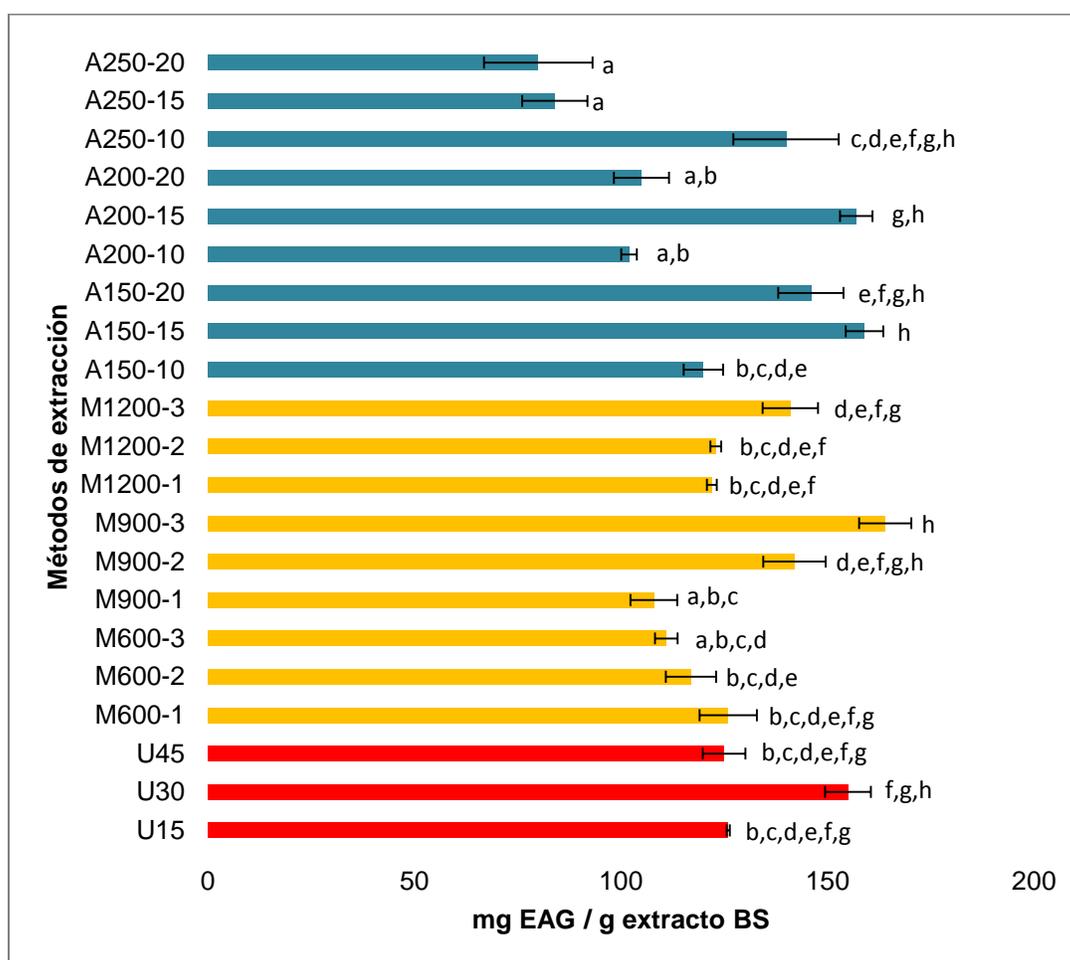


Figura 7. Contenido de FST en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción.

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Este mecanismo, conduce a la disipación de la energía dentro del solvente de extracción y la muestra, causando un sobrecalentamiento interno, por lo tanto el calor generado por la energía de microondas podría estar afectando la estructura de los compuestos fenólicos (Alara y cols., 2018), la disipación en un solvente tiene ciertas ventajas, puesto que a mayor disipación la recuperación de compuestos fenólicos es mayor, sin embargo, esta misma disipación pudiera provocar pérdida de moléculas termosensibles, razón por la cual se observó un mayor rendimiento a potencias medias.

Multari y cols. (2018), estudiaron el efecto de diferentes temperaturas de secado sobre el contenido de compuestos fenólicos y de carotenoides en semilla de quinoa (*Chenopodium quinoa*) observaron que a temperaturas de secado de 60 a 70 °C facilitaron la extracción de compuestos fenólicos; cuando las semillas se secaron a 70 °C, la cantidad de compuestos fenólicos fue 4.5 veces mayor que la de quinoa secada a 40 °C. Sin embargo, lo reportado por Francini y cols. (2017) y Suazo y cols. (2014) mencionan que altas temperaturas pueden generar pérdidas de compuestos fenólicos en matrices como fresa, manzana y cacao, proporcionando fenoles libres térmicamente lábiles tales como flavonoides y antocianinas, es decir que dependerá del material vegetal del que se haga la extracción de fenoles para saber si una temperatura alta afecta o no en la recuperación de estos compuestos. No obstante, en la Fig. 7, se muestra que no hubo diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos A150-15, A150-20, A200-15, A250-10, M900-2, M1200-3 y U30 ( $p>0.05$ ), es posible que los altos rendimientos mostrados por APH, se deban a la aplicación de presión, ya que la presión aumenta rápidamente, la presión diferencial entre el interior y el exterior de la célula es muy alta, en condiciones de APH causan deformación de la celda y daños en la pared celular, permitiendo una mejor extracción de compuestos bioactivos (Huang y cols., 2013), en contraste, el ultrasonido lo hace por medio de cavitación acústica, esto permite que el solvente penetre en las paredes celulares y las burbujas producidas por la cavitación acústica ayuden a la ruptura celular, liberando los compuestos activos (Strati y Oreopoulou, 2014), de modo que se tomaron los tratamientos con las medias más altas para posteriores estudios.

### 6.1.5 Contenido de Taninos Totales (TT) en hojas de jaca por tres métodos de extracción

Los taninos poseen una estructura fenólica, los cuales son encontrados de manera abundante en las ramas y en menor cantidad en hojas y frutos de una gran variedad de especies de plantas, estos compuestos protegen a las plantas contra los rayos UV, radicales libres, así como amenazas biológicas (animales, insectos, hongos y bacterias) (Mueller-Harvey, 2001; Schofield y cols., 2001; Tondi y cols., 2013).

En la Fig. 8, se muestra el contenido de taninos totales por cada uno de los métodos de extracción empleados, el mayor contenido de Taninos Totales ( $94 \pm 0.63$  mg EAG / g BS) se encontró por el método de extracción microondas, durante 2 y 3 minutos ( $p > 0.05$ ), el tiempo no influyó en la recuperación de estos compuestos.

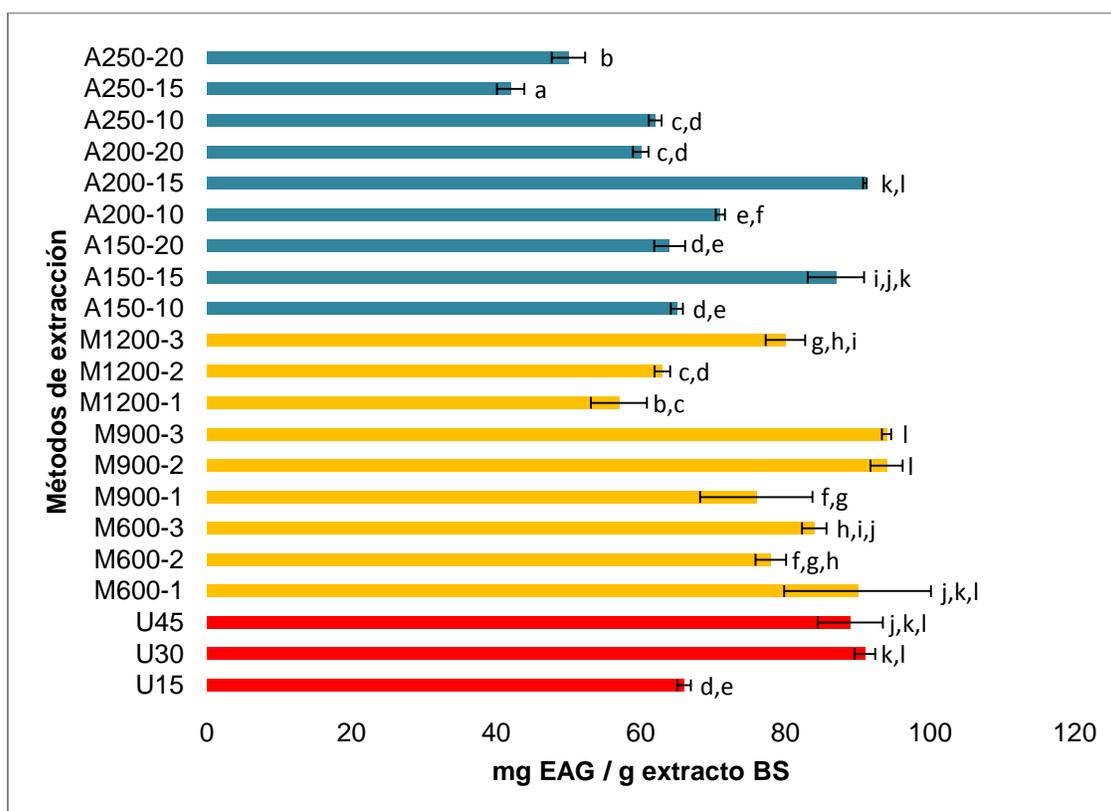


Figura 8. Contenido de Taninos Totales en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción.

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Este resultado se le atribuyó a la adición de agua al etanol, la polaridad del etanol aumenta cuando se agrega agua y esto influye en la solubilidad de los compuestos

fenólicos, asimismo, se acelera la transferencia de masa entre el sólido y el líquido al aumentar la permeabilidad de la matriz de la planta e interrumpir la unión entre la matriz de la planta y los solutos (Bouras y cols., 2015).

Este resultado coincide con lo estudiado por Dahmoune y cols. (2015), quienes al utilizar como método de extracción la EAM y Et:Ag como solvente, además de obtener un mayor rendimiento de FST, también observaron un incremento en el rendimiento de taninos, obteniendo  $32.65 \pm 0.01$  mg EAG / g BS.

No obstante, este tratamiento no mostró diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos A200-15, M600-1, U45 y U30 ( $p > 0.05$ ), indicando que al aplicar cualquiera de estos tratamientos, se obtendrá una recuperación de compuestos estadísticamente iguales. Como ya se mencionó anteriormente, debido a la eficacia de la APH y al mínimo aumento de temperatura al aplicar presión, no hay pérdida de compuestos sensibles al calor, permitiendo obtener recuperaciones considerables de este tipo de compuestos (Strati y cols., 2015), así como también al aplicar ultrasonido, puesto que las burbujas que se generan implotan, creando presiones localizadas, causando lisis celular, mejorando la extracción de compuestos, en general, estos métodos de extracción pudieran estar actuando principalmente sobre la vacuola, ya que aquí se encuentran los metabolitos secundarios hidrofílicos, así como también en menor medida sobre las tricomas, la cutícula y algunos conductos de resinas ya que aquí se encuentran principalmente los metabolitos secundarios lipofílicos (Siddiqui y Bansal, 2017).

#### **6.1.6 Contenido de Flavonoides Totales (FT) en hojas de jaca por tres métodos de extracción**

Los flavonoides son una subdivisión de los compuestos fenólicos, los cuales son metabolitos secundarios que se encuentran naturalmente en las plantas y se encuentran principalmente en alimentos y bebidas, como frutas, verduras, cereales, té, café y vino tinto (Taveira y cols., 2010).

La estructura general de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos unidos entre sí por un puente de 3 carbonos (C6-C3-C6), una posible subclasificación de

flavonoides incluye chalconas, isoflavonoides, flavonoles, flavanones y antocianidinas (Seleem y cols., 2017).

En la Fig. 9, se muestra que el mayor contenido de FT fue de  $20 \pm 0.89$  mg ER / g BS y se observó con la aplicación de APH, a una presión de 200 MPa durante 15 minutos, este resultado fue estadísticamente significativo mostrando la media más alta en comparación a los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ). Se atribuye este resultado al hecho de que al aumentar la presión, el aumento de la temperatura es mínimo ( $3^\circ\text{C} / 100$  MPa) (Strati y cols., 2015; Wang, 2014), razón por la cual no hay una pérdida de FT en comparación con otros métodos, que mediante reacciones de oxidación y condensación podrían contribuir a la disminución de FT (Suazo y cols., 2014).

El resultado obtenido en el presente estudio, coincide con lo reportado por Pinela y cols. (2018), quienes realizaron un modelado y optimización de procesos de la extracción en frío de compuestos fenólicos de berros por APH, ellos obtuvieron un mayor rendimiento de FT ( $52.45 \pm 2.63$  mg / g BS) en comparación con lo obtenido mediante extracción convencional sólido-líquido durante 2 h usando una mezcla de metanol:agua (80:20, v/v) como solvente de extracción, mostrando un valor de  $22 \pm 1$  mg / g BS.

No obstante Ojwang y cols. (2017) reportaron concentraciones bajas de FT en hoja de jaca (5.02 a 6.70 mg ER/g BS), de la misma forma, la mayor recuperación de FT en el presente estudio, fue atribuido principalmente al método de extracción, puesto que Ojwang y cols. (2017) utilizaron como método de extracción maceración, este método se basa en la difusión del solvente en la matriz sólida y la extracción de los componentes solo por solubilización (Strati y Oreopoulou, 2014), mientras que en la presente investigación se utilizó la APH, a medida que se aplica la presión, aumenta la transferencia de masa cambiando el gradiente de concentración y la difusividad, causando daños a la membrana celular de la planta, provocando ruptura o permeabilidad de los tejidos de las plantas y mejorando la transferencia de masa de los solventes a los materiales y los constituyentes solubles a los solventes (Huang y cols., 2013).

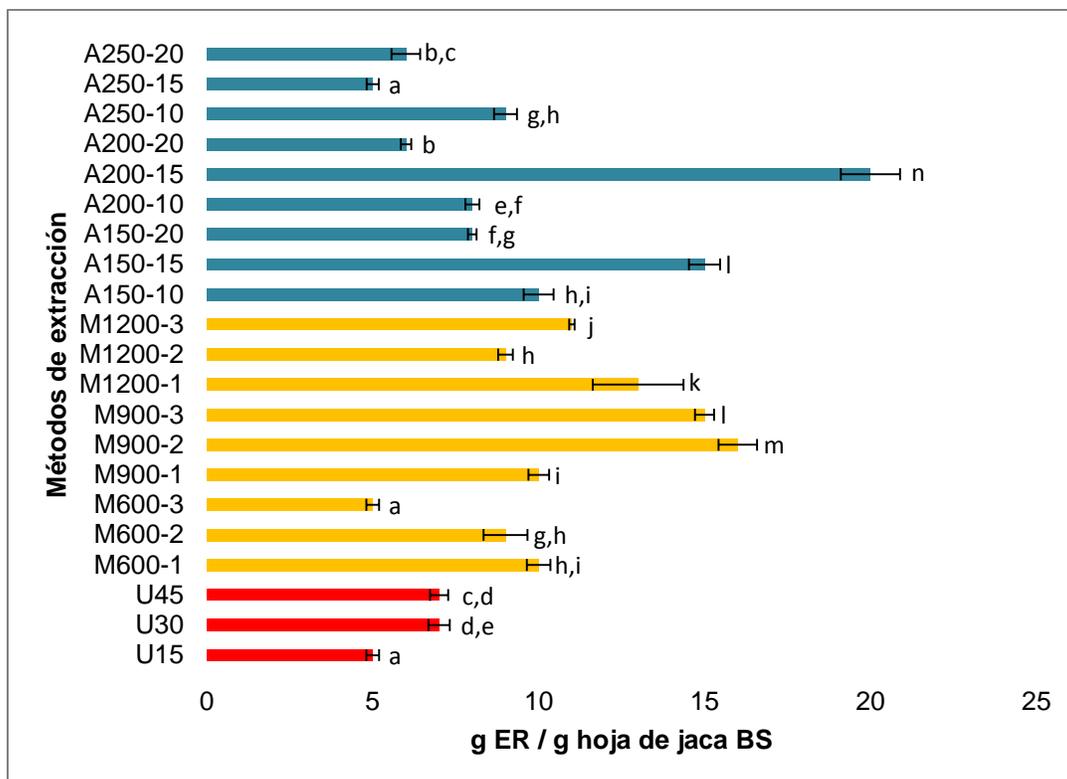


Figura 9. Contenido de Flavonoides Totales en hoja de jaca, mediante los diferentes métodos de extracción.

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

La presión dentro de las células altera los enlaces no covalentes, como los enlaces de hidrógeno, los enlaces iónicos y las interacciones hidrófobas que controlan la estructura 3D polimérica.

Esto hace que las células se expandan y el fluido impacte fuertemente contra la pared celular, la membrana celular, la membrana plasmática, la membrana nuclear, la vacuola y los microtúbulos, lo que produce una deformación significativa y daño a la membrana y un aumento subsiguiente de la permeabilidad (Xi y cols., 2011). Además, el incremento de la presión mejora el contacto con el solvente de extracción resultando en una mayor eficiencia de extracción (Chen y cols., 2009).

Como se explicó anteriormente, los flavonoides son moléculas termosensibles, es posible que la disminución en la recuperación de estos compuestos mediante microondas y ultrasonido se deba a un sobrecalentamiento localizado, debido a una mayor temperatura en el interior de la muestra.

De manera general, los tres métodos de extracción evaluados han mostrado ser efectivos, económicos, no consumen mucho tiempo y tienen altas tasas de rendimiento (Pudziuvelyte y cols., 2018), sin embargo, la APH mejora la eficiencia de extracción en términos de rendimiento, calidad y selectividad (Alexandre y cols., 2017; Huang y cols., 2013; Prasad y cols., 2009). La APH logró extraer un mayor contenido de flavonoides, compuestos que han demostrado tener actividades antifúngicas (Seleem y cols., 2017) tema de interés en la presente investigación.

## 6.2 Segunda etapa

### 6.2.1 Ensayos *in vitro* de extractos fenólicos

#### 6.2.1.1 Pruebas *in vitro* frente a *Colletotrichum gloeosporioides*

En la Fig. 10, se presentan los porcentajes de inhibición frente a *C. gloeosporioides* al séptimo día de estudio, tratado con el extracto fenólico obtenido con microondas (900W-2 minutos). Las concentraciones: 0.5, 2 y 5 mg de extracto liofilizado / mL, presentaron inhibiciones del  $37.17 \pm 0.25\%$ ,  $36.21 \pm 0.65\%$  y  $29.26 \pm 0.15\%$  respectivamente, los porcentajes de inhibición mostrados a la concentración de 0.5 y 2 mg / mL no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

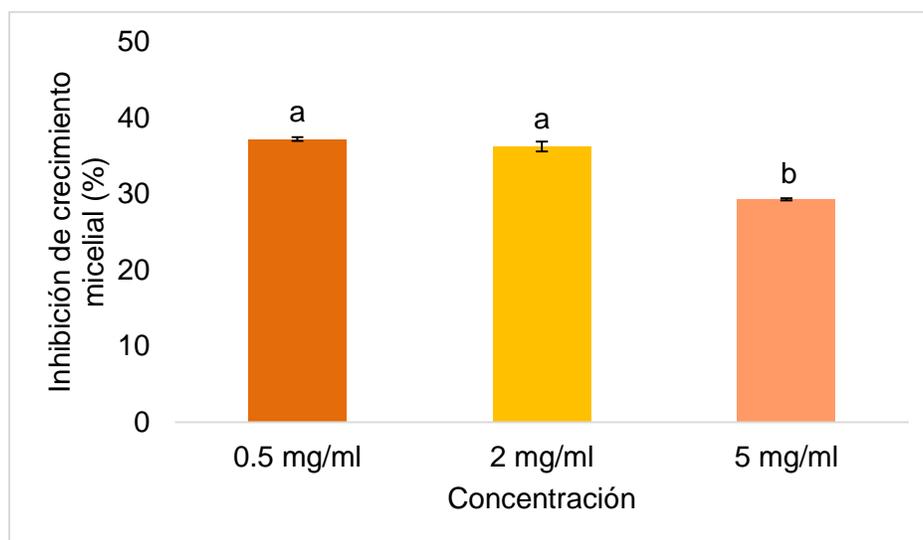


Figura 10. Inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* utilizando el extracto obtenido por EAM (900W-2min)

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

En general, los porcentajes de inhibición mostrados con el extracto fenólico obtenido por microondas (900W-2min) a las tres concentraciones, fueron menores en comparación a los mostrados por el extracto fenólico obtenido mediante APH (200MPa-15min) a las tres concentraciones, puesto que presentó los siguientes valores:  $45.32 \pm 0.48\%$ ,  $42.45 \pm 0.17\%$  y  $52.52 \pm 0.18\%$  referentes a las concentraciones establecidas, esto valores fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), siendo la concentración de 5 mg / mL, la que mostró el mayor porcentaje de inhibición (Fig. 11).

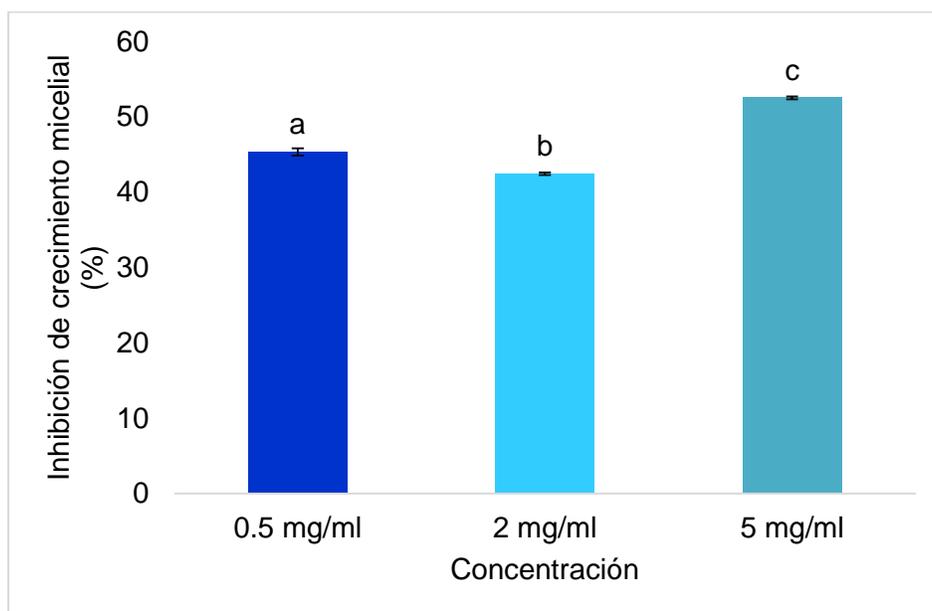


Figura 11. Inhibición de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* utilizando el extracto obtenido por APH (200MPa-15min)

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Esta tendencia fue atribuida a la mayor concentración de flavonoides obtenida mediante APH, los flavonoides han sido ampliamente asociados con una extensa cantidad de actividades biológicas, destacando la actividad antimicrobiana. Se ha reportado que las propiedades antimicrobianas inherentes de estos compuestos, están determinadas por su estructura química (Edziri y cols., 2012), puesto que en el anillo A, de la estructura de los flavonoides, las hidroxilaciones en las posiciones 5 y 7 son las más críticas para la actividad antimicrobiana de los flavonoides, de acuerdo a cálculos de química cuántica (Yang y cols., 2017).

El posible mecanismo de acción de los flavones, principalmente de balcaléina (5, 6, 7 trihidroxiflavonoide) fue mostrado por Huang y cols. (2008), quienes reportaron que fue a través de la inhibición de las bombas de flujo de salida, puesto que disminuyó la eficiencia de las mismas; lo que finalmente indujo a la muerte celular o apoptosis, estas bombas constituyen la mayor causa de resistencia por parte de los microorganismos a fungicidas de síntesis química (Serpa y cols., 2012).

En un estudio realizado por Liu y cols. (2014) también evaluaron algunas isoflavonas, puesto que se han conocido por su actividad antifúngica, tal es el caso de la glabridina, aislada de *Glycyrrhiza glabra*, la cual afectó la permeabilidad de la membrana celular, provocando daño en la pared celular. Asimismo, se reportó que el carvacrol alteró la membrana citoplasmática celular y provocó apoptosis celular en varias especies de *Candida* spp (Zuzarte y cols., 2012).

#### **6.2.1.2 Pruebas *in vitro* frente a *Penicillium italicum***

Los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial frente a *Penicillium italicum* con el extracto obtenido mediante microondas (900W-2min) a las diferentes concentraciones en el día séptimo de estudio fueron de  $34.21 \pm 0.13\%$ ,  $40.79 \pm 1.3\%$  y  $40.35 \pm 0.34\%$ , los dos últimos no mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), pero sí fueron diferentes del porcentaje de inhibición obtenido a la concentración de 0.5 mg / mL, ya que se presentó un porcentaje menor en la inhibición de este hongo (Fig. 12).

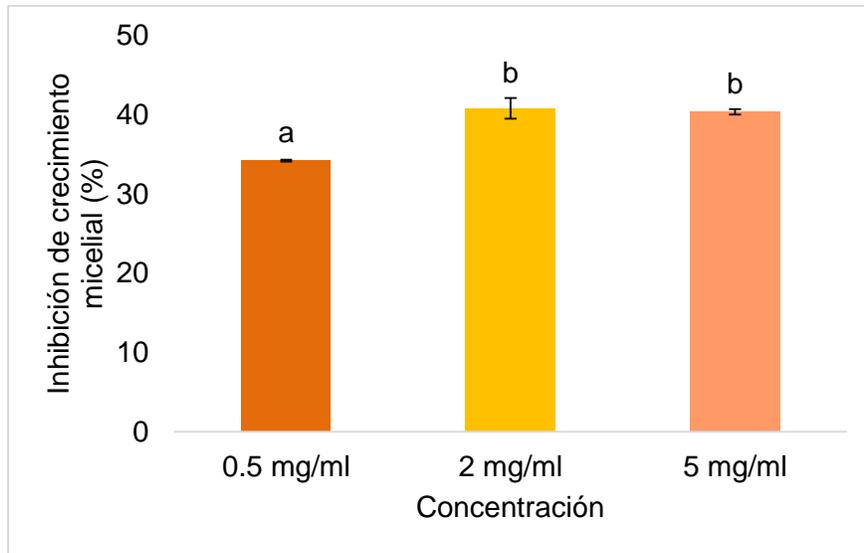


Figura 12. Inhibición de crecimiento micelial de *P. italicum* utilizando el extracto obtenido por EAM (900W-2min)

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Sin embargo, estos valores mostraron la misma tendencia como lo observado frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, ya que los porcentajes de inhibición fueron inferiores en comparación a los presentados con el extracto fenólico obtenido mediante APH (200MPa-15 min) a las diferentes concentraciones (Fig. 13), por este método se obtuvieron porcentajes de inhibición de  $38.16 \pm 0.23\%$ ,  $46.49 \pm 0.25\%$  y  $35.09 \pm 0.41\%$ , correspondientes a las concentraciones mencionadas, mostrando diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), siendo la concentración de 2 mg / mL, la que presentó mayor porcentaje de inhibición.

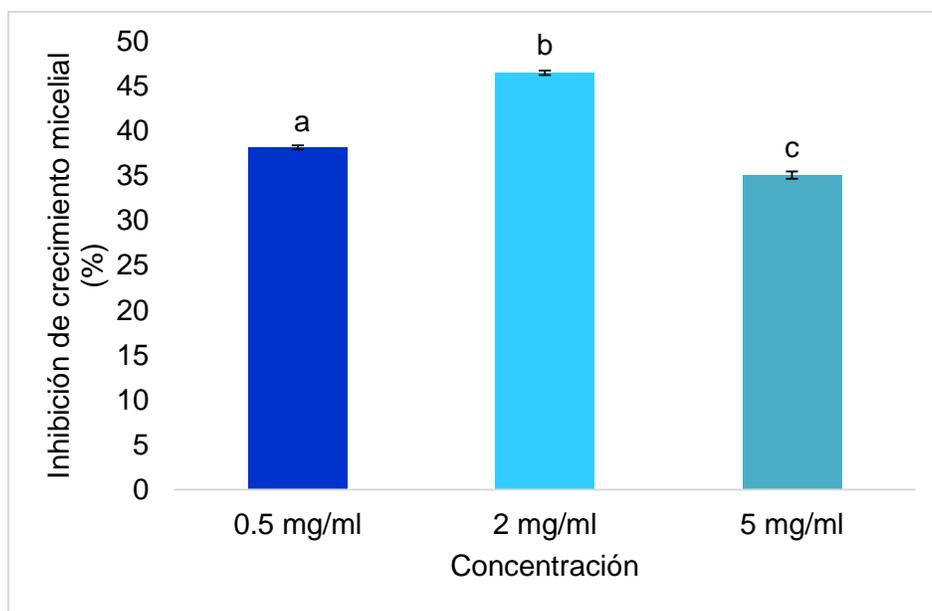


Figura 13. Inhibición de crecimiento micelial de *P. italicum* utilizando el extracto obtenido por APH (200MPa-15min)

Los valores representan la media de las tres repeticiones  $\pm$  DS, letras diferentes indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

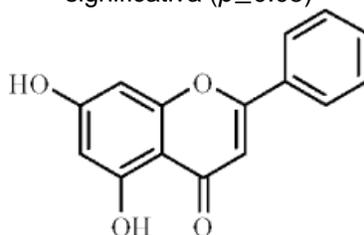


Figura 14. Estructura de 5,7 dihidroxiflavonoide

De la misma forma, se le atribuyó esta tendencia a la mayor concentración de flavonoides obtenida mediante APH y su relación con actividad antifúngica, tal como lo reportó Yang y cols. (2017) quienes explicaron la relación que existe entre la estructura de 5,7-dihidroxiflavonoides (Fig. 14) y *Penicillium italicum*; ellos mencionan que las propiedades antimicrobianas están ligadas directamente a su estructura química. Por ejemplo, se demostró que los grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 en flavones y flavonoles podían inhibir eficazmente la trihidroxinaftaleno reductasa (Brunskole y cols., 2009), enzima que últimamente ha sido objetivo para el desarrollo de fungicidas y nuevos antimicóticos, puesto que esta enzima produce melanina; la melanina protege a los hongos de pigmentación oscura del estrés ambiental, radicales libres, toxinas, radiación UV, X o gamma, temperaturas extremas y enzimas hidrolíticas. En los hongos fitopatógenos las

melaninas participan en la formación del apresorio (conidios melanizados que facilitan la adhesión a la superficie del hospedero y la penetración de la hifa en los tejidos del huésped) (Brunskole y cols., 2009).

Además, otro de los mecanismos antimicrobianos importantes de los flavonoides es la interferencia en la respiración de los microorganismos. Algunos flavonoides como la quercetina y sus concentraciones altas de glucósidos y dihidromicetina pueden disminuir la tasa de respiración de la mitocondria y la síntesis de ATP en células fúngicas, lo que lleva a la muerte celular (Trumbeckaite y cols., 2006). Yang y cols. (2018) demostraron que la mayoría de los 5,7-dihydroxiflavonoides tienen efecto inhibitorio en la respiración de *Penicillium italicum*, pudiendo ser uno de los mecanismos más importantes de estos compuestos, aunque la efectividad de estos compuestos dependerá de otros factores, como el tiempo de contacto, la concentración, factores ambientales, así como la composición de la pared celular del hongo.

### **6.3 Tercera etapa**

#### **6.3.1 Fraccionamiento del extracto fenólico total de hoja de jaca**

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se procedió a realizar un fraccionamiento del extracto total con solventes de diferente polaridad, el tipo de solvente seleccionado para realizar la extracción depende de lo que se pretende hacer con el extracto. En este caso, la razón principal para usar solventes de diferente polaridad fue para determinar si alguno de ellos podría extraer selectivamente compuestos antifúngicos, ya que se pensaba que al realizar la extracción con Et:Ag, se estarían extrayendo diferentes compuestos compatibles con solventes polares con polaridad desde 4.3 hasta 10.2, causando un sinergismo con compuestos que no tienen actividad impidiendo que los compuestos antifúngicos logran su función frente a los hongos estudiados, es por ello que se decidió investigar la posibilidad de incrementar la actividad antifúngica de estos compuestos mediante extracciones “selectivas” (Eloff y cols., 2017). Este tipo de extracciones consisten en hacer una serie de extracciones con diferentes solventes,

con el fin de eliminar compuestos que no tienen bioactividad, hasta que se obtiene un extracto con una concentración mínima inhibitoria (MIC) muy baja. En un estudio realizado por Zishiri (2004) quien mediante una extracción selectiva logró obtener un extracto de hojas de *Combretum woodii* con alta actividad antioxidante y antibacteriana. En la Fig. 15, se muestran las 6 fracciones obtenidas, el tubo a) contiene el extracto obtenido con agua (P' 5.2), mostró tonalidades rojas a naranjas, el tubo b) contiene el extracto obtenido con hexano (P' 0.1) mostró tonalidades verde olivo, el tubo c) contiene el extracto obtenido con etanol (P' 4.3) el cual mostró tonalidades verdes y cafés, el tubo d) contiene el extracto obtenido con acetato de etilo (P' 4.4) mostró un color verde oscuro y textura pastosa, el tubo e) contiene el extracto obtenido con acetona (P' 5.1) presentó un color verde intenso y textura viscosa finalmente el tubo f) contiene el extracto obtenido con metanol (P' 5.1) el cual mostró una coloración verde olivo.

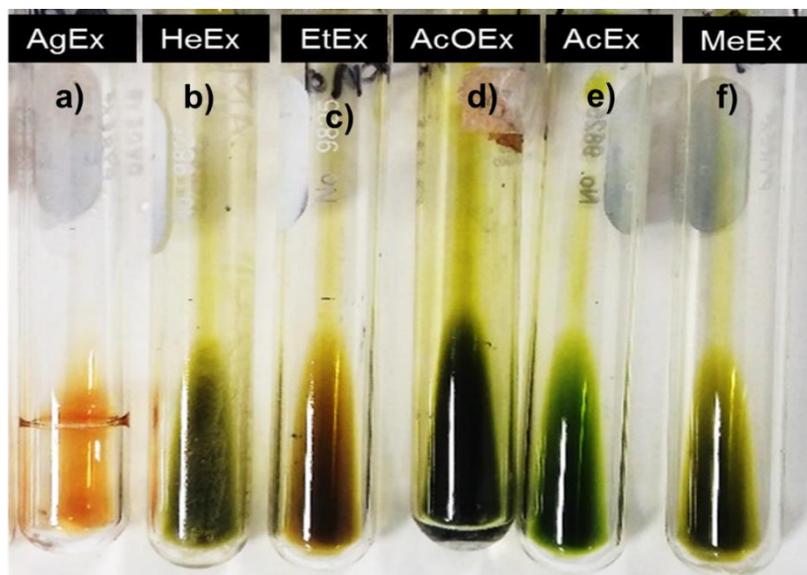


Figura 15. Fracciones obtenidas a partir del extracto total de hoja de jaca

#### 6.3.1.1 Análisis cualitativo

Una vez obtenidas las fracciones se procedió a caracterizarlas cualitativa y cuantitativamente, cabe resaltar que este tipo de análisis es una prueba presuntiva y necesaria para tener una idea general de los posibles compuestos que pudieran estar ejerciendo alguna actividad de interés. La mayoría de las fracciones presentaron uno o varios de estos metabolitos a excepción del AcOEx, quién al

parecer no mostró presencia de estos compuestos (Cuadro 8), esto podría atribuirse a que cuando se realizó la extracción con este solvente, se precipitan los compuestos fenólicos (Ballesteros y cols., 2017), quedándose gran parte de éstos en la torta o retenido que se generó al hacer la extracción, el cual generalmente es desechado, quedando en el sobrenadante una pequeña cantidad de compuestos fenólicos que no son susceptibles de reaccionar con los reactivos utilizados en el análisis. En contraste el AgEx, mostró abundancia en la mayoría de estos fitoquímicos, esto indicó que el extracto acuoso de la hoja de jaca, contiene altas concentraciones de compuestos polares como azúcares, aminoácidos y glucósidos (Eloff y cols., 2017).

Cuadro 8. Análisis fitoquímico de las fracciones

Fitoquímicos	Fracciones					
	HeEx	EtEx	AcOEx	AcEx	MeEx	AgEx
Flavonoides	+	++	-	+	++	+++
Saponinas	-	++	-	-	++	+++
Esteroides	-	+	-	-	+	+++
Terpenoides	-	+	-	-	+	+++
Taninos	+	+	-	-	-	+++
Fenoles	+	+	-	-	-	+++
Antraquinonas	-	+	-	-	+++	+

(+++) abundancia (++) presencia (+) poca presencia (-) ausencia

### 6.3.1.2 Análisis cuantitativo

Posterior a la caracterización cualitativa de las fracciones, se realizó el análisis cuantitativo, en la Fig. 16, se observa el contenido de FST, FT y TT, el EtEx mostró el mayor contenido de FST y TT ( $36 \pm 1.75$  y  $43.79 \pm 2.07$  mg EAG / g extracto respectivamente), el extracto obtenido con metanol con una concentración de  $29 \pm 4.03$  y  $39.09 \pm 3.61$  mg EAG / g extracto y el extracto obtenido con agua,

presentando una concentración de  $22 \pm 3.93$  y  $31.33 \pm 2.45$  mg EAG / g extracto. Por el contrario, el extracto que mostró el menor contenido de los compuestos estudiados fue el HeEx, ya que sólo mostró  $8 \pm 1.85$ ,  $1.05 \pm 0.67$  y  $5.68 \pm 1.24$  mg / g, correspondientes a FST, FT y TT. Sin embargo, el solvente que fue superior en la extracción de FT, fue la acetona, mostrando un contenido de  $37.88 \pm 1.32$  mg ER / g extracto, esto puede deberse a la polaridad de la acetona ( $P' 5.1$ ) y su capacidad por arrastrar este tipo de compuestos, tal como se observó por Kotzé y cols. (2002), quienes extrajeron compuestos antibacterianos de *Combretum microphyllum*, y demostraron que los compuestos antibacterianos de esta especie son de polaridad intermedia, entre los que destacan los terpenoides y fenoles.

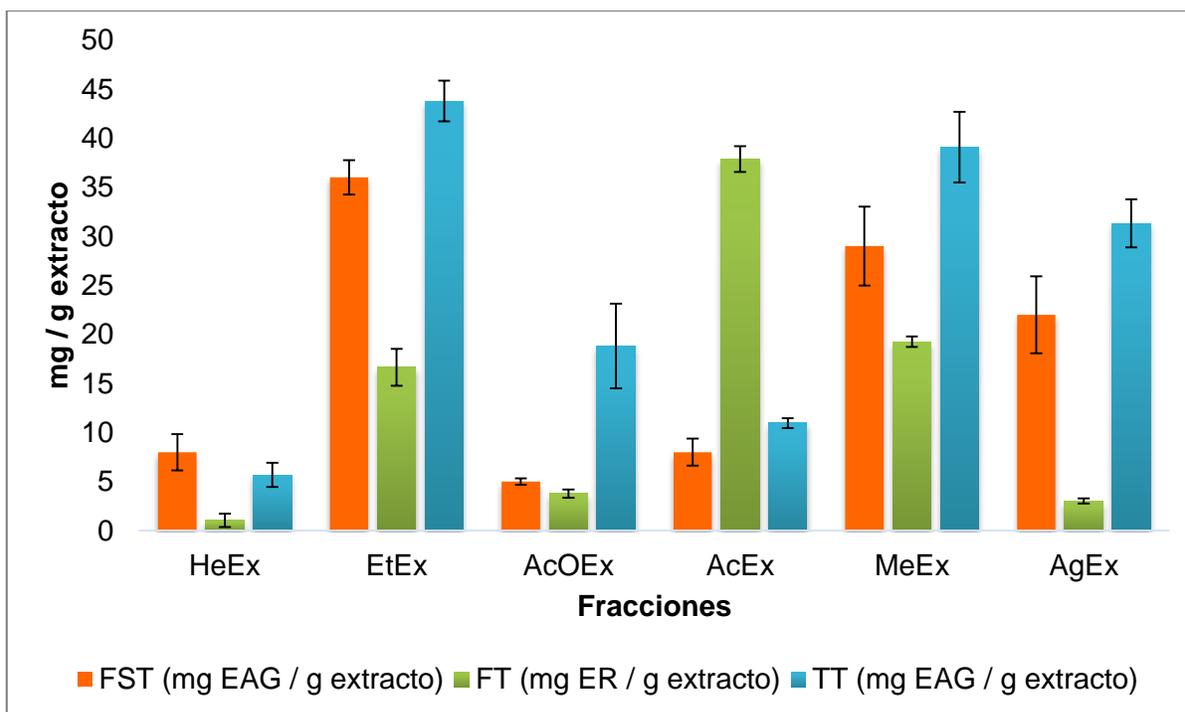


Figura 16. Cuantificación de FST, FT y TT en los extractos de diferente polaridad

### 6.3.2 Ensayo *in vitro* de fracciones obtenidas

#### 6.3.2.1 Inhibición de crecimiento micelial

Una vez caracterizadas las fracciones se realizó la prueba *in vitro* de inhibición de crecimiento micelial de los dos hongos antes mencionados, la Fig. 17 muestra los porcentajes de inhibición de cada una de las fracciones en comparación con los

extractos obtenidos con la solución Et:Ag inicialmente planteada, los extractos que mostraron mayores porcentajes de inhibición fueron el EtEx, presentando un  $83.78 \pm 1.25\%$ , el AcEx ( $69.01 \pm 1.24\%$ ) y el MeEx ( $58.16 \pm 0.31\%$ ) frente a *C. gloeosporioides* a una concentración de 2 mg / mL (Fig. 18), estos valores fueron superiores a los mostrados por los extractos obtenidos con Et:Ag mediante EAM, APH y EAU, en cambio los extractos que mostraron menores porcentajes de inhibición fueron, el AcOEx a una concentración de 0.5 mg / mL mostrando un porcentaje de inhibición del  $2.07 \pm 1.24$ , el AgEx ya que solo mostró un porcentaje de inhibición del  $5.58 \pm 0.72 \%$  y finalmente el HeEx presentando el  $6.40 \pm 0.62 \%$  de inhibición, ambos a una concentración de 2 mg / mL.

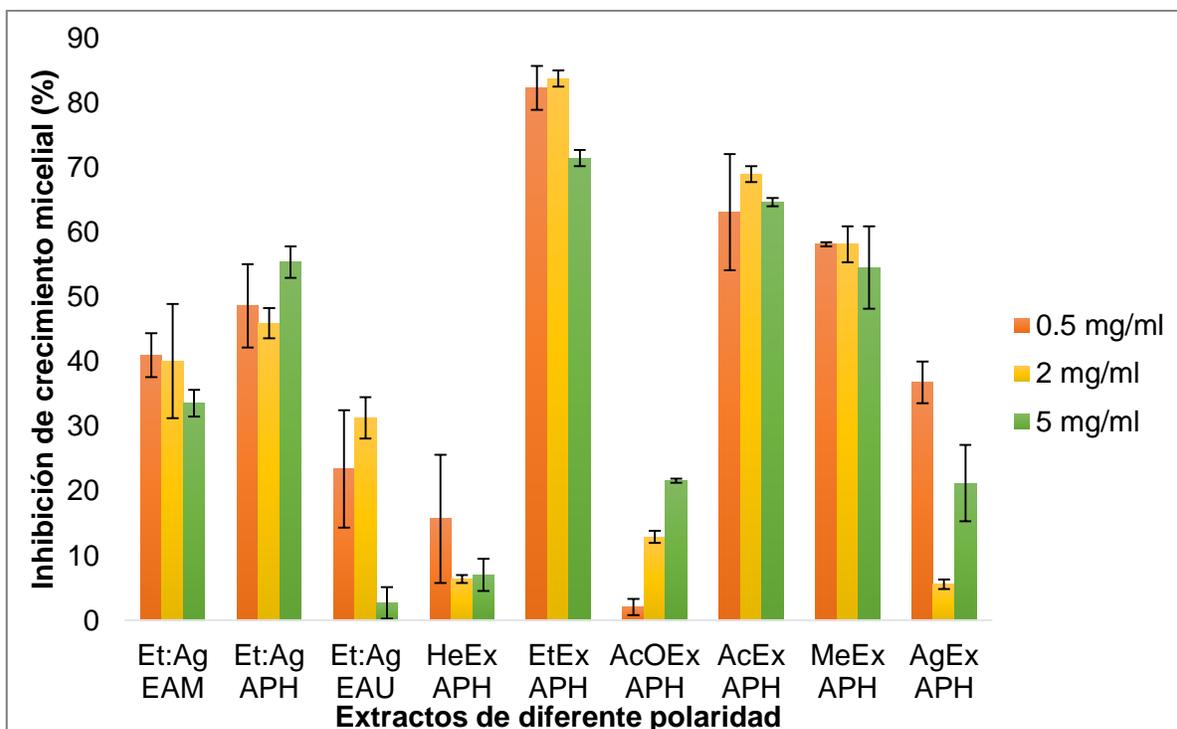


Figura 17. Evaluación *in vitro* de cada fracción frente a *C. gloeosporioides*

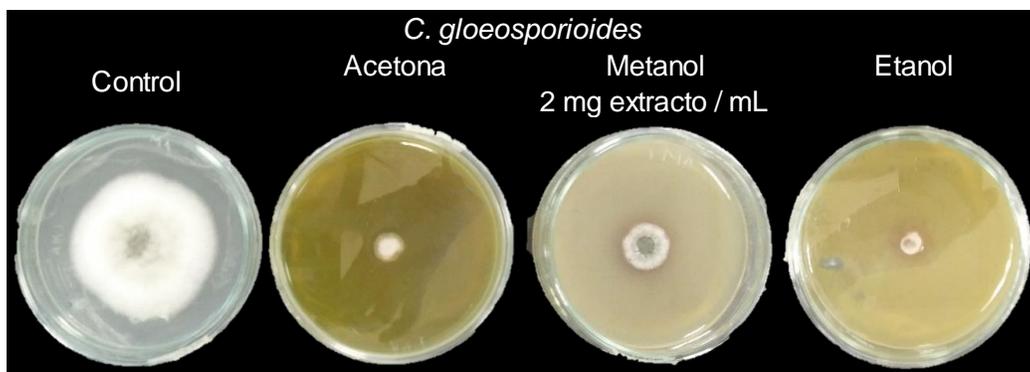


Figura 18. Inhibición de 3 fracciones frente a *C. gloeosporioides*

La mayor inhibición utilizando el EtEx puede atribuirse a que este extracto presentó la mayor concentración de Taninos Totales ( $43.79 \pm 2.07$  mg EAG / g extracto) (Fig. 16). Los taninos reducen la descomposición de  $H_2O_2$ , el exceso de este compuesto es perjudicial para muchos patógenos, puesto que se convierte en especies de oxígeno altamente reactivas (EOR), promoviendo daño oxidativo en los patógenos. En este contexto, los taninos son capaces de bloquear la actividad de la catalasa producida por algunos patógenos, promoviendo acumulación de EOR dentro de los patógenos.

Asimismo, Carvalho y cols. (2018) estudiaron otro posible mecanismo de acción, ya que demostraron la unión de los taninos al ergosterol, éste es un componente principal de la membrana celular de los hongos, el cual contribuye al mantenimiento de la fluidez de la membrana y establece interacciones con algunas proteínas, regulando la actividad de la misma. De modo que, al unirse a la membrana celular forma poros en la misma, llevando a la ruptura y finalmente causando la pérdida de contenido intracelular.

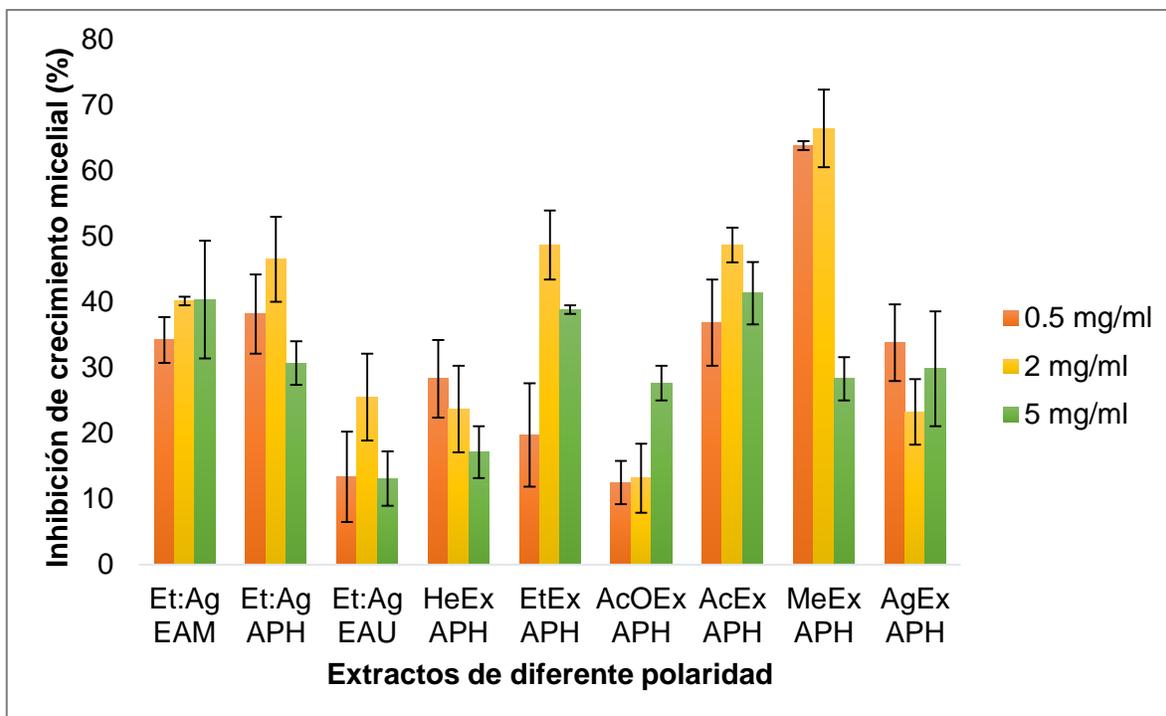


Figura 19. Evaluación *in vitro* de cada fracción frente a *P. italicum*

Con relación a la inhibición de crecimiento micelial de *P. italicum* (Fig. 19), los extractos que mostraron mayor actividad antifúngica fueron, el MeEx mostrando el  $66.45 \pm 5.92\%$  de inhibición, el EtEx ( $48.68 \pm 5.26\%$ ) y el AcExt ( $48.68 \pm 2.63\%$ ) a una concentración de 2 mg / mL. En estos estudios de inhibición también se encontró un incremento en la actividad del extracto total, respecto a los extractos de Et:Ag gracias a la extracción selectiva. Aunque también se observaron porcentajes de inhibición inferiores a los obtenidos con la solución Et:Ag, como lo fueron los extractos AcOEx ( $12.50 \pm 3.29\%$ ) y HeEx ( $17.11 \pm 3.95\%$ ) a una concentración de 0.5 mg / mL y 5 mg /mL, asimismo sería recomendable diseñar un segundo procedimiento respecto a la extracción selectiva ya que se pudiera realizar hasta una tercera extracción con la finalidad de aislar más compuestos de interés e incrementar su actividad antifúngica como en el ejemplo que se muestra en la Fig. 20.

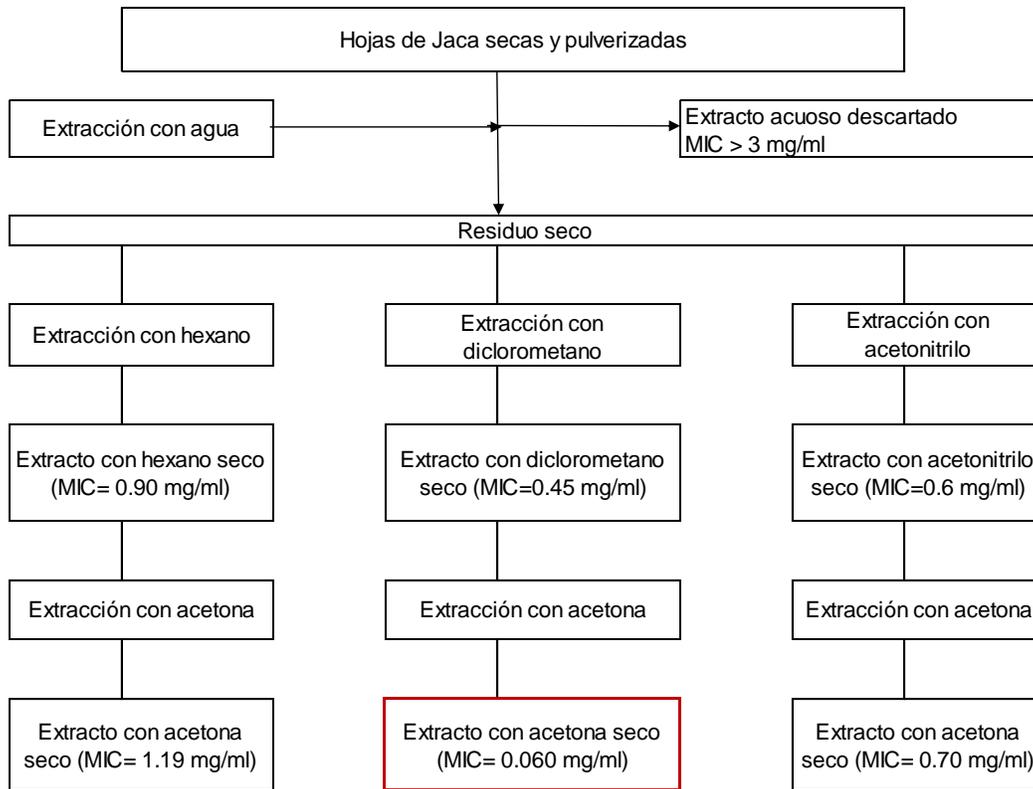


Figura 20. Ejemplo de extracción selectiva

En cuanto a las diferentes concentraciones, la mayoría de los extractos mostraron mayores porcentajes de inhibición a la concentración de 0.5 y 2 mg / mL, es probable que este comportamiento se deba a que a una concentración de 5 mg / mL ocurra una sobresaturación ya que la solución ha pasado el límite de soluto que el solvente puede admitir, es decir, del total del volumen de PDA o PDB, sólo el 5% correspondía al extracto diluido en su respectivo solvente, esto se realizó con el fin de que el solvente no interviniera en los resultados obtenidos y que el volumen agregado no modificara sensiblemente la composición en nutrientes del caldo o agar.

En general, los porcentajes de inhibición altos que mostraron los extractos, pudieron deberse a la presencia de compuestos de polaridad intermedia, ya que resultados similares fueron reportados por Eloff y cols. (2017), quienes mencionan que los extractos con polaridad intermedia tenían mucho más actividad antifúngica que los muy polares o los completamente apolares, frente a todos los hongos estudiados, entre ellos *Penicillium expansum*, *Penicillium janthinellum*, *Colletotrichum*

*gloeosporioides* y *Rhizoctonia solani* a excepción de *Fusarium oxysporum*, esta afirmación confirma los porcentajes de inhibición presentados por el HeEx y el AgEx, ya que el Hexano tiene un índice polaridad de 0.1 y el agua un índice de polaridad de 10.2. También cabe resaltar que dentro de los compuestos de polaridad intermedia destaca el ácido clorogénico, el cual se encontró en el extracto obtenido con etanol, este ácido se ha relacionado con la resistencia a *Gloeosporium perennans* en manzanas jóvenes, también el compuesto 3,4-dihidroxibenzaldehído ha demostrado tener actividad fungistática frente a *Fusarium oxysporum* en plátano verde (Barkai-Golan, 2001).

### **6.3.2.2 Inhibición de germinación de esporas**

Con respecto a la inhibición de germinación de esporas, el AcEx y MeEx mostraron un  $100 \pm 0.00\%$  en la inhibición de esporas de *C. gloeosporioides* a las 3 concentraciones, mientras que el extracto obtenido con Et:Ag mediante APH ( $98.83 \pm 0.76$ ,  $100 \pm 0.00$  y un  $100 \pm 0.00\%$ ), el HeEx ( $100 \pm 0.00$ ,  $98.33 \pm 0.58$  y un  $100 \pm 0.00\%$ ) y el AcOEx ( $100 \pm 0.00$ ,  $99.67 \pm 0.58$  y un  $100.00\%$ ) mostraron un pequeño decremento de estos porcentajes, dichos porcentajes corresponden a las concentraciones evaluadas  $0.5 \text{ mg / mL}$ ,  $2 \text{ mg / mL}$  y  $5 \text{ mg / mL}$  (Cuadro 9). Estos resultados se obtuvieron a las 8 h de estudio, dado que transcurrido este tiempo, el control mostró un 100% de esporas germinadas como se muestra en la Figura 21. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hernández-Albíter y cols. (2007), quienes informaron actividad antifúngica al evaluar el extracto crudo de chirimoya (*Annona cherimola*) utilizando desde 50 hasta 300 ppm frente a *C. gloeosporioides*. Otra posible teoría sobre la inhibición de esporas es la presencia de un dieno y de un monoeno en los extractos, el dieno inhibió la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate verde (Prusky y cols., 1991).



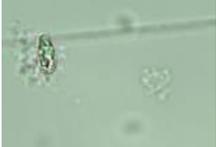
Figura 21. Esporas germinadas de *C. gloeosporioides* (Control)

Cabe mencionar que posterior a las 24 h de la inoculación de este fitopatógeno en los tubos que contenían PDB, en gran parte de los extractos estudiados se desarrolló *C. gloeosporioides* (Fig. 22) tal como se observó en el análisis de inhibición de crecimiento micelial, resultados análogos se mostraron por Bautista-Baños y cols. (2002), quienes también evaluaron la actividad antiesporulante puesto que después del tiempo de estudio, *C. gloeosporioides* creció sobre extractos de *Annona reticulata*, es probable que durante la incubación, compuestos presentes en los extractos disminuyan y esto permita el crecimiento del micelio, como se observó por Prusky y cols. (1991), quienes reportaron que la concentración de dieno disminuyó diez veces permitiendo la continuación del crecimiento del micelio y el desarrollo de la enfermedad en frutos estudiados.



Figura 22. Espora de *C. gloeosporioides* en presencia del MeEx a las 24 h de estudio.

Cuadro 9. Efecto de los extractos totales y de las fracciones en la inhibición de germinación de esporas de *C. gloeosporioides*

Extracto	% Inhibición <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>					
		0.5 mg / ml		2 mg / ml		5 mg / ml
Et:Ag EAM	81 ± 3.51		72 ± 3.21		64 ± 1.00	
Et:Ag APH	98.83 ± 0.76		100 ± 0.00		100 ± 0.00	
Et:Ag EAU	90 ± 2.65		89 ± 3.51		70 ± 5.00	
HeEx APH	100 ± 0.00		98.33 ± 0.58		100 ± 0.00	
EtEx APH	100 ± 0.00		100 ± 0.00		99 ± 1.15	
AcOEx APH	100 ± 0.00		99.67 ± 0.58		100 ± 0.00	
AcEx APH	100 ± 0.00		100 ± 0.00		100 ± 0.00	
MeEx APH	100 ± 0.00		100 ± 0.00		100 ± 0.00	
AgEx APH	69 ± 4.58		60 ± 1.00		66 ± 2.08	

Por otra parte, el extracto que mostró un  $100 \pm 0.00\%$  de inhibición de la germinación de esporas de *P. italicum* a las 3 concentraciones, fue el AcOEx, mientras que los demás extractos (Et:Ag/EAM, Et:Ag/APH, Et:Ag/EAU, HeEx, EtEx) mostraron porcentajes de inhibición arriba del 90% como se muestra en el Cuadro 10, mientras que el MeEx presentó porcentajes de inhibición del  $89 \pm 10.69$ ,  $99 \pm 1.00$  y  $99 \pm 1.26\%$ . AgEx mostró un  $78 \pm 5.57\%$ ,  $80 \pm 13.58\%$  y  $77 \pm 9.07$  correspondientes a las diferentes concentraciones evaluadas frente al control a las 8 h de estudio (Fig. 23).



Figura 23. Esporas germinadas de *P. italicum* (Control)

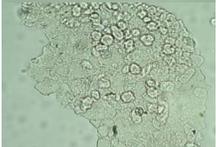
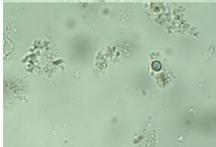
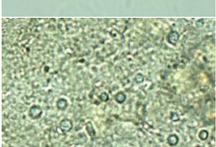
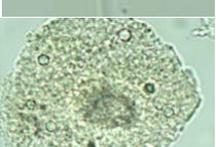
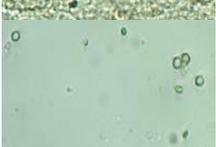
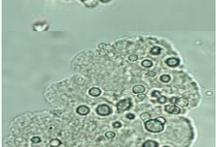
Se observó el mismo comportamiento después de las 24 h de inoculación del hongo a excepción del EtEx, HeEx, AcEt y Et:Ag/APH tal como se observa en la Fig. 24, no obstante, cabe mencionar que la longitud del tubo germinal mostró una menor elongación en comparación a las esporas germinadas de *C. gloeosporioides*.



Figura 24. Espora de *P. italicum* en presencia del AcEx a las 24 h de estudio.

Es posible que este comportamiento también se deba a diversos factores que intervienen en la germinación de esporas como son la temperatura, agua disponible y humedad relativa; debido a que son esenciales para la germinación de las mismas (Barkai-Golan, 2001).

Cuadro 10. Efecto de los extractos totales y de las fracciones en la inhibición de germinación de esporas de *P. italicum*

Extracto	% Inhibición <i>Penicillium italicum</i>					
	0.5 mg / ml (%)		2 mg / ml (%)		5 mg / ml (%)	
Et:Ag EAM	99 ± 1.15		98 ± 2.02		89 ± 1.04	
Et:Ag APH	100 ± 0.00		99.5 ± 0.87		99.83 ± 0.29	
Et:Ag EAU	98 ± 0.87		94 ± 5.11		96 ± 1.61	
HeEx APH	100 ± 0.00		100 ± 0.00		99.83 ± 0.29	
EtEx APH	99.83 ± 0.29		99.67 ± 0.58		98 ± 2.08	
AcOEx APH	100 ± 0.00		100 ± 0.00		100 ± 0.00	
AcEx APH	99.83 ± 0.29		99 ± 1.61		100 ± 0.00	
MeEx APH	89 ± 10.69		99 ± 1.00		99 ± 1.26	
AgEx APH	78 ± 5.57		80 ± 13.58		77 ± 9.07	

### 6.3.3 Identificación de compuestos en el extracto fenólico total y en las fracciones por HPLC-DAD-ESI-M

El Cuadro 11, muestra una posible identificación de los compuestos que se encuentran presentes en cada fracción obtenida a partir del extracto crudo, asimismo se muestra la identificación de los extractos obtenidos mediante una solución Et:Ag mediante EAM, APH y EAU. En general, se identificaron un total de 21 posibles compuestos, la composición fenólica en las diferentes fracciones varió, los extractos que contenían una variedad más amplia de compuestos fenólicos fueron el extracto obtenido mediante Et:Ag/EAM, HeEx y EtEx, dentro de estos compuestos cabe destacar la presencia de Kaempferol 3-O-rutinoside, ácido cítrico, ácido quínico, ácido clorogénico, apigenina 8-C-xilosido-6-C-glucósido (Vicenin 3) y catequina, algunos de estos se reportaron por Elhawary y cols. (2018), quienes analizaron por HPLC-ESI-MS/MS 13 variedades de *Ficus* spp. (Moraceae) y su correlación con actividades inhibitorias antimicrobianas. En efecto, se pudieron diferenciar los compuestos presentes en cada uno de los extractos, principalmente en el EtEx, se pudo observar la presencia de ácido clorogénico y catequina, a diferencia de los demás extractos, que no mostraron presencia de éstos, por lo que es posible que el alto porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con el EtEx sea debido a estos compuestos.

Conviene subrayar que el método de extracción influye ampliamente en el perfil fenólico de los extractos (Xia y cols., 2010).

Asimismo en otro estudio realizado por Mendoza y cols. (2013), donde utilizaron 2 métodos de extracción para obtener extractos de subproductos de uva y un posterior fraccionamiento con hexano, cloroformo y acetato de etilo, se reportó también la presencia de quercentina, kaempferol y catequina, por mencionar algunos, de manera que las fracciones con polaridad intermedia de los extractos obtenidos con metanol o etanol mediante agitación constante durante 4 h presentaron las actividades antifúngicas más altas, resultados semejantes se obtuvieron en el presente estudio.

Cuadro 11. Identificación tentativa de metabolitos secundarios en fracciones obtenidas de la hoja de jaca usando HPLC-DAD-ESI-MS; indicando presencia (+) o ausencia (-) de estos metabolitos.

No.	UV máx. (nm)	m/z experimental	Fragmentos	Posible compuesto	Fórmula molecular	Distribución de compuestos las diferentes fracciones								
						Et:Ag EAM	Et:Ag APH	Et:Ag EAU	HeEx APH	EtEx APH	AcOEx APH	AcEx APH	MeEx APH	AgEx APH
1	230,260,325	593.1509	285	<sup>1</sup> Kaempferol 3-O-rutinosido	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2		741.1934		<sup>2</sup> Kaempferol 3-O-β-D-apiofuranosilo	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	226, 275	191.0204	111	<sup>3</sup> Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4	240, 285, 325	179.0352	135	<sup>3</sup> Ácido cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	227, 285	191.0556	115, 129, 101, 111	<sup>3</sup> Ácido quínico	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
6	226, 257	164.073	147	<sup>3</sup> Fenilalanina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-	-	-	+	-	-	+	-	-
7	240, 285, 325	353.0905	191	<sup>1</sup> Ácido clorogénico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	288, 330	511		<sup>4</sup> Cistanosido	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	-	-	-	+	-	+	-	-	+
9	273, 329	515.3197	353.25, 335.59, 267.66, 161.52	<sup>1</sup> Ácido 3,5-Dicaffeoilquinico	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	+	+	-	+	+	-	-	-	-
10		487		<sup>5</sup> I-isoleucina, n-pentafluoropropionil-, pentadecil éster	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11		150.217		<sup>5</sup> Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	+	-	-	-	-	-	+	-	-
12	227, 277	315.1073	123, 153	<sup>6</sup> Isómero hidroxitirosol-hexosa	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	-	-	+	-	-	+	-	-	-
13	237, 286	285.0373		<sup>6</sup> Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14	279	288.9968	289.00, 271.15, 245.20, 205.30, 179.27	<sup>1</sup> Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	-

15	271, 354	622.8761	447.04, 387.18, 315.16, 271.27, 178.52	<sup>1</sup> Isoramnetin 3-O- rutinósido	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	271, 330	563.1572	473.2, 443.17, 353.28	<sup>1</sup> Apigenina 8-C- xilósido-6-C- glucósido (Vicenin 3)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17	287	271.2468	271.25, 253.37, 232.70, 225.43	<sup>1</sup> Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
18		305.0643		<sup>5</sup> Epigallocatequina	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19		605.2459		<sup>2</sup> Penstebiosido	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>15</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	290, 330	639		<sup>4</sup> β-OH-acteosido	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21		355.104	193	<sup>2</sup> Ácido ferúlico 4-O- glucósido	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	+	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Elhawary y cols. (2018)

<sup>2</sup>Gómez-Caravaca y cols. (2011)

<sup>3</sup>López-Cobo y cols. (2014)

<sup>4</sup>Timóteo y cols. (2015)

<sup>5</sup>NIST (National Institute of Standards and Technology)

<sup>6</sup>Talhaoui y cols. (2014)

## **CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

La Alta Presión Hidrostática fue el mejor método de extracción al evaluar la actividad antifúngica de los extractos.

La extracción selectiva permitió obtener extractos con mayor actividad antifúngica.

Se observó que las fracciones de polaridad intermedia de la hoja de jaca, presentaron las actividades antifúngicas más altas, la fracción que mostró el porcentaje de inhibición más alto frente a *C. gloeosporioides* fue el extracto obtenido con etanol con una inhibición del  $83.78 \pm 1.25\%$ , mientras que para *P. italicum* fue la fracción obtenida con metanol, mostrando un  $66.45 \pm 5.92\%$ .

Asimismo, mediante la identificación por HPLC-DAD-ESI-MS, se encontró la presencia de compuestos fenólicos como: ácido cítrico, ácido cafeico, catequina y ácido clorogénico, estos compuestos pudieran estar ejerciendo actividad antifúngica frente a *C. gloeosporioides* y *P. italicum*.

La hoja de jaca se puede considerar como fuente viable para la extracción de compuestos con actividad antifúngica frente a los hongos estudiados.

## **CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA**

## CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

Alara, O.R., Abdurahmana, N.H., Ukaegbub, C.I. y Azharic, N.H. (2018). Vernonia cinerea leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. *Industrial Crops & Products*, 122, 533-544. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.034>.

Alexandre, E.M.C., Araújo, P., Duarte, M.F., Freitas, V., Pintado, M. y Saraiva, J.A. (2017). High-pressure assisted extraction of bioactive compounds from industrial fermented fig by-product. *Journal of food science and technology*, 54, 2519–2531. doi: 10.1007/s13197-017-2697-2.

Al-Juhaimi, F., Adiamo, O.Q., Ghafoor, K. y Babiker, E.E. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *CyTA - Journal of Food*, 6337, 1–6. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1110202>.

Angulo-Escalante, M., Armenta-Reyes, E., García-Estrada, R., Carrillo-Fasio, J. y Salazar-Villa, E. (2009). Extractos de semilla de *Swietenia humilis* Zucc., con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2):84-90.

Awuor, R., Muge, E.K., Mbatia, B., Mwanza, B. y Ogoyi D.O. (2017). Comparative Analysis of Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of Methanolic Extract of Leaves, Roots and Bark de Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) from Selected Regions in Kenya and Uganda. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 16(1): 1-13. Recuperado de <http://www.sciencedomain.org/abstract/21941>.

Azuola, R. y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología En Marcha*, 20(4), 1. <https://doi.org/ISSN: 0379-3962>.

Badui, S. (2013). *Química de Alimentos* (5ta edición). México: Pearson.

Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A. y Mussatto, S.I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623-631.

Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables* (1ra edición). United States of América: Elsevier Science Ltd. 418 págs.

Bautista-Baños, S., Hernández M.L., Díaz J.C y Cano C.F. (2002). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of ciruela fruit (*Spondias purpurea* L) during storage. *Postharvest Biology Technology*, 20, 99-106.

Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O. y Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>.

Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. y Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229–3235. doi:10.1002/rcm.2720.

Brunskole, M., Zorko, K., Kerbler, V., Martens, S., Stojan, J., Gobec, S. y Rižner, T. (2009). Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata*—A target for flavonoid action?. *Chemico-Biological Interactions*, 178 (1-3), 259-267. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.023.

Carvalho, R.S., Carollo, C.A., de Magalhães, J.C., Palumbo, J.M. C., Boaretto, A.G., Nunes e Sá, I.C., Ferraz, A.C., Lima, W.G., Siqueira, J.M. y Ferreira, J.M.S. (2018). Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. *South African Journal of Botany*, 114, 181–187. doi:10.1016/j.sajb.2017.11.010.

Corrales, M., García, A.F., Butz, P. y Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003.

Crane, J.H. y Balerdi, C.F. (2000). LA JACA (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) EN FLORIDA. Departamento de Ciencias Hortícolas, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

Chalé, F.H., Ancona, D.B. y Campos, M. R.S. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 10–20. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>.

Chandrasekara, A. y Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (11), 6706-6714.

Chen, L., Cheng, C., y Liang, J. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin – Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>.

Chen, R., Meng, F., Zhang, S. y Liu, Z. (2009). Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng. *Separation and Purification Technology*, 66, 340-346.

Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H. y Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* 166, 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>.

Deo, S., Janghel, A., Raut, P., Bhosle, D., Verma, C., Kumar, S.S., Agrawal, M., Amit, N., Sharma, M., Giri, T., Tripath, D.K., y Ajazuddin-Alexander, A. (2015). Emerging microwave assisted extraction (MAE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Technology*, 8, 655–666. DOI.10.5958/0974-360X.2015.00104.3.

Duan, W., Jin, S., Zhao, G. y Sun, P. (2015). Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability. *Food Science and Technology*, 35(3), 524–530. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6731>.

Edeoga, H.O., Okwu, D.E. y Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 685–688. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3127>.

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, M. A., Mighri, Z., Mahjoub, A. y Verschaeve, L. (2012). Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Two Flavonoids from *Retama raetam* Flowers. *Molecules*, 17(6), 7284–7293. doi:10.3390/molecules17067284.

Elhawary, S.S., Younis, I.Y., El Bishbishy, M.H. y Khattab, A.R. (2018). LC – MS / MS-based chemometric analysis of phytochemical diversity in 13 *Ficus* spp . (Moraceae): Correlation to their in vitro antimicrobial and in silico quorum sensing inhibitory activities. *Industrial Crops & Products*, 126, 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.017>.

Eloff, J.N., Angeh, I.E. y McGaw, L.J. (2017). Solvent-solvent fractionation can increase the antifungal activity of a *Melianthus comosus* (Melianthaceae) acetone leaf extract to yield a potentially useful commercial antifungal product. *Industrial Crops & Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.014>.

Francini, A., Romeo, S., Cifelli, M., Gori, D., Domenici, V., Sebastiani, L. (2017). 1H NMR and PCA-based analysis revealed variety dependent changes in phenolic contents of apple fruit after drying. *Food Chemistry*, 221, 1206-1213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.038>.

Francisco, A. y Rodríguez, Y. (2010). Caracterización Residuos Solidos Domiciliarios en Santo Domingo Oeste Provincia de Santo Domingo. *Ciencia y Sociedad*, 35, 556–587. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87020011003>.

García, E., Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universitat Politècnica de Valencia*, 1, 2–8.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. y Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994. <https://doi.org/doi:10.1021/jf9001439>.

Ghafoor, K., Hui, T. y Choi, Y. H. (2011). Optimization of ultrasonicassisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 735–746. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00413.x>.

Ghafoor, K. y Choi, Y. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society of Applied Biological Chemistry*, 52(3), 295–300. <https://doi.org/doi:10.3839/jksabc.2009.052>.

Goldense, D. (2016). *La yaca o jaca: un cultivo exótico de demanda creciente*. México. Recuperado de <http://www.hortalizas.com/author/goldense/>.

Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. y Caboni, M.F. (2011). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoaWilld*) by a Liquid Chromatography–Diode Array Detection–Electrospray Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry Methodology.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10815–10825. doi:10.1021/jf202224j.

González-Estrada, R.R., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J.A., Peyron, S. y Chalier, P. (2018). Antimicrobial soy protein isolate-based films: physical characterisation, active agent retention and antifungal properties against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 921-929. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13664>.

González-Estrada, R.R., Ascencio-Valle, F. de J., Ragazzo-Sánchez, J.A. y Calderón-Santoyo, M. (2017). Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29 (2), 114-122. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1273>.

Goula, A.M., Ververi, M., Adamopoulou, A. y Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.07.022>.

Guo, X., Han, D., Xi, H., Rao, L., Liao, X., y Hu, X. y cols. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: a comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88, 441–448.

Hakim, A. (2010). Diversity of secondary metabolites from Genus *Artocarpus* (Moraceae). *Nusantara Bioscience*, 2(3), 146–156. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n020307>.

Hakim, E.H., Achmad, S.A., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Syah, Y.M., Aimi, N., Kitajima, M. y Ghisalberti, E.L. (2006). Prenylated flavonoids and related compounds of the Indonesian *Artocarpus* (Moraceae). *Journal of Natural Medicine*, 60, 161–184. DOI 10.1007/s11418-006-0048-0.

Hernández-Albíter, R.C., Barrera-Necha L.L., Bautista-Baños S. y Bravo-Luna L. (2007). Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporoides*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 180-185.

Hiranvarachat, B. y Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17–26.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024>.

Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B. y Wang, C.Y. (2013). Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science and Technology*, 33(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.001>.

Huang, S., Cao, Y. Y., Dai, B. D., Sun, X. R., Zhu, Z. Y., Cao, Y. B., Wang, Y. Gao, P. H. y Jiang, Y. Y. (2008). *In Vitro* Synergism of Fluconazole and Baicalein against Clinical Isolates of *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2234–2236. doi:10.1248/bpb.31.2234.

Isaza J.H., Veloza L.A., Guevara C.A., Ávila Y.P. y Díaz O. (2005). Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia melastomataceae. *Actualidades Biológicas*, 27, 75-79.

Jaiswal, B.S. (2012). Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.03.031>.

Khan, M. R., Omoloso, A. D. y Kihara, M. (2003). Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllum*, *Fitoterapia*, 74(3), 501–505. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00120-5).

Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R. y Adachi, S. (2013). Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(5), 810–815. doi:10.1002/cjce.21898.

Kotzé, M., Eloff, J.N. y Houghton, P.J. (2002). Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany*, 68(1), 62–67. doi:10.1016/s0254-6299 (16)30456-2.

Liu, W., Li, L. P., Zhang, J. D., Li, Q., Shen, H., Chen, S. M. y Jiang (2014). Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. *PLOS ONE*, 9(7), 103-442. [http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103442](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103442).

Liyana-Pathirana, C. y Shahidi F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93 (1), 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>.

Loizzo, M.R., Tundis, R., Chandrika, U.G., Abeysekera, A.M., Menichini, F. y Frega,

N.G. (2010). Antioxidant and antibacterial activities on foodborne pathogens of artocarpus heterophyllus lam. (Moraceae) leaves extracts. *Journal of Food Science*, 75(5), 291–295. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01614.x>.

López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Lorenzo C., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.04.009>.

Maksimović, Z., Maleñčić, D. y Kovčević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.006>.

Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., y Cotoras, M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, (43), 360–364. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.048.

Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M. y Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383–1391. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.018>.

Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 3-20. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9).

Multari, S., Marsol-Vall, A., Keskitalo, M., Yang B. y Suomela, J.P. (2018). Effects of different drying temperatures on the content of phenolic compounds and carotenoids in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa*) from Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.008>.

Munir, M.T., Kheirkhan, H., Baroutian, S., Quek, S.Y. y Young, B. R. (2018). Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Waste Onion Skin. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.166>.

Muñiz-Márquez, D.B., Martínez-Ávila, G.C., Wong-Paz, J.E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, C.N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1149–1154. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.008>.

NIST (National Institute of Standards and Technology). U.S. Department of Commerce. Libro del Web de Química del NIST, SRD 69 Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.

Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna, E., Landeros, J. L., Hernández, S. y Delgado, J. C. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de fusarium spp. *Phyton*, 81(1), 69–73.

Ojeda, L.A. (2015). *Inventario y caracterización agronómica de especies y variedades frutícolas introducidas en la provincia de Loja*. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.

Ojwang R.A., Muge E.K., Mbatia B., Mwanza B. y Ogoyi D.O. (2017). Comparative Analysis of Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of Methanolic Extracts of Leaves, Roots and Bark of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) from Selected Regions in Kenya and Uganda. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 16(1), 1-13.

Pérez, G. (2012). *Extracción de compuestos activos de plantas para su aplicación en recubrimientos comestibles para controlar prodredumbre gris en la fresa*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pinela, J., Prieto, M. A., Barros, L., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P. P., Saraiva, J. A. y Ferreira, I. C. F. R. (2018). Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. *Separation and Purification Technology*, 192, 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.10.007>.

Prasad, K. N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M. y Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 155-159.

Prusky, D., Kobilier, I., Fishman, Y., Sims, J. J., Midland, S. L. y Keen, N. T. (1991). Identification of an Antifungal Compound in Unripe Avocado Fruits and its Possible Involvement in the Quiescent Infections of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology*, 132(4), 319–327. doi:10.1111/j.1439-0434.1991.tb00127.x.

Pudziulyte L., Jakštis V., Ivanauskas L., Laukevičienė A., David C. F., Kursvietiene L. y Bernatoniene J. (2018). Different extraction methods for phenolic

and volatile compounds recovery from *Elsholtzia ciliata* fresh and dried herbal materials. *Industrial Crops and Products*, 120, 286-294. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.069>.

Quintero-Mora. L., Londoño, A., Hernández, F., Manzano, P., López, R., Soto, C. I., Carillo L., Penieres G., García C. y Cruz, T. A. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), 22–26. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70006-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70006-8).

Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Durán C., Grimaldo-Juarez O. y Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>.

Ruíz, G. (2012). *EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN FRUTO DE MANGO (Mangifera indica L.) Y JACA (Artocarpus heterophyllus L.)*. Instituto Tecnológico de Tepic.

Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-de la Cruz, G., Ramírez de León J.A. y Navarro-Ocaña A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, 267–272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>.

Saha, R. K., Jamiruddin, M. y Acharya, S. (2015). COMPARATIVE ANALYSIS OF LECTINS ISOLATED FROM SEED AND TESTA OF *Artocarpus heterophyllus* Lam. *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 65–75. Recuperado de [www.ijrcrcps.com](http://www.ijrcrcps.com).

Saini, R. K. y Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 16(2), 16–17.

Schofield P., Mbugua D.M. y Pell A.N. (2001). *Analysis of condensed tannins: a review*. *Food Feed Science and Technology*, 91(1-2), 21-40.

[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0).

Seleem, D., Pardi, V. y Murata, R. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 76, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030>.

Serpa, R., Franca, E.J., Furlaneto-Maia, L., Andrade, C.G., Diniz, A. y Furlaneto, M.C. (2012). *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 61(12), 1704–1708. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.047852-0>.

Sharma, R., Agrawal, M. y Marshall, F. (2009). Heavy metal in vegetables collected from production and market sites of tropical urban area of India. *Food Chemical Toxicology*, 47, 583–591.

Shin, J. S., Ahn, S. C., Choi, S. W., Lee, D. U., Kim, B. Y. y Baik, M. Y. (2010). Ultra high pressure extraction (UHPE) of ginsenosides from Korean Panax ginseng Powder. *Food Science and Biotechnology*, 19, 743–748.

SIAP. (13 de Junio de 2017). Jackfruit, jaca, yaca... ¿la conoces? [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/articulos/jackfruit-jaca-yaca-la-conoces?idiom=es>.

Siddiqui, M. W. y Bansal, V. (2017). *Plant Secondary Metabolites Their Roles in Stress Ecophysiology* (3ra edición). United States of América: Apple Academic Press Inc.

Slinkard, K. y Singleton, V. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viniculture*, 28, 45–55.

Strati, I.F., Gogou, E. y Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food Bioproducts Processing*, 94, 668-674. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.012>.

Strati, I. F. y Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products-a review. *Food Research International*, 65, 311–321. [doi:10.1016/j.foodres.2014.09.032](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032).

Suazo, Y., Davidov-Pardo G. y Arozarena, I. (2014). Effect of fermentation and roasting on the phenolic concentration and antioxidant activity of cocoa from Nicaragua. *Journal of Food Quality*, 37 (1), 50-56. <https://doi.org/10.1111/jfq.12070>.

Swami, S. B., Thakor, N. J., Haldankar, P. M. y Kalse, S. B. (2012). Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 565–576. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00210.x.

Tambe, V. y Bhambar, R. (2014). Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in Hibiscus tiliaceus Linn. wood extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4), 42-45. Recuperado de: <http://www.rroij.com/open-access/estimation-of-total-phenol-tannin-alkaloid-and-flavonoid-in-hibiscus-tiliaceus-linn-wood-extracts-41-47.pdf>.

Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Determination of phenolic compounds of “Sikitita” olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents “Arbequina” and “Picual” olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 28–34. doi:10.1016/j.lwt.2014.03.014.

Taveira, M., Silva, L. R., Vale-Silva, L. A., Pinto, E., Valentao, P., Ferreres, F., Guedes de Pinho P. y Andrade, P. B. (2010). *Lycopersicon esculentum* seeds: An industrial byproduct as an antimicrobial agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9529–9536. <http://dx.doi.org/10.1021/jf102215g>.

Timóteo, P., Karioti, A., Leitão, S.G., Vincieri, F.F. y Bilia, A.R. (2015). A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry*, 175, 366–373. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.129.

Tondi G., Thévenon M.F., Mies B., Standfest G., Petutschnigg A. y Wieland S. (2013). Impregnation of Scots pine and beech with tannin solutions; effect of viscosity and wood anatomy in wood infiltration. *Wood Science and Technology*, 47, 615-626.

Trespalacios, P. (2007). *GELIFICACIÓN DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS POR ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA: ACTIVIDAD SINÉRGICA DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA*. Universidad Autónoma de Barcelona.

Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene D, Jakstas, V., Savickas, A. y Toleikis, A. (2006). The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60 (5), 245-248. doi:10.1016/j.biopha.2006.04.003.

Wang, L. (2014). Energy efficiency technologies for sustainable food processing. *Energy Efficiency*, 7, 791–810. Wang, L. (2014). Energy efficiency technologies for sustainable food processing. *Energy Efficiency*, 7(5), 791–810. Doi: 10.1007/s12053-014-9256-8.

Wang, L. y Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>.

Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J. y Li, H.-B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–646. doi:10.3390/ijms11020622.

Xi, J., Shen, D., Li, Y. y Zhang, R. (2011). Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control*, 22, 1473-1476.

Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y. y Zhang, R. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 139–143.

Yang, S., Zhou, J., Li, De., Shang, C., Peng, L. y Pan, S. (2017). The structure-antifungal activity relationship of 5, 7-dihydroxyflavonoids against *Penicillium italicum*. *Food Chemistry*, 224, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.001>.

Yao, H., Tian, S. y Wang, Y. (2004). Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*, 93(3), 297–304.

Zishiri, V.K. (2004). POTENTISING AND APPLICATION OF A COMBRETUM WOODII LEAF EXTRACT WITH HIGH ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. Universidd de Pretoria, Sudáfrica.

Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J., Pinto, E. y Salgueiro, L. (2012). Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1359–1366. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1450-4>.