



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE EXTRACTOS DE
JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' Y SU
EFECTO FUNGISTÁTICO EN EL CONTROL DE *Rhizopus stolonifer***

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIA EN HORTICULTURA

Presenta:

CAROLINA MARÍA FLORES TREJO

Bajo la supervisión de:

Dra. María Teresa Martínez Damián



APROBADA



Chapingo, Estado de México, Junio 2021

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE EXTRACTOS DE
JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' Y SU EFECTO
FUNGISTÁTICO EN EL CONTROL DE *Rhizopus stolonifer***

Tesis realizada por Carolina María Flores Trejo, bajo la dirección del comité asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 
Dra. María Teresa Martínez Damián


ASESOR: _____
Dra. María del Rosario García Mateos


ASESOR: _____
Dr. Salvador Valle Guadarrama


LECTOR EXTERNO: _____
Dr. Óscar Cruz Álvarez

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	4
INDICE DE FIGURAS	5
AGRADECIMIENTOS	6
DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....	7
DEDICATORIA.....	8
RESUMEN GENERAL	9
GENERAL ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1 FLOR DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	13
2.2. MORFOLOGÍA DE <i>RHIZOPUS STOLONIFER</i>	17
2.3 LITERATURA GENERAL.....	19
3. IDENTIFICACION DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS CÁLCICES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) var. 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA'	23
3.1 RESUMEN	23
3.2 ABSTRACT	24
3.3 INTRODUCCIÓN.....	24
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.6 CONCLUSIONES.....	40
3.7 LITERATURA CITADA	40
4. EXTRACTOS DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' EN LA INHIBICIÓN DE <i>Rhizopus stolonifer</i>	45
4.1 RESÚMEN	45
4.2 ABSTRACT	45
4.3 INTRODUCCIÓN.....	46
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.6 CONCLUSIONES.....	59
4.7 LITERATURA CITADA	59

INDICE DE CUADROS

1. IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS CÁLCES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) var. 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA'

Cuadro 1. Contenido de polifenoles en cálces secos de dos variedades de jamaica

Hibiscus sabdariffa L..... 32

Cuadro 2. Ácidos fenólicos identificados en las fracciones libres, glucosiladas y esterificadas de los extractos etanólicos de cálces de dos variedades de jamaica ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)..... 37

Cuadro 3. Ácidos fenólicos presentes en las variedades 'Alma blanca' y 'Sudan' en sus fracciones libres, glucosilados y esterificados. 38

2. EXTRACTOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' EN LA INHIBICIÓN DE *Rhizopus stolonifer*

Cuadro 1. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*..... 52

Cuadro 2. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*..... 53

Cuadro 3. Análisis factorial de extractos de jamaica en el porcentaje de inhibición de *Rhizopus stolonifer* 55

Cuadro 4. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*..... 56

Cuadro 5. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*..... 57

Cuadro 6. Concentración CIM₅₀ para inhibir el crecimiento a 72 h y 144 h de incubación..... 58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de ácidos fenólicos fraccionados libres, glucosilados y esterificados en extractos de dos variedades de jamaica.....	34
Figura 2. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos libres del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B).....	36
Figura 3. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos glucosilados del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B).....	36
Figura 4. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos esterificados del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B).....	36

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Dra. María Teresa Martínez Damián, Dra. María del Rosario García Mateos, Dr. Salvador Valle Guadarrama y al Dr. Óscar Cruz Álvarez por compartirme sus conocimientos y experiencia en investigación para poder llevar a cabo este proyecto.

A los investigadores que aportaron sus conocimientos en materia de laboratorio, Dra. Yolanda Salinas Moreno, Dra. Diana Guerra Ramírez, M.C. Gustavo Mena Narvaez y M.C. Román Sánchez Carrillo.

A la laboratorista Itzel Nayeli Silvestre González por su apoyo en los análisis de laboratorio.

A los compañeros que compartieron momentos agradables y de gran amistad.

A Gamaliel López López por su apoyo, amor y paciencia en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), por otorgarme el apoyo económico para la conclusión de mi doctorado.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Carolina María Flores Trejo

Fecha de nacimiento: 16 de febrero de 1990

Lugar de nacimiento: Pachuca, Hidalgo

CURP: FOTC900216MHGLRR01

Profesión: Maestra en Ciencias en Horticultura

Cédula profesional: 10512930

Desarrollo académico

Licenciatura en Biología en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Mestría en Ciencia en Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo

DEDICATORIA

Para mis padres Hermila, Gustavo y a mi hermano Marcos, por ser mi más grande apoyo en todo momento, por impulsarme a ser mejor cada día, por ayudarme a superar cualquier obstaculo y simplemente por ser lo mejor de mi vida.

Para mi abuelo Policarpio quien fue mi más grande inspiración y ejemplo de vida, por sus consejos, por sus enseñanzas y por haber estado en cada uno de mis logros.

Con todo mi amor y admiración a ustedes mi familia maravillosa.

RESUMEN GENERAL

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE EXTRACTOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' Y SU EFECTO FUNGISTÁTICO EN EL CONTROL DE *Rhizopus stolonifer*

La flor *Hibiscus sabdariffa* L. posee agentes antimicrobianos pero se desconoce la actividad fungistática en *Rhizopus stolonifer*, hongo que afecta poscosecha. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad inhibitoria de extractos etanólicos de dos variedades de jamaica 'Sudán' y 'Alma blanca' para inhibir el desarrollo de *R. stolonifer in vitro*, así como cuantificar el contenido de los compuestos fenólicos totales mediante diferentes técnicas colorimétricas. Se realizó el aislamiento del hongo y la identificación de la cepa en un diseño con arreglo factorial, con dos concentraciones de esporas (1×10^8 y 1×10^6 esporas $\cdot$ mL⁻¹), dos variedades de jamaica, cinco dosis del extracto etanólico (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 %), tres repeticiones por cada extracto. Se observó que ambas variedades lograron inhibir entre 43.83 y 60.42 % a las 96 horas de desarrollo del hongo, por lo que podrían usarse como fungistáticos potenciales en el control de *Rhizopus stolonifer*. Se determinaron los contenidos de los compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas, se identificaron los principales ácidos fenólicos mediante HPLC-DAD mediante sus tiempos de retención con estándares comerciales y los espectros en UV. Se identificaron 11 ácidos fenólicos en los cromatogramas. La jamaica de color blanco 'Alma blanca' presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides.

Palabras clave: poscosecha, esporas, hongo, concentración mínima inhibitoria, ácidos orgánicos, fenoles, flavonoides, proantocianidinas, extractos etanólicos.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Carolina María Flores Trejo

Director de tesis: Dra. María Teresa Martínez Damián

GENERAL ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) EXTRACTS 'SUDAN' AND 'ALMA BLANCA' AND THEIR FUNGISTATIC EFFECT IN CONTROL OF *Rhizopus stolonifer*

Hibiscus sabdariffa L. flower possesses antimicrobial agents, but its fungistatic activity on *Rhizopus stolonifer*, a fungus that affects postharvest is unknown. The objective of study was to evaluate the inhibitory activity of ethanolic extracts of two varieties of hibiscus 'Sudan' and 'Alma blanca' to inhibit the development of *R. stolonifer* in vitro, as well as to quantify the content of total phenolic compounds by different colorimetric techniques. Isolation of the fungus and strain identification were carried out in a factorial design with two spore concentrations (1×10^8 and 1×10^6 spores- mL⁻¹), two varieties of hibiscus, five doses of ethanolic extract (4.5, 5.0, 5.5, 5.5, 6.0 and 6.5 %), three replicates for each extract. It was observed that both varieties were able to inhibit between 43.83 and 60.42 % at 96 hours of fungal development, so they could be used as potential fungistatics in the control of *Rhizopus stolonifer*. The contents of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and proanthocyanidins were determined, and the main phenolic acids were identified by HPLC-DAD using their retention times with commercial standards and UV spectra. Eleven phenolic acids were identified in the chromatograms. The white hibiscus 'Alma blanca' had the highest content of total phenolic compounds and flavonoids.

Key words: postharvest, spores, fungus, minimum inhibitory concentration, organic acids, phenols, flavonoids, proanthocyanidins, ethanolic extracts.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La jamaica es originaria de África, en países como América la planta es cultivada ampliamente en las zonas tropicales del Caribe y Centroamérica, como un cultivo doméstico (Mahadevan & Kamboj, 2009). A nivel internacional se distinguen seis variedades: sudán, china, roja, negra gigante, morada gigante y la no ácida (Meza-Chavarría, 2012).

México tiene una producción de aproximadamente 7,889 t de jamaica, siendo el estado de Guerrero el principal productor (SIAP, 2019) las principales variedades que se encuentran registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Nacionales de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural son 'Alma blanca' JAM-001-260210, 'Rosalíz' JAM-003-260210, 'Cotzaltzin' JAM-002-260210, 'Tecoanapa' JAM-004-260210 y 'Quinba R-TC' JAM-006-231117 (Ariza-Flores *et al.*, 2014).

Las variedades de jamaica tienen diferencias morfológicas y químicas, las cuales se ven afectadas por factores como genética, ambiente, cosecha y ecología. Una de las variedades que ha sido poco estudiada por su falta de pigmento es 'Alma blanca' por lo que presenta baja demanda comercial (Morales-Cabrera, 2013). Los principales compuestos químicos en los cálices de jamaica son los ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides (Da-Costa *et al* 2014).

El ácido clorogénico se encuentra en mayor concentración en los extractos de jamaica según señala Li (2014), quien reporta el efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. La forma de extracción de los diferentes compuestos químicos depende del disolvente utilizado como, etanol, metanol, acetona, en diferentes mezclas con agua, además de otros factores como la temperatura, tiempo de extracción, relación masa-solvente, entre otros (Amyrgialaki *et al.* 2014, Capriotti *et al.* 2014). Existen estudios del uso de extractos etanólicos de jamaica para inhibir el crecimiento de bacterias como lo reporta Garbi (2016), quien encontró actividad antimicrobiana

contra *Escherichia coli* O157:H7; sin embargo, se desconoce si estos extractos poseen capacidad fungistática, para inhibir el desarrollo de *Rhizopus stolonifer*, uno de los hongos fitopatógenos en poscosecha de mayor importancia económica con pérdidas de aproximadamente 24% en poscosecha (Bautista-Baños *et al.* 2008, 2014). Entre los fungicidas que se aplican para el control de este hongo se encuentran el Iprodione (Rovral), que reduce hasta 59 % la pudrición por *Rhizopus*. Sin embargo, en algunos países su uso está prohibido por daños a la salud. El Dicloran es otro fungicida usado para el control de este hongo, no obstante, se desconoce el estado de toxicidad si se llega a consumir (Bautista-Baños *et al.* 2014).

Actualmente, las personas buscan consumir productos saludables y libres de químicos que puedan perjudicar su salud, por lo que muchos de los desinfectantes que se utilizan en los frutos y hortalizas para su consumo en fresco se han ido sustituyendo por otras técnicas, como la elaboración de productos naturales que inhiban el crecimiento de hongos y aumenten la vida de anaquel de frutos. Una alternativa para disminuir el uso de fungicidas químicos son los fungicidas orgánicos, por lo cual los extractos de jamaica podrían ser utilizados para disminuir el desarrollo de *R. stolonifer* durante poscosecha.

En la presente investigación se planteó la hipótesis de que los cálices de jamaica blanca 'Alma blanca' presentaron concentraciones de compuestos fenólicos similares e incluso mayores que la jamaica roja 'Sudán', además el extracto de jamaica presenta capacidad fungistática en el control de *Rhizopus stolonifer*. Por lo cual, los objetivos fueron evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos etanólicos de dos variedades de jamaica, 'Sudán' y 'Alma blanca' para reducir el desarrollo de *Rhizopus stolonifer in vitro*, así como analizar los compuestos fenólicos de los extractos etanólicos de jamaica (roja y blanca) mediante diferentes técnicas colorimétricas para diferenciar fitoquímicamente ambas variedades.

CAPITULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

2.1.1. Origen, distribución y morfología

Hibiscus sabdariffa es originaria de África, Sureste de Asia y América Central. Se cultiva en Sudán, Egipto, Nigeria, México, Arabia Saudita, Taiwán, India Occidental y América Central. Se conoce comúnmente como roselle en las regiones de habla inglesa, Bissap en Senegal, Jamaica en México y España, Congo en Francia, Wonjo en Gambia, Zobo en Nigeria, Karkade en Egipto, Arabia Saudita y Sudán (Borrás-Linares *et al.*, 2015). En México, en los Estados de Guerrero y Oaxaca se cultiva 91% de la superficie cosechada y se obtiene 85 % de la producción nacional (SIAP, 2012).

Pertenece a la familia Malvaceae, es una planta anual herbácea que crece entre 2 y 2,5 m alto. Las hojas son profundamente lobuladas entre 3-5 cm de ancho y 8-15 cm de largo, dispuestas alternativamente en los tallos rojos lisos y cilíndricos. Las flores, de 3 a 4 cm de largo, está formada por 4 o 5 pétalos de color rojo o blanco, el cáliz es carnoso y sabor ácido (Ilodibia *et al.*, 2019)

2.1.2. Variedades

Existen variedades mexicanas de cálices de color rojo como 'Cotzaltzin' y Tecoanapa' y de color rosa como 'Rosalíz', las cuales se han estudiado debido a su alto contenido de antocianinas, también se encuentra la variedad de cálices blancos 'Alma blanca' la cual tiene pocos estudios en cuanto a su contenido de compuestos químicos y sus posibles usos antimicrobianos. 'Alma Blanca' es una mutación natural de la variedad criolla regional, tiene tallos y hojas de color verde, con cálices de color amarillo claro. 'Rosalíz' se distingue por su color moteado de cáliz 45% de color crema y 55% de color rosado. 'Cotzaltzin' tiene tallos de color rojo claro, con hojas verdes de borde aserrado de color carmín o rojizo y la nervadura central es moteada rojiza, la planta y cálices son de color rojo oscuro.

'Tecoanapa' tiene tallo rojo oscuro, la planta a madurez fisiológica es de forma cónica y su cáliz es de color rojo oscuro (Ariza-Flores *et al.*, 2014).

2.1.3. Usos

Las hojas y tallos tiernos de la jamaica se comen crudos en ensalada o cocido solo, las semillas son ricas en proteínas y después de la extracción del aceite, se hierven y se comen en sopas y también se utilizan como sustituto de café en África. Los cálices secos se utilizan en todo el mundo en la producción de bebidas (té de hierbas / helado), mermeladas, jaleas, salsas, vinos, conservas y una fuente de colorante alimentario natural debido a la presencia de antocianinas. Varias partes de la planta se han utilizado en la medicina tradicional para tratar resfriados, dolores de muelas, infecciones del tracto urinario y resacas. Las bebidas también se utilizan para tratar enfermedades hepáticas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, antiespasmódico y como agente antimicrobiano (Konan *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que los extractos de los cálices de jamaica tienen propiedades antimicrobianas sobre diferentes microorganismos patógenos y de descomposición de alimentos (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

2.1.4. Valor nutricional

La composición nutricional de la jamaica en fresco, está condicionada por la variedad, condiciones genéticas, ambientales, ecología y condiciones de siembra. Algunos estudios reportan que contiene proteína (1.9 g/ 100 g), grasa (0.1 g 100 g⁻¹), carbohidratos (12.3 g 100 g⁻¹) y fibra (2.3 g 100 g⁻¹). Es rica en vitamina C (14 g 100 g⁻¹), calcio (1.72 g 100 g⁻¹) y hierro (57 g 100 g⁻¹) (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014; Riaz & Chopra, 2018).

2.1.5. Compuestos bioactivos

Los principales constituyentes de la flor de jamaica en un contexto de importancia terapéutica son los polisacáridos, ácidos orgánicos y flavonoides, principalmente antocianinas. Se sabe que los extractos de cálices secos contienen componentes

químicos como ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hibisco, ácido oxálico, ácido tartárico) además, fitoesteroles, polifenoles, antocianinas y otros antioxidante. Los ácidos orgánicos, junto con los componentes bioactivos, tienen actividad captadora de radicales libres. El efecto beneficioso para la salud se atribuye principalmente a estas moléculas bioactivas (Peredo *et al.*, 2020; Mohamed-Salem *et al.*, 2019).

Morales-Cabrera *et al.* (2013), evaluaron el efecto de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de siete variedades de jamaica contra *Salmonella typhimurium* y *S. choleraesuis*; el resultado fue que los extractos etanólicos tuvieron mayor efecto de inhibición en comparación con los extractos metanólicos y acuosos, además de que la variedad 'Alma blanca' fue la que presentó mayor efecto inhibitorio para el control de las dos especies de bacterias en comparación con las otras variedades de jamaica.

2.1.6. Ácidos orgánicos

Los extractos de *H. sabdariffa* contienen altos porcentajes de ácidos orgánicos, a menudo se incluyen en la dieta humana y se han estudiado ampliamente debido a sus propiedades bioactivas como antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas (Carocho & Ferreira, 2013). Cada uno de estos ácidos fenólicos tiene una función específica que le otorga propiedades de defensa o medicinales a la planta. Por ejemplo, el ácido protocatequico posee propiedades antimicrobianas (Jalali *et al.* 2020). El ácido clorogénico (CGA) es un compuesto fenólico de la familia del ácido hidroxicinámico. La estructura química del compuesto consta de un fragmento de ácido cafeico y un fragmento de ácido quínico; por lo tanto, también se conoce como ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) (Santana-Gálvez, 2017). El CGA tiene varios efectos antimicrobianos, se encuentra comúnmente en materiales de plantas como manzanas, café, frijoles y frutas de kiwi. Tiene actividades antiflogísticas, antioxidantes, antimutagénicas y otras actividades biológicas (Wang *et al.*, 2009). Por otro lado, el CGA no es sensible a las bacterias probióticas, de este modo es apropiado para su uso en la industria de los alimentos; también tienen un efecto antifúngico contra *Candida*

albicans al tener un impacto en la membrana celular de los hongos (Naveed 2018). El ácido caféico, es un metabolito secundario de la vía fenilpropanoide, se clasifica como un ácido hidroxicinámico que contiene grupos funcionales fenólicos y acrílicos y sus derivados incluyen amidas, ésteres, ésteres de azúcares y glucósidos. Se ha reportado su potencial antimicrobiano y/o efectos sinérgicos con antibióticos (Kepa 2018). El ácido gálico posee propiedades antineoplásicas, bacteriostáticas, antimelanogénicas y antioxidantes, Lu *et al.* (2010) mencionan que funciona para el tratamiento de tumores cerebrales. El ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico) es un ácido hidroxibenzoico (Muthukumaran *et al.* 2013), presenta propiedades útiles en el sector biomédico como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético y de protección del corazón, hígado y cerebro (Kiran *et al.* 2014).

El ácido para-hidroxibenzoico (PHBA), es un ácido monohidroxibenzoico, un derivado fenólico del ácido benzoico; es un sólido cristalino blanco que es ligeramente soluble en agua y cloroformo pero más soluble en disolventes orgánicos polares como alcoholes y acetona, se sabe que se utiliza como base para la preparación de ésteres, conocidos como parabenos (Raveena *et al.* 2017). El ácido p-cumarico es un ácido hiroxicinámico (Boz *et al.* 2015; Pei *et al.* 2016). Es un antioxidante relativamente potente y un eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres (Kilic *et al.* 2013). También muestra actividad antimicrobiana al alterar las membranas celulares bacterianas (Lou *et al.* 2012).

2.1.7. Cultivo de la flor de jamaica

Las condiciones generales óptimas de cultivo reportadas son en temperaturas entre 25 y 38 °C, suelos franco-arenosos, pH 4.0-5.8 y fertilización 80-40-00 kg ha⁻¹, la variedad a elegir dependerá del interés y el mercado que se tengan disponibles, una semilla en buen estado es aquella que presenta un color café, de forma arriñonada con un 85 % de germinación, los sépalos alcanzan su madurez de corte después que la flor se ha desprendido. (Meza, 2012).

2.1.8. Extractos

El uso de etanol en las extracciones de compuestos naturales de plantas, permite recuperar una mayor concentración de compuestos químicos con actividad biológica, que las extracciones realizadas con agua (De León-Zapata *et al.*, 2016). En un estudio se evaluaron extractos acuosos y etanolicos, y se observó que los extractos etanólicos presentaron un mayor contenido de equivalentes de ácido gálico en comparación con los extractos acuosos (Yang, 2012).

Ramaiah & Garampalli (2015), probaron concentraciones de 600,000 mg / L (60%) de extractos acuosos de *Solanum indicum*, *Azadirachta indica* y *Oxalis latifolia* para inhibir *Fusarium oxysporum* en 78.3, 75 y 70.3%, respectivamente. En un estudio realizado por Reyes-Luengas *et al.* (2015), se observó que la variedad Sudán tuvo un mayor contenido de ácidos fenólicos totales, glucosilados y esterificados, en cuanto al contenido de ácidos fenólicos libres la variedad Sudán y Alma blanca tuvieron el mismo contenido. Y en cuanto a los fenoles extratables totales, antocianinas y proantocianidinas la mayor cantidad la presentó la variedad Sudán.

2.2. MORFOLOGÍA DE RHIZOPUS STOLONIFER

2.2.1. *Rhizopus stolonifer*

Este hongo pertenece a la subdivisión: Zygomycotina, clase Zygomycetes, orden: Mucorales, género: *Rhizopus* y especie: *Rhizopus stolonifer*; sobrevive en los suelos, los escombros de las huertas y empacadoras por largos periodos a temperaturas medianamente elevadas, en precosecha la infección por este patógeno ocurre por picaduras de insectos o por alguna herida.

Una vez que las esporas entran en contacto con el tejido vegetal, empiezan a germinar, produciendo un micelio que al mismo tiempo produce enzimas degradadoras como pectinasas y amilasas, enseguida se producen esporangióforos delgados y erectos que se encuentran unidos al sustrato por un rizoide, estos a su vez dan origen a esporangios hemisféricos con pared

celular delgada que contienen numerosas esporangiosporas negras (Baggio *et al.*, 2016).

A nivel mundial es una de las enfermedades más destructivas del jitomate durante el almacenamiento, causa una podredumbre blanda, acuosa y es de rápido crecimiento (Ramos-García *et al.*, 2001). A menudo suele propagarse a las frutas adyacentes, destruyendo todo en unos pocos días. La infección de los jitomates con esporas de *R. stolonifer* ocurre normalmente a través de heridas y a una temperatura medianamente alta (20 ± 2 °C), presentando síntomas después de 24 a 48 h (Petrasch *et al.*, 2019).

Se ha considerado que las hidrolasas primarias involucradas en el proceso de ablandamiento de los jitomates son la poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME); Se han asignado otras enzimas en el metabolismo de la pared celular de la fruta, como la xilanasa, la glucosidasa y la celulasa. La PG ataca hidrolíticamente el ácido poligalacturónico y la PME actúa sobre los grupos carboxilo esterificados del ácido galacturónico liberando los grupos metoxilo que son los principales responsables de disolver las laminillas medias de las paredes celulares de los jitomates infectados (Baggio *et al.*, 2016).

Algunas técnicas para reducir la infección de este hongo es mantener las áreas de trabajo desinfectadas incluyendo los materiales de trabajo, de igual forma se debe prevenir desde la cosecha con adecuadas prácticas de campo en las cuales se incluyen la eliminación de residuos de plantas donde se pueda albergar el hongo (Bartz *et al.*, 2001).

Durante poscosecha se pueden utilizar algunos fungicidas químicos para prevenir la contaminación de *R. stolonifer*. Uno de los fungicidas que reduce hasta 59% de la pudrición por *Rhizopus* es Iprodione (Rovral), sin embargo, en algunos países su uso está prohibido. El Dicloran es otro fungicida usado para el control de este hongo, sin embargo, se desconoce el estado de toxicidad si se llega a consumir. Por ello se ha incrementado el interés en métodos alternativos para el control de patógenos en los cuales se incluyen control biológico, aplicación de aceites esenciales y extractos de plantas, quitosano, y tratamientos de calor y UV-C (Bautista-Baños *et al.*, 2014).

2.3 LITERATURA GENERAL

- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., & Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216-222.
- Ariza-Flores, R., Serrano-Altamirano, V., Navarro-Galindo, S., Ovando-Cruz, M. E., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., ... & Otero-Sánchez, M. A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'Alma Blanca' y 'Rosalíz' de color claro, y 'Cotzaltzin' y 'Tecoanapa' de color rojo. *Revista fitotecnica mexicana*, 37(2), 181-185.
- Baggio, J. S., Gonçalves, F. P., Lourenço, S. A., Tanaka, F. A. O., Pascholati, S. F., & Amorim, L. (2016). Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. *Plant Pathology*, 65(4), 633-642.
- Bartz, J. A., Eayre, C. G., Mahovic, M. J., Concelmo, D. E., Brecht, J. K., & Sargent, S. A. (2001). Chlorine concentration and the inoculation of tomato fruit in packinghouse dump tanks. *Plant disease*, 85(8), 885-889.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. (2014). Chapter 1—*Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). *Postharvest Decay. Control Strategies*, 1-44.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-Gonzáles, I., ... & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Boz, H. (2015). p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11), 2323-2328.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2014). Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food chemistry*, 158, 392-400.
- Carocho, M., & CFR Ferreira, I. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- De León-Zapata, M. A., Pastrana-Castro, L., Rua-Rodríguez, M. L., Alvarez-Pérez, O. B., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). Experimental

- protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food chemistry*, 198, 62-67.
- Garbi, M. I., Saleh, M. S., Badri, A. M., Ibrahim, T. I., Mohammed, S. F., Alhassan, M. S., ... & Kabbashi, A. S. (2016). Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of *Hibiscus sabdariffa* (calyx). *Journal of Advancement in Medicinal Plant Research*, 4(4), 116-121.
- Ilodibia, C. V., Achebe, U. A., Arubalueze, C. U., & Ibeh, E. (2019). A comparative study on morphology, mineral and vitamin compositions of two variants of *Hibiscus sabdariffa* (L.). *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 4(1), 50-56.
- Jalali, O., Best, M., Wong, A., Schaeffer, B., Bauer, B., & Johnson, L. (2020). Protocatechuic acid as a topical antimicrobial for surgical skin antisepsis: preclinical investigations. *JBJS Open Access*, 5(3), 1-6.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Önning, G., Åkesson, B., Cirenajwis, H. M., & Oredsson, S. M. (2011). The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutrition and cancer*, 63(4), 611-622.
- Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., & Wąsik, T. J. (2018). Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *BioMed research international*, 2018.
- Kilic, I., & Yeşiloğlu, Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719-724.
- Kiran, P., Denni, M., & Daniel, M. (2014). Antidiabetic principles, phospholipids and fixed oil of kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* Linn.). *Indian Journal of Applied Research*, 4, 13-15.
- Konan, A. G., Konan, Y., & Kone, M. W. (2015). Polyphenols content and antioxidant capacity of traditional juices consumed in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 87, 8015-8021.
- Lallemand, L. A., Zubieta, C., Lee, S. G., Wang, Y., Acajjaoui, S., Timmins, J., ... & McCarthy, A. A. (2012). A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. *Plant Physiology*, 160(1), 249-260.
- Li, G., Wang, X., Xu, Y., Zhang, B., & Xia, X. (2014). Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *European food research and technology*, 238(4), 589-596.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6), M398-M403.

- Mahadevan, N., & Kamboj, P. (2009). Hibiscus sabdariffa Linn.- an overview. *Natural Product Radiance*, 8(1), 77-83.
- Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., & de la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 30-35.
- Meza, P. (2012). Guía: flor de jamaica (Hibiscus sabdariffa L) e (Hibiscus cruentus Bertol). *Asociada para el Desarrollo eco-Sostenible (ADEES). Chinandega, Nicaragua*. 25 p
- Mohamed-Salem, R., Rodríguez Fernández, C., Nieto-Pelegrín, E., Conde-Valentín, B., Rumero, A., & Martínez-Quiles, N. (2019). Aqueous extract of Hibiscus sabdariffa inhibits pedestal induction by enteropathogenic E. coli and promotes bacterial filamentation in vitro. *Plos one*, 14(3), e0213580.
- Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Soto-Rojas, L., & Castro-Rosas, J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(31), 2319-2322.
- Muthukumar, J., Srinivasan, S., Venkatesan, R. S., Ramachandran, V., & Muruganathan, U. (2013). Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *Journal of Acute Disease*, 2(4), 304-309.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67-74.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962.
- Peredo Pozos, G. I., Ruiz-López, M. A., Zamora Natera, J. F., Alvarez Moya, C., Barrientos Ramirez, L., Reynoso Silva, M., ... & Vargas Radillo, J. J. (2020). Antioxidant Capacity and Antigenotoxic Effect of Hibiscus sabdariffa L. Extracts Obtained with Ultrasound-Assisted Extraction Process. *Applied Sciences*, 10(2), 560.
- Petrash, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., Van Den Abeele, C., Papin, V., ... & Blanco-Ulate, B. (2019). Infection strategies deployed by Botrytis cinerea, Fusarium acuminatum, and Rhizopus stolonifer as a function of tomato fruit ripening stage. *Frontiers in plant science*, 10, 223.
- Ramaiah, A. K., & Garampalli, R. K. H. (2015). In vitro antifungal activity of some plant extracts against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(1), 22-27.

- Ramos-García, M., Bosquez-Molina, E., Hernández-Romano, J., Zavala-Padilla, G., Terrés-Rojas, E., Alia-Tejacal, I., ... & Bautista-Baños, S. (2012). Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 α in fresh tomatoes. *Crop Protection*, 38, 1-6.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I., & Martínez-Peña, M. D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49(3), 277-290.
- Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.
- Roy, N., Narayanankutty, A., Nazeem, P. A., Valsalan, R., Babu, T. D., & Mathew, D. (2016). Plant phenolics ferulic acid and p-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 4019-4023.
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 22(3), 358.
- Sarjit, A., Wang, Y., & Dykes, G. A. (2015). Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food microbiology*, 46, 227-233.
- Sung, W. S., & Lee, D. G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and applied chemistry*, 82(1), 219-226.
- Wang, G. F., Shi, L. P., Ren, Y. D., Liu, Q. F., Liu, H. F., Zhang, R. J., ... & Zuo, J. P. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral research*, 83(2), 186-190.
- Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zhang, B., & Wu, X. (2012). Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4063-4068.

CAPITULO III

IDENTIFICACION DE ÁCIDOS FENÓLICOS EN LOS CÁLICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) var. 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA'

IDENTIFICATION OF PHENOLIC ACIDS IN ROSELLE CALYXES (*Hibiscus sabdariffa* L.) var. 'SUDÁN' AND 'ALMA BLANCA'

Carolina María Flores Trejo¹, María del Rosario García Mateos¹, Salvador Valle Guadarrama², Yolanda Salinas Moreno³, Óscar Cruz Álvarez⁴, María Teresa Martínez Damián^{1*}

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo C.P. 56230, México. ²Investigaciones Forestales, Agrícolas, Fisiología Poscosecha, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo C.P. 56230, México. ³Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuário, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Tepatitlán-Lagos de Moreno km 8, Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos 47600, Jalisco, México. ⁴Facultad de Ciencias Tecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Av. Pascual Orozco s/n, Campus 1, C.P. 31350, Santo Niño, Chihuahua, México.

RESUMEN

En la actualidad la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) ha sido objeto de numerosos estudios que han proporcionado información sobre algunos metabolitos para ser utilizados en la industria cosmética, medicinal y alimenticia. En este estudio se evaluaron dos variedades de jamaica, una pigmentada ('Sudán') y otra sin pigmento ('Alma blanca'), con la finalidad de contribuir a la quimiotaxonomía de las especies, así como brindar conocimiento acerca de la jamaica blanca para potencializar sus propiedades antioxidantes en la agroindustria. Se determinaron los contenidos de los compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas y se identificaron los principales ácidos fenólicos mediante HPLC-DAD y comparación de los tiempos de retención con los de estándares comerciales y los espectros en UV. Se identificaron 11 ácidos en el cromatograma, la jamaica de color blanco 'Alma blanca' presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides, así como dos ácidos no identificados en la variedad de color rojo, el ácido p-cumárico y ácido gálico.

Palabras clave: Ácidos orgánicos, fenoles, flavonoides, proantocianidinas, extractos etanólicos.

ABSTRACT

Currently, the hibiscus flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) has been the subject of numerous studies that have provided information on some metabolites to be used in the cosmetic, medicinal and food industries. In this study, two varieties of hibiscus were evaluated, one pigmented ('Sudan') and the other without pigment ('Alma blanca'), with the aim of contributing to the chemotaxonomy of the species, as well as providing knowledge about white hibiscus to enhance its antioxidant properties in agroindustry. The content of phenolic compounds (phenolic acids, phenols, flavonoids, anthocyanins and proanthocyanidins) was determined and the main phenolic acids were identified by HPLC-DAD and comparison of retention times with those of commercial standards and UV spectra. Eleven acids were identified in the chromatogram, the white hibiscus 'Alma blanca' had the highest content of total phenolic compounds and flavonoids, as well as two unidentified acids in the red variety, p-coumaric acid and gallic acid.

Keywords: Organic acids; phenols; flavonoids; proanthocyanidins; ethanolic extracts

3.3 INTRODUCCIÓN

La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es originaria de África (Ariza *et al.* 2017), es una planta que pertenece a familia Malvaceae, sus cálices son reconocidos como un importante fuente de compuestos fenólicos (Camelo-Méndez *et al.*, 2016). Se ha utilizado en la medicina tradicional por sus efectos diuréticos, coleréticos, febrífugos e hipertensores (Da-Costa *et al* 2014).

El origen geográfico es una determinante para la calidad de la flor, la cual debe ser suave, de color uniforme, libre de materia extraña, con un nivel de humedad por debajo del 12%, acidez del extracto y número de extracciones que se realizan a través de los cálices (Mohamed *et al* 2012).

En México se cultiva una amplia variedad de genotipos nativos y mejorados de jamaica; una de las variedades que ha sido poco estudiada por su falta de pigmento es 'Alma blanca' por lo que presenta baja demanda comercial (Morales-Cabrera, 2013).

Las variedades de *H. sabdariffa* presentan diferencias tanto morfológicas como químicas; entre los principales compuestos que se han identificado, se encuentran los ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides; sin embargo, en las últimas décadas, factores como genética, medio ambiente,

ecología y condiciones de cosecha, han alterado su concentración en estos vegetales, tal es el caso del incremento en la concentración del ácido ascórbico presente en la jamaica (Da-Costa *et al* 2014).

Los compuestos fenólicos (ácidos orgánicos, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas) representan uno de los grupos más abundantes por sus propiedades antioxidantes, entre otras. Este amplio grupo de metabolitos vegetales juegan un papel importante ante diversos tipos de estrés abiótico y biótico (irradiación ultravioleta, agresión por patógenos, parásitos y depredadores de plantas (Rodríguez-Pérez *et al*, 2019).

En la actualidad la flor de jamaica ha sido objeto de numerosos estudios que han proporcionado información sobre algunos metabolitos para ser utilizados en la industria cosmética, medicinal y alimenticia (Abou-Arab *et al.*, 2011). Los cálices de jamaica poseen una gran variedad de antocianinas para el caso de las variedades de jamaica roja (pigmentadas). Estos pigmentos son los responsables del color rojo, mientras que el sabor astringente se debe a la presencia de proantocianidinas. Entre las antocianinas identificadas que proporcionan el color de los cálices se encuentran la delphinidin-3-O-glucósido, delphinidin-3-O-sambubioside y cianidina-3-O-sambubiósido) (Formagio *et al.*, 2015). Otros metabolitos presentes son las proantocianidinas y los ácidos fenólicos, principalmente el ácido clorogénico y derivados del ácido protocatequico, gálico y el ácido caféico (Reyes-Luengas *et al.*, 2015).

La estabilidad del color de las antocianinas depende de una combinación de varios factores que incluyen: estructura de las antocianinas, pH, temperatura, concentración de oxígeno, luz y agua, por lo tanto, la acidez de los sépalos también puede contribuir a la variación de color de estos pigmentos por cambios estructurales de estos metabolitos presentes en algunos alimentos por las interacciones con otros componentes alimenticios como el ácido ascórbico, azúcares, iones metálicos, dióxido de azufre y copigmentos (Abou-Arab *et al.*, 2011).

Un aspecto importante que influye en la calidad de la jamaica es el perfil y concentración de componentes bioactivos, por lo que se debe poner atención en

la optimización de las condiciones de cultivo para conservar o mejorar sus propiedades funcionales (Da-Costa *et al.* 2014); las condiciones generales óptimas de cultivo reportadas son en temperaturas entre 25 y 38 °C, suelos franco-arenosos, pH 4.0-5.8 y fertilización 80-40-00 kg ha⁻¹ (Juliani *et al.*, 2009). Por lo anterior, surge la necesidad de realizar diversos estudios sobre el manejo agronómico que permitan identificar los factores que favorecen la síntesis de los metabolitos involucrados en la calidad de la jamaica para su aplicación en la industria alimenticia (Izquierdo-Vega *et al.*, 2020).

Los flavonoides pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos son parte de los metabolitos secundarios presentes en los vegetales, actualmente identificados 4.000 metabolitos aproximadamente (Sharma y Janmeda, 2017). Continuamente se identifican diferentes tipos de flavonoides en las plantas, principalmente en verduras y frutas, éstos actúan como moduladores metabólicos esenciales debido a su potencial para impactar en diferentes moléculas y vías celulares. Se han categorizado en antocianidinas, flavonoles, flavonas, isoflavonoides, chalconas y flavanonas (Arora & Itankar, 2018). Varios estudios han asociado la actividad antioxidante y otras actividades biológicas de las plantas debido a la presencia de flavonoides (Alara, 2018).

Las proantocianidinas, también flavonoides de mayor peso molecular se encuentran en las flores de jamaica, poseen propiedades antioxidantes naturales ampliamente disponibles en vegetales, frutas, nueces, semillas, flores y corteza de algunas plantas, además de tener actividades farmacológicas y terapéuticas contra los radicales libres producto del metabolismo y del estrés oxidativo (Biao *et al.* 2018, Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019).

Otros metabolitos de gran importancia son los ácidos fenólicos, desempeñan papeles multifuncionales en las interacciones planta-microorganismo. También se producen en las plantas a través de la ruta biosintética del ácido shikímico por la vía fenilpropanoide (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019); estos metabolitos suelen producirse en respuesta a factores bióticos o abióticos, como mecanismos de defensa; estos mecanismos inducidos se expresan en el sitio de ataque (respuesta hipersensible), así como a distancia (señalados por salicilato de

metilo) del sitio de la infección primaria para proteger a la planta de la propagación de infección y futuros ataques. La resistencia inducida está regulada por una red de vías de transducción de señales interconectadas en donde los ácidos fenólicos son moléculas de señalización clave. Los ácidos fenólicos son relativamente estables, se transforman en el suelo porque algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizarlos como fuentes de carbono (Mandal *et al.* 2010).

Los disolventes que se utilizan comúnmente para la extracción de los metabolitos de la jamaica son agua destilada, etanol, metanol, éter de petróleo y acetato de etilo. De León-Zapata *et al.* (2016), mencionan que el uso de etanol en las extracciones de compuestos de plantas permite recuperar una mayor concentración de compuestos químicos de naturaleza polar con actividad biológica en comparación con las extracciones realizadas con agua y con disolventes de menor polaridad. Sin embargo, los estudios acerca de la identificación de los ácidos fenólicos son limitadas y se ha enfocado principalmente en cálices de jamaica de color rojo, por lo que no hay suficientes estudios en cálices de color blanco (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo fue identificar y cuantificar por HPLC los compuestos fenólicos de los extractos etanólicos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de dos variedades 'Alma blanca' (color blanca) y 'Sudán' (color roja), con la finalidad de contribuir a la quimiotaxonomía de las especies, así como brindar conocimiento acerca de la jamaica blanca para potencializar sus propiedades antioxidantes en la agroindustria.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Los cálices de flor de jamaica utilizados para la preparación de los extractos fueron la variedad roja 'Sudán' y la variedad blanca 'Alma blanca', proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicada en los altos de Jalisco, México.

Diseño experimental y análisis estadístico. Todas las determinaciones se realizaron con un diseño completamente al azar de dos variedades de *H. sabdariffa* con cuatro repeticiones. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas, mediante el programa SAS System versión 9.0.

Preparación de los extractos etanólicos. Los cálices de jamaica se secaron a 40°C durante 12 h, después se colocaron 2 g de cálices secos y molidos de cada variedad en un matraz Erlenmeyer y 20 ml de etanol al 96%, se sonicaron durante 20 min y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente, enseguida se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm, el sobrenadante se separó mediante filtración con papel filtro whatman #1 y se midió el volumen final. En los extractos obtenidos se evaluaron los compuestos fenólicos solubles totales, antocianinas totales, proantocianidinas, flavonoides y ácidos fenólicos fraccionados (Reyes-Luengas *et al.* 2015).

Cuantificación de compuestos fenólicos totales. Para cuantificar los compuestos fenólicos solubles totales (FST) se usó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). A 100 μL del extracto etanólico se adicionaron 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agitó y se dejó reaccionar 6 min en oscuridad. La reacción se neutralizó con 1250 μL de Na_2CO_3 al 19 % y se aforó a 3 mL con agua destilada. La muestra se agitó y quedó en oscuridad 90 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Lambda 25 UV/Vis (PerkinElmer, USA) a 760 nm. Los resultados obtenidos se compararon con una curva estándar de ácido gálico (20 a 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de Materia Seca ($\text{mg EAG g}^{-1} \text{MS}$).

Cuantificación de flavonoides. A 8.5 mL de etanol al 20 % (v/v) se le adicionaron 850 μL del extracto de jamaica y 375 μL de NaNO_2 , la solución se agitó en vortex y se dejó reaccionar durante 5 min. Se adicionaron 375 μL de

AlCl_3 se agitó y se dejó en reposo durante 5 min. Se adicionaron 2.5 mL de NaOH, se agitó y se dejó reposar durante 10 min. Se centrifugo por 10 min a 4000rpm. Las muestras se leyeron a 506 nm en espectrofotómetro Lamda 25 UV/Vis (PerkinElmer, USA). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de MS ($\text{mg EAG g}^{-1} \text{MS}$).

Cuantificación de proantocianidinas. Se cuantificaron con el método de Wallace y Giusti (2010). Se preparó una solución DMAC (4-Dimetilamino cinamaldehído) a 2% en una mezcla 1:1 (v/v) de metanol y ácido sulfúrico 6N. Se tomó un alícuota de 20 μL de la muestra y se hizo reaccionar con 2380 μL de metanol y 100 μL de la solución de DMAC. Se dejó reposar por 25 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y se tomó el valor de absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro indicar modelo (marca y país de origen). Se obtuvo la ecuación de la recta a partir de una curva patrón de catequina. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina por g de MS ($\text{mg EC g}^{-1} \text{MS}$).

Cuantificación de antocianinas totales. Las antocianinas totales se determinaron al medir la absorbancia de los extractos acuosos en un espectrofotómetro Lamda 25 UV/Vis (PerkinElmer, USA) de acuerdo con lo descrito por Abdel-Aal y Hucl (1999) y modificado por Salinas-Moreno *et al.* (2005). Se realizó una curva patrón de cianidina 3-glucósido y los resultados se expresaron en mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por g de MS ($\text{mg C3GE g}^{-1} \text{MS}$).

Preparación de la fracción de ácidos fenólicos libres. La extracción de los ácidos fenólicos fraccionados libres, glucosilados y esterificados se realizó de acuerdo con el método de Bakan *et al.* (2003). Para la extracción de los ácidos fenólicos libres, se tomaron 20 mL del extracto etanólico, el cual se ajustó a $\text{pH} = 2$ con HCl 6N, después se realizaron dos extracciones mediante una partición líquido-líquido con 20 mL de acetato de etilo, la fase orgánica recuperada, se

concentró a sequedad en un rotavapor (Heidolph instruments, mod. Laborata 4010 digital, Germany), finalmente el residuo se re-suspendió en 2 mL de metanol grado HPLC. Las muestras se mantuvieron en frascos ámbar a 20 °C hasta su análisis.

Preparación de la fracción de los ácidos fenólicos glucosilados. La fase acuosa restante se aforó a 20 mL con agua destilada y se fraccionó en dos partes iguales. La primera se destinó para la cuantificación en la fracción de los ácidos fenólicos glucosilados, para lo cual se le adicionaron 10 ml de HCL 2 N dejándolo reaccionar por 1 h, la segunda parte, se empleó para la cuantificación en la fracción de los ácidos fenólicos esterificados (Bakan *et al.*, 2003).

Preparación de la fracción de los ácidos fenólicos esterificados. A la fracción de los ácidos fenólicos esterificados se le adicionaron 10 mL de NaOH 2N, dejando reaccionar por 3 h en obscuridad. Transcurrido el tiempo de las dos reacciones (fracciones de ácidos glucosilados y esterificados) se ajustaron a pH 2. Posteriormente, se les realizó una extracción liquido-liquido con acetato de etilo, recuperando la fase orgánica, la cual se concentró a sequedad en un rotavapor y finalmente se re-suspendió en 2 mL de metanol HPLC (Bakan *et al.*, 2003).

Cuantificación de los ácidos fenólicos en las fracciones. Se cuantificaron los compuestos fenólicos solubles totales de cada fracción mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999)) previamente descrito. Las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro Lambda 25 UV/Vis (PerkinElmer, USA) a 760 nm. Los resultados se expresaron en mg g de ácido gálico por g de MS.

Identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos por HPLC-DAD. Se identificaron los ácidos fenólicos presentes en las tres fracciones (libres, glucosilados y esterificados) mediante HPLC serie 200 (Perkin Elmer, USA) con bomba cuaternaria, degasificador, detector de UV/Vis con arreglo de diodos y

automuestreador. La columna que se empleó es Hypersil ODS.1 (250 x 46 nm) con tamaño de partícula de 5 μm . El método que se utilizó es el descrito por Glowniak *et al.* (1996), en el cual se empleó como fase móvil una mezcla de metanol: ácido acético: agua (25:1:75 v/v/v) a un flujo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, con tiempo de corrida de 22 min, inyectando 10 μL de muestra. La identificación de los ácidos fenólicos en los extractos de jamaica se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con los de estándares comerciales y de los espectros en UV que se obtuvieron mediante el detector de arreglo de diodos. Se prepararon curvas patrón de los ácidos: caféico, clorogénico, ferúlico, gálico, protocatecuico, *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, sinápico y siríngico para la cuantificación. Mediante las regresiones obtenidas entre los valores de área bajo la curva de cada uno de los picos de los estándares y su correspondiente concentración se usaron para calcular el contenido de los diferentes ácidos.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos fenólicos totales, flavonoides y proantocianidinas

El contenido de compuestos fenólicos solubles totales (FST) fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) entre las variedades analizadas. El mayor contenido correspondió a 'Alma Blanca' seguido por 'Sudán' (Cuadro 1). Estos resultados coinciden con lo reportado por Yang (2012) en los extractos etanólicos en la variedad 'Sudán' (7.05 mg EAG g^{-1} MS). Sin embargo, Borrás-Linares *et al.* (2015) obtuvieron un mayor contenido en la variedad blanca (81 mg EAG g^{-1} MS) que en la variedad 'Sudán' de color rojo (43 mg EAG g^{-1} MS). Así mismo los reportados en los extractos acuosos en las mismas variedades por Reyes-Luengas *et al.* (2015) (36.5 mg EAG g^{-1} MS) superaron lo reportado en el presente estudio. Lo anterior reafirma su utilidad como alimento funcional ya que una de las características que le da esta categoría son los ácidos fenólicos por sus efectos benéficos en salud (Mohamed *et al.*, 2012). La variedad 'Alma blanca' presentó también el mayor contenido de flavonoides (Cuadro 1). Este resultado coincide con lo obtenido por Borrás-Linares *et al.* (2015) quienes al evaluar una variedad blanca y la variedad 'Sudán' de color rojo, los autores observaron un

mayor contenido de flavonoides (12.72 mg EQ g⁻¹ MS) en la variedad blanca. En otro estudio se reporta mayor contenido de estos metabolitos (17.16 mg EQ g⁻¹ MS) en los extractos acuosos de jamaica roja de Brasil (Maciel *et al.* 2018) con respecto a este estudio.

El contenido de antocianinas totales en la variedad 'Sudán' fue mayor que el obtenido por Yang (2012) con 0.12 mg cianidina 3 glucósido g⁻¹ MS. Las proantocianidinas fueron los metabolitos menos abundantes en los extractos analizados durante el presente estudio, el mayor contenido se observó en la variedad Sudán ($p \leq 0.05$) con respecto a "Alma blanca". Reyes-Luengas *et al.*, 2015 reportaron contenidos superiores en los extractos acuosos de proantocianidinas en la variedad 'Sudán' (1.04 mg EC g⁻¹ MS), así como en la variedad 'Alma blanca' (0.24 mg EC g⁻¹ MS) en comparación a los observados en el presente estudio. Las diferencias encontradas en diversos estudios se podrían explicar a variaciones genéticas, edafoclimáticas, disolvente empleado en la extracción y metodologías de análisis (Da-Costa *et al* 2014).

Cuadro 1. Contenido de polifenoles en cálices secos de dos variedades de jamaica *Hibiscus sabdariffa* L.

Metabolitos	'Sudán'	'Alma blanca'	DHS
Fenoles solubles totales [†]	7.26 ± 0.09 b	9.48 ± 0.07 a	0.147
Flavonoides [§]	3.03 ± 0.07 b	3.72 ± 0.06 a	0.108
Proantocianidinas [§]	0.56 ± 0.03 a	0.44 ± 0.02 b	0.039
Antocianinas*	1.99 ± 0.08 a	ND	0.0

Valores por fila, con diferente letra, son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$). DHS: diferencia honesta significativa. [†]mg EAG g⁻¹ MS; [§]mg EC g⁻¹ MS, *mg C3GE g⁻¹ MS. ND = no detectado.

El contenido de polifenoles en los cálices de ambas variedades es un indicador de que la jamaica es un buen alimento funcional, ya que los valores obtenidos coinciden con alimentos cuyo valor nutracéutico tiene suficiente evidencia científica como el café donde se registraron valores de 11.4 mg EAG g⁻¹ MS en cuanto a fenoles solubles totales y 2.50 mg EQ g⁻¹ MS para flavonoides (Mussatto

et al. 2011); así como con el arándano con valores de 2.96 mg C3GE g⁻¹ MS para antocianinas (Lätti, 2011).

Contenido de ácidos fenólicos libres

La variedad 'Sudán' presentó el mayor contenido de ácidos fenólicos libres y la variedad 'Alma blanca' presentó el mayor contenido en ácidos fenólicos glucosilados y esterificados (Figura 1). Las variedades analizadas presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) del contenido de ácidos fenólicos libres (AFL), con los mayores contenidos en la variedad 'Sudán'; pero el mayor contenido de ácidos fenólicos glucosilados (AFG) y esterificados (AFE) correspondió a la variedad 'Alma Blanca' (Cuadro 2). Los resultados obtenidos en esta investigación difieren con lo encontrado por Reyes-Luengas *et al.* (2015) donde los mayores contenidos de las tres fracciones de ácidos fenólicos (AFL, AFG, AFE) se obtuvieron en la variedad 'Sudán' (color rojo) (5.7, 3.2 y 2.8 mg EAG g⁻¹ MS); pero la variedad 'Alma blanca' (color blanco) presentó un mayor contenido de AFL y AFG (5.6 y 1.5 mg EAG g⁻¹ MS) en comparación con la variedad Criolla Nayarit (color rojo) (3.5 y 1.2 mg EAG g⁻¹ MS).

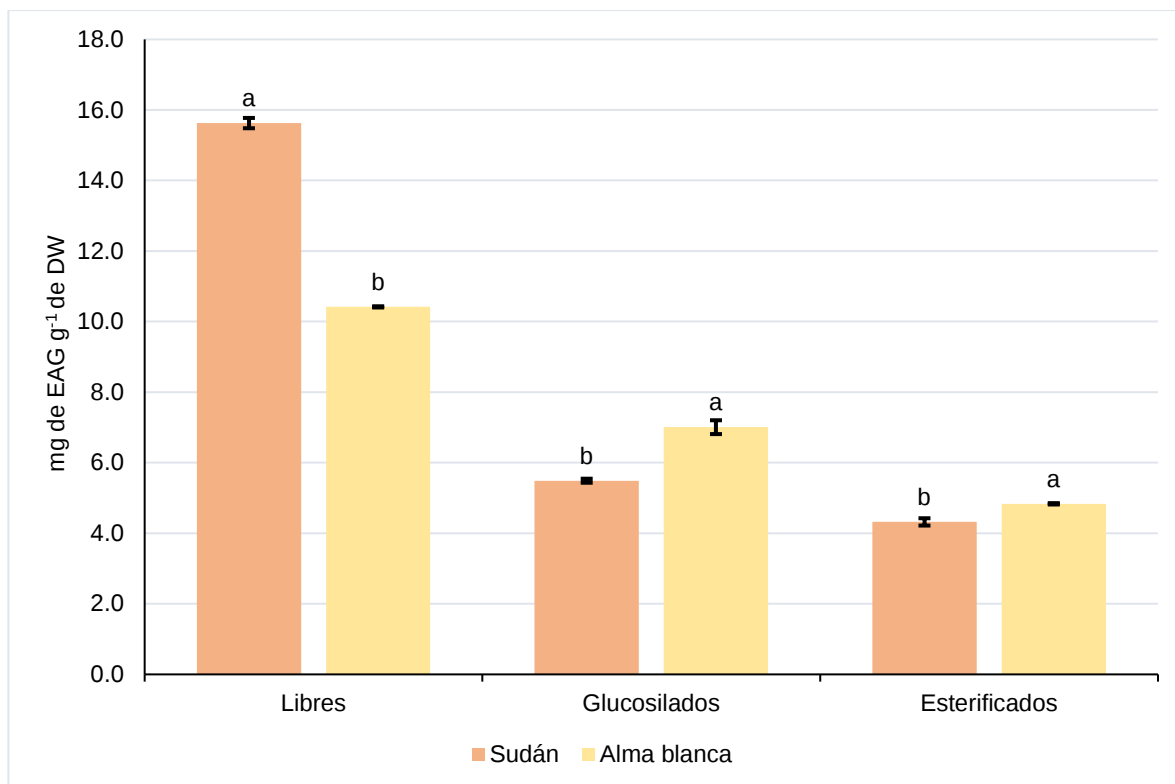


Figura 1. Contenido de ácidos fenólicos fraccionados libres, glucosilados y esterificados en extractos de dos variedades de jamaica. DSH: diferencia significativa honesta. Barras del mismo grupo con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

La presencia de estos metabolitos se recomienda incluirlos en la dieta debido a sus propiedades bioactivas como antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas (Carocho & Ferreira, 2013). Entre los principales ácidos reportados en la flor de jamaica se encuentran el ácido clorogénico, ácido caféico, ácido gálico, ácido protocatéquico y ácido sirínico, por mencionar algunos (Reyes-Luengas et al., 2015). Estos metabolitos están involucrados en el mecanismo de defensa vegetal, debido a que algunos justifican sus propiedades bactericidas y fungicidas (Morales-Cabrera et al., 2013; Rodríguez-Pérez et al., 2019).

La presencia de 12 señales del cromatograma de la fracción de ácidos fenólicos libres (AFL) de los extractos de la variedad 'Sudán' y 'Alma blanca', se presentan en la Figura 2. La identidad de cada pico se identificó mediante los tiempos de retención y la comparación de los espectros UV de los estándares comerciales (Figura 2). Los compuestos que se identificaron en la fracción de AFL fueron el

ácido clorogénico y sus isómeros I (ácido 3-cafeoil quínico) y II (ácido 4-cafeoil quínico), seguido de los derivados del ácido protocatéquico y derivados del ácido siríngico. Es importante señalar que la variedad 'Alma blanca' de cálices blancos presentó un mayor contenido de ácido clorogénico (Cuadro 2).

El contenido de ácido clorogénico y sus isómeros, derivados del *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, derivado del protocatéquico, fueron menores en comparación con lo obtenido por Reyes-Luengas (2015) quien obtuvo un mayor contenido de estos compuestos en los extractos acuosos de 'Alma blanca'. En el presente estudio, se identificaron otros compuestos como el ácido gálico y sus derivados, así como derivados del ácido caféico y derivado del ácido *p*-cumárico, ausentes en la variedad Sudán de cálices rojos. Los ácidos fenólicos identificados mediante HPLC-MS y HPLC-DAD en otros estudios reportaron la presencia de ácido clorogénico y sus isómeros (ácido 5-cafeoil quínico y ácido 4-cafeoil quínico) en los extractos etanólicos (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009); Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011; Reyes-Luengas *et al.*, 2015).

En la fracción de AFG (Figura 3) también predominaron el ácido clorogénico, mayor en 'Sudán' y sus isómeros del clorogénico, con un contenido mayor en 'Alma blanca', sin embargo, no se presentó el ácido protocatéquico en la variedad de cálices blancos.

En la fracción de AFE (Figura 4), 'Alma blanca' presentó derivados del protocatéquico, ácido caféico, derivados del siríngico, derivado del *p*-hidroxibenzoico y derivados de *p*-cumárico. En la variedad 'Sudán' se presentaron los mismos compuestos en la fracción de AFE y en la fracción de AFG, por lo que no hubo una separación adecuada durante la hidrólisis.

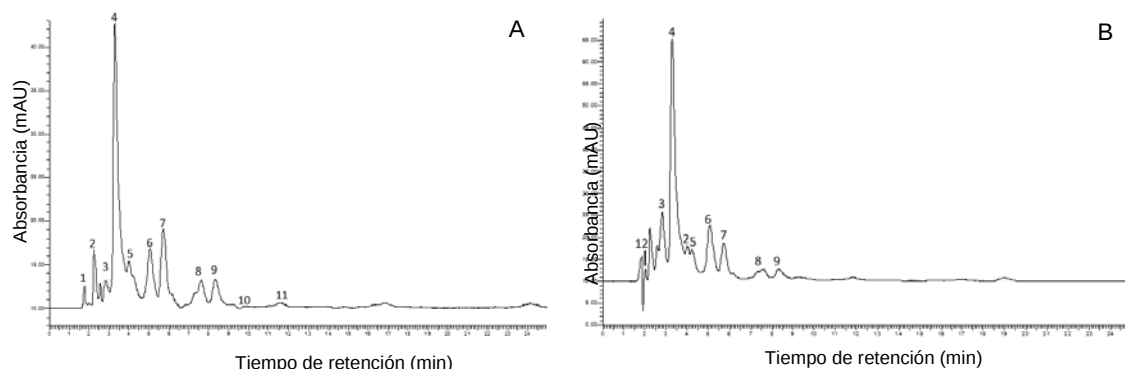


Figura 2. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos libres del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B). La identidad de los picos es: 1) ácido gálico; 2) no identificado; 3) derivado ácido gálico; 4) derivado del clorogénico; 5) derivado del protocatéquico; 6) derivado del clorogénico (isómero II); 7) ácido clorogénico; 8) ácido caféico; 9) derivado del siríngico; 10) derivado del *p*-cumárico; 11) derivado del caféico; 12) derivado del *p*-hidroxibenzóico.

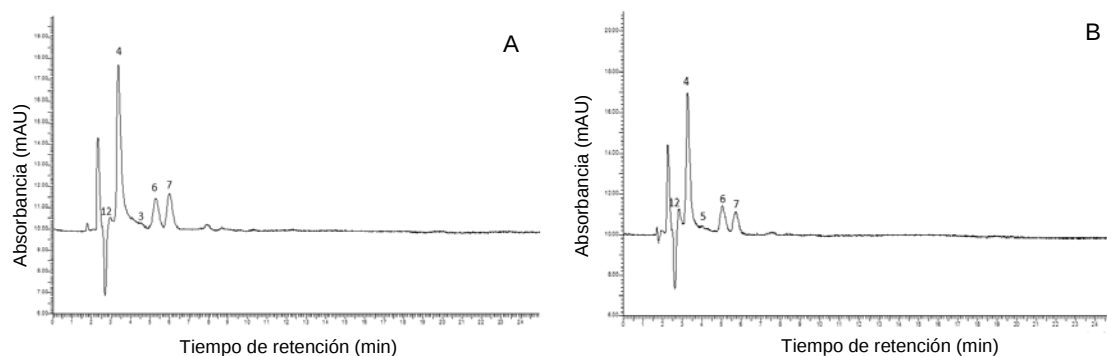


Figura 3. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos glucosilados del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B). La identidad de los picos es: 2) no identificado; 4) derivado del clorogénico (isómero I); 5) derivado del protocatéquico; 6) derivado del clorogénico (isómero II); 7) ácido clorogénico; 12) derivado del *p*-hidroxibenzóico.

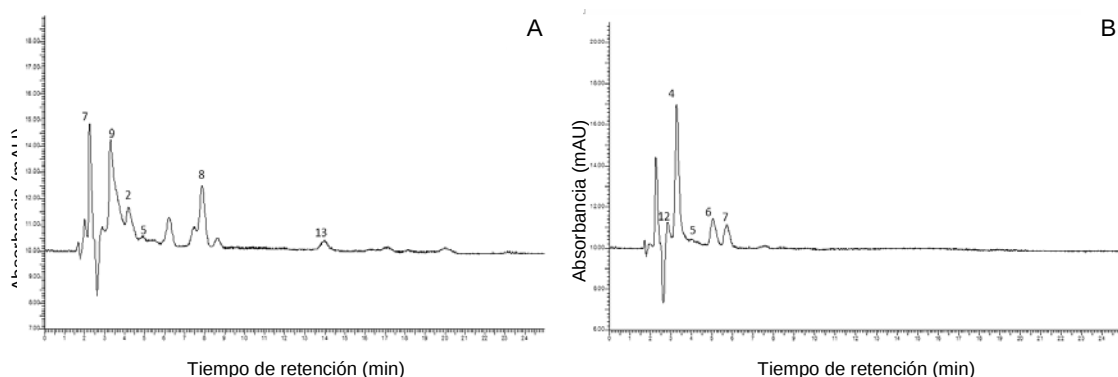


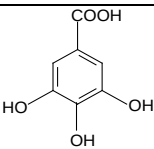
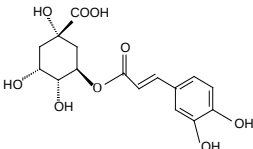
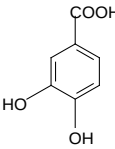
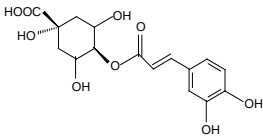
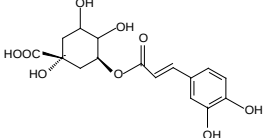
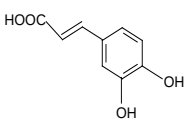
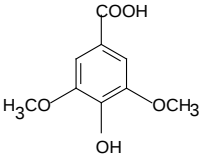
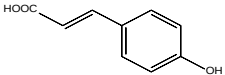
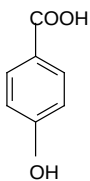
Figura 4. Perfil cromatográfico de los ácidos fenólicos esterificados del extracto etanólico de los cálices de las variedades de jamaica Alma blanca (A) y Sudán (B). La identidad de los picos es: 2) no identificado; 4) derivado del clorogénico (isómero I); 5) derivado del protocatéquico; 6) derivado del clorogénico (isómero II); 7) ácido clorogénico; 8) ácido caféico; 9) derivado del siríngico; 12) derivado del *p*-hidroxibenzóico; 13) ácido *p*-cumárico.

Cuadro 2. Ácidos fenólicos identificados en las fracciones libres, glucosiladas y esterificadas de los extractos etanólicos de cálices de dos variedades de jamaica ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS).

Ácidos fenólicos	D-Ptr	Clg-I	Clg-II	Clg	DCaf	Caf	DGal	Gal	DSrg	Dp-H	p-C	Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Libres												
'Alma blanca'	83.14	370.44	333.47	462.00	14.83	55.90	54.54	3.20	125.21	56.20	27.14	1586.07
'Sudán'	306.89	620.70	474.55	395.04	-	66.86	242.99	-	186.65	64.80	-	2358.48
Glucosilados												
'Alma blanca'	-	156.46	147.66	179.44	-	-	-	-	-	44.68	-	528.24
'Sudán'	16.37	250.79	138.52	139.97	-	-	-	-	-	44.69	-	590.34
Esterificados												
'Alma blanca'	28.32	-	-	-	-	96.13	-	-	326.09	49.18	17.03	516.75
'Sudán'	16.37	250.79	138.52	139.97	-	-	-	-	-	44.69	-	590.34

D-Ptr: Derivado del protocatéquico; Clg-I: isómero de clorogénico I; Clg-II: isómero de clorogénico II; Clg: ácido clorogénico; DCaf: derivado del caféico; Caf: ácido caféico; DGal: Derivado del gálico; Gal: ácido gálico; DSrg: derivado del siríngico; Dp-H: Derivado del *p*-hidroxibenzoico; *p*-C: derivado de *p*-cumárico.

Cuadro 3. Ácidos fenólicos presentes en las variedades ‘Alma blanca’ y ‘Sudán’ en sus fracciones libres, glucosilados y esterificados.

Estructura	Nombre trivial	Número	Nombre sistemático	Tiempo de retención (min)	Variedad
	Ácido gálico	1	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico	1.77	‘Alma blanca’
	Ácido clorogénico (isómero I)	4	Ácido 3-O-Cafeoilquinico	3.2 – 3.3	‘Sudán’ ‘Alma blanca’
	Ácido protocatequico	5	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	4-4.3	‘Sudán’ ‘Alma blanca’
	Ácido clorogénico (isómero II)	6	Ácido 4-O-Cafeoilquinico	4.9 – 5.2	‘Sudán’ ‘Alma blanca’
	Ácido clorogénico	7	Ácido 5-O-Cafeoilquinico	5.6 – 5.9	‘Sudán’ ‘Alma blanca’
	Ácido caféico	8	Ácido 3,4-dihidroxicinámico	7.3 – 7.8	‘Sudán’ ‘Alma blanca’
	Ácido siríngico	9	Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico	8.31	‘Alma blanca’
	Ácido p-cumárico	10	Ácido 4-hidroxicinámico	13.8	‘Alma blanca’
	Ácido p-hidroxibenzóico	12	Ácido 4-hidroxibenzóico	1.8-2.7	‘Sudán’ ‘Alma blanca’

El ácido protocatéquico es un agente antimicrobiano de amplio espectro, con actividad contra organismos resistentes a algunos fármacos de potente penetración cutánea y biodisponibilidad dérmica cuando se aplica tópicamente; como antibacteriano, mejoran la generación de especies reactivas de oxígeno en bacterias e influyen en la integridad de la membrana celular bacteriana, lo que provoca la inhibición y la fuga del contenido intracelular (Jalali *et al.* 2020). El ácido clorogénico se ha usado como conservador y aditivo en algunos alimentos por sus efectos bactericidas contra *Stenotrophomonas maltophilia* resistente a trimetoprima/sulfametoxazol, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, así como actividad fungicida contra *Candida albicans* por sus efectos en la membrana celular de los hongos (Naveed 2018). El ácido caféico, presente en las infusiones de café, en el aceite de argán, avena, trigo, arroz y aceite de oliva; tiene efectos sinérgicos con antibióticos contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Candida albicans* (Kępa 2018).

El ácido gálico posee propiedades antineoplásicas, bacteriostáticas, antimelanogénicas y antioxidantes; se ha demostrado que tiene actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter jejuni* (Sarjit 2015); además, Verma *et al.*, (2013) señalaron se ha usado en algunos tratamientos de tumores cerebrales, debido a su capacidad para suprimir la viabilidad celular, la proliferación, la invasión y la angiogénesis en células de glioma humano. El ácido siríngico se encuentra en vegetales como aceitunas, uvas, acai, por mencionar algunos y funciona como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético y de protección del corazón, hígado y cerebro (Kiran *et al.* 2014). El ácido para-hidroxibenzoico, también conocido como ácido p-hidroxibenzoico o ácido 4 hidroxibenzoico, se utiliza en la preparación de ésteres, conocidos como parabenos, usados como agentes conservantes antimicrobianos en alimentos, bebidas, medicamentos y cosmética, debido a su amplio espectro antimicrobiano (Izquierdo-Vega *et al.*, 2020). Finalmente, el ácido p-cumárico presente en frutas,

verduras y cereales (Boz *et al.* 2015; Pei *et al.* 2016), es un antioxidante relativamente potente (Kilic *et al.* 2013) con actividad antimicrobiana al alterar las membranas celulares bacterianas (Lou *et al.* 2012), inhibe la proliferación de las células cancerosas y promueve la muerte de las células cancerosas por apoptosis, lo que respalda sus posibles efectos anticancerígenos (Janicke *et al.* 2011; Roy *et al.* 2016)

3.6 CONCLUSIONES

La variedad 'Sudán' presentó el mayor contenido de ácidos fenólicos libres (15.62 mg de EAG g⁻¹ MS) y la variedad 'Alma blanca' presentó el mayor contenido en ácidos fenólicos glucosilados (7.00 mg de EAG g⁻¹ MS) y esterificados (4.83 mg de EAG g⁻¹ MS), lo anterior reafirma su utilidad como alimento funcional ya que una de las características que le da esta categoría son los ácidos fenólicos por sus efectos benéficos en salud. La jamaica variedad 'Alma blanca' de cálices de color blanco, subutilizada, por la falta de pigmento no se ha aprovechado comercialmente, sin embargo, presentó mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides que la variedad pigmentada, además se observó que en la jamaica blanca se presentaron ácidos fenólicos similares a los encontrados en la variedad pigmentada, así como dos ácidos no identificados en la variedad de color rojo, el ácido p-cumárico y ácido gálico.

3.7 LITERATURA CITADA

- Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 76(3), 350-354.
- Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M., & Abou-Arab, E. A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7), 445-456.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., & Azhari, N. H. (2018). Vernonia cinerea leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. *Industrial Crops and Products*, 122, 533-544.
- Ariza Flores, R., Serrano Altamirano, V., Michel Aceves, A. C., Barrios Ayala, A., Otero Sánchez, M. A., Avendaño Arrazate, C. H., & Noriega Cantú, D. H.

- (2017). Características bioquímicas y calidad nutracéutica de cinco variedades de jamaica cultivadas en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(2), 269-280.
- Arora, S., & Itankar, P. (2018). Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(4), 476-482.
- Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., & Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2826-2831.
- Biao, L., Tan, S., Meng, Q., Gao, J., Zhang, X., Liu, Z., & Fu, Y. (2018). Green synthesis, characterization and application of proanthocyanidins-functionalized gold nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(1), 53.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Boz, H. (2015). p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11), 2323-2328.
- Camelo-Méndez, G. A., Jara-Palacios, M. J., Escudero-Gilete, M. L., Gordillo, B., Hernanz, D., Paredes-López, O., ... & Heredia, F. J. (2016). Comparative study of phenolic profile, antioxidant capacity, and color-composition relation of roselle cultivars with contrasting pigmentation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 109-114.
- Carocho, M., & CFR Ferreira, I. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- De León-Zapata, M. A., Pastrana-Castro, L., Rua-Rodríguez, M. L., Alvarez-Pérez, O. B., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food chemistry*, 198, 62-67.
- Formagio, A. S. N., Ramos, D. D., Vieira, M. C., Ramalho, S. R., Silva, M. M., Zárata, N. A. H., ... & Carvalho, J. E. (2015). Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology*, 75(1), 69-76.

- Główniak, K., Zgórk, G., & Kozyra, M. (1996). Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some Echinacea species. *Journal of Chromatography A*, 730(1-2), 25-29.
- Izquierdo-Vega, J. A., Arteaga-Badillo, D. A., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J. A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C. A., ... & Madrigal-Santillán, E. (2020). Organic acids from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*, 8(5), 100.
- Jalali, O., Best, M., Wong, A., Schaeffer, B., Bauer, B., & Johnson, L. (2020). Protocatechuic acid as a topical antimicrobial for surgical skin antisepsis: preclinical investigations. *JBJS Open Access*, 5(3), 1-6.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Önning, G., Åkesson, B., Cirenajwis, H. M., & Oredsson, S. M. (2011). The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutrition and cancer*, 63(4), 611-622.
- Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., & Simon, J. E. (2009). Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science*, 74(2), S113-S121.
- Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., & Wąsik, T. J. (2018). Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *BioMed research international*, 2018.
- Kiliç, I., & Yeşiloğlu, Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 719-724.
- Kiran, P., Denni, M., & Daniel, M. (2014). Antidiabetic principles, phospholipids and fixed oil of kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* Linn.). *Indian Journal of Applied Research*, 4, 13-15.
- Lätti, A. K., Riihinen, K. R., & Jaakola, L. (2011). Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid between bilberry and lingonberry (*Vaccinium* × *intermedium* Ruthe). *Phytochemistry*, 72(8), 810-815.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., & Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control*, 25(2), 550-554.
- Maciel, L. G., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Daguer, H., Molognoni, L., de Almeida, M. M., ... & Rosso, N. D. (2018). Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 187-197.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 359-368.

- Mohamed, B. B., Sulaiman, A. A., & Dahab, A. A. (2012). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, cultivation and their uses. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci*, 1(6), 48-54.
- Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Soto-Rojas, L., & Castro-Rosas, J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(31), 2319-2322.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 67-74.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962.
- Ramirez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., & Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of food science*, 76(3), C428-C435.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I., & Martínez-Peña, M. D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49(3), 277-290.
- Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Molina, V. M., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Menendez, J. A., ... & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of separation science*, 32(20), 3441-3448.
- Rodríguez-Pérez, C., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., & Verardo, V. (2019). Grape seeds proanthocyanidins: An overview of in vivo bioactivity in animal models. *Nutrients*, 11(10), 2435.
- Roy, N., Narayanankutty, A., Nazeem, P. A., Valsalan, R., Babu, T. D., & Mathew, D. (2016). Plant phenolics ferulic acid and p-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 4019-4023.
- Salinas Moreno, Y., Sánchez, G. S., Hernández, D. R., & Lobato, N. R. (2005). Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science*, 43(9), 483-487.

- Sarjit, A., Wang, Y., & Dykes, G. A. (2015). Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food microbiology*, 46, 227-233.
- Sharma, V., & Janmeda, P. (2017). Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(4), 509-514.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35(3), 473-485.
- Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zhang, B., & Wu, X. (2012). Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4063-4068.

CAPITULO IV

EXTRACTOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' EN LA INHIBICIÓN DE *Rhizopus stolonifer*

EXTRACTS OF JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) 'SUDÁN' Y 'ALMA BLANCA' IN THE INHIBITION OF *Rhizopus stolonifera*

Carolina María Flores Trejo¹, María Teresa Martínez Damián^{1*}, María del Rosario García Mateos¹, Salvador Valle Guadarrama², Yolanda Salinas Moreno³, Efrén Cíntora Portuguez¹

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo C.P. 56230, México. ²Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo C.P. 56230, México. ³Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Tepatitlán-Lagos de Moreno km 8, Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos 47600, Jalisco, México.

RESÚMEN. *Hibiscus sabdariffa* L. posee actividad fungistática en *Rhizopus stolonifer*, el cual afecta productos hortofrutícolas en poscosecha de mayor importancia económica. Se evaluó la actividad inhibitoria de extractos etanólicos de jamaica 'Sudán' y 'Alma blanca' contra *R. stolonifer in vitro*. Se realizó el aislamiento del hongo y la identificación de la cepa en un diseño con arreglo factorial, con dos concentraciones de esporas (1×10^8 y 1×10^6 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$), dos variedades de jamaica, cinco dosis del extracto etanólico (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 %), tres repeticiones por cada extracto. Se observó que ambas variedades lograron inhibir entre 43.83 y 60.42 % a las 96 horas de desarrollo del hongo, por lo que podrían usarse como fungistáticos potenciales en el control de *Rhizopus stolonifer*.

Palabras clave: actividad fungistática, poscosecha, esporas, hongo, concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT. *Hibiscus sabdariffa* L. has fungistatic activity in *Rhizopus stolonifer*, which affects postharvest horticultural products of greater economic importance. The inhibitory activity of ethanolic extracts of hibiscus 'Sudan' and 'Alma blanca' against *R. stolonifer* was evaluated *in vitro*. The isolation of the fungus and the identification of the strain were carried out in a design with factorial arrangement, with two concentrations of spores (1×10^8 y 1×10^6 spores $\cdot \text{mL}^{-1}$), two varieties of hibiscus, five doses of the ethanolic extract (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5%), three repetitions for each extract. It was observed that both varieties managed to inhibit between 43.83 and 60.42% at 96 hours of development of the fungus, so they could be used as potential fungistatics in the control of *Rhizopus stolonifer*.

Key words: fungistatic activity, postharvest, spores, fungus, minimum inhibitory concentration.

4.3 INTRODUCCIÓN

La jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. es un arbusto anual tropical comúnmente cultivado en África, sudeste asiático y América del Sur (Kamal 2019). En México el consumo de jamaica es de 1,600 t al año, la producción nacional del 50 % y el resto se importa a países como China y Sudán (Fundación Produce de Guerrero 2012).

La variedad Sudán de cálices rojos es una de las que más se distribuye y comercializa en el mercado; se caracteriza por sus cálices grandes y de color rojo, tiene un mayor contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos, así como de compuestos fenólicos, taninos, antocianinas y ácidos fenólicos, en comparación con la jamaica blanca (Ariza *et al.* 2017, Serrano *et al.* 2011).

La variedad de cálices blancos, Alma Blanca, es una mutación natural de la variedad criolla regional, la característica distintiva de esta variedad son sus tallos y hojas de color verde, con cálices de la flor de color amarillo claro hasta la madurez fisiológica, pero que al estar secos toman un color café; la jamaica blanca es menos comercial que las variedades de color rojo como 'Sudán', debido a sus propiedades organolépticas, con una producción promedio de 570 kg·ha⁻¹ de cálices secos, sin embargo, tiene mayor contenido de fibra, ceniza y aminoácidos (Ariza *et al.* 2017) y de acuerdo a algunos estudios, esta variedad posee un mayor efecto antimicrobiano (Morales-Cabrera *et al.* 2013). Aunque, el ambiente de producción puede influir en la concentración de los compuestos fenólicos presentes en los cálices (Salinas-Moreno *et al.* 2012).

Los cálices de jamaica se consumen en áreas indígenas como ingredientes comestibles o alimentos funcionales por su alto contenido en ácidos fenólicos (Shen *et al.* 2016). Un ejemplo de estos compuestos, es el ácido clorogénico, el cual se encuentra en mayor concentración en los extractos de jamaica según señala Li (2014), quien reporta el efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Las plantas sintetizan compuestos de manera natural como respuesta a una infección microbiana llamados flavonoides; se ha encontrado *in vitro* que los compuestos polifenólicos

y/o los aceites volátiles también inhiben el desarrollo de una amplia gama de microorganismos (Al-Hashimi 2012).

Una forma eficiente y sencilla para la extracción de estos compuestos, es la utilización de disolventes orgánicos, sin embargo, se considera costosa y se requieren grandes cantidades de disolventes que pueden ser perjudiciales para la salud humana debido a las trazas que pueden quedar en el extracto (Xavier *et al.* 2015). El uso de disolventes como, etanol, metanol, acetona, en diferentes mezclas con agua son algunas de las opciones para la extracción de compuestos, sin embargo, se requieren de diferentes pruebas para saber con qué disolvente se logra la mayor extracción de compuestos o la extracción de los compuestos de interés, lo anterior depende de la composición química del compuesto, de la cantidad y posición de los grupos hidroxilo, del tamaño de molécula, además de los factores del disolvente como son temperatura, tiempo de extracción, relación masa-solvente, entre otros (Amyrgialaki *et al.* 2014, Capriotti *et al.* 2014). En un estudio se evaluaron extractos de jamaica roja y blanca para inhibir el crecimiento de *Salmonella* sp. Morales-Cabrera *et al.* (2013), probaron diferentes disolventes como, etanol, metanol, agua caliente y agua a temperatura ambiente para realizar extractos de jamaica, como resultado observaron que el etanol extrajo un mayor número de compuestos fenólicos, ya que se obtuvo un diámetro de inhibición mayor en comparación con los otros disolventes.

Existen algunos factores que pueden afectar el contenido de los ácidos fenólicos, desde las condiciones del suelo, momento de cosecha, fertilización, entre otros (Morales-Cabrera *et al.* 2013). El uso de etanol en las extracciones de compuestos naturales de plantas, permite recuperar una mayor concentración de compuestos químicos con actividad biológica, que las extracciones realizadas con agua (De León-Zapata *et al.* 2016). Morales-Luna *et al.* (2019) mencionan que el extracto acuoso de jamaica blanca 'Alma Blanca' es rico en ácidos fenólicos, mientras que el extracto metanólico mostró un alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides no antocínicos. Por otro lado Garbi (2016), encontró que el extracto etanólico de cálices de *H. sabdariffa* contiene metabolitos con actividad antimicrobiana, que inhiben *Escherichia coli* O157:H7; sin embargo, se desconoce si posee capacidad fungistática, para inhibir el desarrollo de *Rhizopus*

stolonifer, uno de los hongos fitopatógenos en poscosecha de mayor importancia económica debido a su tasa de crecimiento extremadamente rápida y que es capaz de propagarse a través de heridas en los frutos, provocando pérdidas económicas de aproximadamente 24% en poscosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2008; Bautista-Baños *et al.*, 2014).

La infección por podredumbre ocasionada por *Rhizopus* generalmente ocurre en las frutas con heridas producidas durante la cosecha, almacenamiento o embalaje, el control de este hongo es muy difícil ya que las esporas se encuentran en la atmósfera y se propagan rápidamente de la fruta infectada a la fruta adyacente cuando la temperatura es superior a 5 °C (Yang & Jiang 2015). Este tipo de infección es frecuente en frutos de jitomate y ocurre a una temperatura medianamente alta (20 ± 2 °C), presentando síntomas después de 24 a 48 h; las enzimas involucradas en el proceso de ablandamiento de la epidermis del fruto durante la infección producida por el hongo son la poligalacturonasa y la pectinmetilesterasa, las cuales son responsables de disolver las laminillas medias de las paredes celulares de los jitomates infectados (Jayani *et al.* 2005).

En poscosecha de frutos se pueden utilizar algunos fungicidas químicos para prevenir la infección por *R. stolonifer*, como el Iprodione (Rovral), que reduce hasta 59 % la pudrición por *Rhizopus*. Sin embargo, en algunos países su uso está prohibido por daños a la salud. El Dicloran es otro fungicida usado para el control de este hongo, no obstante, se desconoce el estado de toxicidad si se llega a consumir (Bautista-Baños *et al.* 2014). Una alternativa para disminuir el uso de fungicidas químicos son los fungicidas orgánicos, por lo cual los extractos de jamaica podrían ser utilizados para disminuir el desarrollo de *R. stolonifer* durante poscosecha.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad fungistática de extractos etanólicos de jamaica, ‘Sudán’ y ‘Alma blanca’ en el desarrollo de *Rhizopus stolonifer*.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Rhizopus stolonifer*. La cepa de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.), se obtuvo aisló directamente de frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tipo Saladette. A los frutos se les realizaron heridas transversales de 5 cm con un bisturí estéril, distribuidas en cuatro cuadrantes del fruto y se colocaron en cajas plásticas transparentes (34 x 21 x 11.6 cm) asperjadas con un atomizador con agua destilada estéril para simular un ambiente húmedo, a una temperatura de 25°C dentro de una cámara de crecimiento KBWF240-230V (BINDER), hasta observar una coloración oscura y blanda en la zona de infección, se realizó un corte de 5 mm de diámetro del fruto infectado y se colocó en cajas Petri de 8 cm de diámetro con 18 mL de agar Papa Dextrosa Agar (PDA), después de dos días se seleccionó un nuevo cultivo para realizar una resiembra en cajas Petri con PDA. A la caja Petri con el hongo, se le agregó 1 mL de agua destilada estéril y se tomó una muestra con una pipeta Pasteur de cristal estéril, se colocó una gota en un portaobjetos y se observaron las esporas del hongo con un microscopio óptico, con una pipeta Pasteur se tomó una spora y se sembró en cajas Petri con PDA para asegurar la pureza del hongo y su posterior identificación se realizó en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo.

Identificación de cepa. La extracción de ADN del cultivo monospórico de *R. stolonifer*, se realizó una amplificación de un marcador molecular (ITS) y una secuenciación para la identificación del hongo. Los productos amplificados por PCR, fueron comparados con la base de datos NCBI, presentando un porcentaje de similitud de 99.74%.

Cuantificación del contenido de esporas por mL⁻¹. Se colocaron 10 mL⁻¹ de agua destilada en cajas Petri con el cultivo monospórico de *Rhizopus stolonifer* (tres cajas Petri con el cultivo del hongo). Posteriormente se tomó 1 mL de esporas de cada caja Petri, colocando una gota de la solución, en una cámara de Neubauer, se observaron en el microscopio compuesto binocular marca

Labomed modelo LX400 y utilizando la siguiente formula se determinó el número de esporas por mL.

$$\# \text{ de esporas/mL} = \frac{\bar{X}}{(\text{Superficie})(\text{Profundidad de la cámara})(\text{Dilución})}$$

Donde:

$\bar{X}$: Promedio de 5 cuadrantes de la cámara

Superficie = 0.25 mm²

Profundidad de la cámara = 0.100 mm²

Dilución = $\left(\frac{1}{200}\right)$

Diseño experimental. Se realizó un diseño con arreglo factorial con cinco repeticiones, con dos concentraciones de esporas 1x10⁸ y 1x10⁸ esporas·mL⁻¹, dos variedades de jamaica ('Sudán' y 'Alma blanca') y cinco concentraciones de los extractos etanólicos (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 %). Los testigos constaron de tres cajas Petri con PDA y agua destilada estéril.

Material vegetal. Los cálices de flor de jamaica utilizados para los extractos fueron 'Sudán' y 'Alma blanca', proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicada en los altos de Jalisco.

Extractos de jamaica. Se elaboraron extractos etanólicos de jamaica 'Sudán' y 'Alma blanca' previamente deshidratada, a diferentes concentraciones (4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 %). para evaluar el efecto antifúngico contra *Rhizopus stolonifer*. Se colocaron 100 g de polvo de jamaica con 500 mL de etanol a 99 % y se sonicaron por 20 min en un sonicador marca Cole-Parmer 8892, se filtraron y el extracto se evaporó en un rotaevaporador marca Heidolph mod. laborota 4003 por 40 °C hasta obtener un extracto con consistencia viscosa.

Aplicación de los extractos de jamaica y las esporas del hongo *in vitro*. Se utilizaron dos concentraciones, 1×10^8 y 1×10^6 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$, con un tiempo de crecimiento de 48 h en PDA. En cajas Petri de 8 cm de diámetro con PDA se agregaron 400 μL del extracto de jamaica a diferentes concentraciones cubriendo en su totalidad todo el medio de cultivo, las cajas con el extracto se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 24 h, después de ese tiempo se colocaron 20 μL de esporas en las dos concentraciones antes mencionadas. Teniendo un testigo con PDA y agua destilada estéril.

Evaluación *in vitro* del efecto de los extractos sobre la inhibición de *Rhizopus*. Las cajas con *R. stolonifer* se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 25 °C. Se midió el diámetro del micelio con un vernier digital marca Mitutoyo 6"/150 mm cada 24 h hasta que el micelio del hongo cubriera en su totalidad la caja Petri. Durante el periodo de evaluación se realizaron observaciones en el microscopio binocular marca Labomed mod. LX400 para evaluar el desarrollo del esporangióforo y de los esporangios. El porcentaje de inhibición de los extractos de jamaica se determinó utilizando el diámetro total de crecimiento del testigo (placa de Petri con solo medio PDA) y el diámetro de crecimiento de cada concentración del extracto, calculado según lo informado por Zabka *et al.* (2011).

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{DC - DT}{DC} \right] \times 100$$

Donde:

DC: diámetro de la colonia del testigo.

DT: diámetro de la colonia de las diferentes concentraciones evaluadas.

Análisis estadístico. Para los datos del crecimiento del hongo (cm^{-1}) se realizó un modelo de regresión exponencial y una prueba de betas con $\alpha = 0.05$ y 0.01. Para los datos obtenidos del porcentaje de inhibición, se realizó un análisis factorial y una prueba de comparación de medias de Tukey con el programa SAS

versión 9.0. Para calcular la Concentración Mínima Inhibitoria, se realizó un análisis Probit con el programa SAS versión 9.0. Los valores de CMI₅₀ se calcularon y se asociaron con valores de Chi cuadrado estadísticamente significativos.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos de jamaica. En los cálices blancos de 'Alma blanca' no se ha reportado su uso sobre su capacidad fungistática en el crecimiento de *R. stolonifer*. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de *R. stolonifer* en función de las concentraciones de los extractos etanólicos de jamaica 'Alma blanca'. En el Cuadro 1 se observa que el hongo con la concentración menor de esporas (1×10^6 esporas·mL⁻¹) a una concentración del 6 % del extracto de jamaica 'Alma blanca', se inhibió su desarrollo. En contraste, en el Cuadro 2 se observa que con la concentración de esporas mayor (1×10^8 esporas·mL⁻¹) el hongo requirió de una concentración mayor (6.5 %) del extracto para inhibir su desarrollo. En la presente investigación se observó que la jamaica roja y blanca, tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizopus* en poscosecha.

Cuadro 1. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*.

Jamaica 'Alma blanca'	1 X 10 ⁶ esporas·mL ⁻¹ Diámetro de crecimiento (cm ⁻¹)										
	B ₀		Lim inf	Lim sup	t ₀	B ₁		Lim inf	Lim sup	t ₀	r ²
Testigo	3.11	a	2.28	3.94	92.47	-0.00466	a	-0.00612	-0.00321	0.12257	0.94
4.5 %	2.54	ab	1.86	3.23	24.59	-0.00541	ab	-0.00683	-0.00398	0.03108	0.95
5.0 %	2.40	bc	1.75	3.04	16.91	-0.00560	bc	-0.00702	-0.00418	0.00000	0.95
5.5 %	2.30	cd	1.69	2.90	47.90	-0.00560	cd	-0.00699	-0.00421	0.07608	0.95
6.0 %	2.03	de**	1.50	2.56	-16.68	-0.00602	de	-0.00739	-0.00466	-0.00592	0.96
6.5 %	2.12	de	1.50	2.73	363.73	-0.00599	de	-0.00751	-0.00448	-1.02941	0.95

Diferentes letras dentro de cada columna indican una diferencia significativa (* α = 0.05 y ** α = 0.01), n= 28 de acuerdo con la prueba de t de Student.

Cuadro 2. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*.

Jamaica 'Alma blanca'	1x10 ⁸ esporas·mL ⁻¹ Diámetro de crecimiento (cm ⁻¹)										
	B ₀		Lim inf	Lim sup	t ₀	B ₁		Lim inf	Lim sup	t ₀	r ²
Testigo	4.02	a	3.31	4.42	211.95	-0.00424	a	-0.00548	-0.00300	0.35908	0.97
4.5 %	2.42	ab	1.66	3.18	42.85	-0.00694	ab	-0.00899	-0.00488	0.10618	0.95
5.0 %	2.06	bc	1.39	2.72	44.96	-0.00785	bc	-0.00992	-0.00577	0.11652	0.95
5.5 %	1.69	cd	1.14	2.24	51.33	-0.00879	cd	-0.01080	-0.00676	0.12953	0.96
6.0 %	1.32	de	0.94	1.70	32.84	-0.00972	de	-0.01150	-0.00794	0.12596	0.97
6.5 %	1.15	ef**	0.86	1.43	268.95	-0.01040	ef	-0.01190	-0.00887	-2.43990	0.98

Diferentes letras dentro de cada columna indican una diferencia significativa (* $\alpha = 0.05$ y ** $\alpha = 0.01$), n= 22 de acuerdo con la prueba de t de Student.

Se ha reportado que los extractos de los cálices de jamaica roja (variedad Criolla de Oaxaca) tienen efecto antimicrobiano principalmente contra algunos tipos de microorganismos enteropatógenos como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia* y *Vibrio cholerae*, sin embargo, se desconoce que metabolitos son los que proporcionan esa actividad (Gómez-Aldapa *et al.* 2018, Morales-Cabrera *et al.* 2013).

Algunos estudios describen que uno de los compuestos que se ha encontrado en los extractos de jamaica blanca y roja, es el ácido clorogénico (Reyes-Luengas *et al.* 2015), el cual ha sido probado para el control de algunos hongos como son *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* y *Cercospora sojina*, con efectos como la anulación de la germinación, la reducción del crecimiento micelial, además de la lisis de algunas ascoesporas (Martínez *et al.* 2017).

Con las dosis de 6 y 6.5% del extracto de jamaica blanca, se registró un porcentaje de inhibición mayor durante un periodo de 216 horas en comparación con el testigo a las 120 horas (Cuadro 3). Para el caso de la jamaica roja en concentraciones similares (6%) obtuvo un porcentaje de inhibición mayor del extracto durante el mismo tiempo.

La actividad de los extractos también parece depender del disolvente empleado para la preparación de los extractos de jamaica, por la capacidad para extraer un perfil diferente de metabolitos o concentración. Morales-Cabrera *et al.* (2013), compararon los diámetros de inhibición de los extractos etanólicos y metanólicos

en una relación 1:9 de jamaica blanca 'Alma blanca' con los que reportó 98 y 70.80 % de inhibición respectivamente contra *Salmonella typhimurium* y 80.8 y 94.8 % respectivamente contra para *S. choleraesuis*.

En el presente estudio se observó que se requieren de concentraciones mayores de los extractos de jamaica roja y blanca para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* en un periodo corto de tiempo, en comparación con otros estudios, algunos de los factores que podrían afectar el contenido de los principales compuestos fenólicos que actúan directamente sobre la inhibición del hongo son, la variedad de la planta, el momento de cosecha, condiciones del cultivo (fertilización, plagas, enfermedades, edad de la planta, etc.), método de secado, los métodos de extracción, la polaridad de los disolventes (Morales-Cabrera *et al.* 2013).

Durante el presente estudio se realizaron observaciones del crecimiento del hongo y se pudo identificar que los extractos no solo inhibieron el crecimiento del hongo, sino que también retardaron el desarrollo de los esporangios durante un periodo de tiempo. Los esporangios son las estructuras que contienen las esporas que son las responsables de la dispersión de *Rhizopus*. Las esporas son estructuras importantes para la supervivencia y propagación del hongo, de igual forma la cantidad de esporas que el hongo dispersa es un factor que garantiza su rápida o lenta colonización (Dos Santos *et al.* 2012), por lo que al tener una menor concentración de éstas y la aplicación de agentes que inhiben la germinación, se disminuye la contaminación a otros frutos.

Baggio *et al.* (2016) evaluaron la germinación de esporas de *R. stolonifer* y observaron que estas producían mayores cantidades de esterillas que las esporas no germinadas en frutos de nectarinas; por lo que al retardar el desarrollo de esporangios con los extractos de jamaica, no se desarrollan las esporas.

Cuadro 3. Análisis factorial de extractos de jamaica en el porcentaje de inhibición de *Rhizopus stolonifer*

Variedad	Tiempo (h)	Dosis (%)						CV
		Testigo	4.5	5	5.5	6	6.5	
'Alma blanca'	24	66.45 b	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0
	48	44.79 d	64.58 c	71.87 b	73.96 b	78.12 ab	80.21 a	4.53
	72	21.45 c	43.75 b	48.96 b	55.21 ab	58.58 a	58.58 a	4.89
	96	12.50 c	32.29 b	37.50 b	43.75 ab	51.04 a	52.08 a	11.55
	120	0	22.92 c	22.92 c	26.04 b	35.41 ab	39.58 a	19.79
	144	0	16.66 c	17.70 c	20.83 bc	29.16 a	29.16 a	28.80
	168	0	4.16 d	6.25 c	9.37 b	19.79 a	14.58 ab	31.67
	192	0	0	2.06 b	8.31 a	8.31 a	6.23 a	22.91
	216	0	0	0	4.14 b	6.23 a	6.23 a	56.69
	240	0	0	0	0	0	0	-
'Sudán'	24	66.45 c	66.50 c	68.75 b	69.79 b	71.87 ab	80.45 a	3.84
	48	44.79 c	60.41 b	62.50 b	63.54 a	65.62 a	63.54 ab	4.64
	72	21.45 d	44.79 c	58.33 ab	57.29 b	59.37 a	57.28 b	5.90
	96	12.50 d	33.33 c	50.00 ab	48.96 b	53.12 a	47.91 b	6.20
	120	0	21.87 c	37.50 b	38.54 ab	41.66 a	34.37 b	11.50
	144	0	6.25 d	16.66 c	26.04 ab	29.16 a	25.00 b	29.39
	168	0	0	11.46 b	12.50 ab	18.75 a	5.21 c	14.08
	192	0	0	8.31 b	8.31 b	24.98 a	0	17.62
	216	0	0	0	4.14 b	8.31 a	0	0
	240	0	0	0	0	0	0	-

Valores por fila, con diferente letra, son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

No existe información del control de *Rhizopus* con extractos de jamaica, sin embargo, se encuentra reportada su actividad en otros hongos y bacterias enteropatógenas. Jabeur *et al.* (2019) probaron dos concentraciones del extracto hidroetanólico de jamaica roja en concentraciones 1 y 10 % en la inhibición de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum var. cyclopium*, pero observaron una mayor inhibición en otros microorganismos como *T. viridae* y *A. ochraceus*. En otro estudio, los autores evaluaron la actividad antimicrobiana mediante extractos etanólicos en diferentes concentraciones (2.5, 5.0, 10 y 20 %) contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en donde observaron mayor respuesta en la inhibición contra *S. aureus* (Jung *et al.* 2013).

Lo anterior sugiere que la actividad fungistática o bactericida de los extractos se ve influenciada por la pared celular de cada microorganismo; la pared celular de los hongos filamentosos está formada principalmente por polisacáridos, glicoproteínas, lípidos y quitina, mientras que en las bacterias gram positivas, la pared celular contiene una capa gruesa de peptidoglucano además de ácidos teicoicos y en las bacterias gram negativas la capa de peptidoglucano es delgada y se encuentra rodeada por una segunda membrana plasmática exterior, algunas bacterias poseen una capsula que las protege del ataque de agentes antibacterianos (Bugg *et al.* 2011).

En relación al extracto de cálices de jamaica roja 'Sudán', de acuerdo con los datos obtenidos se realizó un modelo de regresión exponencial y una prueba de t de Student, con la cual se observó que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de *R. stolonifer* en función de las concentraciones de los extractos etanólicos.

En el Cuadro 4 se observa que con la concentración de 1×10^6 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$, el hongo tuvo un crecimiento más lento por día y requirió de una concentración de 6% del extracto de jamaica roja 'Sudán' para inhibir su desarrollo y en el Cuadro 5 se observa que con la concentración de 1×10^8 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$, se requirió de una concentración de 6.5 % del extracto para inhibir su desarrollo.

Cuadro 4. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*.

Jamaica 'Sudán'	1x10 ⁶ esporas·mL ⁻¹ Diámetro de crecimiento (cm ⁻¹)									
	B ₀	Lim inf	Lim sup	t ₀	B ₁	Lim inf	Lim sup	t ₀	r ²	
Testigo	3.91 a	3.07	4.76	89.41	-0.00362 a	-0.00484	-0.00239	0.09590	0.96	
4.5 %	3.40 ab	2.76	4.03	290.00	-0.00417 ab	-0.00521	-0.00313	0.43028	0.97	
5.0 %	1.92 de	1.69	2.16	13.03	-0.00636 de	-0.00700	-0.00573	0.01720	0.99	
5.5 %	1.89 de	1.69	2.10	106.85	-0.00640 de	-0.00697	-0.00583	-0.10236	0.99	
6.0 %	1.67 ef**	1.56	1.79	-860.10	-0.00619 ef	-0.00691	-0.00620	-0.93480	0.99	
6.5 %	2.67 bc	2.30	3.03	838.25	-0.00511 bc	-0.00584	0.00438	-1.60675	0.98	

Diferentes letras dentro de cada columna indican una diferencia significativa (* α = 0.05 y ** α = 0.01), n= 28 de acuerdo con la prueba de t de Student.

Cuadro 5. Modelo de regresión exponencial de *Rhizopus stolonifer*.

Jamaica 'Sudán'	1x10 ⁸ esporas·mL ⁻¹ Diámetro de crecimiento (cm ⁻¹)										
	B ₀		Lim inf	Lim sup	t ₀	B ₁		Lim inf	Lim sup	t ₀	r ²
Testigo	4.74	a	4.00	5.47	311.12	-0.00372	a	-0.00500	-0.00245	0.47526	0.98
4.5 %	2.52	ef	2.10	2.94	-86.53	-0.00711	ef	-0.00837	-0.00584	-0.14912	0.98
5.0 %	2.96	bc	2.57	3.35	71.91	-0.00635	bc	-0.00735	-0.00535	0.14233	0.99
5.5 %	2.64	ce	2.24	3.04	35.73	-0.00698	ce	-0.00813	-0.00584	0.12358	0.99
6.0 %	2.47	ef	2.03	2.91	79.21	-0.00757	ef	-0.00885	-0.00618	0.19756	0.98
6.5 %	2.04	fg**	1.63	2.44	374.22	-0.00865	fg	-0.01010	-0.00720	-1.58847	0.98

Diferentes letras dentro de cada columna indican una diferencia significativa (* α = 0.05 y ** α = 0.01), n= 19 de acuerdo con la prueba de t de Student.

En algunos estudios se reportan concentraciones mayores de *H. sabdariffa* en comparación con la presente investigación, para inhibir el crecimiento de algunas bacterias como lo reportado por Zarkani (2016), quien probó extractos acuosos de *H. sabdariffa* en concentraciones de 25 y 50 % registrando una inhibición de 80 % en *Escherichia coli*, 51.98 % en *Staphylococcus aureus* y 35.6 % en *Pseudomonas aeruginosa*. Borrás-Linares et al. (2015) reportaron que los extractos etanólicos de jamaica roja 'Sudán' inhibieron *E. coli* en 50 %; sin embargo, no se describe en que concentración se aplicaron los extractos.

Hay pocos estudios reportados para el control de *Rhizopus*, sin embargo, existen estudios donde se probaron extractos de otras plantas para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* en los cuales se pueden observar las diferentes dosis con las que se obtiene determinada inhibición del hongo; por ejemplo, De León-Zapata et al. (2016), observaron que con una concentración de 0.4 % de los extractos acuosos de *Flourensia cernua* se obtuvo una inhibición de 67.40 % de *R. stolonifer*. John et al. (2016) probó altas concentraciones de extractos de hojas de *Vernonia amigdalina* y reportó que en concentraciones de 1.25, 2.5, 5.0 y 10 % se obtuvo un diámetro de inhibición de 4.50 mm (1.25 %) y hasta 10 mm (10 %) contra *R. stolonifer*.

Tijjani et al. (2019), obtuvieron que con extractos acuosos a 20% de *Ziziphus jujube* y *Diospyros mespiliformis*, lograron inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* en 32.59 y 57.10 % respectivamente, después de 10 días; Ngegba et al. (2018), probaron extractos acuosos de *Azadirachta indica*, *Tithonia diversifolia*,

Chromolaena odorata, a una concentración de 100% (p/v) y se obtuvo una inhibición del 64.7, 60.5 y 63.6 % respectivamente. Los diversos resultados publicados permiten observar que la presencia de metabolitos secundarios de diferente naturaleza química (polaridad, solubilidad, interacción con membranas) explican su efecto diferencial con cada tipo de microorganismo (bacterias y hongos) (Al-Hashimi 2012, Amyrgialaki *et al.* 2014, Capriotti *et al.* 2014).

Concentración mínima inhibitoria. Los resultados de la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de jamaica demostraron que la concentración mínima que se requiere para inhibir al hongo a las 144 h de incubación fue de 7.2 % para la jamaica roja con una concentración de 1×10^6 esporas·mL⁻¹ y de 8.13 % para la jamaica blanca con una concentración de 1×10^6 esporas·mL⁻¹ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración CIM₅₀ para inhibir el crecimiento a 72 h y 144 h de incubación.

Extractos	72 h				144 h			
	CMI ₅₀ (%)	95% Límites fiduciales		Chi ^a	CMI ₅₀ (%)	95% Límites fiduciales		Chi ^a
		Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Sudán 1×10^8	5.32	4.24	6.50	18.11	7.07	6.48	10.87	13.16
Sudán 1×10^6	4.29	-2082.75	9.83	7.71	7.25	-	-	4.72
Blanca 1×10^8	4.49	4.04	4.91	77.29	7.25	6.79	8.16	30.87
Blanca 1×10^6	7.29	5.21	50.51	4.34	8.13	6.60	23.86	10.75

Valor de Chi-cuadrado, significativo a nivel $p < 0.05$.

Dwivedi *et al.* (2020), determinó que la CMI₅₀ del extracto crudo de *H. sabdariffa* preparado en DMSO fue 0.15 % contra *Candida albicans*. Salami y Afolayan (2020), evaluaron extractos etanólicos de jamaica verde y roja, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.125 % del extracto de jamaica verde contra *Streptococcus pyogenes* y 0.25 % contra *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Psuedomonas aeruginosa* y con los extractos de jamaica roja se obtuvo una CMI de 0.125 % contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y de 0.25 % contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus* y *Psuedomonas aeruginosa*. En otro estudio (Abdallah 2016) se evaluaron extractos metanólicos de *H. sabdariffa* contra *Acinetobacter baumannii* y se obtuvo una concentración

mínima inhibitoria de 2.5 y 5.0 %. Alshami y Alharbi (2014) determinaron una concentración mínima inhibitoria de 0.2 y 0.1 % del extracto metanólico de *H. sabdariffa* contra *Candida albicans*.

Otros factores que explican las variaciones de los efectos en la concentración mínima inhibitoria son: a) las concentraciones de los metabolitos en los extractos, b) la polaridad del disolvente del proceso de extracción, c) características genéticas, condiciones edafoclimáticas del cultivo, etapas fenológicas (edad, estado de crecimiento), variación estacional, condiciones ambientales en las que se cultivó la planta y momento del corte (Silva *et al.* 2012).

4.6 CONCLUSIONES

Este estudio demostró que los extractos de *Hibiscus sabdariffa* ('Sudán' y 'Alma blanca') podrían usarse como fungistáticos potenciales en el control de *Rhizopus stolonifer*. El uso de extractos de jamaica para el control de enfermedades poscosecha de vegetales minimiza el riesgo de los fungicidas tóxicos. Se observó un efecto fungistático a una dosis de 6% de los extractos de jamaica, con una concentración de 1×10^6 esporas $\cdot$ mL⁻¹. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre variedades para el control de *Rhizopus*.

4.7 LITERATURA CITADA

- Abdallah, E. M. (2016). Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Acute Disease*, 5(6), 512-516.
- Al-Hashimi, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), 506-511.
- Alshami, I., & Alharbi, A. E. (2014). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of *Candida albicans* isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 104-108.
- Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., & Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59, 216-222.

- Ariza Flores, R., Serrano Altamirano, V., Michel Aceves, A. C., Barrios Ayala, A., Otero Sánchez, M. A., Avendaño Arrazate, C. H., & Noriega Cantú, D. H. (2017). Características bioquímicas y calidad nutracéutica de cinco variedades de jamaica cultivadas en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(2), 269-280.
- Ariza-Flores, R., Serrano-Altamirano, V., Navarro-Galindo, S., Ovando-Cruz, M. E., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., ... & Otero-Sánchez, M. A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'Alma Blanca' y 'Rosalíz' de color claro, y 'Cotzaltzin' y 'Tecoanapa' de color rojo. *Revista fitotecnica mexicana*, 37(2), 181-185.
- Baggio, J. S., Gonçalves, F. P., Lourenço, S. A., Tanaka, F. A. O., Pascholati, S. F., & Amorim, L. (2016). Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. *Plant Pathology*, 65(4), 633-642.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., & Barrera-Necha, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (soft rot). In *Postharvest decay* (pp. 1-44). Academic Press.
- Bautista-Baños, S., Velaquez-Del Valle, M. G., Hernandez-Lauzardoa, A. N., & Barka, E. A. (2008). 12 The *Rhizopus stolonifer*-Tomato interaction.
- Bautista-Baños, S., Velaquez-Del Valle, M. G., Hernandez-Lauzardoa, A. N., & Barka, E. A. (2008). The *rhizopus stolonifer*-tomato interaction. In: Ait Barka E, Clément C (ed) *Plant-Microbe Interactions*. Kerala, India pp: 269–289.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports*, 28(12), 1883-1896.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2014). Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food chemistry*, 158, 392-400.
- De León-Zapata, M. A., Pastrana-Castro, L., Rua-Rodríguez, M. L., Alvarez-Pérez, O. B., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi. *Food chemistry*, 198, 62-67.
- Dos Santos, N. S. T., Aguiar, A. J. A. A., de Oliveira, C. E. V., de Sales, C. V., e Silva, S. D. M., da Silva, R. S., ... & de Souza, E. L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food microbiology*, 32(2), 345-353.
- Dwivedi, M., Muralidhar, S., & Saluja, D. (2020). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits adhesion, biofilm initiation and formation in *Candida albicans*. *Indian journal of microbiology*, 60(1), 96-106.
- Fundación Produce de Guerrero, A. C. (2012). Agenda de innovación. Guerrero. pp: 76-85.

- Garbi, M. I., Saleh, M. S., Badri, A. M., Ibrahim, T. I., Mohammed, S. F., Alhassan, M. S., ... & Kabbashi, A. S. (2016). Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of *Hibiscus sabdariffa* (calyx). *Journal of Advancement in Medicinal Plant Research*, 4(4), 116-121.
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M. R., Villarruel-López, A., Acevedo-Sandoval, O. A., Gordillo-Martínez, A. J., ... & Castro-Rosas, J. (2018). Antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* extracts and chemical sanitizers directly on green leaves contaminated with foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 81(2), 209-217.
- Jabeur, I., Pereira, E., Caleja, C., Calhelha, R. C., Soković, M., Catarino, L., ... & Ferreira, I. C. (2019). Exploring the chemical and bioactive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces from Guinea-Bissau (West Africa). *Food & function*, 10(4), 2234-2243.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- John, W. C., Anyanwu, N. C. J., & Ayisa, T. (2016). Evaluation of the effects of the extract of *Vernonia amygdalina* on fungi associated with infected tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in Jos North Local Government Area, Plateau State, Nigeria. *Annual Research & Review in Biology*, 1-8.
- Jung, E., Kim, Y., & Joo, N. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3769-3776.
- Kamal, A. S., Hussein, H. J., & Tolaifeh, Z. A. (2019). Antibacterial potential of *Hibiscus sabdariffa* L. against some Enterobacteriaceae: in vitro. *Biochemical and cellular archives*, 19(2), 4291-4294.
- Li, G., Wang, X., Xu, Y., Zhang, B., & Xia, X. (2014). Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *European food research and technology*, 238(4), 589-596.
- Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., & de la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 30-35.
- Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Soto-Rojas, L., & Castro-Rosas, J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(31), 2319-2322.
- Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I. F., Salgado, L. M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 596-605.
- Ngegba, P. M., Kanneh, S. M., Bayon, M. S., Ndoko, E. J., & Musa, P. D. (2018). Fungicidal effect of three plants extracts in control of four phytopathogenic

- fungi of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) fruit rot. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(1), 239044.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I., & Martínez-Peña, M. D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49(3), 277-290.
- Salami, S. O., & Afolayan, A. J. (2020). Assessment of Antimicrobial Activities and Toxicological Effects of Green and Red Cultivars of Roselle-Hibiscus sabdariffa L. *European Journal of Medicinal Plants*, 31, 11-22.
- Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Serrano-Altamirano, V., & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 18(3), 395-407.
- Serrano, A. V., Navarro, G. S., Guzmán, M. S. H., Ariza, F. R., & Herrera, H. G. (2011). Descripción varietal de: Alma Blanca, Cotzaltzin, Rosalíz y Tecuanapa, primeras variedades de jamaica registradas en México. *INIFAP, CIRPAS, Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Folleto técnico*, (35).
- Shen, C. Y., Zhang, T. T., Zhang, W. L., & Jiang, J. G. (2016). Anti-inflammatory activities of essential oil isolated from the calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. *Food & function*, 7(10), 4451-4459.
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019). Reporte módulo agrícola (Jamaica). Fecha de consulta el 5 de mayo del 2021.
- Silva, M. P., Piazza, L. A., López, D., Rivilli, M. J. L., Turco, M. D., Cantero, J. J., ... & Scopel, A. L. (2012). Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (–)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry*, 77, 140-148.
- Tijjani, A., Usman, G. U., Gurama, A. U., Babura, S. R., Aliyu, M., & Adamu, A. D. (2019). Fungicidal activity of crude extracts from some indigenous medicinal plants against *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* causing wet rot disease on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1), 12-18.
- Xavier, L., Freire, M. S., Vidal-Tato, I., & González-Álvarez, J. (2015). Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from Eucalyptus wood. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 17(2), 345-354.
- Yang, X., & Jiang, X. (2015). Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology letters*, 37(7), 1463-1472.
- Zarkani, A. A. (2016). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Sesbania grandiflora* extracts against some G–ve and G+ ve strains. *Banats J Biotechnol*, 7(13), 17-23.