



Synthesis of a 45S5 bioactive glass cementitious resin bonded composite material for orthodontic applications

Magallanes-López, E.A., Rodríguez-González, C.A., Morfín-Chavarría, L., Hernández-Paz, J.F., Chavarría-Gaytán, M.C., Sáenz-Villela, J.M., Olivas-Armendáriz, I.

Aprovechamiento de subproductos de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) para la elaboración de harina aplicando diferentes condiciones térmicas

Alatríste-Pérez, I., Contreras-Oliva, A., Salinas-Ruiz, J., Herrera-Corredor, J. A., Hidalgo-Contreras, J.V., Rustrián-Portilla, E., Rodríguez-Alcalá, O.

Extractos de semilla y cáscara de guanábana (*Annona muricata* L.): evaluación fitoquímica

Hernández-Guerrero, S.E., López-Guzmán, G.G., Balois-Morales, R., De los Santos-Santos, M.A., Chavarín-Pérez, V., Magaña-Cervantes, M.G., Vázquez-Martínez, K.G.

In vitro* antifungal activity of *Lippia graveolens* and *Viscum album* ethanolic extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici

Tucuch-Pérez, M.A., Hernández-Castillo, F.D., Arredondo-Valdés, R., Barrera-Martínez, C.L., Anguiano-Cabello, J.C., Laredo-Alcalá, E.I.

Evaluación del índice glicémico *in vitro* e *in vivo* de yogurt funcional de leche de cabra adicionado con *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana*

Enriquez, M., Cruz, M., Rodríguez-Jasso, R.M., Flores, M., Garza, A., Belmares, R.

Cintillo Legal

RIIT REVISTA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA, Vol. 12, No. 69. Julio - Agosto 2024, es una publicación bimestral editada y publicada por Universidad Autónoma de Coahuila, boulevard Venustiano Carranza s/n colonia República Oriente, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, Tel. (844) 414 85 82, <https://riit.com.mx/>, correo electrónico: publicacionesriit@uadec.edu.mx. Editor responsable: Dra. Antonia Mtz. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-021512364600-102, ISSN: 2007-9753, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Departamento de Divulgación y Comunicación Digital de la Dirección de Investigación y Posgrado de la UAdeC, Q.F.B. Fernando García, Edificio “D” planta alta, unidad Camporredondo, Saltillo, Coahuila, C.P. 25280, Tel. (844) 414 85 82, fecha de última modificación: 01 Julio 2024.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de Universidad Autónoma de Coahuila.

Tabla de Contenido

Título artículo/ Autores	Páginas
Synthesis of a 45S5 bioactive glass cementitious resin bonded composite material for orthodontic applications Magallanes-López, E.A., Rodríguez-González, C.A., Morfín-Chavarría, L., Hernández-Paz, J.F., Chavarría-Gaytán, M.C., Sáenz-Villela, J.M., Olivas-Armendáriz, I.	1 – 11
Aprovechamiento de subproductos de limón persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) para la elaboración de harina aplicando diferentes condiciones térmicas Alatríste-Pérez, I., Contreras-Oliva, A., Salinas-Ruiz, J., Herrera-Corredor, J.A., Hidalgo-Contreras, J.V., Rustrián-Portilla, E., Rodríguez-Alcalá, O.	12 – 29
Extractos de semilla y cáscara de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.): evaluación fitoquímica Hernández-Guerrero, S.E., López-Guzmán, G.G., Balois-Morales, R., De los Santos-Santos, M.A., Chavarín-Pérez, V., Magaña-Cervantes, M.G., Vázquez-Martínez, K.G.	30 – 43
<i>In vitro</i> antifungal activity of <i>Lippia graveolens</i> and <i>Viscum album</i> ethanolic extracts against <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Tucuch-Pérez, M.A., Hernández-Castillo, F.D., Arredondo-Valdés, R., Barrera-Martínez, C.L., Anguiano-Cabello, J.C., Laredo-Alcalá, E.I.	44 – 58
Evaluación del índice glicémico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de yogurt funcional de leche de cabra adicionado con <i>Aloe vera</i> y <i>Stevia rebaudiana</i> Enriquez, M., Cruz, M., Rodríguez-Jasso, R.M., Flores, M., Garza, A., Belmares, R.	59 - 72



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Synthesis of a 45S5 bioactive glass cementitious resin bonded composite material for orthodontic applications

Síntesis de un material compuesto de resina cementante con vidrio bioactivo 45S5 para aplicaciones de ortodoncia

Magallanes-López, E.A.^a, Rodríguez-González, C.A.^a, Morfín-Chavarría, L.^b, Hernández-Paz, J.F.^a, Chavarría-Gaytán, M.C.^a, Sáenz-Villela, J.M.^a, Olivas-Armendáriz, I.^{a*}

^a Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ingeniería y Tecnología, Ave. Del Charro #610 norte, Col. Partido Romero, C.P. 32320 Cd. Juárez, Chihuahua, México.

^b Neo-Odontología Moderna, Colombia No. 820 Sur, el Barreal, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.
enrique.lopez@uacj.mx; claudia.rodriguez@uacj.mx; juan.hernandez.paz@uacj.mx; morfín_drum@hotmail.com; cchava@uacj.mx; iolivas@uacj.mx*

Technological Innovation: Composite material suitable for adhesive bonding in orthodontic applications.

Industrial application area: Orthodontics.

Received: february 02th, 2024

Accepted: may 23th, 2024

Resumen

Se obtuvo un material compuesto base vidrio bioactivo 45S5 y resina comercial cementante para aplicaciones de ortodoncia, tomando como control dos resinas comerciales. La síntesis del vidrio bioactivo se realizó mediante sol-gel, estabilizando el gel seco por medio de la asistencia de microondas durante 6 minutos, obteniendo un material amorfo con buena estabilidad dimensional y transparente. Se preparó un material compuesto por resina cementante Transbond y 8% de vidrio bioactivo 45S5. El material se sometió a pruebas de degradación para determinar el efecto de la saliva artificial en la degradación del material durante un mes. La degradación de las muestras se analizó mediante SEM/EDS y variaciones de pH del fluido. La bioactividad de los compuestos se llevó a cabo exponiendo el material a fluido fisiológico simulado (SBF), encontrando la formación de capas de apatita biológica en la superficie de los materiales. Las propiedades mecánicas del material se analizaron uniéndolos los brackets con el material compuesto a las piezas dentales de

humanos previamente preservadas y se midió la resistencia al corte y el esfuerzo de tensión de la interfaz diente-resina. Los análisis se realizaron por triplicado. Los datos de la prueba mecánica se analizaron mediante el análisis estadístico ANOVA. Encontrando que el material compuesto sintetizado exhibe mejores propiedades de bioactividad, mecánicas y de degradación en comparación con las resinas comerciales.

Palabras clave: Material compuesto, Vidrio bioactivo, Resina cementante, Ortodoncia.

Abstract

A composite material based on 45S5 bioactive glass and commercial cementitious resin for orthodontic applications, was obtained, taking two commercial resins as control. The bioactive glass was synthesized using sol-gel and stabilizing the dry gel using microwave assistance for 6 minutes, obtaining an amorphous material with good dimensional stability and transparency. A composite material was prepared using Transbond cementitious resin and 8% 45S5 bioactive glass. The resulting composite was subjected to degradation tests to determine the effect of artificial saliva on this material degradation over a period of one month. Sample composite degradation and the fluid pH variations were analyzed via SEM/EDS. Composite bioactivity was determined by exposing the material to simulated physiological fluid (SBF), showing the formation of biological apatite layers on the materials' surface. The composite's mechanical properties were analyzed by adhering the brackets with the composite material to previously preserved human dental pieces and the shear strength of the composite was determined along with the tension strength between the resin teeth interface. Analyzes were performed by triplicate. A Statistical ANOVA analysis was performed to determine significant mechanical test results. These data showed that the synthesized composite material exhibited better bioactivity, mechanical and degradational properties compared to the commercial resins.

Keywords: Composite material, Bioactive glass, Cementitious resin, Orthodontics.

Introduction

In medicine, odontology uses materials to repair or replace dental pieces. A branch of odontology is orthodontics, which deals with teeth alignment using metal brackets that are fixed with adhesives to ensure correct treatment.

Even considering the advances in the materials used in orthodontics, these still show a significant disadvantage: the surface of the teeth have to be abraded to apply orthodontics adhesives to fix the brackets in place, which has been shown to develop

caries or white or brown stains (Al et al., 2011; Seyhan-Cezairli et al., 2019) which are caused by organic acids generated by bacteria during treatment (Gao et al; 2023). According to a 2011 study by Al, a sample of 230 patients was taken to verify the incidence of caries and stains. This study found that approximately 70% s had developed these problems. Factors such as treatment duration, oral hygiene, overall health, and even the patient's gender would be contributing factors to these problems (Al et al., 2011). Another reported problem in the literature is the demineralization of dental enamel (Gao et al;

2023), mainly in the bracket area. This problem appears in the abraded surfaces created to apply the bracket adhesive, which can foster the growth of oral microorganisms such as *Streptococcus mutans* (SM) (Seyhan-Cezairli et al., 2019).

Currently, resin-based compounds, such as methylmethacrylate and polymethylmethacrylate polymer resins, are used as adhesives and restoring materials (Zafar, 2020). These resins are classified as acrylic and compound, showing desirable advantages such as stronger adhesion and better aesthetic presentation (Vallittu et al; 2015). However, they also have some disadvantages, such as polymerization contraction, stress at the tooth-restoration interface, and potential damage to the skin or eyes as they are light-cured by UV light. The resins contribute nothing to stop bacterial growth.

Degrazia and Leitune found an alternative in 2016 (Degrazia et al., 2016); they modified the existing adhesives by adding external agents to improve their properties and reduce their deficiencies. They proposed using silver nanoparticles (AgNP) in concentrations of 0%, 0.11%, 0.18%, and 0.33%, dissolved in distilled water to improve particle distribution in Transbond XT Primer, a commercial adhesive. Their results show a decrease in SM growth in the case of 0.11% and 0.18% concentration. Also, the study found that the shear stress is affected in the case of 0.33% concentration. In addition, using silver nanoparticles reduces the resin's toxicity compared with other agents such as gold and zinc. Current efforts are dedicated to developing materials with better mechanical, adhesive, and antibacterial properties. One such proposal is the use of biomaterials such as glass ionomer cements (GIC) (5) and bioactive glasses (Kim et al., 2021).

Glass ionomer cements (GIC) are made from calcium fluoraluminumsilicate powder and a liquid mixture of 50% polyacrylic acid and 50% water (Vallittu et al; 2015). This material shows three advantages: biocompatibility, anticarcinogenic action, and a specific adhesion to the enamel and dentine. These advantages are obtained by conditioning the dental tissue with 10% polyacrylic acid. On the other hand, the widely commercialized bioactive glass 45S5 is composed of 46.1 mol% of SiO_2 , 24.4 mol% Na_2O , 26.9 mol% of CaO , and 2.6 mol% of P_2O_5 (Manafi et al., 2019). Given the fluoride and calcium ion liberation generated by prolonged contact with bodily fluids, this bioactive glass hosts better bioactive properties than GIC. Bioactive glass also shows better mechanical properties, such as a improved adhesion in the resin-tooth interface and antibacterial properties (Pirayesh, 2010).

For the reasons above, this research centers on preparing and characterizing orthodontic adhesives containing 45S5 bioactive glass in their composition.

Materials and methods

The synthesis of the bioactive glass was prepared following the method reported by Pirayesh (Kokubo and Takadama, 2006) by preparing a solution of nitric acid and water. Then, 33.5 mL of tetraorthosilicate was added. The reaction in the solution occurred for one hour under agitation to favor hydrolysis. After agitation, the following reagents were added in order: 2.9 ml of tetraethyl phosphate, 20.13 gr calcium nitrate, 4 mL water, and 13.52 g sodium nitrate. Between each reagent, intervals of 45 minutes under agitation elapsed until a transparent sol was obtained. The gelation process took five days, during which the solution was placed in a closed container at ambient temperature. Once the gel was obtained, it was aged in a closed container for one day at 70 °C. The

aged gel was then dried at 120 °C for one day. Finally, to stabilize the glass, a microwave oven was used, in which the glass was exposed to microwave radiation for 6 minutes to eliminate residual and saline nitrates and other undesirable compounds. Once the 45S5 bioactive glass was obtained, it was crushed in a mortar.

Samples of size 3 x 3 x 2 mm were prepared for the Transbond™ XT and ACTIVA BioACTIVE-BASE/LINER brand resins, which were the control resins marked as Transbond and ACTIVA, respectively. A compound was prepared with the Transbond™ XT resin by mixing it with the 8% in weight of the 45S5 bioactive glass powder. This compound was marked as Transbond45. The samples were photocured using an RTA MINIS halogen light lamp for 5 seconds to initiate the polymerization process and then for 20 seconds to complete the light curing process. Then, the samples were weighed, and as well as the Petri dishes and 2 mL tubes (used as containers), were UV sterilized.

VIARDENER artificial saliva was used in the degradation test. The samples were weighed and placed in test tubes containing 5 ml of the

artificial saliva. The tubes were placed in an ECOSHEL incubator at 37 °C for four weeks.

In each of the four weeks, three samples of each resin were taken, washed with distilled water, dried, and weighed. Images of the samples were taken with a HITASHI scanning electron microscope, and the pH of the saliva was registered with a HANNA HI4221 potentiometer. The artificial saliva was replaced in the samples each week.

The sample preparation for the tensile and shear resistance tests was performed with ASTM D412. First, test tubes were prepared using COMEX epoxy on which the teeth were placed to be subjected to the universal machine loads. For the tensile resistance at the resin-tooth interface measurements, three test tubes were given a rectangular form, each with cavities in which three teeth were placed in horizontal positions and covered with the epoxy but leaving an exposed and accessible area in which the bracket was placed, as shown in Fig. 1A1. The test tubes used in the shear resistance test were also made of the epoxy and with a small perforation in which the teeth were placed in a vertical position. The teeth were covered up to the root by the epoxy to fix them in the test tubes, as shown in Fig. 1B1.

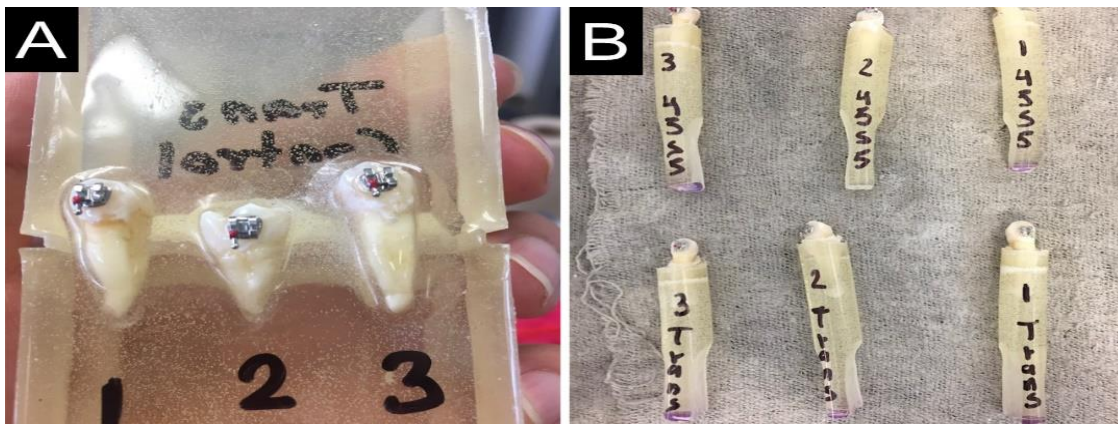


Figure 1. Teeth prepared for tensile test (A) and teeth prepared for shear strength test (B).

The stainless-steel brackets were adhered with the Transbond and ACTIVA cementing resins and were labeled as controls 1 and 2. The Transbond45 resin was identified as Experiment 1. All test tubes were stored for 24 hours before the tests were initiated. The shear resistance tests were performed with a Sintech 20/D universal machine at an approach speed of 0.5 mm/min at a 500 N pressure, following ISO 29022:2013.

The tensile resistance measurement was made by applying a tensile force using a 12 stainless steel orthodontics cable tied to the bracket flaps. The cable was pulled upwards at 90° angle with respect to the tooth-resin interface, while the epoxy test tubes were maintained in a horizontal position. An approach of 0.5 mm/min was used.

The simulated body fluid (SBF) used in the bioactivity tests was recreated following the method proposed by Kokubo and Takadama (Kokubo and Takadama, 2006). Samples of 2 x 2x 3 mm were three times exposed to the SBF solution for 3, 7, 14, and 21 days and placed in the ECOSHEL incubator at 37 °C. Three samples were taken and observed by SEM/EDS each week with a HITASHI SU5000. Infrared spectra were also obtained. The chemical analysis was performed on a Nicolet 6700 spectrophotometer in the 500-3000 cm⁻¹ region, with 16 cm⁻¹ resolution.

Results and discussion

Figure 2 shows SEM images and their respective EDS for each resin and compound material subjected to degradation tests in

artificial saliva for 28 days. Figures 2A1 and 2C1 show the morphology of the Transbond resin before and after its exposure to the artificial saliva. These images show particle sizes between 2.3 and 2.3 µm, which can be attributed to silicon before the exposure. Figures 2A2 and 2C2 show the images of the ACTIVA resin, with particle sizes between 1.5 and 2 µm. In both cases, the size of the crystals is maintained. These results suggest a slow resin degradation. On the other hand, the particle size of the Transbond45 compound material shows an average particle size of 1.64 µm during the period investigated. However, the arrangement and distribution (compared to the resins) are due to the mechanical mixing of the bioactive glass, diminishing the size of the larger crystals.

The EDS spectra of the Transbond resin (2B1) show the presence of Si, which is the main component of the resin, and also of C and O, which can be attributed to polymers such as polyethylene glycol dimethacrylate, bisphenol A diglycidyl ether dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate, which are used as adhesives in their composition. The EDS images of the ACTIVA resin show the presence of Si, Ba, P, and Ca, which are attributed to its composition: a mixture of diurethane and methacrylates with modified polyacrylic acid which contains amorphous silica and sodium fluoride (Vouzara et al; 2020; Pulpdent, 2019). The EDS of the compound material (2B3) shows the components of the Transbond resin along with the increment of the presence of O and C, attributed to the bioactive glass.

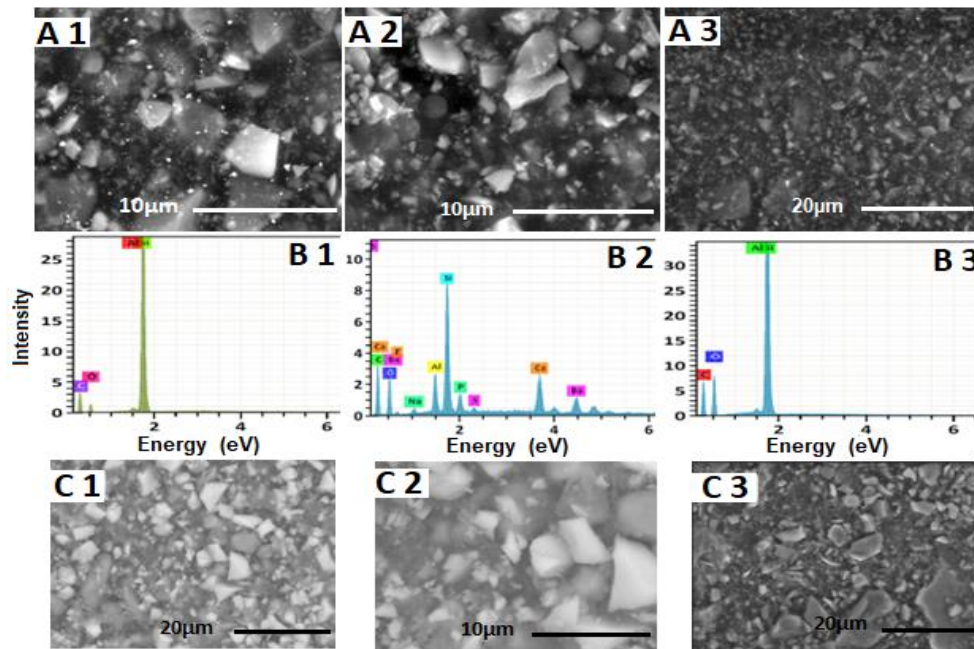


Figure 2. SEM and EDS of the compound material a 0 (A) and 28 (C) days after exposure to artificial saliva. A1 and C1 are the SEM images, and B2 is the EDS image of the Transbond resin. A2 and C2 are the SEM images, and B2 is the EDS image of the ACTIVA resin. Finally, A3 and C3 are the SEM images, and B3 is the EDS image of the compound material Transbond45.

The percentages of weight loss for different periods are shown in Fig. 3A. The Transbond resin retains its initial weight for the first two weeks and loses between 2 and 4 % of its total weight. The ACTIVA resin lost about 5% of its initial weight during the first week, which was maintained for the rest of the study, making it the one that lost more weight. In contrast, the Transbond45 resin kept its initial weight and average particle size of 1.64 μm , which suggests that this material is the most stable and that adding bioactive glass to the resins impacts on the degradation of the material.

Figure 3B shows pH variations in the artificial saliva where the samples were placed during the degradation analysis. The initial pH value was 7.4, which increased to 7.9 after the first week. After that, the pH stabilized between 7.5 and 7.6 for the Transbond resin and the Transbond45 compound. This pH behavior is typical for this type of resin, which tends to have a higher

pH during the first days then settles down. The pH behavior results from the ion exchange between the material and the fluids (Bauer, 2019). Also, Fig. 2 shows that the Transbond45 sample with bioactive glass behaves similarly to the Transbond resin, keeping a stable pH. These results support the orthodontics application of the material, as studies have shown that in an acidic environment, low pH fosters caries development (Barrios et al; 2017), besides leading to rapid and gradual decomposition of the material during orthodontic treatment. One could think that a neutral pH is sufficient to prevent degradation, along with low salt content and adequate body temperature. However, material degradation can happen by many mechanisms in which by products of degradation can be liberated, altering the local pH and stimulating additional reactions, along with continuous or cyclic tension, which can produce abrasion or deformation of the adhesives (Silva et al; 2023).

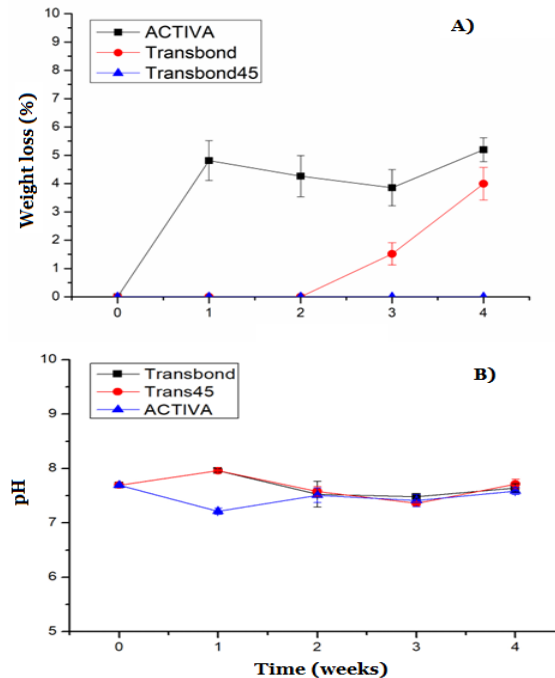


Figure 3. Weight loss and pH behavior of Transbond, Transbond45, and ACTIVA cementing resin solutions.

Figure 4 shows the results of the tensile and shear resistance tests before the brackets were detached from the teeth. The results of these mechanical properties are essential, given that the adhesion of the brackets to the surface of the dental piece is a basic procedure during orthodontic treatment. The adhesion should fix the orthodontic anchors in place, preventing undesirable effects that could harm the enamel surface (Nawrocka et al; 2023).

Figure 4A shows that the compound material Transbond45 had greater resistance to tension than the Transbond and ACTIVA resins. In the cross-section tension test, the Transbond45 resin withstood a maximum load of more than 6.1 MPa before rupture. Also, the shear resistance test (Fig. 4B) aimed to reproduce various dynamics of mandibular mechanics. The test found no significant differences (between 29 and 42 MPa) in the compound resin Transbond45, Transbond, and ACTIVA. Furthermore, all resins show adequate adherence as required in orthodontic procedures (Seyhan-Cezairli et al., 2019).

Figure 4C shows the Young's modulus or elastic modulus of the materials. A significant difference can be observed in the resistance to deformation in the compound material (45 MPa) and the other resins (11 and 27 MPa). The results obtained for the shear modulus (Figure 4D) show no significant difference in the shear resistance of the adhesives and the compound material, as the materials required the same load to break the bond between the dental piece and the brackets by applying antiparallel forces. These results indicate that adding bioactive glass to the Transbond resin modified its Young modulus, having a tensile resistance of approximately 6 MPa. According to Ariztizabal (Skallevold et al; 2019), adhesives that exceed 9.7 MPa would damage the enamel, and at 14 MPa or more, the enamel can fracture or detached. These results agree with other research; using filler particles for a resin improves mechanical properties (Seyhan-Cezairli et al., 2019; Profeta and Prucher, 2014).

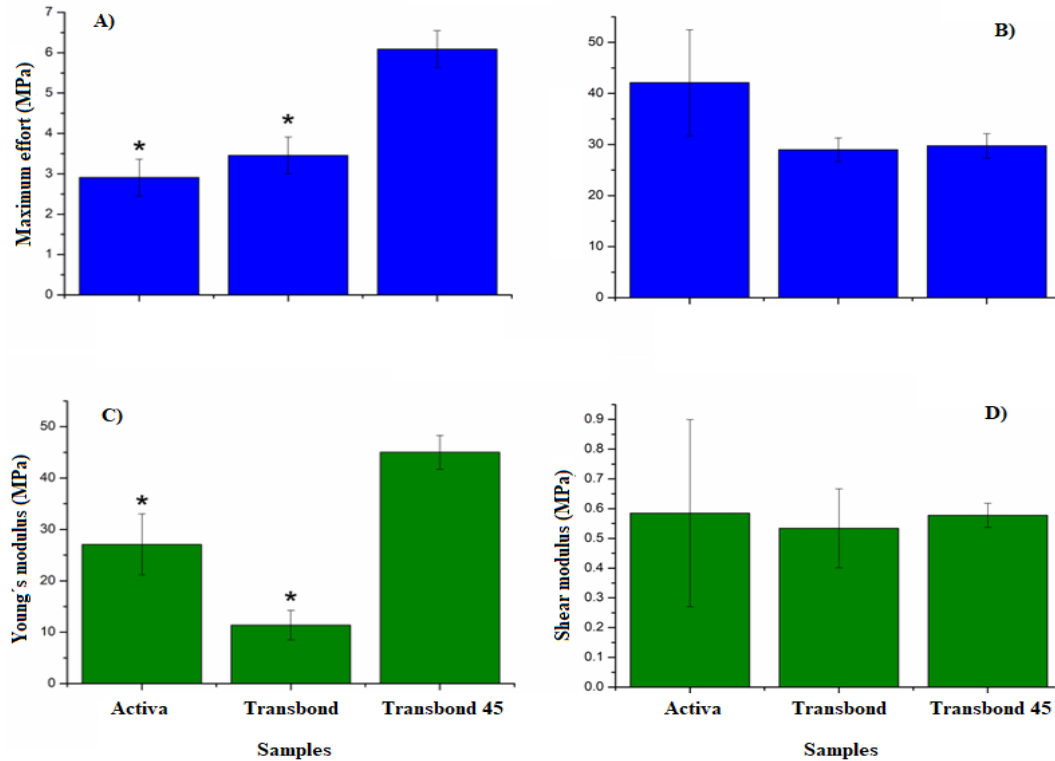


Figure 4. A) Maximum stress registered before yielding of the resin and composite material by the tensile load. * Significant difference for the Transbond45 with $p=0.0005$ and 0.0001 . B) Maximum stress registered before yielding of the resins and compound material by the shear load. No significant difference between the resins is observed ($p=0.0751$). C) Young's modulus of the resins and compound material. * A significant difference can be observed in the Transbond sample with $p=0.0051$. D) Shear modulus obtained for the resins and compound material. No significant difference is observed between the resins ($p=0.9394$).

In the assessment of the amount of residual resins on the dental surface, the Adhesive Remnant Index (RAI) was found. This index is of relevance in clinical studies. Its value is scaled as follows: 0 denotes the absence of adhesive residual on the dental piece, 1 indicates 50% of adhesive residual on the dental piece, 2 means that 50% or more of the adhesive remains on the dental piece, and 3 indicates that 100% of the adhesive remains attached to the dental piece (Alsamak et al., 2023).

Figure 5 shows the images of the brackets and dental pieces after detachment. Some adhesive remains are still attached to the bracket base and the tooth. As shown in Figure 5 (A and B) of the Transbond resin, there is an acceptable resin-tooth interface, but this is different for the resin-bracket

interface. From these observations, the ARI index would be 3, which explains the prompt detachment from the bracket, as the statistical analysis shows. Figures 5 C, D, and F show stronger interfaces for the ACTIVA and Transbond45 resins, as they show evidence of adhesion both in the bracket and to the tooth surface, which places them at 1 on the ARI scale. From the statistical data and the images shown, it can be deduced that adding the 45S5 bioactive glass improves the tensile and shear resistances and the ARI of the Transbond resin by reinforcing the resin's inorganic matrix with particles of varying sizes. A lower ARI means that at the end of the orthodontic treatment, the orthodontist should have few problems removing the remaining adhesive from the dental pieces, producing little to no damage to the enamel.

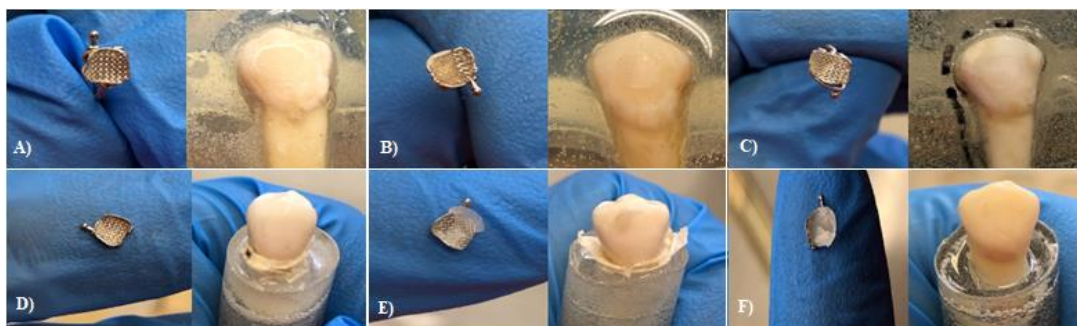


Figure 5. Bracket and dental piece images after detachment. A) Tensile load in the Transbond resin. B) Shear load in the Transbond resin. C) Tensile load in the Transbond45 compound material. D) Shear load in the Transbond45 compound material. E) Tensile load in the ACTIVA resin, and F) Shear load in the ACTIVA resin.

Figure 6 shows the SEM and EDS images for the 21 days during which the samples were exposed to the SBF. These images show the deposition of the biological hydroxyapatite layer on the surface of the material and its increment with time. The layer shows a morphology similar to that of coral. The

ACTIVA resin completely covers the surface, while the Transbond and Transbond45 exhibit less surface coverage. The EDS analysis shows the presence of P and Ca, which are characteristic of forming a hydroxyapatite layer in bioactive materials.

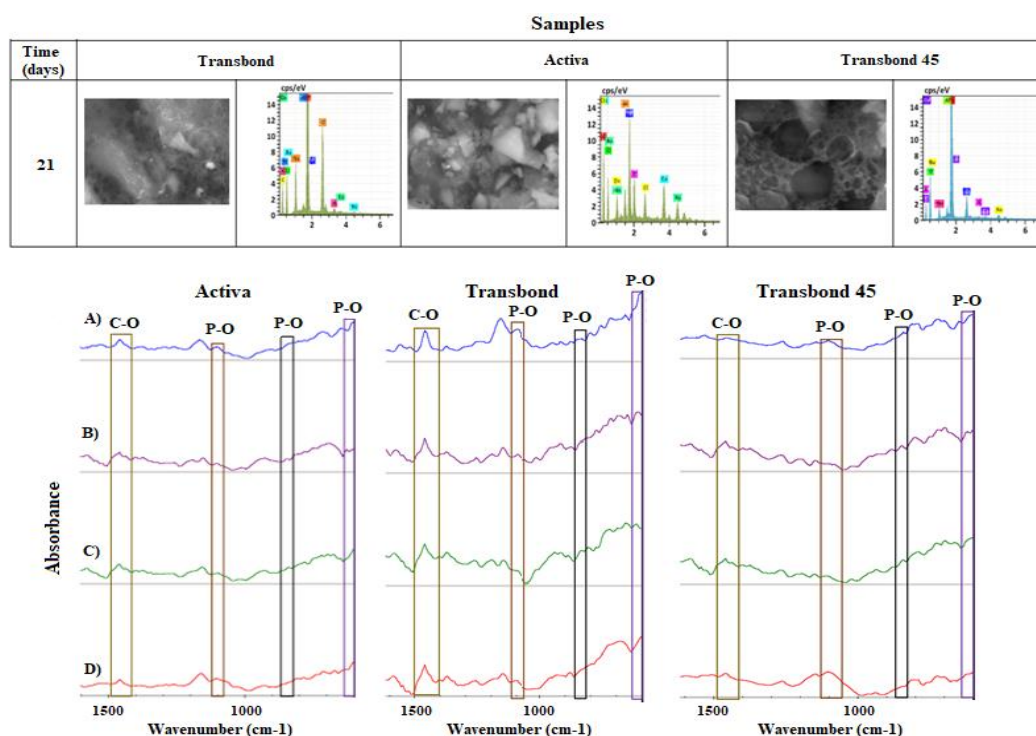


Figure 6. Sem and EDS images of the morphology and composition of the hydroxyapatite layer after 21 days of sample exposure to the SBF. Infrared spectra of the ACTIVA, Transbond, and Transbond45 compound material exposed to the SBF for A) 3, B) 7, C) 14, and D) 28 days.

Figure 6 shows the infrared spectra of the material exposed to the SBF. In the images, The absorption bands attributed to the

functional groups present in hydroxyapatite can be identified. The phosphate groups can be observed at 660, 850, and 1100 cm^{-1}

(Alvarez-Monsiváis et al; 2022). The absorption bands for the carbonates groups can be observed at 870, 1420, and 1480 cm^{-1} . Finally, the absorption band associated with calcite appears at 1400 cm^{-1} .

Conclusions

In this study, the use of 45S5 bioactive glass was tested to improve mechanical properties, bioactivity, and degradation of Transbond resin used as an adhere metallic bracket. The results show that the Transbond45 samples were stable in their degradation and lost less weight than the Transbond and ACTIVA samples. The mechanical properties of the Transbond45 samples improved by adding the bioactive glass to the resin, as they withstood a more significant tensile load, increasing by approximately 5 MPa compared to the Transbond and ACTIVA resins. Also, the ARI of the Transbond45 resin was determined to be 1, thus improving the value of 3 of the base resin. This study shows that the Transbond45 resin is a compound material suitable as an adhesive in orthodontic applications, especially since the Transbond base resin is among the most widely used and commercially available resins.

References

Al, E., Adeyemi, A., Higham, S., Pender, Harrison, J. (2009). Factors affecting demineralization during orthodontic treatment: A post-hoc analysis of RCT recruits. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 139(2), 181–191. [10.1016/j.ajodo.2009.08.028](https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2009.08.028)

Seyhan-Cezairli, N., Serkan-Küçükekenci, A., & Başoğlu, H. (2019). Evaluation of shear bond strength between orthodontic brackets and three aged bulk fill composites. *Odovtos International Journal of Dental Sciences*, 21(3), 89-99. <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.36005>

Gao, Z., Chen, X., Wang, C., Song, J., Xu, J., Liu, X., ... & Suo, H. (2023). New strategies and mechanisms for targeting *Streptococcus mutans* biofilm formation to prevent dental caries: a review. *Microbiological Research*, 127526.

Zafar, M. S. (2020). Prosthodontic applications of polymethyl methacrylate (PMMA): An update. *Polymers*, 12(10), 2299. [doi:10.3390/polym12102299](https://doi.org/10.3390/polym12102299)

Vallittu, P., Närhi, P., Hupa L. (2015). Fiber glass-bioactive glass composite for bone replacing and bone anchoring implants. *Dent. Mater.*, 31 (4), 371–381. [10.1016/j.dental.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.01.003)

DEGRAZIA, F., LEITUNE, C., GARCIA, I., ARTHUR, R., SAMUEL, S., COLLARES, F. (2016) Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *J. Appl. Oral Sci.*, 24(4), 404–410. [10.1590/1678-775720160154](https://doi.org/10.1590/1678-775720160154)

Kim, H. J., Bae, H. E., Lee, J. E., Park, I. S., Kim, H. G., Kwon, J., & Kim, D. S. (2021). Effects of bioactive glass incorporation into glass ionomer cement on demineralized dentin. *Scientific Reports*, 11(1), 7016.

Manafi, S., Mirjalili, F., & Reshadi, R. (2019). Synthesis and evaluation of the bioactivity of fluorapatite-45S5 bioactive glass nanocomposite. *Progress in biomaterials*, 8(2), 77-89.

Pirayesh, H. (2010). Effects of manufacturing method on surface mineralization of bioactive glasses. University of Alberta, Edmonton, Alberta. <https://doi.org/10.7939/R37G64>

Kokubo T. and Takadama H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*. 27(15), 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>

Vouzara, T., Roussou, K., Nikolaidis, A., Tolidis, K., Koulaouzidou, E. (2020). Organic eluates derived from intermediate restorative dental materials, *Molecules*, 25(7), 1–14. doi:10.3390/molecules25071593

Pulpdent Coporation. (2019). Safety data sheet: ACTIVA BioACTIVE-BASE/LINER.

Bauer J., Silva A., Moreno E., Campos P., Nunes C., Pigozzo A., Marins R. (2018). Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: Effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 90, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.10.029>

Barrios, C., Vila, V., Martinez, S., Encina A. (2017). Ph Salival como factor asociado a la caries dental, *Rev. Fac. Odontol. Univ. Nac. (Cordoba)*, 10(1), 13. <https://core.ac.uk/reader/230848120>

Silva, R. R. A., Marques, C. S., Arruda, T. R., Teixeira, S. C., & de Oliveira, T. V. (2023). Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. *Macromol*, 3(2), 371-399. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>

Nawrocka, A., Nowak, J., Sauro, S., Hardan, L., Bourgi, R., & Lukomska-Szymanska, M. (2023). Shear Bond Strength of Metal and Ceramic Brackets Depending on Etching Protocol in Direct Bonding Technique. *Materials*, 16(20), 6697.

Skallevold, H., Rokaya, D., Khurshid, Z., Zafar, M. (2019). Bioactive glass applications in dentistry, *Int. J. Mol. Sci.*, 20(23), 1–24. 10.3390/ijms20235960

Profeta A., Prucher, G. Bioactive-glass in periodontal surgery and implant dentistry, *Dent. Mater. J.*, 34(5), 559–571. 10.4012/dmj.2014-233.

AlSamak, S., Alsaleem, N. R., & Ahmed, M.

K. (2023). Evaluation of the shear bond strength and adhesive remnant index of color change, fluorescent, and conventional orthodontic adhesives: An in vitro study. *International Orthodontics*, 21(1), 100712. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2022.100712>

Álvarez-Monsiváis, M. E., Cruz-Ortiz, B. R., Olivas-Armendáriz, I., Sáenz-Galindo, A., Solís-Rosales, S. G., & Múzquiz-Ramos, E. M. (2022). Bioactividad y biocompatibilidad de compósitos de zirconia estabilizada con Y/hidroxiapatita-Cu, Fosfato Tricálcico-Ag o Fosfato Tricálcico-Ga. *Afinidad*, 79(596), 358-366. <https://doi.org/10.55815/401133>



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Aprovechamiento de subproductos de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) para la elaboración de harina aplicando diferentes condiciones térmicas

Utilization of persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by-products for flour production applying different thermal conditions

Alatríste-Pérez, I.^{a,b}, Contreras-Oliva, A.^{c*}, Salinas-Ruiz, J.^c, Herrera-Corredor, J.A.^c, Hidalgo-Contreras, J.V.^c, Rustríán-Portilla, E.^d, Rodríguez-Alcalá, O.^b

^a Colegio Interdisciplinario de Especialización (CIES). C. P. 94330, Orizaba, Veracruz.

^b Departamento de Procesos Alimentarios; Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz; Campus Cuitláhuac; C. P. 94910, Cuitláhuac, Veracruz.

^c Colegio de Postgraduados; Campus Córdoba; C. P. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz. *Autor de correspondencia. tel.: (+52) 271 716 6000, ORCID: 0000-0002-9686-7447.

^d Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Veracruzana; C. P. 94349, Orizaba, Veracruz.
ismael.alatríste@utcv.edu.mx; adricon@colpos.mx*; salinas@colpos.mx; jandreshc@colpos.mx;
jvhidalgo@colpos.mx; erustrian@uv.mx; olivia.rodriguez@utcv.edu.mx

Innovación tecnológica: Proceso para elaborar harina de subproductos de limón.

Área de aplicación industrial: Formulación de alimentos para consumo humano.

Recibido: 11 diciembre 2023

Aceptado: 21 mayo 2024

Abstract

It's important to revalue the by-products of Persian lime generated in the agro-industry because they do not meet the visual quality standards such as size, color, or appearance of the fruit. The main objective of this study was to evaluate the feasibility of using Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by-products for the production of flours with potential applications in the food industry. Specifically, the optimal drying and thermal treatment conditions were determined to maximize the physicochemical and techno-functional properties of the obtained flours. A completely randomized design with sub-divided plots with a factorial arrangement was applied. The factors were: type of residue (bagasse and peel); thermal treatment (fresh and blanched); and drying temperature (70, 80, and 90 °C). The physicochemical and functional characterization of the flour was performed. Blanching significantly reduced acidity and increased pH in bagasse flours,

although it also decreased swelling capacity and caused darkening. On the other hand, peel flour showed lower water retention capacity and swelling capacity but higher luminosity compared to bagasse flours. Drying temperature also significantly influenced the properties of the flours; lower temperatures resulted in flours with higher luminosity and lower water activity compared to higher temperatures. Considering multiple relevant properties, the best treatments were CF80 (fresh peel and 80 °C) and BE70 (blanched bagasse and 70 °C), as these flours not only showed lower moisture and water activity but also good physicochemical and techno-functional properties. In general, the flours obtained showed good potential for use as partial substitutes for grain and cereal flours in various preparations.

Keywords: Codex Alimentarius, Food quality, Food wastes, Fruit size.

Resumen

Es importante revalorizar los subproductos de limón persa que se generan en la agroindustria debido a que no cumplen con los estándares de calidad visuales como tamaño, color o aspecto del fruto. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la viabilidad del aprovechamiento de subproductos de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) para la producción de harinas con aplicaciones potenciales en la industria alimentaria. Específicamente, se determinaron las condiciones óptimas de secado y tratamiento térmico para maximizar las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de las harinas obtenidas. Se aplicó un diseño completamente al azar con parcelas subdivididas con un arreglo factorial. Los factores fueron: tipo de residuo (bagazo y cáscara); tratamiento térmico (fresco y escaldado) y temperatura de secado (70, 80 y 90 °C). Se realizó la caracterización fisicoquímica y funcional de la harina. El escaldado redujo significativamente la acidez y aumentó el pH en las harinas de bagazo, aunque también disminuyó la capacidad de hinchamiento y provocó un oscurecimiento. Por otro lado, la harina de cáscara mostró una menor capacidad de retención de agua y capacidad de hinchamiento, pero una mayor luminosidad en comparación con las harinas de bagazo. La temperatura de secado también influyó significativamente en las propiedades de las harinas; temperaturas más bajas resultaron en harinas con mayor luminosidad y menor actividad de agua en comparación con temperaturas más altas. Considerando múltiples propiedades relevantes, los mejores tratamientos fueron CF80 (cáscara fresca y 80 °C) y BE70 (bagazo escaldado y 70 °C), ya que estas harinas presentaron no solo menor humedad y actividad de agua, sino también buenas propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales. En general, las harinas obtenidas mostraron un buen potencial para su uso como sustitutos parciales de harinas de granos y cereales en diversas preparaciones.

Palabras clave: Calidad de los alimentos, Codex Alimentarius, Desechos alimentarios, Tamaño de la fruta.

1. Introducción

Aproximadamente 1,300 millones de toneladas de alimentos se desperdician o se

pierden anualmente a nivel mundial, lo cual representa alrededor de un tercio de toda la producción de alimentos para consumo

humano. Las mayores pérdidas provienen de las cadenas de frutas y verduras; representando hasta el 50% de la producción y ocurren principalmente durante las etapas de procesamiento y postcosecha (1). La reutilización de subproductos agroindustriales es una estrategia clave en la bioeconomía circular, que busca reintegrar estos subproductos en la cadena de valor.

En la Unión Europea anualmente se descartan más de 50 millones de toneladas de frutas y hortalizas, fundamentalmente debido a que no alcanzan estándares de calidad externa vinculados con especificaciones de carácter estético exigidos por el comercio minorista y por los consumidores. Los determinantes de la pérdida y desperdicio de frutas y hortalizas son diversos e incluyen tanto directos como indirectos. Los directos se relacionan con los actores de la cadena agroalimentaria tales como decisiones productivas vinculadas a la selección de variedades de cultivo, la planeación de la cosecha o la gestión logística durante el almacenamiento y transporte. Por otro lado, los determinantes indirectos están relacionados con las características económicas, culturales y políticas del sistema alimentario, por ejemplo, la falta de infraestructura adecuada para el almacenamiento, y la escasa sensibilización de los trabajadores vinculados a la cosecha (2).

En muchos casos los motivos por los que se desechan frutas y verduras son exclusivamente criterios estéticos. En términos generales, la presencia de imperfecciones en frutas y verduras influye negativamente en la percepción de la calidad e inocuidad, a la vez que genera asociaciones emocionales negativas (2).

La reutilización es una de las estrategias que se han implementado para reducir el desperdicio de alimentos en las últimas etapas de la cadena de suministro. Está basado en

una bioeconomía sustentable, orientada a reinsertar en la cadena de valor a subproductos y excedentes de la cadena agroalimentaria (3).

Los cítricos son uno de los grupos de frutas más importantes a nivel mundial, con una producción significativa en varios países. Los principales productores de cítricos incluyen a China, Brasil, India, México y Estados Unidos. Estos países contribuyen en gran medida al suministro global de cítricos, principalmente naranjas, limones, limas, pomelos y mandarinas (4). Los cítricos representan el sector más grande de la producción mundial de frutas, con 100 millones de toneladas por temporada, y alrededor del 34% de los cítricos se utilizan para producir jugos (5).

México produce en promedio 2 millones de toneladas por año de limones y limas, de los cuales, únicamente 29% (625,000 t) es destinado a exportación (6) y del resto que se queda en el país, aproximadamente 40%, es desechado por carecer de valor comercial. Derivado de las jugueras, se generan enormes cantidades de subproductos anuales, aproximadamente un tercio de la materia prima (5). Las cáscaras son la mayor proporción de subproductos del procesamiento de cítricos, sin embargo, la mayor parte se desperdicia.

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el aprovechamiento de subproductos cítricos debido a su riqueza en compuestos bioactivos como fenoles y fibra dietética. Estudios recientes han demostrado que las cáscaras y bagazos de cítricos pueden ser utilizados para producir harinas con propiedades funcionales beneficiosas para la industria alimentaria (7,8,9,10). Estas harinas pueden mejorar la calidad nutricional y funcional de los productos alimenticios, además de contribuir a la sostenibilidad al reducir los desechos agroindustriales.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la viabilidad del aprovechamiento de subproductos de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) para la producción de harinas con aplicaciones potenciales en la industria alimentaria. Específicamente, se determinaron las condiciones óptimas de secado y tratamiento térmico para maximizar las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de las harinas obtenidas.

La novedad de esta investigación radica en la evaluación específica de las condiciones óptimas de secado y tratamiento térmico para la producción de harinas de subproductos de limón persa. Además, se enfoca en determinar las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de estas harinas, explorando su potencial para ser utilizadas en diversos sectores de la industria alimentaria, como productos de panadería, cárnicos y lácteos.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

Para realizar los análisis de las harinas se utilizaron los siguientes reactivos: soluciones tampón pH 4 y 7, agua destilada, hidróxido de sodio, fenoltaleína y aceite de maíz.

2.2 Material vegetal

El limón persa fue proporcionado por una empacadora ubicada en km 27.3 Carretera Federal Córdoba–Veracruz en marzo de 2021. Los frutos suministrados fueron de los descartados por no cumplir con los estándares de tamaño (calibre) y por el grado de maduración, evidenciado por ligeras manchas amarillas en la piel, lo que los hace no aptos para el mercado fresco. Estos subproductos se

envían a jugueras de la zona. Los limones se trasladaron a la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz ubicada en Av. Universidad No. 350, Carretera Federal Cuitláhuac-La Tinaja, Congregación Dos Caminos, Cuitláhuac, C.P. 94910, Veracruz, México. El material vegetal se procesó el mismo día de su traslado.

2.3 Medición de atributos físicos y proporción del fruto

Se tomaron diez frutos de limón persa y se pesaron utilizando una balanza digital (Torrey, clase 3, México), los cuales equivalen a un kilogramo, aproximadamente, para calcular la proporción de bagazo, cáscara y jugo. Posteriormente, utilizando un vernier de 6" (150 mm) (Calibrador digital, modelo No. 7352, Japón) se determinaron el diámetro polar y diámetro ecuatorial para cada fruto.

2.4 Elaboración de las harinas

Del total de limones proporcionados por la empacadora (20 kg), se tomaron tres, se realizó un lavado con agua para retirar posible materia orgánica extraña, se extrajo el jugo de limón, y se separó el bagazo de la cáscara de forma manual. Los residuos de los tratamientos correspondientes se escaldaron a 100 °C por 10 min y se secaron en un horno análogo (Felisa®, Jalisco, México) de acuerdo al diseño experimental (Tabla 1). Posteriormente, se redujo el tamaño de partícula con un molino (Desintegrador multifuncional GRT-20B, 3000 W, 25000 rpm, China) y se pasaron por un tamiz de pruebas físicas de número 30 (0.595 mm) de acero inoxidable (Montinox®, modelo TI82030, México). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Tratamientos para la elaboración de harinas derivados del diseño experimental.

Tratamiento	Residuo	Pretratamiento	Temperatura de secado (°C)
CF70	Cáscara	Fresco	70
CE70	Cáscara	Escaldado	70
CF80	Cáscara	Fresco	80
CE80	Cáscara	Escaldado	80
CF90	Cáscara	Fresco	90
CE90	Cáscara	Escaldado	90
BF70	Bagazo	Fresco	70
BE70	Bagazo	Escaldado	70
BF80	Bagazo	Fresco	80
BE80	Bagazo	Escaldado	80
BF90	Bagazo	Fresco	90
BE90	Bagazo	Escaldado	90

Fuente: elaborada por autor.

2.5 Caracterización fisicoquímica y tecno-funcional de las harinas

Para la caracterización fisicoquímica de las harinas se determinaron por triplicado los siguientes análisis: pH con un potenciómetro (Conductronic®, modelo PC45, Puebla, México) empleando la AOAC 981.12 (AOAC, 1990), acidez titulable expresada como porcentaje de ácido cítrico de acuerdo con la Norma NMX-F-102-S-1978, sólidos solubles (°Brix) con un refractómetro digital de mano (pocket ATAGO®, modelo PAL-3, Tokio, Japón) mediante la AOAC 932.12 (AOAC, 1990), color (Konica & Minolta®, modelo CR-400, Japón) con el método CIELab, humedad empleando la Norma NMX-F-083-1986, y a_w con un medidor de actividad de agua (AQUALAB®, 4TE, Lleida, España).

Para conocer las propiedades tecno-funcionales de las harinas se determinaron por triplicado la capacidad de retención de agua (CRA), capacidad de hinchamiento (CH) y capacidad de retención de aceite (CRAceite), de acuerdo con el método propuesto por Robertson *et al.* (2000) (11).

2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con parcelas subsubdivididas. El primer factor fue el tipo de residuo con dos niveles: bagazo y cáscara. El segundo factor correspondió al efecto del tratamiento térmico con dos niveles: fresco y escaldado. El tercer factor fue la temperatura de secado con tres niveles: 70, 80 y 90 °C. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SAS® versión 9.4, con un nivel de confianza del 95% y una comparación de medias con la prueba de Tukey. El modelo estadístico del diseño experimental se presenta a continuación:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \omega_{l(i)} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \delta_{l(ij)} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$i = 1,2; j = 1,2; k = 1,2,3; l = 1,2,3$$

Donde: y_{ijkl} es la $ijkl$ ésima respuesta observada, μ es la media general, α_i es el efecto fijo del tipo de residuo, $\omega_{l(i)}$ es el error aleatorio debido a tipo de residuo dentro de

repetición $\{\omega_{l(i)} \sim N(0, \sigma_\omega^2)\}$, β_j es el efecto fijo de temperatura, $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre tipo de residuo con temperatura, $\delta_{l(ij)}$ es el error aleatorio debido al tipo de bagazo con temperatura dentro de repetición $\{\delta_{l(ij)} \sim N(0, \sigma_\omega^2)\}$, γ_k es el efecto fijo de la temperatura de secado, $(\alpha\gamma)_{ij}$ es el efecto fijo de la interacción tipo de residuo y la temperatura de secado, $(\beta\gamma)_{jk}$ es el efecto fijo de la interacción temperatura y temperatura de secado, $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ es la interacción tipo de residuo, temperatura y temperatura de secado y ε_{ijkl} es el error experimental donde cada ε_{ijkl} tiene media 0 y varianza constante $\sigma^2 \{\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)\}$.

3. Resultados y discusión

Se midieron los atributos físicos y la proporción de bagazo, cáscara y jugo de los limones. El peso de los frutos fue de 81 ± 26.02 g, con diámetro polar de 59.9 ± 3.25

mm y diámetro ecuatorial de 51.7 ± 2.12 mm, lo cual muestra la variabilidad del calibre de estos frutos. La cantidad de bagazo fue de 46.59%, 31.25% de cáscara y 22.15% de jugo. Los tiempos de secado se realizaron al mismo tiempo, tanto de cáscara como de bagazo fueron de 570 min a 70 °C, 390 min a 80 °C y 270 min a 90 °C, reduciendo al 10% el peso del producto en base seca. En la Figura 1 se muestran los tratamientos de limón persa deshidratados.

La caracterización fisicoquímica de las frutas es importante para mejorar la calidad y agregar valor al producto final (9). En la Figura 2 se observan las harinas obtenidas en cada tratamiento. Los resultados de los análisis fisicoquímicos de las harinas de bagazo y cáscara del limón persa se muestran en la Tabla 2 y las significancias estadísticas de los factores se presentan en la Tabla 3.

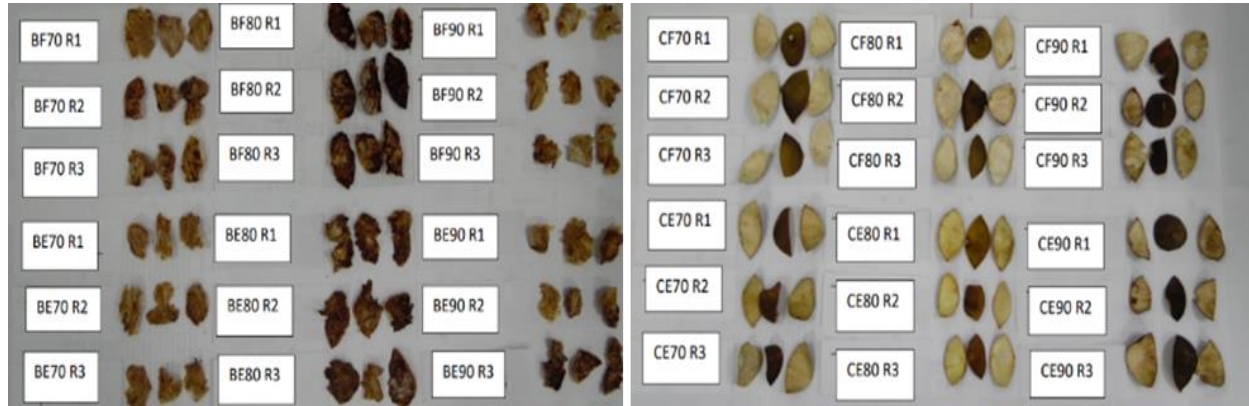


Figura 1. Bagazo y cáscara de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) deshidratados. BF: bagazo fresco, BE: bagazo escaldado, CF: cáscara fresca, CE: cáscara escaldado. 70, 80 y 90 indican las temperaturas de secado en °C; y R1, R2 y R3 las repeticiones por tratamiento.

Fuente: elaborada por autor.

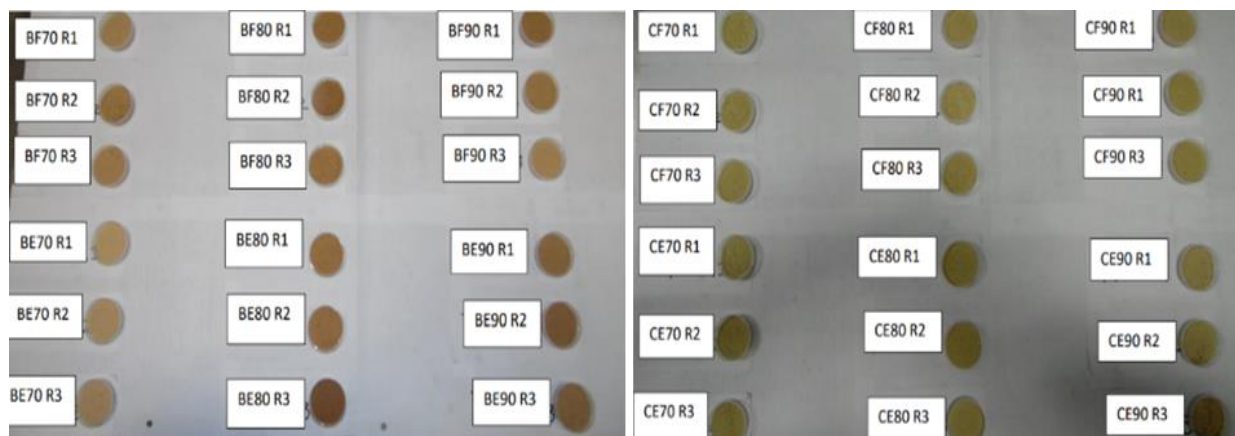


Figura 2. Harinas de bagazo y de cáscara de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) obtenidas de los diferentes tratamientos. BF: bagazo fresco, BE: bagazo escaldado, CF: cáscara fresco, CE: cáscara escaldado. 70, 80 y 90 indican las temperaturas de secado en °C; y R1, R2 y R3 las repeticiones por tratamiento.

Fuente: elaborada por autor.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las harinas de cáscara y de bagazo de limón persa derivadas de los diferentes tratamientos.

Tratamientos	pH	Acidez	SS	Humedad	a_w	Color		
		(%)	(°Brix)	(%)		L^*	a^*	b^*
CF70	3.93 ^a	7.03 ^c	2.73 ^d	4.24 ^{ab}	0.36 ^{cd}	76.05 ^a	-2.32 ^e	26.44 ^a
CE70	3.96 ^a	26.19 ^a	3.00 ^{cd}	3.75 ^{ab}	0.32 ^{cd}	74.58 ^{ab}	1.76 ^{cd}	22.42 ^{cd}
CF80	4.07 ^a	8.40 ^c	3.40 ^c	3.12 ^b	0.33 ^{cd}	76.68 ^a	-1.20 ^{de}	25.10 ^{ba}
CE80	4.04 ^a	7.70 ^c	3.26 ^{cd}	4.71 ^{ab}	0.33 ^{cd}	60.37 ^d	7.87 ^a	22.11 ^d
CF90	3.85 ^a	7.43 ^c	2.90 ^{cd}	5.06 ^{ab}	0.48 ^a	73.67 ^{ab}	-0.75 ^{de}	24.97 ^{abc}
CE90	3.74 ^a	9.00 ^{bc}	3.40 ^c	5.60 ^{ab}	0.46 ^{ab}	64.65 ^{cd}	6.43 ^{ab}	22.66 ^{bcd}
BF70	3.26 ^b	38.96 ^a	5.30 ^b	6.55 ^a	0.40 ^{bc}	68.17 ^{bc}	5.67 ^{ab}	22.54 ^{cd}
BE70	3.32 ^b	29.76 ^a	5.13 ^b	4.05 ^{ab}	0.37 ^{cd}	74.17 ^{ab}	3.72 ^{bc}	21.73 ^d
BF80	2.92 ^{cd}	38.63 ^a	6.10 ^a	3.48 ^{ab}	0.29 ^d	63.01 ^{cd}	7.47 ^a	21.69 ^d
BE80	3.26 ^{bc}	25.96 ^{ab}	6.20 ^a	3.66 ^{ab}	0.37 ^c	60.62 ^d	7.82 ^a	22.19 ^d
BF90	2.88 ^d	23.66 ^{abc}	5.40 ^b	3.91 ^{ab}	0.38 ^c	66.60 ^{cd}	6.15 ^{ab}	22.54 ^{cd}
BE90	2.88 ^d	22.80 ^{abc}	5.06 ^b	5.08 ^{ab}	0.40 ^{bc}	65.13 ^{cd}	6.40 ^{ab}	22.95 ^{bcd}

Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística significativa con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Fuente: elaborada por autor.

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) mostrando la significancia estadística de los efectos principales e interacciones entre tipo de residuo, pretratamiento y temperatura de secado en las propiedades fisicoquímicas de las harinas de limón persa.

Effect	pH	Acidez	SS	Humedad	A_w	L^*	a^*	b^*
FA	<.0001	0.0006	<.0001	0.9009	0.2487	0.0003	0.0006	0.0004
FB	0.3772	0.8138	0.6339	0.8178	0.8901	0.0007	0.8138	0.0008
FA*FB	0.1154	0.0012	0.0597	0.1987	0.0234	0.0002	0.0012	0.0007
FC	<.0001	0.0017	<.0001	0.0309	<.0001	<.0001	0.0017	0.2260
FA*FC	0.0023	0.1489	0.0007	0.0518	<.0001	0.1892	0.1489	0.2013
FB*FC	0.0488	0.0615	0.8039	0.0155	0.0135	<.0001	0.0615	0.0892
FA*FB*FC	0.0980	0.0343	0.0102	0.2962	0.2445	0.1667	0.0343	0.8436

FA: Factor A (Residuo: Bagazo, cáscara); FB: Factor B (Pretratamiento: Escaldado, Fresco), FC: Factor C (Temperatura de secado: 70 °C, 80 °C, 90 °C). Las diferencias significativas se indican con un valor de $p < 0.05$.

3.1 pH y acidez

El pH y la acidez de los alimentos están influenciados por la presencia de diversos ácidos orgánicos como el ácido cítrico, málico, tartárico, oxálico, fórmico, succínico y galacturónico, los cuales afectan el sabor, color y estabilidad del producto (13). Diversos estudios han demostrado que los ácidos orgánicos no solo mejoran el sabor y la estabilidad de los alimentos, sino que también desempeñan un papel crucial en la regulación de la acidez y la preservación de la calidad de los alimentos (14).

Las harinas de bagazo presentaron una acidez que varió entre 22.80 y 38.96 %, mientras que las harinas de cáscara mostraron valores de acidez que oscilaron entre 7.03 y 26.19 %. Esto se vio reflejado en el pH, el cual fue de 2.88 a 3.26 en harina de bagazo y 3.74 a 4.07 en harina de cáscara. Lo anterior demuestra que el proceso de escaldado disminuye la acidez en la harina de bagazo, pero no es útil para reducir la acidez de la harina de cáscara. La acidez titulable es otro parámetro fisicoquímico que disminuye al avanzar la madurez como resultado de la descomposición del ácido cítrico (15). Por otra parte, al aplicar escaldado a las pulpas se produce la inactivación de enzimas como catalasa, lipasa, lipoxigenasa, peroxidasa y polifenoloxidasas, con disminución de la pérdida de ácido ascórbico, aroma, sabor y color, además, se reduce la fermentación y se promueve la estabilización de la textura (16).

Por otro lado, las harinas que se secaron a 90 °C (15.73%, pH 3.34) presentaron menor acidez que las secadas a 80 °C (20.18%, pH 3.58) y 70 °C (25.49%, pH 3.62); aunque el pH fue significativamente más ácido con el aumento de la temperatura (3.62 a 70 °C, 3.58 a 80 °C y 3.34 a 90 °C). La harina CF70 presentó baja acidez (7.03) y un pH de los más elevados (pH 3.94) entre las harinas de cáscara, por lo que este tratamiento es más

favorable, considerando estos dos parámetros.

Se encontró un pH de 3.98 en fibra de cáscara de limón (*Citrus limon cv Fino*) secada a 65 °C por 24 h (17), el cual es similar a los encontrados en las harinas de cáscara de limón persa. Por otro lado, las harinas de bagazo con menor acidez mostraron un pH muy ácido: BE90 (22.80%, pH 2.88) y BF90 (23.67%, pH 2.88); sin embargo, la harina BE80 presentó un pH de 3.26 y una acidez de 25.96%, lo que indica una alta concentración de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico. Esta podría ser una opción adecuada para evaluarla en productos que requieran un sabor cítrico pronunciado. En frutos climatéricos el aumento del índice de madurez (IMAD) se presenta principalmente cuando estos alcanzan la tasa máxima de respiración, ocurriendo un desdoblamiento de las reservas (ácidos orgánicos), como respuesta al incremento de su metabolismo; es por ello que la acidez decrece con el tiempo (18).

3.2 Sólidos solubles

Respecto a los sólidos solubles (SS), conforman del 10 al 20 % del peso del limón fresco, y son principalmente carbohidratos, y en pequeñas cantidades, ácidos orgánicos, proteínas, lípidos y minerales (19). En las harinas de residuos de limón, los sólidos solubles disminuyen considerablemente, ya que los residuos están principalmente compuestos de fibra, siendo el jugo el que concentra la mayoría de los carbohidratos, ácidos orgánicos y minerales (20).

Las harinas de bagazo presentaron sólidos solubles que variaron entre 5.06 y 6.20 °Brix, mientras que las harinas de cáscara presentaron valores de sólidos solubles entre 2.73 y 3.40 °Brix. Esto puede explicarse por la mayor cantidad de carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en el bagazo (21). Por

otro lado, no hubo diferencia entre las harinas de residuos frescos y de escaldados. Sin embargo, la temperatura impactó en los SS, los cuales fueron superiores a una temperatura de secado de 80 °C tanto en los residuos frescos como en los escaldados. Esto se debe a que temperaturas de secado más altas, como 80 °C, promueven una mayor evaporación del agua, lo que reduce el contenido de agua en los residuos y concentra los solutos. Como resultado, se obtiene una mayor concentración de SS debido a la eficiencia en la eliminación del agua a estas temperaturas elevadas; esto sugiere que esta temperatura es óptima ya que preserva los componentes solubles durante el secado.

3.3 Humedad y a_w

En el caso de la humedad y la a_w , se observó un efecto significativo de la temperatura de secado, así como de algunas interacciones con los otros factores evaluados. Todas las harinas presentaron una humedad menor al 14%, cumpliendo con el estándar de humedad establecido por el Codex Alimentarius (22). La a_w promedio de las harinas disminuyó proporcionalmente con la humedad. La a_w es un parámetro crucial para la estabilidad y seguridad de los alimentos. Los productos con una a_w menor a 0.85 se consideran seguros frente al crecimiento microbiano patógeno (23). En nuestro estudio, las harinas presentaron niveles de a_w de 0.29 a 0.48, sugiriendo una buena estabilidad microbiológica y seguridad del producto. La humedad y la a_w de las harinas disminuyeron con el aumento de la temperatura de secado, siendo 80 °C la temperatura óptima para obtener una baja humedad y a_w . Esto es consistente con estudios que indican que temperaturas de secado moderadas son eficaces para reducir la humedad sin comprometer la calidad de los productos. Por ejemplo, un estudio reciente mostró que el secado a temperaturas moderadas, como 80 °C, mantiene la calidad de los productos

secos al minimizar la pérdida de compuestos bioactivos y preservar las características sensoriales (24).

En particular, la harina de cáscara fresca a 80 °C (CF80) presentó menor humedad que el resto de las harinas de cáscara, sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre las harinas de bagazo fresco y escaldado secados a 80 °C (BF80 y BE80). Cabe señalar que, aunque la harina de cáscara a 90 °C mostró mayor a_w (0.47) que la harina de bagazo a 90 °C (0.39), a 80 °C no se observó diferencia significativa entre la a_w de las harinas de cáscara (0.33) y bagazo (0.33). Las harinas con menor humedad fueron CF80 (3.12%, a_w =0.33) y BF80 (3.49%, a_w =0.29), por otro lado, la harina con mayor humedad fue BF70 (6.56 %, a_w =0.40).

Otros estudios en residuos cítricos deshidratados han presentado humedades superiores a las encontradas en las harinas de limón persa. Se reportó un contenido de humedad de 10.62, 9.52 y 7.64 % en residuos de *Citrus lemon* (L.) *Burn f* secados a 70 (20 h), 80 (16 h) y 90 °C (16 h), respectivamente (21). Por otro lado, se analizaron residuos de naranja dulce escaldados y secados a 50 °C por 24 h, los cuales presentaron una humedad de 9.46 y 10.23 % para cáscara de naranja y pulpa de naranja, respectivamente (25). Mientras tanto, se encontró una a_w de 0.13 en fibra de cáscara de limón (*Citrus limon* cv Fino) secada a 65 °C por 24 h (17).

3.4 Color

Las harinas de cáscara presentaron una mayor luminosidad, con valores que oscilaron entre 60.37 y 76.68, en comparación con las harinas de bagazo, cuyos valores de luminosidad variaron entre 60.62 y 74.17. Esta diferencia se debe a la distinta composición de los residuos. La cáscara contiene menos pigmentos marrones y compuestos que tienden a oscurecerse durante el secado, como

las fibras insolubles y la celulosa presentes en mayor cantidad en el bagazo (9,21). Además, los compuestos fenólicos en la cáscara pueden contribuir a una mayor capacidad de reflejar luz (10).

Por otra parte, las harinas de residuo escaldado mostraron una disminución en luminosidad en comparación con las harinas de residuo fresco. Además, a temperaturas de secado más altas, se observó una disminución en los valores de L^* , indicando un color más oscuro en las harinas. Este efecto se debe a la mayor degradación térmica de los compuestos responsables del color a temperaturas elevadas. En concreto, los tratamientos con mayor luminosidad fueron CF80 (76.68) y CF70 (76.06), mientras que CE80 y BE80 presentaron los valores más bajos de L^* (60.37 y 60.63, respectivamente). Estos resultados coinciden con investigaciones que demuestran que temperaturas más bajas durante el secado pueden preservar mejor los colores naturales de los subproductos (26).

Respecto a los valores de a^* y b^* , todos los factores tuvieron efecto significativo en estos parámetros. La harina de bagazo presentó valores de a^* entre 3.72 - 7.82 y en b^* un rango de 21.69 a 22.95. Por su parte, la harina de cáscara obtuvo un rango de -2.32 a 7.87 en a^* y 22.11 a 26.44 en b^* . Estos resultados se deben a que las harinas de bagazo tuvieron tonos marrones por lo que mostraron mayor tendencia al rojo y un poco menos al amarillo que las harinas de cáscara, las cuales fueron más claras y en tonalidades crema.

Por otra parte, las harinas de bagazo fueron afectadas significativamente por el proceso de escaldado, ya que las harinas de residuos escaldados exhibieron mayor tendencia al rojo y menor intensidad de amarillo. Además, las harinas de bagazo en fresco presentaron tonalidades más cercanas al verde y al amarillo que las escaldadas. Al parecer, el

proceso de escaldado indujo el oscurecimiento del bagazo de limón y a la pérdida de compuestos que otorgan el color al fruto. El procesamiento térmico de los alimentos afecta la calidad del producto, produciendo pérdida de componentes termolábiles y termosensibles responsables de las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (27).

La temperatura de secado no afectó los valores de b^* , no obstante, impactó en los valores de a^* (rojo-verde). Las harinas secadas a 70 °C presentaron menor valor de a^* (menos rojo), lo cual demuestra que las altas temperaturas de secado oscurecen las harinas, por lo que esto debe considerarse si se desean obtener harinas claras.

3.5 Propiedades tecno-funcionales

Con el objetivo de determinar el empleo potencial de las harinas de residuos de limón persa en alimentos, se analizaron algunas propiedades tecno-funcionales como capacidad de retención de agua (CRA), capacidad de hinchamiento (CH) y capacidad de retención de aceite (CRAceite). Las significancias estadísticas de los factores se presentan en la Tabla 4.

Las harinas de residuos de frutas tienen una composición y características reológicas diferentes a las de la harina de trigo, ya que esta última posee gluten, el cual aporta propiedades viscoelásticas adecuadas en la fabricación de diversos productos alimenticios como galletas y panes. No obstante, las fibras de las frutas son de buena calidad debido a su elevado contenido de fibra total y de fibra soluble, la cual es deseable por sus propiedades nutricionales, funcionales y tecnológicas; por lo que pueden sustituir parte de la harina de trigo sin afectar negativamente las características físicas y sensoriales del producto final (28,29).

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) mostrando la significancia estadística de los efectos principales e interacciones entre tipo de residuo, pretratamiento y temperatura de secado en las propiedades tecno-funcionales de las harinas de limón persa.

Effect	Capacidad de retención de agua	Capacidad de hinchamiento	Capacidad de retención de aceite
FA	<.0001	<.0001	0.2010
FB	0.5055	<.0001	0.4131
FA*FB	0.5924	<.0001	0.2859
FC	0.0836	<.0001	0.4572
FA*FC	0.0368	0.2088	0.1771
FB*FC	0.0149	0.0020	0.0597
FA*FB*FC	0.0009	0.0063	0.6802

FA: Factor A (Residuo: Bagazo, cáscara); FB: Factor B (Pretratamiento: Escaldado, Fresco), FC: Factor C (Temperatura de secado: 70 °C, 80 °C, 90 °C). Las diferencias significativas se indican con un valor de $p < 0.05$.

3.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

Las fibras de las frutas poseen buenas propiedades funcionales, como la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de absorción de aceite (CAA), además de un bajo contenido calórico (30). La Figura 3 muestra la CRA de las harinas de los diferentes tratamientos. La CRA se vió afectada de manera significativa por el tipo de residuo de limón persa. La capacidad de retención de agua fue significativamente

mayor en las harinas de bagazo (0.22 a 0.24 g de H_2O /g muestra seca) en comparación con las harinas de cáscara (0.05 a 0.11 g H_2O /g muestra seca), lo cual se atribuye al mayor contenido de fibra soluble presente en el bagazo, que tiene una alta capacidad para retener agua. Estudios recientes han demostrado que las fibras dietéticas con alto contenido de fibra soluble, como las de los subproductos cítricos, presentan una excelente capacidad de retención de agua y propiedades funcionales mejoradas (24).

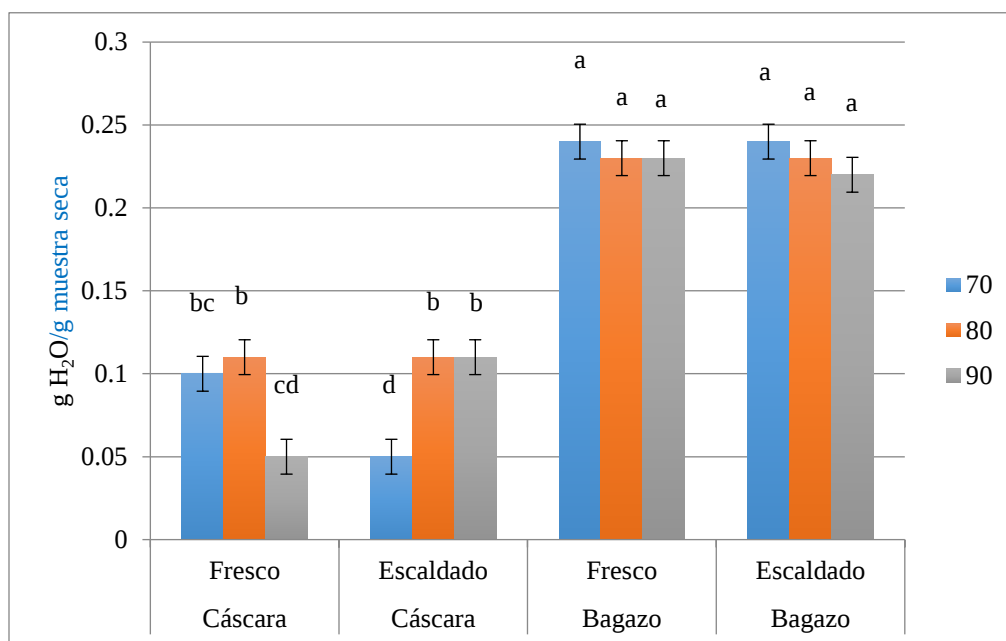


Figura 3. Capacidad de retención de agua de las harinas de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Fuente: elaborada por autor.

La CRA de fibra obtenida a partir de cítricos depende de la estructura física, composición química y contenido de fibra soluble, así como del procesamiento que se le dé al residuo (31,32). En este caso, el escaldado no afectó la CRA de la harina de limón persa, por lo que no se presentaron diferencias significativas entre harinas de residuo escaldado y fresco. Además, tampoco se vio un efecto de la temperatura de secado en las harinas. Cabe destacar que la harina de cáscara escaldada a 70 °C mostró una CRA significativamente inferior (0.05 g H₂O/g muestra seca) en comparación al resto de tratamientos.

Otros autores encontraron CRA superiores a las obtenidas en este estudio. La CRA para fibra de limón (*Citrus limon* cv Fino) varió entre 6 y 13 g de agua/g de fibra para residuo sin escaldar y residuo escaldado, respectivamente (17). Por otra parte, se obtuvo una CRA de 10.66 g de agua/g de fibra de frutas cítricas (11).

3.5.2 Capacidad de hinchamiento (CH)

La CH en alimentos con importante contenido proteico se considera una propiedad funcional de las proteínas debido a

la interacción proteína-agua, importante en la elaboración de alimentos viscosos como sopas, salsas y masas, y de productos horneados. No obstante, ya que la CH está directamente relacionada con la CRA, en harinas con alto contenido de fibra, como las de residuos cítricos, la CH está vinculada con el contenido de fibra (33).

En la Figura 4 se presentan los resultados de la CH de los diferentes tratamientos de harinas de residuos de limón persa. El análisis de varianza mostró efecto significativo del tipo de residuo, pretratamiento y temperatura de secado, así como de sus interacciones, con excepción de la interacción entre tipo de residuo y temperatura de secado. La CH para harinas de bagazo fue de 5.73 a 7.06 g H₂O/g muestra seca, y para harinas de cáscara fue de 0.5 a 6.33 g H₂O/g muestra seca. La fibra de frutas y hortalizas tiene una elevada proporción de fibra soluble en agua como pectina y gomas, este tipo de fibra muestra propiedades funcionales importantes, entre las cuales están la CRA y por lo tanto la CH; sin embargo, la cáscara posee una mayor proporción de fibra insoluble como celulosa, hemicelulosa y lignina por lo que su CH es menor (25).

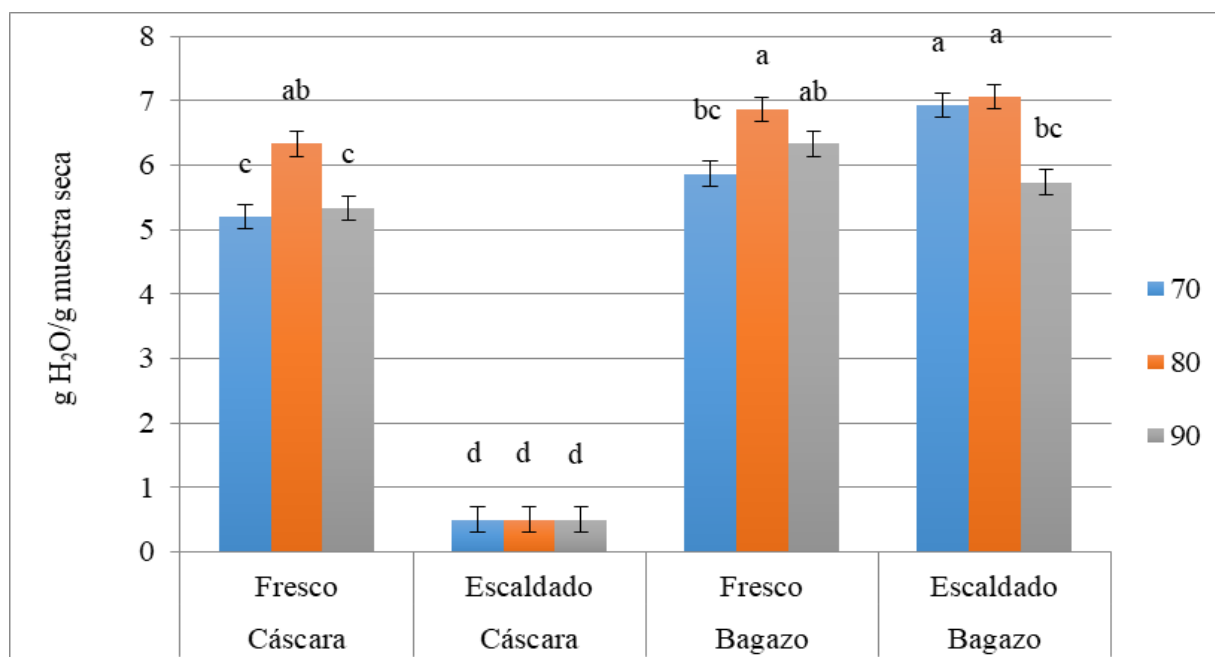


Figura 4. Capacidad de hinchamiento de las harinas de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Fuente: elaborada por autor.

Por su parte, el proceso de escaldado redujo significativamente la CH de las harinas de cáscara. Las harinas de cáscara en fresco mostraron una CH de 5.2 a 6.33 g H₂O/g muestra seca, mientras que las harinas de cáscara escaldada presentaron 0.5 g H₂O/g muestra seca, sin importar la temperatura de secado. Esta reducción puede atribuirse a la descomposición de componentes solubles como las pectinas presentes en la cáscara, que son sensibles al calor y, al descomponerse, disminuyen la capacidad de la cáscara para retener agua (24,34).

En contraste, en las harinas de bagazo, el proceso del escaldado no disminuyó la CH, incluso se incrementó ligeramente en harinas secadas a 70 y 80 °C. A diferencia de la cáscara, el bagazo presenta mayor contenido de fibras insolubles y celulosa, las cuales mantienen su capacidad de hinchamiento incluso después de un tratamiento térmico como el escaldado.

3.5.3 Capacidad de retención de aceite (CRAceite)

La CRAceite expresa la capacidad que tiene la fibra para retener aceite después de ser sometida a una fuerza externa, por ejemplo, la centrifugación; asimismo, indica de manera indirecta el grado de interferencia de la fibra en la adsorción de lípidos en el tracto gastrointestinal (35). La CRAceite de las harinas de residuos de limón persa no se vió afectada por ninguno de los factores evaluados (Figura 5). Las harinas presentaron 0.07 a 0.09 y 0.05 a 0.08 g aceite/g muestra seca para la harina de bagazo y de cáscara, respectivamente. De la misma manera, en otro estudio no se observó efecto del escaldado en fibra de residuos de limón, aunque la CRAceite fue muy superior (6.58 a 6.81 g de aceite/g de fibra) (17) en comparación al presente estudio. Las propiedades funcionales dependen de la estructura química de los polisacáridos presentes en el producto. El proceso de secado puede alterar las propiedades fisicoquímicas de los productos modificando

sus propiedades funcionales (36). Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que la estructura de las fibras dietéticas, incluyendo su capacidad de retención de aceite, se mantiene estable bajo

diversas condiciones de procesamiento térmico (37). Otros autores obtuvieron valores de 2.46 y 1.69 g aceite/g muestra para harinas de cáscara de pepino y semillas de pepino, respectivamente (26).

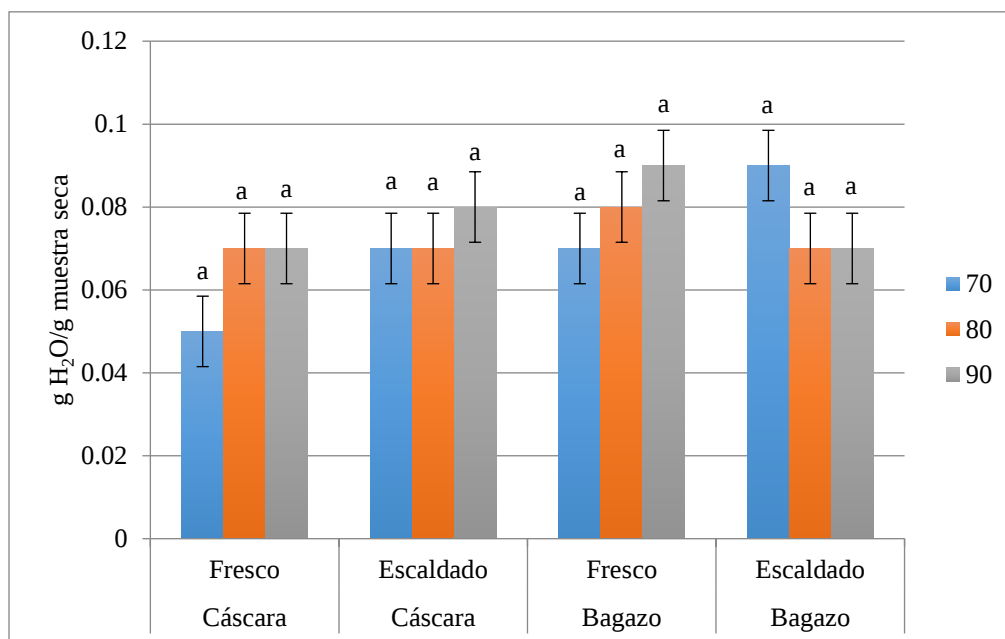


Figura 5. Capacidad de retención de aceite de las harinas de residuos de limón persa (*Citrus latifolia*). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Fuente: elaborada por autor.

4. Conclusiones

Se elaboraron harinas de subproductos de limón persa y se evaluaron los efectos del tipo de residuo, el tratamiento térmico y la temperatura de secado en sus características fisicoquímicas y propiedades funcionales. El escaldado redujo la acidez en la harina de bagazo, aunque en harina de cáscara el escaldado incrementó la acidez. El proceso de escaldado no afectó el contenido de sólidos solubles de las harinas, por otro lado, las harinas secadas a 80 °C mostraron la menor humedad y actividad de agua. Respecto al color, las harinas de cáscara presentaron mayor luminosidad, en especial con residuo fresco, ya que el escaldado parece inducir el oscurecimiento de la fibra. Finalmente, aunque la capacidad de retención de aceite no se vio afectada por ninguno de los factores, la harina de bagazo presentó mayor capacidad

de retención de agua y capacidad de hinchamiento; adicionalmente, el proceso de escaldado redujo la capacidad de hinchamiento de las harinas de cáscara. Los tratamientos que produjeron las mejores harinas fueron CF80 (cáscara fresca y 80 °C) y BE70 (bagazo escaldado y 70 °C). Estos tratamientos destacaron por su menor humedad y actividad de agua, además de mostrar buenas propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales. Las harinas de subproductos de limón persa obtenidas en este estudio presentaron buenas propiedades fisicoquímicas y funcionales, indicando su potencial como ingredientes en productos de panadería (pan, galletas, pasteles), cárnicos (hamburguesas, salchichas), lácteos (yogures, quesos), sin gluten y alimentos funcionales. Sin embargo, se requieren análisis adicionales para evaluar su perfil nutricional

completo, posibles alérgenos, estabilidad durante el almacenamiento y su comportamiento en diferentes matrices alimentarias. Es necesaria más investigación para evaluar su aplicación y determinar los sectores más adecuados en la industria alimentaria.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la LGAC-2: Innovación y Desarrollo de Procesos Agroalimentarios para el Bienestar Social del programa de Innovación Agroalimentaria Sustentable del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba y al Posgrado del Doctorado en Ciencias por Investigación, así mismo al Departamento de Procesos Alimentarios de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) por el apoyo al fortalecimiento del Cuerpo Académico (UTCV-CA-1): Implementación y mejoramiento de gestión de calidad y producción agroalimentaria; así mismo a IPB. Paola Lizeth Ramírez Ameca y Miguel Concepción del Valle por su valioso apoyo durante el proyecto.

5. Referencias

1. Brito, T. B., Carrajola, J. F., Gonçalves, E. C. B. A., Martelli-Tosi, M., & Ferreira, M. S. L. (2019). "Fruit and vegetable residues flours with different granulometry range as raw material for pectin-enriched biodegradable film preparation". *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 121, 412-421. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.058>
2. Giménez, A., Montoli, P., Curutchet, M. R., y Ares G. (2021). "Estrategias para reducir la pérdida y el desperdicio de frutas y hortalizas en las últimas etapas de la cadena agroalimentaria: avances y desafíos". *Agrociencia Uruguay*, 25(NE2), 813. <https://doi.org/10.31285/agro.25.813>
3. Tchonkouang, R. D., Onyeaka, H., & Miri, T. (2023). "From Waste to Plate: Exploring the Impact of Food Waste Valorization on Achieving Zero Hunger". *Sustainability*, 15(13), 10571. <https://doi.org/10.3390/su151310571>
4. World Citrus Organization. (2022). *World Citrus Statistics 2021/22*. Produce Report. Recuperado de <https://www.producereport.com/article/world-citrus-organization-announces-202122-statistics>
5. Fayek, N. M., El-shazly, A. H., Abdel-monem, A. R., Moussa, M. Y., Abd-elwahab, S. M., & El-tanbouly, N. D. (2017). "Comparative study of the hypocholesterolemic, antidiabetic effects of four agro-waste Citrus peels cultivars and their HPLC standardization". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 488-494. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.010>
6. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2015). *Producción Agrícola*. En línea: www.siap.sagarpa.gob.mx.
7. Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Ahmad Nayik, G. (2016). "Citrus peel as a source of functional ingredient: A Review". *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Article in press, 4–11.
8. Thikham, S., Tongdonyod, S., Kantala, C., Therdtatha, P., & Klangpetch, W. (2023). "Enhancing

- enzymatic production efficiency of crude pectic oligosaccharides by pulsed electric field and study of prebiotic potential". *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05843-8>
9. Magalhães, D., Vilas-Boas, A. A., Teixeira, P., & Pintado, M. (2023). "Functional Ingredients and Additives from Lemon by-Products and Their Applications in Food Preservation: A Review". *Foods*, 12(5), 1095. <https://doi.org/10.3390/foods12051095>
 10. Lubinska-Szczygeł, M., Kuczyńska-Łażewska, A., Rutkowska, M., Polkowska, Ż., Katrich, E., & Gorinstein, S. (2023). "Determination of the Major By-Products of Citrus hystrix Peel and Their Characteristics in the Context of Utilization in the Industry". *Molecules*, 28(6), 2596. <https://doi.org/10.3390/molecules28062596>
 11. Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., & Thibault, J. F. (2000). "Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study". *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 33, 72-79.
 12. Schiassi, M. C. E. V., de Souza, V. R., Lago, A. M. T., Campos, L. G., & Queiroz, F. (2018). "Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation". *Food Chemistry*, 245, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>
 13. Ivit, N. N., Polaskova, P., Stuknyte, M., & Tylewicz, U. (2022). "Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines". *Foods*, 11(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>
 14. Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). "Recent Progress in the Study of Taste Characteristics and the Nutrition and Health Properties of Organic Acids in Foods". *Foods*, 11(21), 3408. <https://doi.org/10.3390/foods11213408>
 15. García-López, F. M. (2017). "Relación entre color y parámetros fisicoquímicos del limón persa (Citrus latifolia T.) del centro de Veracruz, México". *Agro Productividad*, 10(9), 9-14.
 16. Luo, Z., Zhang, L., & Wang, M. (2021). "Effect of blanching on enzyme inactivation and quality of fruits and vegetables". *Foods*, 10(11), 2569. <https://doi.org/10.3390/foods10112569>
 17. Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). "Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(1), 113-117.
 18. Pillco Cochán, C. J., Guzmán Loayza, D., y Cuéllar Bautista, J. E. (2021). "Composición físico química y análisis proximal del fruto de sofaique "Geoffroea decorticans (Hook. et Arn.)" procedente de la región Ica-

- Perú". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 87(1), 14-25. <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i1.319>
19. Matheyambath, A. C., Padmanabhan, P., & Paliyath, G. (2016). "Citrus fruits". In: *Encyclopedia of Food and Health*. University of Guelph, Guelph, Canada, pp. 136-140.
 20. Duan, X., Hu, J., Yang, F., & Wang, H. (2022). "Dynamic Changes in Volatile Flavor Compounds, Amino Acids, Organic Acids, and Soluble Sugars in Lemon Juice Vesicles during Freeze-Drying and Hot-Air Drying". *Foods*, 11(18), 2862. <https://doi.org/10.3390/foods11182862>
 21. Patrón-Vázquez, J., Baas-Dzul, L., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Sánchez Contreras, A., García-Cruz, U., & Pacheco, N. (2019). "The effect of drying temperature on the phenolic content and functional behavior of flours obtained from lemon wastes". *Agronomy*, 9, 474. <https://doi.org/10.3390/agronomy909047>
 22. Codex Alimentarius Commission. (1985). *Codex Alimentarius Standard for Wheat Flour (CXS 152-1985)*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%2F%2Fworkspace.fao.org%2Fsites%2Fcodex%2FStandards%2FCXS%2B152-1985%2FCXS_152e.pdf
 23. Sánchez-Maldonado, A. F., Lee, A., & Farber, J. (2018). "Methods for the Control of Foodborne Pathogens in Low-Moisture Foods". *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 177-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012304>
 24. Nowacka, M., Dadan, M., & Tylewicz, U. (2023). "Drying Technologies in Food Processing". *Applied Sciences*, 13(19), 10597. <https://doi.org/10.3390/app131910597>
 25. Nassar, A. G., AbdEl-Hamied, A. A., & El-Naggar, E. A. (2008). "Effect of citrus by-products flour incorporation on chemical, rheological and organoleptic characteristics of biscuits". *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(5), 612-616.
 26. Gallegos-Garza, M. M., Aguilar-Pérez, S. A., Guzmán-Díaz, D. A., Báez-González, J., Alanís-Guzmán, G., y Amaya-Guerra, C. A. (2018). "Caracterización tecnofuncional de harinas obtenidas de la cáscara y semillas de pepino (*Cucumis sativus*) y su aplicación en un alimento funcional". *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 602-606.
 27. Moon, K. M., Kwon, E., Lee, B., & Kim, C. Y. (2020). "Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products". *Molecules*, 25(12), 2754. <https://doi.org/10.3390/molecules25122754>
 28. Culetu, A., Susman, I. E., Duta, D. E., & Belc, N. (2021). "Nutritional and Functional Properties of Gluten-Free Flours". *Applied Sciences*, 11(14), 6283. <https://doi.org/10.3390/app11146283>

29. Juszczak, L., Witczak, M., & Ziobro, R. (2020). "Effect of Citrus Fiber on the Rheological Properties of Dough and Quality of Gluten-Free Bread". *Applied Sciences*, 10(19), 6633. <https://doi.org/10.3390/app10196633>
30. Huang, X., Chen, Y., Cai, Z., & Liu, F. (2023). "Functional properties of citrus by-products: Water holding capacity and oil absorption capacity". *Foods*, 12(5), 1234. <https://doi.org/10.3390/foods12051234>
31. Li, H., Liu, X., Ma, Y., Liu, Y., & Hou, J. (2022). "Comparison and Characterization of the Structure and Physicochemical Properties of Three Citrus Fibers: Effect of Ball Milling Treatment". *Foods*, 11(17), 2665. <https://doi.org/10.3390/foods11172665>
32. Bugarín, R., & Gómez, M. (2023). "Can Citrus Fiber Improve the Quality of Gluten-Free Breads?". *Foods*, 12(7), 1357. <https://doi.org/10.3390/foods12071357>
33. Jiang, S. C., Engle, N. L., Banday, Z. Z., Cecchini, N. M., Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., & Greenberg, J. T. (2021). "ALD1 accumulation in Arabidopsis epidermal plastids confers local and non-autonomous disease resistance". *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2710-2726. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa609>
34. Xu, Y., Zhang, W., & Li, G. (2019). "Blanching effects on chemistry, quality and structure of green beans". *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(6), e14127. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14127>
35. Wen, J., Gu, Q., Wu, J., Yu, Y., Xu, Y., Fu, M., & Lin, X. (2021). "Evaluation of the Structural, Physicochemical and Functional Properties of Dietary Fiber Extracted from Newhall Navel Orange By-Products". *Foods*, 10(11), 2772. <https://doi.org/10.3390/foods10112772>
36. Hincapié Llanos, C., Arias Gómez, Z., & Vélez Acosta, L. (2021). "Efecto de la temperatura de secado sobre las propiedades funcionales de la fibra dietaria presente en la citropulpa". *Revista Lasallista de Investigación*, 7(2), 85-93. ISSN: 1794-4449. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69519014010>
37. López-Sánchez, P., Gidley, M. J., & Gilbert, E. P. (2020). "Dietary fiber and its interactions with water: A review". *Food Hydrocolloids*, 105, 105846. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105846>



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Extractos de semilla y cáscara de guanábana (*Annona muricata* L.): evaluación fitoquímica Soursop (*Annona muricata* L.) seed and peel extracts: phytochemical evaluation

Hernández-Guerrero, S.E.¹, López-Guzmán, G.G.^{2*}, Balois-Morales, R.³, De los Santos-Santos, M.A.³, Chavarin-Pérez, V.⁴, Magaña-Cervantes, M.G.⁵, Vázquez-Martínez, K.G.⁶

¹ Estancias postdoctorales, CONAHCyT-becarios investigadores, Universidad Autónoma de Nayarit, México.

² Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63780. Xalisco.

³ Unidad de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura, C. P. 63000, Tepic, Nayarit, México.

⁴ Universidad Tecnológica de la Costa, DICA, Carretera Santiago entronque internacional No. 15 km 5, Santiago Ixcuintla Nayarit, México.

⁵ Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo Av. Universidad No. 3000, Lomas de la Universidad, C. P. 59103. Sahuayo Michoacán, México.

⁶ Universidad de Guadalajara, CUCEI Blvd. Gral. Marcelino García Barragán No. 1421, Olímpica, C. P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

sara_hernandez@uan.edu.mx, graciela.lopez@uan.edu.mx*; rmbalois@uan.edu.mx;
miguel.delossantos@uan.edu.mx; vladimir.chavarin02@outlook.com; lupitamaganacervantes@gmail.com;
kevin.vazquez8770@alumnos.udg.mx

Innovación tecnológica: Alternativa sostenible para la obtención de extractos vegetales.

Área de aplicación: Fitoquímica.

Recibido: 07 diciembre 2023

Aceptado: 22 mayo 2024

Abstract

Depending on environmental conditions, plants have developed defense mechanisms such as secondary metabolites for in order to adapt to environmental conditions. Several studies on soursop extracts have reported antimicrobial, antiprotozoal, anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and insecticidal properties. Therefore, a phytochemical evaluation of soursop peel and seed extracts obtained with methanol at 100 % and 80 %, and ethanol at 96 %, 80 % and 70 % was proposed to be used in alternative methods for the control of fungal diseases in post-harvest, in addition to providing an alternative to the use of soursop fruit residues. Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites were performed by colorimetry for phenols and tannins, flavonoids, quinones, terpenoids, steroids, saponins and alkaloids, and spectrophotometry for total soluble

phenols, tannins, flavonoids, chlorophylls, and total carotenoids. The following nomenclature was assigned to each of the extracts obtained: The methanol extracts at 100 and 80 % were assigned MET 100 and MET 80, and the ethanolic extracts at 96, 80 and 70 % were assigned ET 96, ET 80, and ET 70 respectively. For the determination of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids, methanol at 100 and 90 % and ethanol at 95 % were used as solvents, assigning MET 100, MET 90 and ET 95 as nomenclature.

A positive qualitative phytochemical screening for phenols, tannins, flavonoids, quinines, steroids, saponins and alkaloids was obtained in peel extracts (MET 100 and 80, ET 96, 80 and 70) while seed extracts (MET 100 and 80, ET 96, 80 and 70) were positive for flavonoids and alkaloids, however, the determination of quinines was negative in these same extracts. ET 70 presented high phenol content (137.96 mg EAG g.p.s.⁻¹) in the soursop peel extract and in the seed sample, ET 80 obtained high phenol content (36.45 mg EAG. g.p.s.⁻¹), with a $P > 0.05$. On the other hand, ET 70 and ET 80 had a high tannin content (62.71 mg EAG.g.p.s.⁻¹) in peel and 22.99 mg EAG.g.p.s.⁻¹ in soursop seed with a $P > 0.05$. The flavonoid content in the ET 70 extract was 92.69 mg ER g.p.s.⁻¹ in peel and in soursop seed, MET 80 extract, obtained 20.85 mg ER.g.p.s.⁻¹ with a $P \geq 0.05$ between the extracts evaluated. Regarding the total chlorophyll content, a high content was obtained in peel (23.79 $\mu\text{g. g}^{-1}$) when compared to total chlorophyll content in soursop seed (2.46 $\mu\text{g. g}^{-1}$) presenting a statistical difference (3.48; $P \geq 0.05$). As for the content of carotenoids present in soursop peel, the value was 4.67 $\mu\text{g. g}^{-1}$ while in seed it was 0.41 $\mu\text{g. g}^{-1}$. In soursop peel extracts (qualitative) with solvent (80 % methanol) the presence of phenols, tannins, flavonoids, quinines, terpenoids, steroids, saponins and alkaloids was detected. Seed extracts (quantitative) with 80 % ethanol and peel with 70 % ethanol showed a high content of total soluble phenols, tannins, and flavonoids. Extracts with high chlorophyll content were shell with 100 % methanol and seed with 90 % methanol, for carotenoids, seed with 95 % ethanol.

Key words: Annonaceae, Ethanol, Methanol, Ultrasound.

Resumen

Las plantas para su adaptación, dependiendo de las condiciones ambientales, han desarrollado mecanismos de defensa como son los metabolitos secundarios. Diversos estudios en extractos de guanábana han reportado propiedades antimicrobianas, antiprotzoarias, antiinflamatorias, antioxidantes, citotóxicas e insecticidas. Por ello, se propuso realizar una evaluación fitoquímica de extractos de cáscara y semilla de guanábana obtenidos con metanol al 100 y 80 %, y etanol al 96, 80 y 70 % para ser utilizados en métodos alternativos de control de enfermedades fúngicas en postcosecha, además de brindar una alternativa al uso de residuos derivados del fruto de guanábana. Se realizaron análisis cualitativos y cuantitativos de metabolitos secundarios, mediante colorimetría para fenoles y taninos, flavonoides, quininas, terpenoides, esteroides, saponinas y alcaloides y espectrofotometría para fenoles solubles totales, taninos, flavonoides, clorofilas y carotenoides totales. La siguiente nomenclatura se le asignó a cada uno de los extractos obtenidos: A los extractos de metanol al 100 y 80 % se les asignó MET 100 y MET 80, y a los extractos

etanólicos al 96, 80 y 70 %, se les fue asignando ET 96, ET 80 y ET 70 como nomenclatura. Para la determinación de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales se utilizaron los solventes metanol al 100 y 90 %, y etanol al 95 % asignando la nomenclatura MET 100, MET 90 y ET 95 respectivamente.

Se obtuvo un tamizaje fitoquímico cualitativo positivo a fenoles, taninos, flavonoides, quininas, esteroides, saponinas y alcaloides en extractos de cáscara (MET 100 y 80, ET 96, 80 y 70) mientras que los extractos de semilla (MET 100 y 80, ET 96, 80 y 70) fueron positivos a flavonoides y alcaloides, no obstante, la determinación de quininas fue negativa en estos mismos extractos. ET 70 presentó alto contenido de fenoles (137.96 mg EAG g.p.s.⁻¹) en el extracto de cáscara de guanábana y en la muestra de semilla, ET 80 obtuvo alto contenido de fenoles (36.45 mg EAG g.p.s.⁻¹), con una $P > 0.05$. Por otro lado, ET 70 y ET 80 presentaron alto contenido de taninos (62.71 mg EAG.g.p.s.⁻¹) en cáscara y 22.99 mg EAG.g.p.s.⁻¹, en semilla de guanábana con una $P > 0.05$. El contenido de flavonoides en el extracto ET 70 fue de 92.69 mg ER g.p.s.⁻¹ en cáscara y en semilla de guanábana, MET 80 obtuvo 20.85 mg ER.g.p.s.⁻¹ con una $P \geq 0.05$ entre los extractos evaluados. Respecto al contenido de clorofilas totales, se obtuvo un alto contenido en cáscara (23.79 $\mu\text{g. g}^{-1}$) al ser comparado con el contenido de clorofilas totales en semilla de guanábana (2.46 $\mu\text{g. g}^{-1}$) presentando una diferencia estadística (3.48; $P \geq 0.05$). En cuanto al contenido de carotenoides presentes en la cáscara de guanábana, el valor fue de 4.67 $\mu\text{g. g}^{-1}$ mientras que en semilla fue de 0.41 $\mu\text{g. g}^{-1}$. En extractos de cáscara de guanábana (cualitativo) con solvente (metanol al 80 %) se detectó la presencia de fenoles, taninos, flavonoides, quininas, terpenoides, esteroides, saponinas y alcaloides. En extractos de semilla (cuantitativo) con etanol al 80 %, y cáscara con etanol al 70 % presentaron alto contenido de fenoles solubles totales, taninos y flavonoides. Los extractos con alto contenido de clorofila fueron cáscara con metanol al 100 % y semilla con metanol al 90 %; para carotenoides, semilla con etanol al 95 %.

Palabras Clave: Annonaceae, Etanol, Metanol, Ultrasonido.

1. Introducción

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa y plasticidad en donde la producción de metabolitos secundarios contribuye a la atracción de polinizadores y a la protección de las plantas en contra de factores bióticos (animales, plantas, hongos, bacterias, protistas) y abióticos (temperatura, agua, suelo, aire, luz solar) presentes en el entorno donde se propagan (Jiménez-Zurita *et al.*, 2016; Flores *et al.*, 2008).

La guanábana (*Annona muricata* L.) es una planta nativa de las zonas tropicales cálidas del Sur y de Norte América, produce un fruto

comestible de color verde oscuro con protuberancias estilares (Errayes *et al.*, 2020; Jiménez-Zurita *et al.*, 2023). México destina 3,378.49 ha para el cultivo de guanábana, posicionándose como el principal productor de este fruto, siendo Nayarit el estado que aporta la mayor parte de la producción con 2,464 ha sembradas y valuada en 322 millones de pesos, de acuerdo con los datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2022).

Diversos estudios en extractos de guanábana, reportan propiedades antimicrobianas, citotóxicas, antiprotazoarias,

antiinflamatorias, antioxidantes e insecticidas, identificándose 212 compuestos bioactivos entre los que se destacan terpenoides, esteroides, alcaloides, acetogeninas, compuestos fenólicos y saponinas, cuya presencia o concentración varía en cada órgano estructural (raíz, corteza, hoja, flor, pulpa y semilla) durante cada etapa fenológica de la planta, técnica utilizada para la obtención del extracto así como tipo de solvente (Coria-Tellez *et al.*, 2018; Abdel *et al.*, 2019; León-Fernández *et al.*, 2021).

Existen diferentes métodos para la extracción de metabolitos presentes en las plantas, destacando los métodos no convencionales que sustituyen a los métodos convencionales; algunos de los métodos no convencionales incluyen campos de los pulsos eléctricos, microondas, calentamiento óhmico y ultrasonido, siendo uno de los métodos más eficientes la extracción asistida por ultrasonido (EAU) debido al colapso de las burbujas formadoras de cavitación que rompen las paredes celulares (Corona-Jiménez *et al.*, 2016; Nolasco-González *et al.*, 2022).

Por otro lado, los frutos son altamente susceptibles a las enfermedades poscosecha lo que provoca pérdidas considerables debido a un mal manejo poscosecha, daños físicos y daños mecánicos en los frutos. Para el control de enfermedades en frutos poscosecha se utilizan fungicidas químicos que son eficientes y económicos; sin embargo, pueden incrementar la resistencia de las especies fúngicas y de los residuos químicos, los cuales son considerados como una amenaza para el consumidor y el medio ambiente (Oztekin *et al.*, 2023).

Considerando la importancia que tiene el fruto de guanábana en el estado de Nayarit y los reportes acerca de las múltiples propiedades que poseen los extractos

obtenidos de este fruto, se propuso realizar una evaluación fitoquímica de extractos de cáscara y semilla de guanábana obtenidos con metanol al 100 y 80 %, y etanol al 96, 80 y 70 % para ser utilizados en investigaciones futuras como método alternativo en el control de enfermedades fúngicas en poscosecha, además de brindar una alternativa al uso de residuos derivados del fruto de guanábana.

2. Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron frutos de guanábana en los huertos del municipio de Venustiano Carranza, Nayarit, México (21°31' 6.0" N y 104° 59' 10.0" O) en el mes de noviembre del 2022. Los frutos fueron trasladados a la Unidad de Tecnología de Alimentos (UTA) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN).

Los frutos fueron sumergidos en una solución de hipoclorito sódico (NaClO_3) al 1 % durante 3 min, con la finalidad de eliminar los microorganismos patógenos y remover restos de contaminantes presentes de campo. Posteriormente, los frutos se enjuagaron con agua de grifo y se dejaron secar durante 30 minutos en papel absorbente hasta la evaporación del agua. De un lote de frutos de guanábana (madurez fisiológica) se les desprendió la cáscara, la cual fue tratada con una solución de ácido cítrico al 1 % (p/v). De un segundo lote de frutos (madurez de consumo) se obtuvo la semilla de guanábana, se permitió al fruto llegar a la madurez de consumo. El material obtenido (cáscara y semilla de guanábana) se llevó a secado en un horno de convección forzada (MMM Venticell VC 55 ECO, Germany) a 25 °C. La cáscara se dejó en secado por un periodo de 3 d, mientras que, para la semilla fue un periodo de 7 d (hasta peso constante). Posteriormente, la cáscara y semilla, se trituraron, por separado, en un procesador de alimentos (Oster, E.U.A.) y se conservó a -20 °C para su posterior uso.

Obtención de extractos

En la presente investigación, se emplearon dos solventes a diferentes concentraciones: Metanol al 100 y 80 %, y Etanol al 96, 80 y 70 %; a 10 g de muestra (cáscara o semilla) se le adicionaron 100 mL de solvente. La mezcla (material seco más solvente) se llevó a baño ultrasónico (Luzerner modelo CD-4820, China) a 35 kHz y 160 W durante 32 min (4 ciclos de 8 min), y a continuación, se centrifugó a 4508 x g/15 min/4 °C en una centrifuga HERMLE® modelo Z326K (Wehingen, Germany), recuperando el sobrenadante y éste se llevó a una segunda centrifugación a 6136 x g/15 min/4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros Whatman No. 1 y 5, así como filtros de jeringa de polivinilideno fluoruro (PVDF) de 0.45 µm con base a la metodología de Hernández-Guerrero *et al.* (2020), con modificaciones. El solvente fue evaporado en un sistema de flujo de aire continuo de acuerdo con la metodología reportada por Zavaleta-Espejo *et al.* (2019) a 26 °C por un periodo de 72 h para los extractos etanólicos y 96 h para los extractos metanólicos, hasta la obtención de extractos semisólidos. Los extractos obtenidos fueron conservados en frascos ámbar a -20 °C para su uso posterior. La siguiente nomenclatura se le asignó a cada uno de los extractos obtenidos: A los extractos de metanol al 100 y 80 % se les asignó MET 100 y MET 80 y a los extractos etanólicos al 96, 80 y 70 %, se le asignó la nomenclatura de ET 96, ET 80 y ET 70 respectivamente.

Análisis fitoquímico cualitativo

El cribado fitoquímico de cáscara y semilla de guanábana se llevó a cabo mediante métodos estandarizados descritos por Sofowara (1993), Harborne (1998) y Evans (2009) indicando la presencia o ausencia de metabolitos secundarios mediante el sistema de cruces. Se tomó 0.1 g de cada extracto

obtenido y se diluyó en 10 mL (solución madre) del respectivo solvente (MET100 y 80, ET 96, 80 y 70). De la solución madre, se tomó una alícuota de 500 µL para la detección de cada uno de los fitoquímicos. Para evaluar los compuestos fenólicos y taninos, se utilizó el reactivo FeCl₃ al 10 %, para detectar flavonoides, se utilizó NaOH al 20 %; para quininas NaOH al 1 %. Así mismo, para terpenoides y esteroides se utilizó H₂SO₄ concentrado; y para saponinas, se utilizó agua destilada, agitando vigorosamente por un minuto, generando una espuma estable y duradera. Para la presencia de alcaloides se utilizó el reactivo de Mayer's, los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis fitoquímico cuantitativo

La determinación cuantitativa se realizó por triplicado realizando diluciones de la solución madre (1 a 15 v/v para cáscara y 1 a 5 v/v para semilla) de cada extracto obtenido. Las muestras se colocaron en microplacas ELISA de 96 pocillos utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate para las lecturas de absorbancia.

Fenoles solubles totales: Para la cuantificación de los fenoles solubles totales se utilizó el reactivo de Folin y NaCO₃ al 7.5 %. Se tomaron lecturas de absorbancia a 765 nm de acuerdo con la metodología propuesta por Maksimović *et al.* (2005). Los resultados se expresaron mg EAG.g p.s⁻¹. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones de (0-100 mg/L).

Taninos totales: Se determinaron utilizando los reactivos Folin + PVPP (polivinilpolipidorrilona) y NaCO₃ al 7.5 %. de acuerdo con la metodología descrita por Makkar (2003). Las absorbancias se leyeron a 765 nm. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones de (0-100 mg/L). Los resultados se expresaron en mg

EAG/g.p.s.⁻¹. El contenido de Taninos Totales se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Taninos totales} = \text{Fenoles totales} - \text{Fenoles no taninos}$$

Flavonoides totales: Con base a la metodología sugerida por Zhishen *et al.*, (1999), se realizó una curva de referencia con rutina en metanol puro de 0 a 400 mg/L. Los flavonoides totales se cuantificaron utilizando los reactivos NaNO₃ al 15 %; AIC₃ al 10 % y NaOH al 4 %. Las absorbancias se midieron a 510 nm. Los resultados fueron expresados mg ER/100 g p.s.⁻¹.

Carotenoides: Se utilizaron dos solventes asignándoles la nomenclatura a metanol al

100 % de MET 100, a metanol al 90 % MET 90 y ET 95 a etanol al 95 % para la cuantificación de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales. Este procedimiento se llevó a cabo con base a la metodología propuesta por (Branisa *et al.*, 2014). Se pesaron 0.1 g de muestra seca y pulverizada (cáscara y semilla de guanábana) y se adicionaron 10 mL del solvente extractante (MET 100, MET 90 y ET 95); la mezcla fue llevada a baño ultrasónico por 8 min. Posteriormente, las mezclas obtenidas se centrifugaron en una microcentrífuga Sigma modelo 1-14K (Osterode, Germany) a 7378 g/10min/4 °C. Las absorbancias se leyeron de acuerdo con el solvente utilizado como lo determina Lichtenthaler (1987) (tabla 1).

Tabla 1. Fórmulas utilizadas en para la determinación de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales.

Solvente	Fórmula
MET 100	$C_a (\mu\text{g/mL}) = 13.36A_{665} - 2.79A_{652}$
	$C_b (\mu\text{g/mL}) = 34.09A_{652} - 15.28A_{665}$
	$C_{a+b} (\mu\text{g/mL}) = 1.44A_{665} + 24.93A_{652}$
	$C_{x+c} (\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 1.91C_a - 95.15C_b) / 225$
MET 90	$C_a (\mu\text{g/mL}) = 16.82A_{665} - 9.28A_{652}$
	$C_b (\mu\text{g/mL}) = 36.92A_{652} - 16.54A_{665}$
	$C_{a+b} (\mu\text{g/mL}) = 0.28A_{665} + 27.64A_{652}$
	$C_{x+c} (\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 1.91C_a - 95.15C_b) / 225$
ET 95	$C_a (\mu\text{g/mL}) = 13.36A_{664} - 5.19A_{648}$
	$C_b (\mu\text{g/mL}) = 27.43A_{648} - 8.12A_{664}$
	$C_{a+b} (\mu\text{g/mL}) = 5.24A_{664} + 22.24A_{648}$
	$C_{x+c} (\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 2.13C_a - 97.64C_b) / 225$

Donde la fórmula de C_a permite obtener la concentración de clorofila *a*; C_b obtener la concentración de clorofila *b*, y C_{a+b} para la obtención de clorofilas totales, mientras que de la fórmula C_{x+c} se obtiene el total de carotenoides.

3. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los resultados se analizaron con un ANOVA y comparación de medias mediante la prueba Tukey ($P \leq 0.05$) para la detección de diferencias estadísticas significativas utilizando el software

Statistical Analysis System (SAS V. 9.2. Castillo, 2011).

4. Resultados y discusión

Los rendimientos de MET 100 y 80; ET 96, 80 y 70 de cáscara, y semilla de guanábana oscilaron entre el 5 y 11.9 % a una proporción de 1:10, siendo MET 80 el solvente que presentó mayor efectividad en cáscara de guanábana (11.9 %) en cuanto a rendimiento se refiere; en cambio, en semilla de guanábana, el solvente que presentó el rendimiento más alto fue ET 70 (8 %) (Tabla 2). En un estudio realizado por Orak *et al.* (2019), donde compararon extractos

obtenidos con solventes de polaridad creciente en pulpa de frutos, subproductos (cáscara y semilla) y hojas de guanábana utilizando el método de extracción Soxhlet a una proporción de 1:3. Los investigadores obtuvieron un 16.50 % de rendimiento para el extracto de cáscara de guanábana; mientras que, para la semilla de guanábana con el mismo solvente (metanol), obtuvieron 3.66 %, valores que difieren con la presente

investigación. De acuerdo con Aguilar-Hernández *et al.* (2019), la eficacia de la extracción dependerá de las condiciones del ultrasonido y el material vegetal, ya que el efecto del ultrasonido altera sus propiedades físicas y químicas del material vegetal a causa del fenómeno de cavitación el cual facilita la liberación de los compuestos extraíbles y mejora el transporte de masa al alterar las paredes celulares.

Tabla 2. Rendimiento de extractos obtenidos de cáscara y semilla de *A. muricata* L. utilizando metanol al 100 y 80 % y etanol al 96, 80 y 70 % como solvente.

Muestra vegetativa	Solvente	Peso muestra (g)	Solvente (mL)	Extracto recuperado	Rendimiento
Cáscara	MET 100	10	100	0.93	9.3 %
	MET 80	10	100	1.19	11.9 %
	ET 96	10	100	0.53	5.3 %
	ET 80	10	100	0.56	5.6 %
	ET 70	10	100	0.91	9.1 %
Semilla	MET 100	10	100	0.52	5.2 %
	MET 80	10	100	0.67	6.7 %
	ET 96	10	100	0.73	7.3 %
	ET 80	10	100	0.62	6.2 %
	ET 70	10	100	0.80	8 %

Análisis cualitativo

En los extractos de cáscara y semilla de guanábana (tabla 3) se muestra la presencia de diferentes metabolitos secundarios tales como fenoles, flavonoides, quininas, terpenoides, esteroides, alcaloides y saponinas. Se obtuvo un tamizaje fitoquímico cualitativo positivo a fenoles, taninos, flavonoides, quininas, esteroides, saponinas y alcaloides en extractos de cáscara (MET 100 y 80, ET 96, 80 y 70). Del mismo modo, los extractos de semilla (MET 100 y 80, ET 96, 80 y 70) fueron positivos a flavonoides y alcaloides; no obstante, la determinación de quininas en estos mismos tratamientos fue negativa. Los compuestos fenólicos contribuyen a la actividad antioxidante de la planta (Zhou *et al.*, 2011). Los taninos hidrolizables, son metabolitos secundarios que se consideran una combinación fenólica los cuales tienen la característica de poder

unirse a proteínas incluyendo compuestos básicos y moléculas de gran tamaño fortaleciendo la resistencia a ataques de bacterias y hongos en la planta (Dehghanian *et al.*, 2022). Por otro lado, la presencia de flavonoides en los extractos de cáscara y semilla de guanábana se atribuye a que los flavonoides son compuestos no lipofílicos, por lo que se obtiene un mayor contenido de éstos al utilizar solventes polares (Escamilla *et al.*, 2009). Algunas de las plantas son conocidas por producir alcaloides tóxicos que sirven como repelente a depredadores y parásitos. De la guanábana se han extraído alcaloides tanto de la raíz como de las hojas, semillas y pulpa; sin embargo, el contenido de alcaloides en la cáscara de guanábana ha sido poco estudiado (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020). La presencia de los metabolitos secundarios que se abordan en este proyecto ha sido reportada en diferentes partes de la

planta de guanábana: raíces, hojas, pulpa, inflorescencia (León-Fernández *et al.*, 2021; Dilrikshi *et al.*, 2020) e incluso en otras

especies de *Annona* (Sánchez-González *et al.*, 2019; Anaya-Esparza *et al.*, 2020).

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cáscara y semilla de *A. muricata* L.

Compuesto fitoquímico	Extracto									
	Cáscara					Semilla				
	Metanol (%)		Etanol (%)			Metanol (%)		Etanol (%)		
	100	80	96	80	70	100	80	96	80	70
Fenoles y taninos	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quininas	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Terpenoides	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Esteroides	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Saponinas	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Alcaloides	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+

Presencia (+), Ausencia (-).

Análisis Cuantitativo

Los compuestos fenólicos tienen una serie de funciones metabólicas en el crecimiento y reproducción de las plantas, en la protección contra patógenos externos, así como la protección de factores de estrés, la radiación UV y depredadores (Aguilar- Hernández *et al.*, 2019; Peñarrieta *et al.*, 2014). Los taninos son moléculas complejas conformadas por alrededor de 12 a 16 grupos fenólicos, lo que les otorga gran capacidad de interaccionar con otras moléculas de interés biológico (Hassanpour *et al.*, 2011). De acuerdo con los resultados (tabla 4) en cáscara de guanábana (ET 70) presentó alto contenido de fenoles (137.96 mg EAG. g.p.s.⁻¹) y en semilla (ET 80) fue el extractante con alto contenido de fenoles (36.45 mg EAG. g.p.s.⁻¹), presentando una diferencia estadística significativa ($P > 0.05$). En la investigación de Manochai *et al.* (2018) utilizaron como solvente etanol al 96 % para la extracción de fenoles en pulpa de *Annona squamosa* L. ‘Sugar apple’ obteniendo como resultado 140.4 mg EAG.g.p.s.⁻¹, donde se puede apreciar que son resultados cercanos a los obtenidos en la presente investigación con etanol al 70 % en cáscara de guanábana (137.96 mg EAG.g.p.s.⁻¹). En la tabla 3, se

evidencia que el extracto ET 70 presentó mayor contenido de taninos en cáscara de guanábana (62.71 mg EAG.g.p.s.⁻¹) y en semilla ET 80 es el extracto con mayor presencia de taninos (22.99 mg EAG.g.p.s.⁻¹), obteniendo una diferencia estadística ($P > 0.05$). La presencia de taninos se debe a que son metabolitos secundarios de las plantas que los caracteriza por ser solubles en agua y alcohol (Herrera-Fuentes *et al.*, 2017); con base a la investigación reportada por Zárate-Martínez *et al.* (2021) se puede inferir que los taninos están presentes en cáscara, semilla y pulpa de guanábana. En el presente estudio se obtuvo un mayor contenido de flavonoides en el extracto ET 70 en cáscara (92.69 mg ER g.p.s.⁻¹) y en semilla, el contenido en el extracto MET 80 fue de 20.85 mg ER.g.p.s.⁻¹ con una diferencia estadística ($P \geq 0.05$) entre los extractos evaluados (tabla 4). Los resultados obtenidos en esta investigación con el extracto ET 96 en cáscara de guanábana fue de 73.32 mg ER g.p.s.⁻¹ mostrando una diferencia con los datos reportados por Zavaleta *et al.* (2005) donde realizaron una determinación de flavonoides en pulpa de Olluco (*Ullucus tuberosus*) utilizando etanol 96 % donde obtuvieron 0.1422 mg ER g.p.s.⁻¹ Los flavonoides son

compuestos que constituyen uno de los grupos más característicos y extensos de las plantas superiores; se encuentran normalmente en las vacuolas y su concentración generalmente es determinada

por factores exógenos (luz solar, lugar de cultivo, entre otros) así como de factores endógenos tales como la edad de la planta y su variabilidad genética (Piffer *et al.*, 2023; Esquinca *et al.*, 2005).

Tabla 4. Contenido de fenoles, taninos totales y flavonoides presentes en cáscara y semilla de guanábana.

Muestra vegetativa	Solvente	Fenoles solubles totales mg EAG/g.p.s.	Taninos totales mg EAG/g.p.s.	Flavonoides totales mg ER/g.p.s.
Cáscara	MET100	85.77 ± 8.23 b	25.04 ± 8.29 c	75.86 ± 2.50 a
	MET 80	65.31 ± 5.17 d	12.82 ± 4.89 c d	53.12 ± 9.38 b c
	ET 96	110.25 ± 5.61 b	42.85 ± 7.15 b	73.32 ± 21.36 a b
	ET 80	108.65 ± 4.46 b	14.65 ± 9.39 c d	41.43 ± 0.99 c d
	ET 70	137.96 ± 0.0 a	62.71 ± 2.20 a	92.69 ± 1.88 a
Semilla	MET 100	34.04 ± 5.66 e	16.11 ± 8.61 c d	6.24 ± 0.96 e
	MET 80	27.75 ± 0.18 e f	14.61 ± 0.68 c d	20.85 ± 3.34 d e
	ET 96	19.48 ± 3.88 f	4.86 ± 4.26 d	3.47 ± 0.24 e
	ET 80	36.45 ± 4.49 e	22.99 ± 5.35 c	20.57 ± 1.93 d e
	ET 70	31.75 ± 1.09 e f	17.55 ± 0.58 c d	5.41 ± 1.05 e
	CV	5.01	5.01	4.53
	DMS	13.38	17.31	13.31

Literales iguales por columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \geq 0.05$).

Los frutos poseen una alta concentración de pigmentos fácilmente identificables por sus colores característicos, tal es el caso de las clorofilas que se caracterizan por el color verde y están directamente relacionadas con la fotosíntesis de las plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos (Carranco *et al.*, 2011). En este estudio se cuantificó el contenido de clorofilas y carotenoides totales presentes en las muestras de semilla y cáscara de guanábana, observando un mayor contenido de clorofilas totales en cáscara de guanábana (23.79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) que en semilla de guanábana (2.46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentando una diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) (tabla 5), esto debido a que la concentración de clorofila es mayor en frutos que presentan el color verde en la cáscara durante el proceso de maduración (Arteaga Dalgo *et al.*, 2014; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017), mientras que, Andrade-Cuvi *et al.* (2021) reportan que el contenido de clorofila es menor en la semilla

de naranjilla (*Solanum quitoense* L.) que en la cáscara del mismo fruto. Los carotenoides pueden acumularse en los plastidios que se encuentran en fruta, flor, raíz y semilla (Howitt y Pogson, 2006) y son precursores para la síntesis de ácido abscísico (ABA), que se asocia con la dormancia de la semilla (Maluf *et al.*, 1997). Branisa *et al.*, (2014) reportan el contenido de carotenoides totales en fresa (2.10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), frambuesa (10.40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y albaricoque (16.27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), donde al compararlo con los datos obtenidos en la presente investigación, se obtuvo un valor de 4.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en el contenido de carotenoides presentes en la cáscara de guanábana (tabla 5); cifra mayor a lo reportado en fresa, y menor a lo reportado en albaricoque y frambuesa, mientras que los carotenoides obtenidos en semilla de guanábana (0.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) son aún más bajos en comparación con los valores reportados anteriores. Por otro lado, Neta *et al.* (2019) obtuvieron 7.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de carotenoides totales en pulpa de guanábana; sin embargo, en la presente investigación se obtuvieron valores menores

en cáscara y semilla del mismo fruto (4.67 y 0.41 $\mu\text{g. g}^{-1}$ respectivamente).

Tabla 5. Contenido de clorofilas y carotenoides totales presentes en cáscara y semilla de guanábana.

Muestra vegetativa	Solvente	Clorofila a $\mu\text{g/g}$	Clorofila b $\mu\text{g/g}$	Clorofilas totales $\mu\text{g/g}$	Carotenoides totales $\mu\text{g/g}$
Cáscara	MET 100	16.63 $\pm$ 0.17 a	7.16 $\pm$ 0.11 a	23.79 a	4.67 $\pm$ 0.21 a
	MET 90	14.46 $\pm$ 0.1 b	6.95 $\pm$ 0.06 a	21.41 ab	4.41 $\pm$ 0.12 a
	ET 95	12.63 $\pm$ 0.05 b	6.34 $\pm$ 0.03 a	18.97 b	3.40 $\pm$ 0.06 b
Semilla	MET 100	0.34 $\pm$ 0.002 c	0.99 $\pm$ 0.004 b	1.34 c	0.14 $\pm$ 0.009 c
	MET 90	0.48 $\pm$ 0.010 c	1.56 $\pm$ 0.009 b	2.46 c	0.22 $\pm$ 0.01 c
	ET 95	0.38 $\pm$ 0.002 c	0.94 $\pm$ 0.002 b	1.32 c	0.41 $\pm$ 0.007 c
	CV	0.55	0.26	1.50	0.04
	DMS	2.01	1.44	3.48	0.53

Literales iguales por columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \geq 0.05$).

5. Conclusión

En extractos de cáscara de guanábana (cualitativo) con solvente (metanol al 80 %) se detectó la presencia de fenoles, taninos, flavonoides, quininas, terpenoides, esteroides, saponinas y alcaloides. En extractos de semilla (cuantitativo) con etanol al 80 %, y cáscara con etanol al 70 % presentaron alto contenido de fenoles solubles totales, taninos y flavonoides. Los extractos con alto contenido de clorofila fueron cáscara con metanol al 100 % y semilla con metanol al 90 %; para carotenoides, semilla con etanol al 95 %.

6. Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca Posdoctoral otorgada.

Referencias

- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Jiménez-Ruiz, E. I., Sumaya-Martínez, T. & Bello-Lara, J. E. (2017). Tópicos del manejo postcosecha del fruto de guanábana *Annona muricata* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1155–1167.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263152411012>.
- Flores, R. C., Reyes, L. H., y Guzmán, V. D. H. (2008). *Ecología y medio ambiente*. Cengage Learning Latin America.
- Errayes, A., Mohammed, W. & Darwish, M. (2020). Review of Phytochemical and Medical Applications of *Annona Muricata* Fruits. *Journal of Chemical Reviews*, 2(1), 70-79.
<https://doi.org/10.33945/SAMI/JCR.2020.1.5>
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G. G., Palomino-Hermosillo, Y. A. & Bautista-Rosales, P. U. (2023). Guanay-1, Guanay-2 y Guanay-3: nuevas variedades de guanábana para Nayarit. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(4), 641-646.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v14i4.3098>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). *Anuario estadístico de la producción agrícola*.
<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M. & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* 11(5), 662–691.

- <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.
7. Abdel-Rahman, T., Hussein, A. S., Beshir, S., Hamed, A. R., Ali, E. & El-Tanany, S. S. (2019). Antimicrobial Activity of Terpenoids Extracted from *Annona muricata* L. Seeds and its Endophytic *Aspergillus niger* Strain SH3 Either Singly or in Combination. *Open access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(19), 3127–3131. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.793>.
 8. León-Fernández, A. E., Morales, R. B., Bautista-Rosales, P. U., Palomino-Hermosillo, Y. A., Bello-Lara, J. E. & López-Rivas, C. E. (2021). Extracción de compuestos fitoquímicos de inflorescencia y frutos de guanábana (*Annona muricata* L.). *Acta Agrícola y Pecuaria*, 7(1), Article 1. <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/269>.
 9. Corona-Jiménez, E., Martínez-Navarrete, N., Ruiz-Espinosa, H. & Carranza-Concha, J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. *Agrociencia* 50, 403-412. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000400403.
 10. Nolasco-González, Y., Chacón-López, M. A., Ortiz-Basurto, R. I., Aguilera-Aguirre, S., González-Aguilar, G. A., Rodríguez-Aguayo, C., Navarro-Cortez, M. C., García-Galindo, H.S., García-Magaña, M. de L., Meza-Espinoza, L. & Montalvo-González, E. (2022). *Annona muricata* Leaves as a Source of Bioactive Compounds: Extraction and Quantification Using Ultrasound. *Horticulturae*, 8(7), 1-17. <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae8070560>.
 11. Oztekin, S., Dikmetas, D. N., Devecioglu, D., Acar, E. G., & Karbancioglu-Guler, F. (2023). Recent Insights into the Use of Antagonistic Yeasts for Sustainable Biomanagement of Postharvest Pathogenic and Mycotoxigenic Fungi in Fruits with Their Prevention Strategies against Mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(26), 9923. <https://doi.org/10.1021%2Facs.jafc.3c00315>.
 12. Hernández-Guerrero, S., Balois-Morales, R., Bautista-Rosales, P., Lopez, G., Berumen-Varela, G., Hermosillo, Y. A., Jiménez Zurita, J. O., Bello-Lara, J. & León-Fernández, A. (2020). Identification of Fungal Pathogens of Mango and Soursop Fruits Using Morphological and Molecular Tools and Their Control Using Papaya and Soursop Leaf and Seed Extracts. *International Journal of Agronomy*, 2020, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2020/8962328>.
 13. Zavaleta, J., Muñoz, AM, Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte Médico*, 5 (2), <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637113004>.
 14. Harborne, J.B. (1998). *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Third edition. Chapman y Hall: London, UK.
 15. Sofowara, A. 1993. *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*, Second Edition. John Wiley and Sons Ltd: Ibadan, Nigeria, 191-289.
 16. Evans, W. C. (2009) *Trease and Evan's Pharmacognosy*. 16th edition. Reino Unido: Elsevier Health Sciences.
 17. Maksimović, Z., Malečić, D. & Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.006>.
18. Makkar HP (2003) *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*. Springer, New York.
 19. Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559. [http://doi:10.1016/s0308-8146\(98\)00102-2](http://doi:10.1016/s0308-8146(98)00102-2).
 20. Branisa, J., Jenisová, Z., Porubska, M., Jomová, K. & Valko M. (2014). Spectrophotometric determination of chlorophylls and carotenoids. An effect of sonication and sample processing. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(2), 61-64. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143095655>.
 21. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Plant Cell Membranes*, 34, 350-382. [http://doi:10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](http://doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1).
 22. Castillo M. L. E. (2011). Introducción al SAS® para Windows. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 295 p.
 23. Orak, H. H., Bahriseft, I. S., Sabudak, T. (2019). Antioxidant Activity of Extracts of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves, Fruit Pulps, Peels, and Seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 359-366. <https://doi.org/10.31883/pjfn/112654>.
 24. Aguilar-Hernández, G., García-Magaña, M. D. L., Vivar-Vera, M. D. L. Á., Sáyo-Ayerdi, S. G., Sánchez-Burgos, J. A., Morales-Castro, J., Anaya-Esparza L. M. & Montalvo González, E. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Annona muricata* by-products and pulp. *Molecules*, 24(5), 904. <https://doi.org/10.3390/molecules24050904>.
 25. Dehghanian, Z., Habibi, K., Dehghanian, M., Aliyar, S., Lajayer, B. A., Astatkie, T., Minkina, T., & Keswani, C. (2022). Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon*. 8(2022) e09094. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09094>.
 26. Zhou, K., Wang, H., Mei, W., Li, X., Luo, Y., y Dai, H. (2011). Antioxidant activity of papaya seed extracts. *Molecules*, 16(8), 6179-6192. <https://doi.org/10.3390/molecules16086179>.
 27. Escamilla J. C. I., Cuevas Martínez, E. Y. & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. In *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73-75. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092g.pdf>.
 28. Aguilar-Hernández, G., Zepeda-Vallejo, L. G., García-Magaña, M. D. L., Vivar-Vera, M. D. L. Á., Pérez-Larios, A., Girón-Pérez, M. I., Coria-Tellez, A. E. Rodríguez-Aguayo, C. & Montalvo-González, E. (2020). Extraction of alkaloids using ultrasound from pulp and by-products of soursop fruit (*Annona muricata* L.). *Applied Sciences*, 10(14), 4869. <https://doi.org/10.3390/app10144869>.
 29. Dilrikshi M. K. D. T., Dharmadasa R.M., Abeysinghe D. C. & Abhayagunasekara A. V. C. (2020). Selection of Superior Quality *Annona* Species by Means of Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity. *World Journal of Agricultural Research*, 8(2), 39-44. <https://doi.org/10.12691/wjar-8-2-3>.
 30. Sánchez-Gonzales, G., Castro-Rumiche, C., Álvarez-Guzmán, G., Flores-García, J. & Barriga-Sánchez, M. (2019).

- Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de la hoja de chirimoya (*Annona cherimola* Mill). *Revista Colombiana de Química*, 48(2), 21-26.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042019000200021&script=sci_arttext.
31. Anaya-Esparza, L. M., García-Magaña, M. de L., Abraham Domínguez-Ávila, J., Yahia, E. M., Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G. A. & Montalvo-González, E. (2020). Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. *Food Research International*, 138, 1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109775>.
 32. Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
<https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>.
 33. Hassanpour, S., MaheriSis, N. & Eshratkhah, B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*, 1(1), 47-53.
https://www.researchgate.net/publication/216069956_Plants_and_secondary_metabolites_Tannins_A_Review.
 34. Manochai, B., Ingkasupart, P., Lee, S. H. & Hong, J. H. (2018). Evaluation of antioxidant activities, total phenolic content (TPC), and total catechin content (TCC) of 10 sugar apple (*Annona squamosa* L.) cultivar peels grown in Thailand. *Food Science and Technology*, 1-7. <https://doi.org/10.1590/fst.22117>.
 35. Herrera-Fuentes, I., Quimis-Ponce, K., Sorroza-Rojas, N., García-Larreta, F., Mariscal-Santi, W., & Mariscal-García, R. (2017). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Polo del Conocimiento*, 2(7), 500-522.
<http://dx.doi.org/10.23857/pc.v2i7.257>.
 36. Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Effect of phenolic acids on the antioxidant system of tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 854-868.
<http://dx.doi.org/10.15517/am.v32i3.45101>.
 37. Piffer, A. B. M., Fornaciari, I. M., Zuqui, E., Bolsoni, A. M. H., de Paula Marchiori, J. J., Alves, A. G., de Carvalho, J. R., Aguiar, L. R., Furno, F. S. P. & de Paula Gomes, M. (2023). Extracts of plant residues from soursop peels in the management of palm red mite. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 11 (2): 19-24.
<https://doi.org/10.22271/j.ento.2023.v11.i2a.9168>.
 38. Esquinca, A. R. G. (2005). La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y tecnología en la frontera*, 2(3), 41-45.
<https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-tecnologia-en-la-frontera/articulo/la-familia-annonaceae-en-chiapas-y-sus-metabolitos>.
 39. Carranco J. M. E., Calvo C. Ma. de la C., & Pérez-Gil R, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233-241.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222011000300001.
 40. Arteaga Dalgo, M., Andrade Cuví, M. J. & Moreno Guerrero Carlota. (2014). Relación del desarrollo del color con el contenido de antocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez de mortiño (*Vaccinium floribundum*). *Enfoque UTE*, 5(2), 14-28.
<http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/>.

41. Andrade-Cuvi, M. J., Guijarro-Fuertes, M. & Luzcando Figueroa, J. (2021). Evaluación fisicoquímica y antioxidante de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) durante la maduración. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22(2), 145-164. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81369610003>.
42. Howitt, C. A. & Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), 435-445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x>
43. Maluf, M. P., Saab, I. N., Wurtzel, E. T. & Sachs, M. M. (1997). The *viviparous 12* maize mutant is deficient in abscisic acid, carotenoids, and chlorophyll synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(311), 1259-1268. <https://academic.oup.com/jxb/article/48/6/1259/654729>.
44. Neta, M. T. S. L., de Jesus, M. S., da Silva, J. L. A., Araujo, H. C. S., Sandes, R. D. D., Shanmugam, S., & Narain, N. (2019). Effect of spray drying on bioactive and volatile compounds in soursop (*Annona muricata*) fruit pulp. *Food Research International*, 124, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.039>.



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

In vitro* antifungal activity of *Lippia graveolens* and *Viscum album* ethanolic extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici

Actividad antifúngica in vitro de extractos etanólicos de *Lippia graveolens* y *Viscum album* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Tucuch-Pérez, M.A.^a, Hernández-Castillo, F.D.^b, Arredondo-Valdés, R.^a, Barrera-Martínez, C.L.^c, Anguiano-Cabello, J.C.^a, Laredo-Alcalá, E.I.^{c*}

^a Departamento de Nanobiociencia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, Col. República, CP. 25280 Saltillo, Coahuila, México.

^b Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

^c Centro de Investigación para la Conservación de la Biodiversidad y Ecología de Coahuila, Universidad Autónoma de Coahuila.

martp1216@gmail.com; fdanielhc@hotmail.com; r-arredondo@uadec.edu.mx; cynthia_barrera@uadec.edu.mx; julia.anguiano@ulsasalttillo.edu.mx; elan_laredo@uadec.edu.mx*

Technological Innovation: Evaluation of the antifungal activity of two plant extracts against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Industrial Application Area: Agricultural Biotechnology, Food Production, Formulation of Biocontrol Control Products.

Received: october 05th, 2023

Accepted: may 29th, 2024

Resumen

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es un problema en el cultivo de tomate. Su manejo comúnmente se hace con productos sintéticos. Sin embargo, el uso de este tipo de productos podría inducir resistencia hacia los ingredientes activos y problemas toxicológicos. Debido a esto, se han propuesto alternativas bioracionales como los extractos vegetales, para el manejo de enfermedades en las plantas. Los objetivos de esta investigación fueron obtener información de la composición fitoquímica de los extractos vegetales, así como determinar la actividad antifúngica y la concentración inhibitoria al 50 y 90 % (CI50 y CI90) de extractos vegetales etanólicos de *Lippia graveolens* y *Viscum album* mediante el método de microdilución en placa; se realizó un análisis Probit para determinar la CI50 y CI90 de cada extracto, y ANOVA por prueba de Tukey ($p < 0.05$) para determinar diferencias estadísticas. En ambos extractos se identificaron compuestos fitoquímicos, como

ácidos hidroxycinámicos, estilbenos, flavonoides, catequinas, polifenoles y ácidos metoxycinámicos. Además, ambos extractos presentaron actividad antifúngica mayor al 80 % de inhibición. Sin embargo, el extracto de *L. graveolens* fue estadísticamente mejor, con una CI_{50} más baja de 60.91 mg/L. En conclusión, ambos extractos vegetales contienen compuestos fitoquímicos de interés para el control de microorganismos y representan una alternativa natural para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Palabras clave: Fungicidas botánicos, Extractos de plantas, Compuestos fitoquímicos, Control biológico de enfermedades, Biofungicidas.

Abstract

Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is a problem in tomato crops. Its management is commonly done with synthetic products. However, the excessive use of such products could induce resistance to the active ingredients and toxicological problems. Because of this, biorational alternatives such as plant extracts have been proposed for plant disease management. The objectives of this research were to obtain information on the phytochemical composition of plant extracts, as well as to determine the antifungal activity and the inhibitory concentration at 50 and 90 % (IC_{50} and IC_{90}) of ethanolic plant extracts of *Lippia graveolens* and *Viscum album* using the microdilution plate method. A Probit analysis was performed to determine the IC_{50} and IC_{90} of each extract, and ANOVA by Tukey's test ($p < 0.05$) to determine statistical differences. Phytochemical compounds, such as hydroxycinnamic acids, stilbenes, flavonoids, catechins, polyphenols, and methoxycinnamic acids were identified in both extracts. Furthermore, both extracts showed antifungal activity higher than 80 % inhibition. However, the *L. graveolens* extract was statistically superior, with the lowest IC_{50} of 60.91 mg/L. In conclusion, both plant extracts contain phytochemical compounds of interest for the control of microorganism and represent a natural alternative for controlling *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Keywords: Botanical fungicides, Plant extracts, Phytochemical compounds, Biological control of diseases, Biofungicides.

1. Introduction

Tomato farming is one of the world's major crops, being the second most cultivated vegetable, second only to potatoes, with an estimated production of 140 million tons (FAO, 2022). Nevertheless, the production and quality of tomatoes are affected by several diseases caused by viruses, bacteria, oomycetes, and fungi in fields, greenhouses, on seedlings, and at the post-harvest stage (Singh *et al.*, 2017). Vascular wilt by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* is one of the main diseases in tomato-producing areas, which, if not controlled, can cause losses in production of up to 80 %

because it affects the vascular system of plants, causing wilt (Marlatt *et al.*, 1996; González *et al.*, 2012; Hernández- Martínez *et al.*, 2014). Currently, the control of this disease is with chemical products; however, the continues use of these products has caused resistance on microorganisms toward the active ingredients and ecological problems too (Chen *et al.*, 2007).

Given the aforementioned challenges, the demand for organic products worldwide is on the rise, reflecting a global shift towards sustainable agriculture. In response, researchers are actively exploring new

compounds for disease control that do not compromise environmental security (Hernández *et al.*, 2007; Igbiosa *et al.*, 2009). This has led to the emergence of plant extracts with antifungal properties as a promising alternative for plant disease management. Numerous studies have demonstrated their efficacy in controlling phytopathogens, thanks to the diverse array of secondary metabolites they contain, such as flavonoids, phenols, terpenes, essential oils, alkaloids, lectins, and polypeptides, each with its unique mode of action (Castillo *et al.*, 2010; Mendez *et al.*, 2012).

The vegetable species *L. graveolens* and *V. album* are options to produce plant extracts with antimicrobial activity; in the case of *L. graveolens*, it has a well-documented antifungal capacity, inhibiting the development of phytopathogenic fungi such as *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloesporoides*, *Penicillium digitatum*, and *Rhizoctonia solani* (Hernández-Castillo *et al.*, 2010; De Rodríguez *et al.*, 2011), becoming an alternative for plant extracts production for disease management; while *V. album* is a species that has been reported to possess antimicrobial activity and induce resistance in plants towards phytopathogenic microorganisms due to the considerable amount of phytochemical compounds present in its metabolism, becoming a viable option to be used in disease management on crops (Chandrashekhara *et al.*, 2010; Orhan *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011; Nacsá-Farkas, 2014). Both plant extracts contain many phytochemical compounds, such as polyphenols, tannins, stilbenes, flavonoids, and saponins. These compounds can affect the development of phytopathogenic fungi through various mechanisms of action, such as inhibiting electron transport and oxidative phosphorylation, damaging DNA, inhibiting key proteins for cell division, and inhibiting genes involved in the production of ergosterol in fungal cell walls (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2011; Mendez *et al.*, 2012;

Cantelli *et al.*, 2017; Vestergaard & Ingmer, 2019).

The aims of this research were to obtain information about the phytochemical composition of plant extracts from *L. graveolens* and *V. album*, and determine its biological effectiveness in *in vitro* tests of these extracts against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from diseased tomato plants.

2. Materials and methods

Collection of plant species

The sampling of *L. graveolens* was performed in the municipality of General Cepeda, Coahuila, Mexico; the plant specimens were placed into plastic bags and then transported to the laboratory of Mycology and Biotechnology of the Autonomous University Agrarian Antonio Narro; while the *V. album* plants were collected in the municipality of Orizaba, Veracruz, Mexico. Both plant species were in the flowering phenological stage in August 2023. Whole plant samples were washed and cut into pieces of 1 cm; subsequently, the samples were placed in a drying stove at 60 °C until they showed constant weight; finally, the plants were pulverized, sifted with a pore size of 0.2 mm, and stored in a flask in the darkness at room temperature (Castillo *et al.*, 2010).

Preparation of Plant extracts

Plant extracts were produced using the method proposed by Shami *et al.* (2013). The solvent was ethanol, and the initial step involved adding 14 g of pulverized plant material in 200 mL of solvent and placing it under agitation (LabTech, LMS-1003, Korea) for 72 h at 50 °C (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2015). Subsequently, the obtained extract was filtered with Whatman No. 1 paper to separate the extract from the dust; the extract was roto-evaporated (Yamato, RE301B-O, Japan) at 150 RPM at 60 °C; it was lyophilized and finally stored at – 20 °C.

Identification of phytochemical compounds by analytical High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS)

HPLC-ESI-MS was employed to identify the phytochemical compounds, following the protocol described by Araújo *et al.* (2020). The chromatography setup included a Varian HPLC system, with an autosampler (Varian ProStar 410, USA), a ternary pump (Varian ProStar 230I, USA), and a PDA detector (Varian ProStar 330, USA); and ion trap liquid chromatography mass spectrometer equipped with an electrospray ion source was also used. Five microliters of the sample were injected into Denali C18 column (150 mm × 2,1 mm, 3µm, Grace, EE. UU.); the temperature of the oven was maintained at 30 °C, the used eluents were formic acid (0.2 %, v/v; solvent A) and acetonitrile (solvent B). The applied gradient was, initially, 3 % B; 0–5 min, 9 % B linear; 5–15 min, 16 % B linear; 15–45 min, 50 % B linear; then, the column was washed and reconditioned. The flow rate was maintained at 0.2 mL/min, and the elution was monitored at 245, 280, 320, and 550 nm; the whole effluent was injected into the spectrometer source without splitting. All MS experiments were carried out in negative [M-H]⁻1 mode. Nitrogen was used as nebulizing gas and helium as damping gas; the parameters of the ion source were: spray voltage of 5.0 kV and capillary voltage of 90.0 V, as well as the temperature of 350 °C. The data were analyzed with the software MS Workstation (V6.9), and the samples were firstly analyzed in full scan mode acquired in the m/z range 50–2000.

Determination of total phenols, flavonoids, and antioxidant activity by DPPH

The total phenolic content was determined in both extracts, following the methodology proposed by Zenil-Lugo *et al.* (2014) with slight modifications. The extracts were resuspended at a concentration of 1000

mg/L using water as solvent. Subsequently, 20 µL of the extract, control, and calibration curve (98, 195, 391, 781, 1563, 3125 mg/L, $r^2 = 0.998$) were mixed with 120 µL of Na₂CO₃, 30 µL of Folin-Ciocalteu reagent, and 400 µL of water. The reaction was conducted at 50 °C for 5 minutes, and absorbance values were measured at 700 nm using a microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finland). Gallic acid was used as the standard reference. Total flavonoids were determined using the aluminum chloride method described by Chang *et al.* (2002), with absorbance measured at 510 nm. Quercetin was used as standard reference, and a calibration curve was prepared using quercetin solutions (195, 391, 781, 1563, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000, 100000 mg/L, $r^2 = 0.998$). Antioxidant activity was assessed following the method outlined by Jasso de Rodríguez *et al.* (2015). A 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) solution was used, with 2950 µL of the solution added to 50 µL of the extract. The mixture was stirred manually and incubated for 30 minutes at 37 °C, and absorbance was subsequently measured at 517 nm. A control solution consisting of 100 µL of distilled water was used for comparison. The results were expressed as the percentage of inhibition, calculated using the following formula:

$$\% \text{ of inhibition DPPH} = \frac{1 - \text{Abs } 517\text{nm sample}}{1 - \text{Abs } 517\text{nm control}} \times 100$$

Biological effectiveness of plant extracts of *L. graveolens* and *V. album* in vitro

Obtaining *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain and molecular identification

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* strain was isolated from tomato plants showing symptoms of vascular wilt, collected from the tomato production region of the municipality of Ahome, Sinaloa, Mexico. Previously a pathogenicity test was conducted with this strain in tomato seedlings, resulting in wilt within seven days. The DNA extraction was done using the CTAB method according to Kumar *et*

al. (2014), with some modifications, employing the previously isolated strain cultured on Potato Dextrose Agar medium for five days. PCR was performed using the primers FO1 (5'-ACATACCACTTGTTCCTCG-3') and FO2 (5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3') (Nirmaladevi *et al.*, 2016). The amplification mixture consisted of 3 µL of DNA from the sample, 12.5 µL of GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA polymerase in 2X reaction buffer GoTaq® pH 8.5, 400 µg dNTPs, 3 mM MgCl₂, reaction buffer), 2 µL of primers and 7.5 µL of sterile water nuclease-free. The conditions of amplification were initial denaturalization at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, with a final extension of 72 °C for 8 min. The product of PCR was visualized on agarose gel at 1 % with ethidium bromide and visualized with light UV (Nirmaladevi *et al.*, 2016). The isolated and identified strain was added to the strain collection of the Laboratory of Mycology and Biotechnology within the Parasitology Department of the Autonomous University Agrarian Antonio Narro.

Antifungal activity of plant extracts against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by the micro-dilution in plate method.

The microplate dilution method used was that described by Tucuch-Pérez *et al.* (2020) with slight modifications; the treatments were the plant extracts of *L.*

graveolens and *V. album*, which were resuspended at 2000 mg/L using water as solvent. Polystyrene 96- well plates were filled with 100 µL of Sabouraud liquid medium; after placing 100 µL of each extract at 2000 mg/L in column number four it was mixed, and 100 µL of the mixture was transferred to column number five, the same action was carried out up to column number 12, obtaining concentrations of 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L, 62.5 mg/L, 31.2 mg/L, 15.6 mg/L, 7.8 mg/L y 3.9 mg/L (figure 1); the next step was to add 40 µL of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; finally 10 µL of a conidia solution at 1x10⁸ was added in all wells of plate except in the wells of column number one. Each plate was considered a repetition and eight repetitions per treatment were performed; the plates were incubated at 28 °C, and with a spectrophotometer, the absorbance of plates was read at 490 nm (Thermo Scientific, Multiskan GO, Finland). The growth of the fungus was positive when the well-showed pink coloration and negative when no coloration was present. The inhibition percentage was calculated by considering it as the inverse of the growth percentage, using the formulas:

$$\% \text{ of growth} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Where A is the absorbance of each treatment, B is the absorbance of the negative control, and C is the absorbance of the positive control.

$$\% \text{ of inhibition} = 100 - \% \text{ of growth}$$

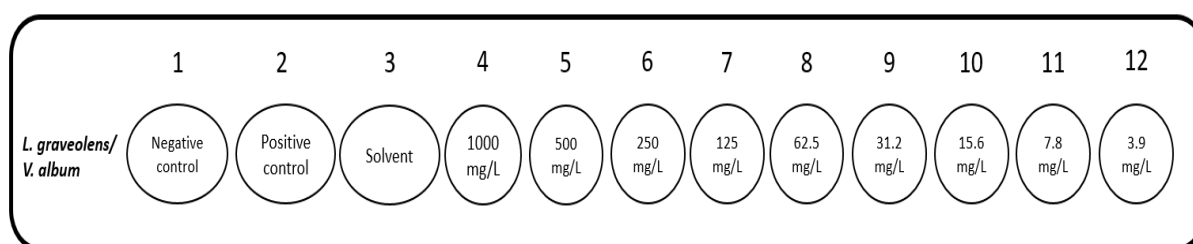


Figure 1. Arrangement of treatments and concentrations used in the in vitro bioassay on 96-well polystyrene plates.

Statistically analysis

A Probit analysis was carried out for both bioassays to determine the IC₅₀ and IC₉₀ of each extract; subsequently, An ANOVA was performed with the results obtained using the Tukey's test ($p < 0.05$) with the Statistical Analysis System (SAS) 9.0 software.

3. Results and discussion

Identification of phytochemical compounds by analytical HPLC-ESI-MS

Table 1 shows the compounds detected in *L. graveolens* and *V. album* extracts by HPLC-ESI-MS analysis, where the presence of compounds from the hydroxycinnamic acids, stilbenes, flavonols, methoxy flavones, catechins, polyphenols, and flavanones families can be observed in the extract of *L. graveolens*, and compounds from hydroxycinnamic acids, catechins, flavones, and methoxycinnamic acid families were observed in the extract of *V. album*. Regarding this, Trejo-Márquez *et al.* (2015) reported the presence of resveratrol and caffeic acid in an ethanolic extract from *L. graveolens*. Furthermore, the presence of caffeic acid in *Lippia citriodora* extract has been reported (Quirantes-Piné *et al.*, 2009); on the other hand, chromatographic studies by HPLC have detected the presence of caffeic acid in methanolic extracts of *V. album* (Khatun *et al.*, 2016). The antioxidant activity, which allows the interaction of phytochemical compounds with free radicals, is one of the most

significant attributes of flavonoids because it is related to the antifungal activity by the interaction with fungal reactive oxygen species (Warris & Ballou, 2019), kaempferol and catechins have been identified as common compounds present in plant extracts produced from various solvents of species within the Verbenaceae family, which includes the genus *Lippia* (Güereca *et al.*, 2007; Funari *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2013; Cid-Pérez *et al.*, 2016), while in ethanolic extracts from *V. album* it has been possible to detect catechins (Kang *et al.*, 2016; Trifunski *et al.*, 2017). Among the secondary metabolites of plants, the polyphenols play an essential role in the antimicrobial and antioxidant activity present in plant extracts; this capacity to inhibit the growth of the microorganisms has been documented in several studies, allowing to obtain natural compounds as alternatives to control diseases in plants such as the arbutin, pinocembrin, luteolin, and ferulic acid (López-Lázaro, 2009; Rasul *et al.*, 2013; Jurica *et al.*, 2017; Kim & Park, 2019). These compounds, as mentioned earlier, have been reported by several authors as compounds present in plant extracts; in this sense Arias *et al.* (2020) detected pinocembrin in the essential oil of *Lippia origanoides* and *L. graveolens*, whereas in extracts from *V. album* the presence of luteolin and feruloylquinic acid has been detected (Trifunski *et al.*, 2017; Stefanucci *et al.*, 2020).

Table 1. Detection of phytochemical compounds in extracts from *L. graveolens* and *V. album* by HPLC-ESI-MS.

Extract	Compound	Retention time (Min)	Mass	Family
<i>L. graveolens</i>	Caffeic acid 4-O-glucoside	4.094	340.9	Hydroxycinnamic acids
	Resveratrol 3-O-glucoside	13.881	391	Stilbenes
	Resveratrol 5-O-glucoside	18.291	389	Stilbenes
	Kaempferol 3-O-glucosyl-rhamnosyl-glucoside	25.897	755	Flavonols
	Sinensetin	26.243	371.1	Methoxyflavones
	(+)-Catechin 3-O-glucose	26.699	451.3	Catechins

	Arbutin	41.333	270.9	Other polyphenols
	Pinocembrin	50.559	254.9	Flavanones
<i>V. album</i>	Caffeic acid 4-O-glucoside	4.152	341	Hydroxycinnamic acids
	(+)-Catechin 3-O-glucose	26.628	451.3	Catechins
	Luteolin 7-O-(2-apiosyl-6-malonyl)-glucoside	3.823	665	Flavones
	5-Feruloylquinic acid	55.776	367.2	Methoxycinnamic acids
	p-Coumaroyl tartaric acid	58.2	295.2	Hydroxycinnamic acids

Determination of total phenols, total flavonoids, and antioxidant activity by DPPH

Statistical differences were observed among the extracts of *L. graveolens* and *V. album* in determining total phenols and flavonoids. However, no statistical differences were observed in the evaluation of antioxidant activity (Table 2). Phenols and flavonoids are synthesized in all plant organisms and exhibit high biological activity when applied to different organisms. Previous

studies have analyzed the presence of total phenols, flavonoids, and antioxidant activity in *L. graveolens* extracts, reporting 4.54 mg/g total phenols, 200 mg/g total flavonoids, and an antioxidant activity of 8.79 % (Martínez-Rocha *et al.*, 2008; Cortés-Chitala *et al.* 2021). Additionally, other studies reported 10.43 mg/g and 0.428 mg/g of total phenols and flavonoids respectively in extracts from *V. album* (Pietrzak *et al.*, 2017) and an antioxidant activity of 95.36 % (ÖnayUçar *et al.*, 2006).

Table 2. Total phenols and flavonoids, and antioxidant activity (DPPH) of ethanolic extracts from *L. graveolens* and *V. album*.

Extract	Total phenols (mg/g)*	Total flavonoids (mg/g)	DPPH (%)
<i>V. album</i>	53±17b	283±85b	94±0.24a
<i>L. graveolens</i>	254±3a	1210±349a	96±0.39a

* = Values with the same letter are statistically equal ($P \leq 0.005$).

Biological effectiveness of plant extracts of *L. graveolens* and *V. album* in vitro Molecular identification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain

The amplicon obtained with the specific primers FO1/FO2 confirmed the species *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtaining 340 bp amplified DNA products (Nirmaladevi *et al.*, 2016).

Antifungal activity of plant extracts against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by micro-dilution plate method.

The bioassays using the microdilution plate method demonstrated significant inhibition of the pathogen by *L. graveolens* and *V. album* extracts. The inhibitory effect of *L.*

graveolens extract on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was observed starting at a concentration of 62.5 mg/L, with an inhibition rate of 41.72 %. Subsequently, as the concentration increased to 125 mg/L, 250 mg/L, and 1000 mg/L, the inhibition rates progressively increased to 50.83 %, 72.08 %, 83.61 %, and eventually 88.65 %. On the other hand, the inhibitory activity of *V. album* extract started at 125 mg/L, showing an inhibition rate of 50.25 %. As the concentration increased to 500 mg/L and 1000 mg/L, the inhibition rates increased to 73.75 % and 88.56 %, respectively. These results showed the inhibitory activity of both extracts against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, with their efficacy being concentration-dependent. (Figure 2).

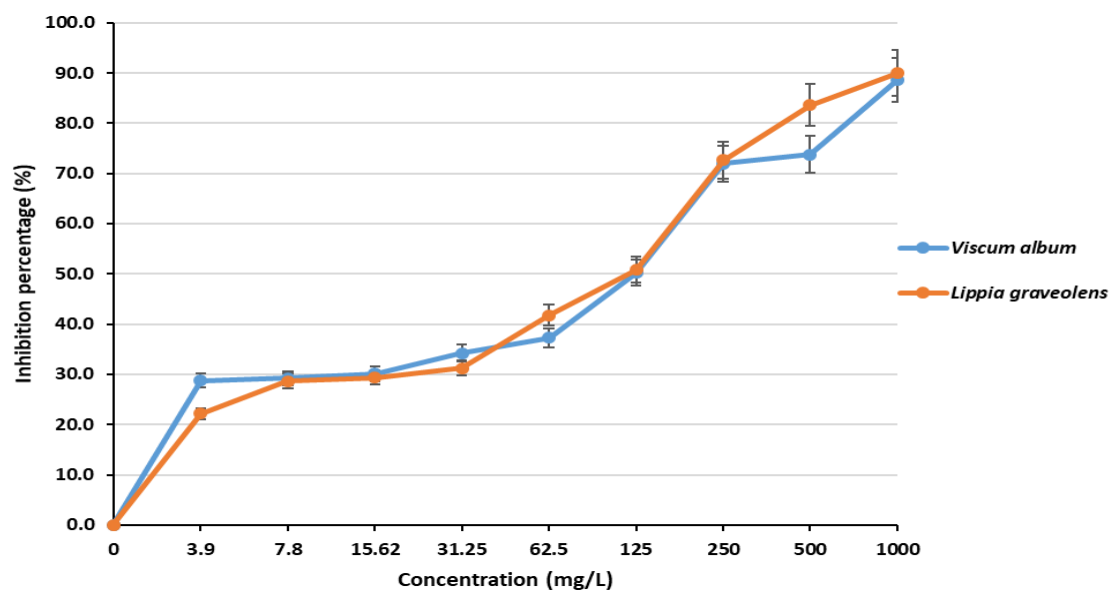


Figure 2. Inhibition percentage of ethanol extracts from *Lippia graveolens* and *Viscum album* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by microdilution in plate method.

The antimicrobial activity from *L. graveolens* and *V. album* extracts can be due to resveratrol, a stilbene detected in plant extracts. Studies have reported that it acts on ATP hydrolysis, inhibits oxidative phosphorylation, induces DNA fragmentation, suppresses the expression of ftsZ protein, and is correlated with cell membrane damage (Vestergaard & Ingmer, 2019). Flavonoids are compounds recognized for their antioxidant activity. Recent studies have shown that flavonoids could inhibit hyphae formation because they can affect reactive oxygen species of pathogen's mitochondria (Candiracci *et al.* 2012; Warris & Ballou 2019). The luteolin inhibits the efflux pump, and pinocembrin decreases ATP production, causing lipid peroxidation (Peng *et al.*, 2012). On the other hand, caffeic acid and feruloylquinic acid inhibit gene expression involved in ergosterol synthesis (Cantelli *et al.*, 2017). Finally, catechins and saponins damage the cell membrane, causing lysis of hyphae and forming a complex with sterols, allowing higher permeability of the fungal membrane (Hirasawa & Takada, 2004; Lanzotti *et al.*, 2012).

Several studies have demonstrated the antifungal activity of *L. graveolens* extract.

Medina-Romero *et al.* (2022) reported inhibition of radial growth, damage to hyphal morphology, and effects on spore production and germination of *Fusarium* species treated with pure carvacrol and the essential oil of *L. graveolens*. Additionally, De Rodríguez *et al.* (2011) reported a 100 % inhibitory effect on mycelial and sporulation growth of *C. gloesporoides* and *R. stolonifer* using an ethanolic extract of *L. graveolens* at 500 mg/L, while Hernández-Castillo *et al.* (2010) used ethanol to produce an extract of *L. graveolens* and reported a maximum mycelial inhibition of 60 % against *R. solani* at 3000 mg/L. On the other hand, Ertürk *et al.* (2004) and Hussain *et al.* (2011) observed antifungal activity by testing ethanolic and hexane extracts from *V. album* against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Aspergillus flavus*. Ertürk (2010) reported inhibition by the ethanolic extract of *V. album* on *C. albicans* and *Aspergillus niger*. The antifungal activity of both extracts might be attributed to the various modes of action of compounds identified therein.

IC₅₀ of *L. graveolens* and *V. album* extracts

The IC₅₀ values of the extracts against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* exhibited

statistically significant differences, as shown in Table 3.

Table 3. Inhibitory concentration to 50 % and 90 % (IC50 and IC90) of ethanolic extracts from *L. graveolens* and *V. album* on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Source of plant extract	IC50* (mg/L)	IC90 (mg/L)
<i>L. graveolens</i>	60.91 ± 0.07a	1990 ± 0.07a
<i>V. album</i>	63.73 ± 0.09b	3892 ± 0.09b

*=Values with the same letter are statistically equal ($P \leq 0.005$).

The IC50 indicates the amount of a compound necessary to inhibit a biological process by half, allowing for the measure of inhibitory capacity. The IC50 is crucial because a low IC50 of an agricultural product positions it as an excellent candidate for controlling phytopathogens (Aykul & Martinez-Hackert, 2016). Tests were conducted to evaluate the inhibitory effect of plant extracts by determining their IC50 values. Regarding the plants investigated in our study, Hernández-Castillo *et al.* (2010) reported an IC50 of 1930 mg/L for the ethanolic extract of *L. graveolens* against *R. solani*. However, there are no documented reports of *V. album* extract has been tested against phytopathogenic microorganisms, as compounds derived from this species commonly treat human diseases.

Nevertheless, it is noteworthy that ethanolic extracts of *V. album* have been reported to exhibit a low IC50 value in destroying carcinogenic cells (Zhao *et al.*, 2012). The IC50 obtained in this work for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with both plant extracts can be considered low due to the presence of phytochemical compounds, such as polyphenolic compounds, which inhibit the development of phytopathogenic microorganisms. These compounds act by the interaction of phenolic hydroxyl groups with the hydrophilic ends of the lipid bilayer to agglomerate lipids of the membrane and provoke its rupture, allowing the leakage of cytoplasmic material (Yang & Zhang, 2019).

4. Conclusions

L. graveolens and *V. album* are plant species widely used in plant extract production, with their application in the agricultural industry emerging as an option due to the variety of phytochemical compounds produced in their metabolism. In this study, both species presented polyphenolic compounds associated with antifungal and antioxidant activity, including hydroxycinnamic acids, stilbenes, flavonoids, catechins, polyphenols, and methoxycinnamic acids. The results obtained in this work suggest that the plant extracts exhibit inhibitory capacity on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* development, with an inhibition percentage exceeding 80 % and low IC50 values. This effectiveness is attributed to various phytochemical compounds in both extracts, positioning them as alternatives for the control of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Notably, *V. album* has not been previously reported for its use in directly controlling phytopathogenic microorganisms, making this research the first report of *V. album* ethanolic extract for such purpose.

5. References

1. FAO (2022) Page on world food production. Available via <http://www.fao.org/faostat/en/>. Cited 20 jan 2022
2. Singh, V.K., Singh, A.K. & Kumar, A. (2017). "Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective". 3 *Biotech*, 7(4), 255. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1>

3. Marlatt, M.L.J., Correll, J.C., Kaufman, P. & Cooper, P.E. (1996). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Diseases*, 80(12), 1336-1342.
<https://doi.org/10.1094/PD-80-1336>
4. González, I., Arias, Y. & Peteira, B. (2012). Aspectos Generales de la Interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522012000100001&script=sci_arttext&tlng=en
5. Hernández-Martínez, R., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Espinoza-Velásquez, J., Sánchez-Aspeytia, D., Maldonado-Mendoza, E. & López-Ochoa, L. (2014). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1169-1178.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000700003
6. Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S. & Zhou, M. (2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Science: formerly Pesticide*, 63(12), 1201-1207.
<https://doi.org/10.1002/ps.1449>
7. Hernández, A.N., Bautista, S. & Velázquez, M.G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, (2), 119-123.
<https://www.redalyc.org/pdf/610/61030202.pdf>
8. Igbinsola, O.O., Igbinsola, E.O. & Aiyegoro, O.A. (2009). Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African journal of pharmacy and pharmacology*, 3(2), 058-062.
<https://doi.org/10.5897/AJPP.9000049>
9. Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. & Aguilar, C.N. (2010). *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 324-328.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.013>
10. Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F.D. & Aguilar, C.N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 445-450.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.017>
11. Hernández-Castillo, F.D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar-González, C.N. (2010). *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* organic extracts and there *in vitro* effect against *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 380-384.
<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2010.380.384>
12. De Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V. & Zuccolotto, L. M. (2011). *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960-966.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>

13. Chandrashekhara, Niranjan Raj, S., Manjunath, G., Deepak, S. & Shekar Shetty, H. (2010). Seed treatment with aqueous extract of *Viscum album* induces resistance to pearl millet downy mildew pathogen. *Journal of Plant Interactions*, 5(4), 283-291.
<https://doi.org/10.1080/17429140903556539>
14. Orhan, D.D., Özçelik, B., Özgen, S. & Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research*, 165(6), 496-504.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.09.002>
15. Hussain, M.A., Khan, M.Q., Hussain, N. & Habib, T. (2011). Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(23), 5545-5549.
<https://doi.org/10.5897/JMPR.9000126>
16. Nacsa-Farkas, E. (2014). Antifungal effect of selected European herbs against *Candida albicans* and emerging pathogenic non-albicans *Candida* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 58(1), 61-64.
<http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2819/2811>
17. Shami, A.M.M., Philip, K. & Muniady, S. (2013). Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 360.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-360>
18. Jasso de Rodríguez, D. J., Trejo-González, F. A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F. D. & Peña-Ramos, F. M. (2015). Antifungal activity *in vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Industrial Crops and Products*, 75, 150-158.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.048>
19. Araújo, R.G., Rodríguez-Jasso, R.M., Ruiz, H.A., Govea-Salas, M., Pintado, M.E. & Aguilar, C.N. (2020). Process optimization of microwave-assisted extraction of bioactive molecules from avocado seeds. *Industrial Crops and Products*, 154, 112623.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112623>
20. Zenil-Lugo, N., Colinas-León, M., Bautista-Bañuelos, C., Vázquez-Rojas, T.R., Lozoya-Saldaña, H. & Martínez-Damián, M. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(6), 1029-1039.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342014000600010&script=sci_abstract&tlng=en
21. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10(3), 3.
<https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
22. Kumar, M.S., Kaur, G. & Sandhu, A.K. (2014). Genomic DNA isolation from fungi, algae, plant, bacteria and human blood using CTAB. *International Journal of Science and Research*, 3(9), 6171618.
<https://www.ijsr.net/archive/v3i9/U0VQMTQxMDU=.pdf>
23. Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R.K., Uppalapati,

- S.R., Gupta, V.K., Yli-Mattila, T. & Chandra, N.S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific reports*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
24. Tucuch-Pérez, M.A., Arredondo-Valdés, R. & Hernández-Castillo, F.D. (2020). Antifungal activity of phytochemical compounds of extracts from Mexican semi-desert plants against *Fusarium oxysporum* from tomato by microdilution in plate method. *Nova scientia*, 12(25), 1-19. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2345>
25. Vestergaard, M. & Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *International Journals of Antimicrobial Agents*, 53(6), 716-723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015>
26. Trejo-Márquez, M.A., Vargas-Martínez, M.G., Sánchez-Soto, A., Vargas, A.A.L., Pascual-Bustamante, S., López, G.G. & González, A.G.V. (2015). Extracción de compuestos bioactivos de plantas del desierto mexicano para su aplicación en envases activos para zarzamora. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 101-107. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81339864015.pdf>
27. Quirantes-Piné, R., Funes, L., Micol, V., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5391-5397. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.038>
28. Khatun, A., Rahman, M., Rahman, M. M., Hossain, H., Jahan, I. A. & Nesa, M. L. (2016). Antioxidant, antinociceptive and CNS activities of *Viscum orientale* and high sensitive quantification of bioactive polyphenols by UPLC. *Frontiers in pharmacology*, 7, 176. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00176>
29. Warris, A. & Ballou, E.R. (2019). Oxidative responses and fungal infection biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.004>
30. Rocha, M.F.G., Sales, J.A., da Rocha, M.G., Galdino, L.M., de Aguiar, L., Pereira-Neto, W.D.A. & Brilhante, R.S.N. (2019). Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling*, 35(3), 320-328. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1604948>
31. Güereca, M.C.G., Hernández, M.S., Kite, G. & Vázquez, M.M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnica Mexicana*, 30(1), 43-49. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61030106.pdf>
32. Funari, C.S., Eugster, P.J., Martel, S., Carrupt, P.A., Wolfender, J.L. & Silva, D.H.S. (2012). High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *Journal of Chromatography A*, 1259, 167-

178.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.069>
33. de Oliveira, F.C., Barbosa, F.G., Mafezoli, J., Maria da Conceição, F., Neto, M.A. & Guedes, M. L. (2013). Chemical constituents of *Lippia rigida schauer* (Verbenaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, (51), 328-330.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.09.009>
34. Cid-Pérez, T.S., Nevárez-Moorillón, G.V., Torres-Muñoz, J.V., Palou, E. & López-Malo, A. (2016). Mexican oregano (*Lippia berlandieri* and *Poliomintha longiflora*) oils. In: Predy, V.R. (ed). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. (pp 551-560). Massachusetts, Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00063-8>
35. Kang, S.N. (2016). Ethanol extracts from mistletoe (*Viscum album* L.) act as natural antioxidants and antimicrobial agents in uncooked pork patties during refrigerated storage. *Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(1), 109.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0253>
36. Trifunschi, S., Munteanu, M.F., Pogurschi, E. & Gligor, R. (2017). Characterization of Polyphenolic Compounds in *Viscum album* L. and *Allium sativum* L. extracts. *Revista de Chimie*, 68, 1677-1680.
<https://doi.org/10.37358/RC.17.7.5741>
37. López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(1), 31-59.
<https://doi.org/10.2174/138955709787001712>
38. Rasul, A., Millimouno, F.M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J. & Li, X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed Research International*, 2013, 379850.
<https://doi.org/10.1155/2013/379850>
39. Jurica, K., Gobin, I., Kremer, D., Čepo, D. V., Grubešić, R. J., Karačonji, I. B. & Kosalec, I. (2017). Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 8, 17-23.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.006>
40. Kim, J.K. & Park, S.U. (2019). A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. *EXCLI Journal*, 18, 132-138.
<https://doi.org/10.17179/excli2019-1138>
41. Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J.R., Stashenko, E. & del Valle, J.M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 146, 112170.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112170>
42. Stefanucci, A., Zengin, G., Llorent-Martínez, E.J., Dimmito, M.P., Della Valle, A., Pieretti, S. & Mollica, A. (2020). *Viscum album* L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13377.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13377>
43. Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, L., Loarca-Piña, G. & Mendoza, S. (2008). Antioxidant and antimutagenic

- activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant foods for human nutrition*, 63(1), 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0061-9>
44. Cortés-Chitala, M.D.C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M. & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26(3), 702. <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>
 45. Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M.K. & Rzeski, W. (2017). LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules*, 22(4), 624. <https://doi.org/10.3390/molecules22040624>
 46. ÖnayUçar, E., Karagöz, A. & Arda, N. (2006). Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77(7-8), 556-560. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.08.001>
 47. Candiracci, M., Citterio, B. & Piatti, E. (2012) Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*, 131(2), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.012>
 48. Peng, L., Yang, S., Cheng, Y.J., Chen, F., Pan, S. & Fan, G. (2012). Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science Biotechnology*, 21(6), 1533-1539. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0204-0>
 49. Cantelli, B.A.M., Bitencourt, T.A., Komoto, T.T., Belebony, R.O., Marins, M. & Fachin, A.L. (2017). Caffeic acid and licochalcone A interfere with the glyoxylate cycle of *Trichophyton rubrum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1389-1394. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.051>
 50. Hirasawa, M. & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 225-229. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh046>
 51. Lanzotti, V., Romano, A., Lanzuise, S., Bonanomi, G. & Scala, F. (2012). Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry*, 74, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.008>
 52. Medina-Romero, Y. M., Rodriguez-Canales, M., Rodriguez-Monroy, M. A., Hernandez-Hernandez, A. B., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., ... & Canales-Martinez, M. M. (2022). Effect of the essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* and five pure compounds on the mycelium, spore production, and germination of species of *Fusarium*. *Journal of Fungi*, 8(6), 617. <https://doi.org/10.3390/jof8060617>
 53. Ertürk, Ö., Kati, H., Yayli, N. & Demirbağ, Z. (2004). Antimicrobial activity of *Viscum album* L. subsp. *abietis* (Wiesb). *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 255-258. <https://journals.tubitak.gov.tr/biolog/abstract.htm?id=6444>
 54. Ertürk, Ö. (2010). Antibacterial and antifungal effects of alcoholic extracts of 41 medicinal plants growing in Turkey. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(1), 53-60.

<https://doi.org/10.17221/144/2008-CJFS>

55. Aykul, S. & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
56. Zhao, Y.L., Wang, X.Y., Sun, L.X., Fan, R.H., Bi, K.S. & Zhi, G.Y. (2012). Cytotoxic constituents of *Viscum coloratum*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 67(3-4), 129-134. <https://doi.org/10.1515/znc-2012-3-404>
57. Yang, Y. & Zhang, T. (2019). Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: A review. *Molecules*, 24(4), 816. <https://doi.org/10.3390/molecules24040816>



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Evaluación del índice glicémico *in vitro* e *in vivo* de yogurt funcional de leche de cabra adicionado con *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana*

In vitro and *in vivo* glycemic index evaluation of functional goat's milk yoghurt with added *Aloe vera* and *Stevia rebaudiana*

Enriquez, M.¹, Cruz, M.^{2*}, Rodríguez-Jasso, R.M.¹, Flores, M.², Garza, A.³, Belmares, R.^{1*}

¹ Universidad Autónoma de Coahuila; Blvd. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas s/n Col. República C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

³ Universidad Autónoma de Nuevo León; Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro sin número Monterrey, N.L. México. C.P. 64460.

enriquezmariela@uadec.edu.mx; myke13_80@hotmail.com*; rrodriguezjasso@uadec.edu.mx; labcta@hotmail.com; aurgarza@gmail.com; ruthbelmares@uadec.edu.mx*

Innovación tecnológica: Yogurt funcional de leche de cabra con *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana*.

Área de Aplicación: Ciencias de los alimentos, biotecnología alimentaria, nutrición humana.

Recibido: 21 septiembre 2023

Aceptado: 18 abril 2024

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* (inhibition of α -amylase and α -glucosidase) and *in vivo* (Glycemic Index and Glycemic Load) functionality of three formulations 1) natural yogurt (N), 2) 10% *Aloe vera* pulp and sucrose (AA) and 3) 10% *Aloe vera* pulp and *Stevia rebaudiana* (AS). Determining the % inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity, Glycemic Index (GI) and Glycemic Load (GL). An Inhibition of α -amylase activity of 43.01%, 44.66% and 55.75% was obtained for yoghurt N, AA, and AS, respectively. On the other hand, α -glucosidase inhibition was 3.29%, 6.35% and 22.87% for yoghurt N, AA, and AS, respectively. The GI and GL of yogurt N was 36.11 and 9.02, for yoghurt AA was 55.51 and 13.90 and for yogurt AS was 16.13 and 4.02, respectively. Its consumption in the tested subjects kept blood glucose levels within normal values.

Key words: Functional food, Diabetes, Enzyme inhibition, Glycemic index, Glycemic load.

Resumen

El propósito de este trabajo fue evaluar la funcionalidad *in vitro* (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa) e *in vivo* (Índice Glicémico y Carga Glicémica) de tres formulaciones 1) yogurt natural (N), 2) 10% pulpa de *Aloe vera* y sacarosa (AA) y 3) 10% pulpa de *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana* (AS). Determinando el % de inhibición de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa, Índice Glicémico (IG) y Carga Glicémica (CG). Se obtuvo una inhibición de la actividad α -amilasa de 43.01%, 44.66% y 55.75% para el yogurt N, AA, y AS, respectivamente. Por otra parte, la inhibición α -glucosidasa fue de 3.29%, 6.35% y 22.87% para yogurt N, AA, y AS, respectivamente. El IG y CG del yogurt N fue 36.11 y 9.02, para yogurt AA fue 55.51 y 13.90 y para yogurt AS fue 16.13 y 4.02, respectivamente. La mejor formulación fue AS su consumo en los sujetos evaluados mantuvo los niveles de glucosa en sangre dentro de los valores normales.

Palabras clave: Alimento funcional, Diabetes, Inhibición enzimática, Índice glicémico; Carga glicémica.

1. Introducción

Hoy en día la problemática a solucionar es el prevenir enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) para ayudar a mejorar la calidad de vida de la población. Actualmente 38 millones de personas mueren cada año por las ECNT a nivel mundial, siendo en México el 9.4% de la población total debido a la diabetes, datos reportados por la ENSANUT (2016) sabiendo que algunos de los principales factores de riesgos de este tipo de enfermedades son: dietas malsanas, falta de actividad física, consumo de alcohol y tabaco.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica no transmisible incurable, en la cual hay un desorden del metabolismo de la glucosa (Zhang y Li, 2015), conocida como hiperglicemia caracterizada por un rápido incremento de los niveles de glucosa en sangre debido a una dieta alta en carbohidratos y una hidrólisis de estos por acción de enzimas α -amilasa localizadas en la saliva y jugos pancreáticos, así como, la α -glucosidasa localizada en el borde del cepillo del intestino delgado (Kazeem y Davies, 2016). Por otra parte, la inhibición de estas enzimas ayuda a disminuir la hiperglicemia (Lordan y col., 2013) al retardar la

absorción de carbohidratos y dando como resultado una reducción de glucosa postprandial en sangre.

En recientes investigaciones se demuestran los beneficios a la salud de algunas especies vegetales, tal es el caso de la hierba mora (*Solanum nigrum*) (Dasgupta y col., 2016), sábila (*Aloe vera*) (Cuvas y col., 2016; Ramesh y col., 2016) así como estevia un endulzante vegetal (*Stevia rebaudiana*) (Mathur y Johri, 2016, Narayana y col., 2022) entre otras. Estas poseen propiedades funcionales y han demostrado inhibición *in vitro* de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa, siendo una opción de tratamiento alternativo para la DM (Djeridane y col., 2015) siendo de potencial interés la posible incorporación de ingredientes o compuestos.

Estudios previos de alimentos funcionales han utilizado yogurt como una alternativa para atenuar ciertas enfermedades crónicas degenerativas, mediante la adición de ingredientes naturales para presentar mayores beneficios terapéuticos en el producto y dar solución a los estilos de vida modernos y malsanos (Shori & Baba, 2011). Algunos de estos ingredientes incluyen el *Aloe vera*, la cual posee propiedades hipoglucemiantes comprobada

en estudios *in vitro* e *in vivo*, en forma de extractos, así como ingrediente añadido a productos alimenticios, gracias a sus polisacáridos y algunos minerales (Radha y Laxmipriya, 2015). Y la *S. rebaudiana* es un endulzante natural hasta 20 veces más dulce que el azúcar, ya que 50 g de hoja de *S. rebaudiana* pueden reemplazar 1000 g de azúcar, presentando efectos hipoglucemiantes *in vitro* e *in vivo* debido a sus esteviósidos y compuestos fenólicos (Ruiz y col., 2015).

Debido a estos beneficios tanto nutrimentales como terapéuticos, su aprovechamiento es una alternativa interesante para elaborar nuevos productos alimenticios. Una modificación del estilo de vida puede mejorar la calidad de ésta en pacientes con DM tipo 2 (Dämon y col., 2015) y los alimentos funcionales ayudan, ya que no solo ofrecen un beneficio nutricional, sino que, brindan un valor agregado gracias a la presencia de componentes fisiológicamente activos (Valenzuela y col., 2014).

Se puede conocer la funcionalidad *in vivo* de un alimento mediante la determinación del Índice glicémico (IG) y la Carga glicémica (CG). Además de establecer con mayor exactitud la cantidad de carbohidratos disponibles en los alimentos, la manera en que son metabolizados por el organismo y su importancia en la dieta (Franco y col., 2013).

El IG es la respuesta al aumento de la glucemia en sangre que se produce posterior a la ingesta de un alimento comparado con un alimento de referencia en una escala de 0 a 100 (Franco y col., 2013). Un consumo de alimentos con un IG bajo demuestran mejores niveles de glucosa, insulina y lípidos en sangre; beneficiando a personas que presentan DM, resistencia a la insulina y sobrepeso (Brand-Miller, 2017). La CG relaciona la cantidad de hidratos de carbono disponibles en la ración de un alimento y su índice glicémico, se clasifica en una escala

de 0 a 20 (Guerrero y col., 2016). El consumo a largo plazo de una dieta con una CG baja está relacionada con un menor riesgo de DM tipo II (Longoria y col., 2016).

Algunos estudios utilizan yogurt para prevenir ciertas enfermedades gastrointestinales mediante la adición de ingredientes que mejoren los beneficios terapéuticos del producto, dando solución a los estilos de vida modernos y malsanos (Shori y Baba, 2011). La leche caprina es una buena materia prima para producir productos lácteos, además de ser una fuente de oligosacáridos similares a los de la leche humana (Sousa y col., 2019). La concentración de lactosa en leche bovina es alrededor de 0.2-0.5 % mayor que en la leche de cabra, favoreciendo la absorción intestinal de minerales como el calcio (Kalyankar, et al., 2016).

La tendencia mundial actual busca desarrollar nuevos productos con un valor agregado y que presenten propiedades benéficas. Sin embargo, es necesario conocer la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de los alimentos que confirmen sus propiedades funcionales.

El objetivo de este estudio fue evaluar la funcionalidad *in vitro* mediante la inhibición de actividad α -amilasa y α -glucosidasa e *in vivo* por medio de la determinación de Índice Glicémico y Carga Glicémica, de tres formulaciones de yogurt natural (N), yogurt con *Aloe vera* y sacarosa (AA) y yogurt con *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana* (AS) a base de leche de cabra fermentada con *Streptococcus thermophilus*, cuyas características funcionales en forma conjunta lo hacen apto para consumo de personas sin patologías, debido a sus propiedades hipoglucemiantes.

2. Materiales y métodos

El proceso metodológico se presenta en subsecciones, en las que se describe la metodología empleada en el presente

estudio desde la elaboración de un yogurt a base de cultivos alternativos de acuerdo con el Codex Alimentarius (2011), hasta determinar su funcionalidad mediante la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la α -amilasa y α -glucosidasa.

2.1 Elaboración de yogurt

Se prepararon tres formulaciones de yogurt: natural (N), con *Aloe vera* al 10% (Mathur y Johri, 2016) y 4% sacarosa (AA) y con *Aloe vera* al 10% y 0.04% *Stevia rebaudiana* (AS) mediante el proceso de la NOM-181-SCFI-2010.

A 100 mL de leche de cabra pasteurizada a 60 °C por 30 min, se le agregaron 119×10^5 UFC/mL de *Streptococcus thermophilus* (Jointec 203 CSL, ABIASA MEXICO) liofilizado, se incubó a 43 °C por 5 horas y se refrigeró; desarrollado de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 243 (NOM, 2010).

El *A. vera* y *S. rebaudiana* fueron proporcionadas de los campos experimentales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México.

Para este estudio se utilizó el gel de *A. vera* en forma de cubos de 0.5 cm. Las hojas de *S. rebaudiana* fue deshidratada a 40 °C por 10 horas utilizando un deshidratador marca Colzer. Posteriormente se obtuvo un extracto acuoso de *S. rebaudiana* (relación 1:9, p/v) y se calculó la cantidad necesaria para este estudio de acuerdo con el dulzor con respecto a la sacarosa (Lima y col., 2022).

2.2 Evaluación de la funcionalidad *in vitro*

Se elaboró un ensayo *in vitro* de la inhibición de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa, tomando como muestra las formulaciones de yogurt (N, AA y AS) y como testigo positivo acarbosa.

Obtención del extracto de yogurt

Una muestra de 10 g de yogurt (N, AA, AS) se mezcló con 2.5 mL de agua destilada y su pH se ajustó a 4 con HCl 1 M, la muestra fue incubada a 45 °C por 10 min y se removieron las proteínas precipitadas por centrifugación (3,000 rpm, 10 min). Se recolectó el sobrenadante y se ajustó su pH de 7 usando NaOH al 0.5 M seguida de otra centrifugación (3,000 rpm, 10 min) para eliminar los residuos de las proteínas precipitadas, así como las sales. Se recolectó el sobrenadante y este fue utilizado para determinar la inhibición de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa (Shori y Baba, 2014).

2.3 Inhibición de la actividad α -amilasa

Para demostrar la funcionalidad *in vitro* del yogurt se siguió el método de Shori & Baba (2011). En un tubo de ensayo protegido de la luz se colocó 100 μ L del extracto de yogurt (N, AA, AS), 100 μ L de buffer de fosfatos pH 6.9, 100 μ L de α -amilasa (4.5 U/mL) (Páncreas Porcino, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)), pre-incubada a 20 °C por 10 min. y 100 μ L de almidón al 1%. La mezcla se homogenizó y se incubó a 20 °C durante 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 1000 μ L de una solución de ácido dinitrosalicílico (DNS), se incubó a 37 °C durante 5 min, y se enfrió a 25 °C. Posteriormente, la mezcla se diluyó con 5.6 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 540 nm. El testigo negativo consistió en buffer de fosfatos pH 6.9 en lugar del extracto y el positivo consistió en 100 μ L de una solución de 0.44 mg/mL de acarbosa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.4 Inhibición de la actividad α -glucosidasa

En un tubo de ensayo protegido de la luz se colocaron 500 μ L del extracto de yogurt (N, AA, AS), 500 μ L de buffer de fosfatos pH 6.8 y 500 μ L de α -glucosidasa (1 U/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) la mezcla se homogenizó y se incubó a 37 °C por 5

minutos, posteriormente se adicionaron 500 μ L de una solución de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (p-NPG 5 μ mol) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se incubó a 37 °C durante 10 min. La absorbancia se determinó a 405 nm (Shori y Baba, 2014), los cambios de absorbancia se monitorearon en el tiempo cero y después de la incubación (de la adición del p-NPG). El control negativo consistió en buffer de fosfatos pH

6.8 en lugar del extracto y el control positivo consistió en 500 μ L de una solución de 0.44 mg/mL de acarbosa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por ser un inhibidor ideal de las α -glucosidasas.

Los análisis fueron realizados por triplicado y el porcentaje de inhibición de la actividad α -amilasa y α -glucosidasa se calculó con la ecuación 1:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\Delta Abs \text{ control} - \Delta Abs \text{ muestra})}{\Delta Abs \text{ control}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: ΔAbs control: Cambios en la absorbancia del control.

ΔAbs muestra: Cambios en la absorbancia de la muestra.

2.5 Evaluación de la funcionalidad *in vivo* - Ensayo clínico

Atendieron a la convocatoria 23 sujetos de etapa adulta, de los cuales 13 entraron en criterios de eliminación por factores externos (dieta y/o consumo de alcohol) que podrían afectar sus niveles de glucemias postprandiales. Se trabajó con 10 participantes que cumplieron los criterios para esta investigación.

Presentaron promedio de edad de 22.20 ± 1.98 años, el peso promedio fue de 51.68 ± 7.01 kg, talla de 158.90 ± 3.66 cm, un IMC normal de 20.45 ± 2.65 kg/m², niveles de glucosa de 82.80 ± 8.06 , colesterol de 152.60 ± 15.92 y triglicéridos de 69.5 ± 35.84 .

Criterios de inclusión

Se realizó un ensayo clínico en 23 sujetos de etapa adulta (20 a 45 años) con Índice de Masa Corporal (IMC) grado I y II (normal-sobrepeso), niveles de colesterol, glucosa y triglicéridos normales, basándonos en la metodología de Méndez, et al. (2016), así como la ISO-26642 (2010), 4 entraron en criterio de eliminación y 9 por factores externos (dieta y consumo de alcohol), incluyéndose en este estudio 10 sujetos; brindándoles una carta de consentimiento informado, aprobado en el proyecto (17-

FaSPyN-SA-08) por el comité de ética de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) avalado por la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) y la Norma Oficial Mexicana 012 (NOM, 2012).

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron sujetos de etapa adulta (mayores de 45 años) con IMC grado III (obesidad), niveles de colesterol altos (mayor a 200 mg/dL), glucosa (mayor a 126 mg/dL) y triglicéridos elevados (mayor a 150 mg/dL), que tomaban algún medicamento y mujeres embarazadas.

Criterios de eliminación

Los criterios de eliminación fueron sujetos que no concluyeron la valoración, que no pudieron consumir el alimento de prueba y sujetos que por decisión propia abandonaron el estudio.

2.6 Determinación del índice glicémico

Se citó a los participantes en 4 ocasiones, la primera cita el participante llegó en ayuno de 10 a 12 h, se le realizó una punción capilar en la yema del dedo utilizando el glucómetro (On-Call Plus) para conocer su glucosa basal en mg/dL, posteriormente se dio de 7 a 15 min para ingerir una carga glicémica estándar (pan blanco a una proporción de 25g de carbohidratos) acto seguido de la ingesta se realizaron punciones capilares a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min y se elaboró la curva a la

tolerancia a la glucosa, mediante la lectura de la concentración de la glucosa postprandial en mg/dL de cada punción realizada. De la segunda a la cuarta cita con una semana de diferencia entre cada una, cada participante realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, en el cual se consumieron las formulaciones (Cita 2 (yogurt N), Cita 3 (Yogurt AA) y Cita 4 (Yogurt AS) en una proporción de 25g de carbohidratos de cada uno.

Cálculo del Índice glicémico y Carga glicémica

$$IG = \frac{(ABC \text{ formulación})}{ABC \text{ estándar}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

La carga glicémica se determinó empleando el Índice glicémico de los yogurts y la

Para valorar los resultados se utilizó la concentración de la glucosa postprandial en mg/dL de cada punción realizada para determinar la relación entre el área bajo la curva después de consumir cada formulación (ABC formulación) y el área bajo la curva después de consumir el alimento estándar (ABC estándar) y esta relación midió el IG de cada una de las formulaciones.

Se determinó el índice glicémico aplicando la siguiente ecuación 2:

cantidad de hidratos de carbono totales de la formulación (25 g) usando la ecuación 3:

$$CG = (IG \times \text{contenido de carbohidratos por porción}) / 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

2.7 Análisis estadístico

Las variables a evaluar *in vitro* (inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa) se analizaron por triplicado y se estimó por un diseño completamente aleatorio con una comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de ($p < 0.05$). Aplicando el programa estadístico Infostat.

Las concentraciones de glucosa postprandial de las punciones realizadas de cada una de las formulaciones se analizaron con una comparación de medias de Tukey. La determinación de Índice y Glicémico y Carga Glicémica se estimó por el área bajo la curva de la respuesta a la glucosa utilizando el método de trapecios. Aplicando el programa informático Excel.

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo tuvieron como propósito reducir o mantener los niveles de glucosa después de ser ingerido y poder dirigir este producto especialmente a las personas diagnosticadas

como diabéticos; así como también a individuos sanos. Se evaluó la funcionalidad del yogurt desarrollado tanto *in vitro* como *in vivo* para poder catalogarlo como funcional, ya que existen muy pocas investigaciones en donde realizan esta acción, dejando en duda si el alimento presenta beneficios para la salud.

3.1 Actividad α -amilasa

En la Figura 1 se observa que las 3 formulaciones obtuvieron actividad inhibitoria para la enzima α -amilasa, la formulación N presentó una inhibición de 43.01% y AA de 44.66% no presentando diferencias significativas. AS presentó el porcentaje de inhibición mayor de 55.75%, mostrando diferencias significativas respecto a las anteriores. Se utilizó como control positivo la acarbosa, que tiene la propiedad de reducir el aumento postprandial de la glucosa; lo que se puede observar en la figura mediante la inhibición de la actividad amilasa del 99.6%. Este es un fármaco que también ha sido evaluado en pacientes con obesidad o sobrepeso,

reduciendo sus niveles de triglicéridos, además de provocar un efecto hipoglucemiante (Yu y col., 2021). Otros estudios demuestran que extractos de estevia empleados como endulzantes para mermeladas también han demostrado una

inhibición de la actividad α -amilasa (Ruiz y Segura, 2019). Lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo al obtener en la formulación AS una inhibición de más del 55% en comparación con la acarbosa.

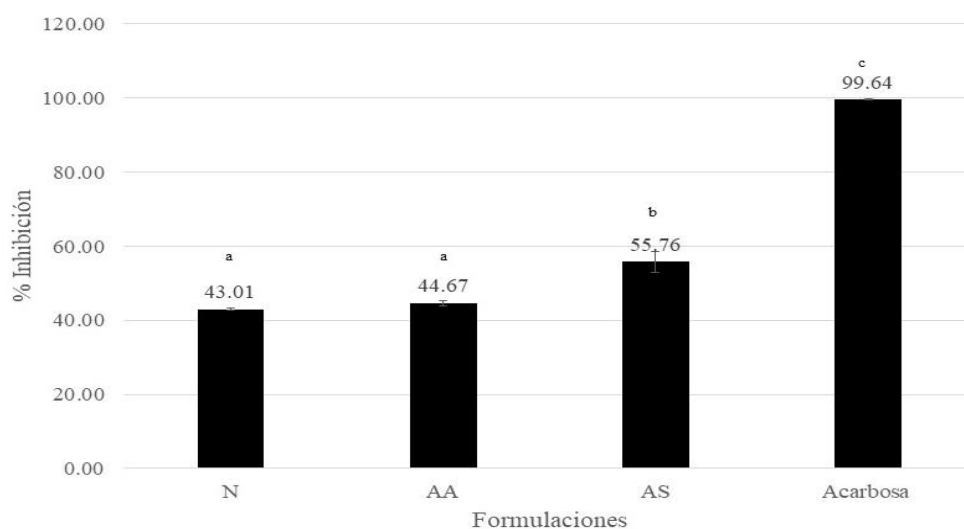


Figura 1. Inhibición de α -amilasa. Yogurt natural (N), Yogurt; 10% *A. vera* endulzada con sacarosa (AA) y Yogurt; 10% *A. vera* endulzada con *S. rebaudiana* (AS). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2 Actividad α -glucosidasa

Por otra parte, la figura 2 muestra la inhibición de α -glucosidasa donde la formulación N fue de 3.29% y AA de 6.35% no teniendo diferencias significativas, en

comparación con la formulación AS que obtuvo un porcentaje de inhibición 3 veces más alto de 22.87%. La acarbosa presentó una inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa de 99.64% y 99.15% respectivamente.

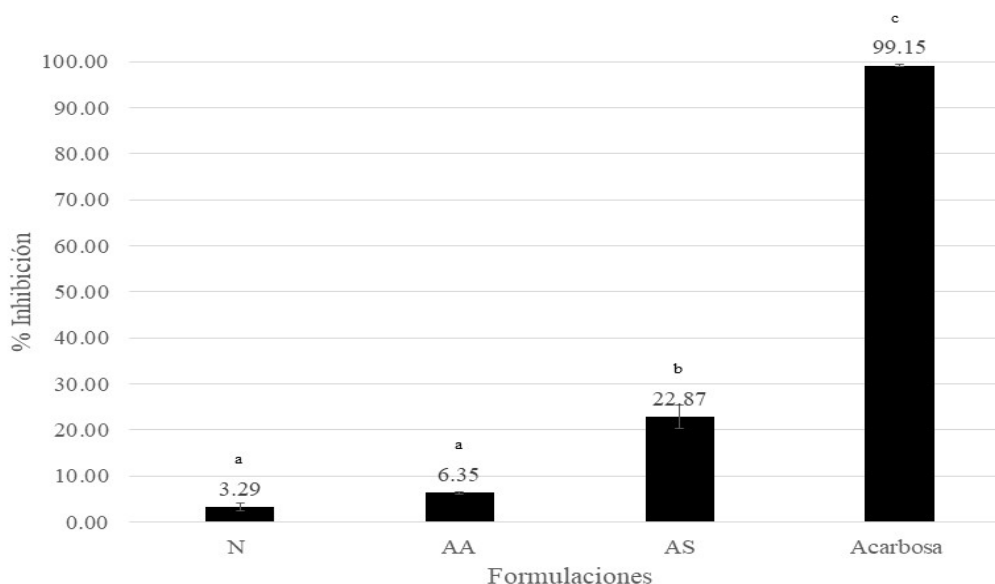


Figura 2. Inhibición de α -glucosidasa. Yogurt natural (N), Yogurt; 10% *A. vera* endulzada con sacarosa (AA) y Yogurt; 10% *A. vera* endulzada con *S. rebaudiana* (AS). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Existen diferentes estudios relacionados con la elaboración de yogurt entre los que podemos mencionar el estudio realizado por Shori & Baba (2011) quienes evaluaron un yogurt de leche de vaca con extracto de Neem, presentando una inhibición de α -amilasa de 30% y una inhibición de α -glucosidasa de 4%. En el mismo año con un yogurt de leche de camello y extracto de ajo, obtuvieron una inhibición de α -amilasa de 33% y una inhibición de α -glucosidasa de 7% (Shori y Baba, 2014); comparando sus resultados con las formulaciones evaluadas en este estudio, en especial con la AS, se presentan mayores porcentajes de inhibición de α -amilasa y de α -glucosidasa. Uno de los factores que atribuye resultados de inhibición en nuestras formulaciones, son las bacterias ácido lácticas utilizadas en este estudio ya que ha sido reportado que ellas promueven a la inhibición de enzimas (Ramchandran, 2008). La formulación que obtuvo los mejores resultados de inhibición fue yogurt AS esto es debido, además de las bacterias ácido lácticas y según Djeridane et al. (2015), al agregar compuestos fenólicos de los productos vegetales, los cuales al unirse al complejo enzima-sustrato, pueden inhibir proporcionalmente la hidrólisis de los carbohidratos. Por otra parte, cuando se utiliza un extracto metanólico del *A. vera* se puede tener una inhibición de la actividad enzimática α -glucosidasa 10% menor a la obtenida con acarbosa (97%) como control (Haloluwe, 2022). Además, Pérez-Ramírez, y col. (2015) en su bebida funcional

comenta que la incorporación de *Stevia rebaudiana* en un producto conduce a un aumento en la capacidad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa, debido a los compuestos fenólicos que modifican las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Es de gran importancia considerar este producto como una alternativa de alimentación ya que representa una solución a la hiperglicemia (síntoma principal de la diabetes) la cual ocurre por un rápido incremento de los niveles de glucosa en sangre debido a una dieta alta en carbohidratos y una hidrólisis de estos que se realiza gracias a la enzima α -amilasa localizada en la saliva y en los jugos pancreáticos; y de la enzima α -glucosidasa localizada en el borde del cepillo del intestino delgado.

3.3 Índice glicémico (IG) y carga glicémica (CG)

Los resultados de las glucemias obtenidas en los tiempos de ayuno y después del consumo del alimento estándar, así como de las formulaciones se muestran en la Figura 3. Se calculó el área bajo la curva de los valores de glucemias individuales para el alimento estándar y para las formulaciones (N, AS y AA), a partir de estos resultados se definió el IG y CG de cada una de las formulaciones por cada participante.

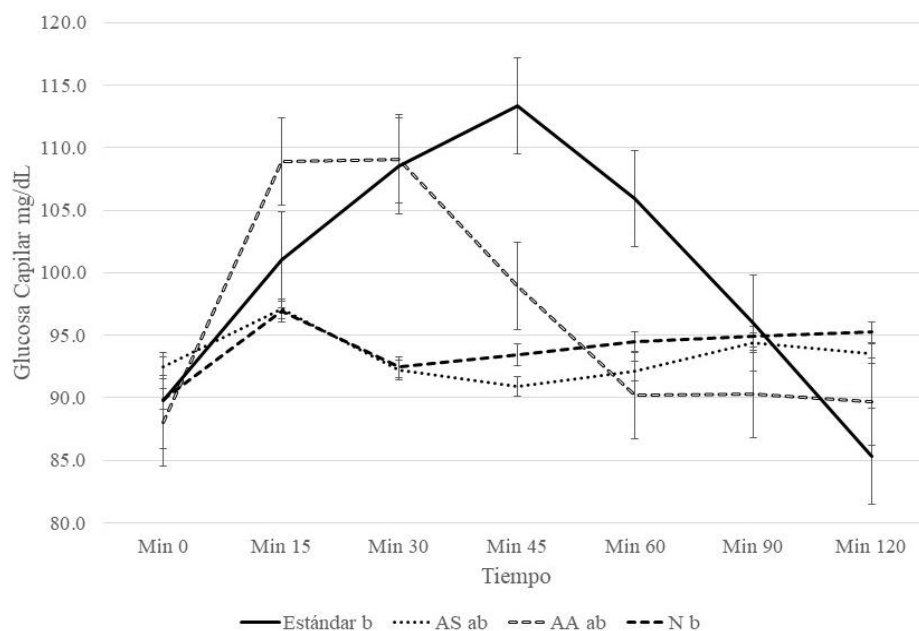


Figura 3. Curvas de glucosa postprandial. Estándar (pan blanco), Yogurt Natural (N), Yogurt, 10% *A. vera* endulzada con sacarosa (AA) y Yogurt, 10% *A. vera* endulzada con *S. rebaudiana* (AS). Nivel de significancia ($p < 0.05$).

Se presentan diferencias significativas en el comportamiento de la glucosa postprandial que al min 30, posteriormente (min 45, 60, 90 y 120) se observan diferencias significativas solo contra el alimento estándar.

El valor del índice glicémico (IG) obtenido para el yogurt N fue de 36.1 ± 15.41 , el yogurt AA de 55.5 ± 8.96 y el yogurt AS de 16.1 ± 7.77 ; así mismo, los resultados de carga glicémica (CG) para el yogurt N fue de 9.0 ± 3.80 , yogurt AA de 13.90 ± 2.24 y yogurt AS de 4 ± 1.94 .

Comparando los resultados se observa que la formulación AA presenta un IG y una CG media, la formulación N presenta un IG y CG bajos, por otra parte, la mejor formulación fue AS que presentó el IG y CG más bajo; de acuerdo con Östan, et al. (2001) quien concluye en su trabajo con productos lácteos fermentados, estos presentan IG bajos asociándose al tratamiento no farmacológico de pacientes con diabetes o prevención de dicha patología. Un factor que contribuye a los resultados de las 3 formulaciones es el

proceso de fermentación, el cual hidroliza los carbohidratos de la leche formando disacáridos y ácidos orgánicos, disminuyendo su biodisponibilidad según Guerrero Morales, et al. (2016) quién midió el IG de diferentes productos lácteos. Se ha reportado que las proteínas lácteas reducen la glucemia, aunque las proteínas de la leche estimulan la insulina ayudando a una rápida digestión; además la grasa láctea es un importante regulador de las respuestas metabólicas (Panahi, et al., 2014) (Alcantar, et al., 2013). Los factores que promueven a un IG y CG más bajo, y las diferencias significativas en las glucosas postprandiales en la formulación AS es, además del proceso de fermentación, el incluir productos vegetales (*Aloe vera* y *Stevia rebaudiana*). La viscosidad de la fibra soluble contenida en *Aloe vera* reduce la absorción de carbohidratos en el intestino, bajando así la respuesta glucémica en alimentos con contenido de hidratos de carbono (Aston, et al., 2014). Góngora, et al. (2018) en su investigación reportan que a comparación de la sacarosa la *Stevia rebaudiana*, no es un carbohidrato de rápida absorción y debido a sus glucósidos de

esteviol es un endulzante sin calorías con efectos hipoglucemiantes, lo que la hace un atractivo sustituto de azúcar.

De acuerdo con estudios realizados hasta el momento, esta investigación es innovadora ya que la materia prima principal (leche de cabra) aunque tiene una producción de 88.6 litros por cabra anuales en Coahuila, México; su demanda poblacional de consumo y producción de productos lácteos es poca, aunque con potencial aplicación en la producción de yogurt (Hernández, et al., 2016). La adición de *Aloe vera* representa eficacia terapéutica gracias a sus polisacáridos y compuestos fenólicos, presentando efectos antihipertensivos, hipoglucemiantes y antiulcerosos (Radha y Laxmipriya, 2015), así como la *Stevia rebaudiana* que tiene efectos hipoglucemiantes *in vitro* e *in vivo* debido a sus esteviósidos y compuestos fenólicos.

Se observó que las 3 formulaciones presentaron propiedades funcionales al inhibir enzimáticamente la α -amilasa y α -glucosidasa y al momento de ser consumidas por los pacientes se absorbieron en el torrente sanguíneo lentamente dejando el nivel de glucosa en la sangre más uniforme, presentado índices glicémicos de medio a bajos. Las 3 formulaciones (N, AA y AS), al incluir productos vegetales como el *Aloe vera* beneficia el potencial de inhibición y a bajar el IG en las formulaciones AA y AS, debido al contenido rico de fibra soluble. Al endulzar con sacarosa la formulación AA disminuye los beneficios antes mencionados, en comparación de la formulación AS que fue endulzado con *Stevia rebaudiana* la cual, al ser un producto natural, gracias a sus compuestos fenólicos y glucósidos de esteviol un mayor potencial de inhibición enzimática, así como un IG más bajo, de manera que deben de ser cuantificados en próximas investigaciones para correlacionar dichos resultados.

4. Conclusiones

Al evaluar *in vivo* las 3 formulaciones de yogurt, se estableció que la mejor formulación es el prototipo AS adicionado con *Aloe vera* y *Stevia rebaudiana* ya que presenta una inhibición α -amilasa y α -glucosidasa de 55.75% y 22.87% respectivamente, teniendo relación con los estudios *in vitro* donde su IG fue de 16.1 y CG de 4, concluyendo que es un alimento funcional que podría mejorar la calidad de vida de personas sanas y con futuros estudios podría ser una alternativa para personas con diabetes. Esta investigación debe seguir siendo estudiada a profundidad conociendo los compuestos fenólicos, el contenido de ácidos grasos, aminoácidos y péptidos bioactivos que contiene la formulación identificando, no solo por bibliografía, que atribuye su funcionalidad, trabajar en un futuro con pacientes diabéticos evaluando su hemoglobina glucosilada corroborando las propiedades funcionales del producto.

Agradecimiento

Los autores agradecen el poder realizar esta investigación, que fue financiada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías de México a través de una beca de estudios de posgrado, con número de becario 611600. Financiamiento por parte de Sumorg de México, SA de CV., Proyecto: *YAloe-2020-2023-UAdeC* para el desarrollo de este producto.

Referencias

1. Alcantar Rodríguez, V., González Rosendo, G., Rodríguez Murguía, N., Villanueva Sánchez, J., Quintero Gutiérrez. (2013). Índice glucémico en alimentos compuestos, <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7786651>, Rev Esp Nutr Comunitaria, 19 (4), 216-223 (2013).
2. Aston LM., Gambell JM., Lee DM., Bryant SP., Jebb SA., Determination of the glycaemic index of various staple carbohydrate-rich foods in the UK diet,

- <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602723>, Eur J Clin Nutr, 62, 279-285 (2009).
3. Brand-Miller, J., Glicemic Index. <http://www.glycemicindex.com/about.php>, University of Sydney, Glicemic Index, (2017).
 4. Codex alimentaris, Leche y productos lacteos, segunda edición, <https://www.fao.org/3/i2085s/i2085s.pdf>, FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ISSN 1020-2579, 2011.
 5. Cuvas R., Montañez J., Contreras JC., Cruz M., Mussatto S. and Belmares R., *Aloe vera* and Probiotics: A New Alternative to Symbiotic Functional Foods, <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/22622>, Ann Reser & Rev Biol, 9 (2), 1-11, (2016).
 6. Dämon S., Schätzer M., Hö J., Tomasec G., Hoppichler F., Nutrition and diabetes mellitus: an overview of the current evidence, <https://doi.org/10.1007/s10354-011-0888-4>, Wien. Med. Wochenschr, 161, 282-288, (2011).
 7. Dasgupta N., Muthukumar SP., Murthy PS., Solanum nigrum Leaf: Natural Food Against Diabetes and its Bioactive Compounds, <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2016.181.193>, Res J Med Plant, 10, 181-193, (2016).
 8. Djeridane A., Hamdi A., Bensania W., Cheifa K., Lakhdari I., Yousfi M., The in vitro evaluation of antioxidative activity α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts, <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.10.007>, Res Rev, 9 (4), 324-331, (2015).
 9. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016, <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/encuestas/resultados/ENSA NUT.pdf>, 2016.
 10. Franco-Mijares AC., Cardona-Pimentel G., Villegas-Canchola KP., Vázquez-Flores L., Juareui-Vega P., Jaramillo-Barrón E., Nava A., Sobre el índice glucémico y el ejercicio físico en la nutrición humana. www.medigraphic.com/elresidente, El Residente, 8 (3), 89-96, (2013).
 11. Guerrero Morales JC., Rosas Romero R., García Zepeda RA., Oropeza Hernández R., Ruiz Jiménez S., Ríos Chávez AN., Cervantes Covarrubias L., Determinación del índice glucémico y la carga glucémica de productos lácteos fermentados en sujetos adultos sanos, sedentarios y deportistas, <http://dx.doi.org/10.20960/nh.572>, Nutr Hosp, 33, 1095-1101, (2016).
 12. Góngora Salazar VA., Vázquez Encalada S., Corona Cruz A., Segura Campos MR., Stevia rebaudiana: A sweetener and potential bioactive ingredient in the development of functional cookies, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.007>, J Func Foods, 44, 183-190, (2018).
 13. Haloluwe Kankanamge S.T., Chalani Oshala H., Katugampalage Don Prasanna P.G. Evaluation of functional properties in ready-to-drink beverage formulated with *Kalanchoe pinnata* (Akkapana) and *Aloe vera*, <https://doi.org/10.22059/jfabe.2022.348521.1128>, J Food Bioprocess Eng, 5(2): 168-177, (2022).
 14. Hernández-Monzón, A., Torres-Herrera, A., Duarte-García, C., Rodríguez Villacis, D. Desarrollo de una leche fermentada de cabra con cultivos probióticos. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445546669002>, Tecnol Quim, 36 (3), 321-336, (2016).

15. ISO-26642. ISO 26642:2010 Food products. Determination of the glycaemic index (GI) and recommendation for food classification. <https://www.iso.org/standard/43633.html>, (2010).
16. Kalyankar SD., Khedkar CD., Patil AM., Goat: Milk, Encyclopedia of Food and Health, Primera Edición, Elsevier Ltd, ISBN: 9780123849472, 358, United Kingdom. (2016).
17. Lima Illescas, Miriam Verónica; Jiménez Jaramillo, Diego José; Porras Polo, Claudia Adriana; Maurat Argudo, Andrea Karina; Álvarez Álvarez, Diana Patricia. Efectos de azúcares totales sustitutos de sacarosa en la salud bucal. <https://doi.org/10.37135/ee.04.14.11>, Revista Eugenio Espejo, 16 (2), 101-108, (2022).
18. Longoria-García, S., Belmares-Cerda, R. E., Flores-Verástegui, M. I., Contreras-Esquivel, J. C., Montañez-Sáenz, J. C., & Cruz-Hernández, M. A., Prebiotics, Probiotics, Synbiotics and Functional Foods in Control and Treatment of Type II Diabetes Mellitus and Colorectal Cancer. Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, Edition First, Venketeshwer Rao, ISBN: 978-953-51-2476-4, 17, 345-362, London, United Kingdom, (2016).
19. Lordan S., Smyth TJ., Soler-Vila A., Stanton C., Ross, RP. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>, Food Chem. 141 (3), 2170–2176, (2013).
20. Mathur R. and Johri N., Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7627>, J Sci Food Agric, 96 (12), 4231-4234, (2016).
21. Méndez López LF., Melendez Corral M., Cerda Flores RM., de la Garza Hernández AL., Ramírez López E., Ibarra Salas M., Garza Juárez, AdeJ., Standardization and Glycemic Index of a Traditional Oat (*Avena sativa*) Beverage. <http://pubs.sciepub.com/jfnr/4/6/7>, J. Food Nutr Res, 4 (6), 388-393, (2016).
22. Narayana, N.K., Govinda, G., Kumari, A.V. and Palliyaguru, O.G. Effect of sugar replacement with stevia on quality of vanilla flavoured cow milk set yoghurt, [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(5\).548](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(5).548), Food Res, 6 (5): 174-182, (2022).
23. Norma Oficial Mexicana, NOM-012-SSA3-2012, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013, (2012).
24. Norma Oficial Mexicana, NOM-181-SCFI-2010, Yogurt Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4209/seeco/seeco.htm>, (2010).
25. Norma Oficial Mexicana: NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>, (2010).
26. Östman EM., Liljeberg Elmståhl HGM., Björck, IME. Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented

- milk products.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/74.1.96>,
Am. J. Clin. Nutr. 74(1), 96-100,
(2001).
27. Panahi S., Khoury D., Kubant R., Akhavan T., Luhovyy B., Goff D., Anderson GH., Mechanism of action of whole milk and its components on glycemic control in healthy young men. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.07.002>, J. Nutr. Biochem. 25 (11), 1124-1131, (2014).
 28. Pérez-Ramírez I., Castaño-Tostado E., De León J., Rocha-guzmán N., Reynoso-Camacho R., Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.126>, Food Chem. 172, 885-892, (2015).
 29. Radha, M. H., & Laxmipriya, N. P., Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.10.006>, J Tradit Complement Med. 5 (1), 21-26, (2015).
 30. Ramchandran L., Shah NP., Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00643.x>, J. Food Sci, 73 (2), 75-81, (2008).
 31. Ramesh P., Raj S., Suneel O., Satvinder S., Shaik H., Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Aloe vera* Extract Preparations: A Review, <https://doi.org/10.1002/ptr.5532>, Phytother Res, 30, 200-207, (2006).
 32. Ruiz-Ruiz JC., Moguel-Ordoñez YB., Matus-Basto AJ., Segura-Campos MR. Antidiabetic and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* extracts (var. Morita) and their incorporation into a potential functional bread, <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1883-3>, J. Food Sci Tech, 52 (12), 7894-7903, (2015).
 33. Ruiz Ruiz JC, Segura CamposMR. Development of nopal-pineapple marmalade formulated with stevia aqueous extract: effect on physicochemical properties, inhibition of α -amylase, and glycemic response, <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02048>, Nutr Hosp., 36 (5), 1081-1086, (2019).
 34. Shivani Chauhan, Pratik Powar and Rahul Mehra. A review on nutritional advantages and nutraceutical properties of cow and goat milk. <https://doi.org/10.22271/allresearch.2021.v7.i10b.9025>. Int J Appl Res, 7(10), 101-105, (2021).
 35. Shori AB., Baba AS. Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.04.006>, J Saudi Chem Soc, 17 (3), 295-301, (2011).
 36. Shori AB., Baba AS. Comparative antioxidant activity, proteolysis and in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibition of *Allium sativum*-yogurts made from cow and camel milk, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.09.014>, J Saudi Chem Soc, 18 (5), 456-463. (2014).
 37. Sousa Yasmim, B. Medeiros Larissa, Pintado Manuela, Queiroga Rita, Goat milk oligosaccharides: Composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.052>, Trends Food Sci Technol, 92, 152-161, (2019).
 38. Valenzuela A., Valenzuela R., Sanhueza J., Morales G. Alimentos

funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?,

<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011>, Rev Chil Nutr, 41 (2), 198-204, (2014).

39. Ai-Qing Yu, Jiong Le, Wen-Tao Huang, Bin Li, Hui-Xin Liang, Qun Wang, Yu-Ting Liu, Charlotte-Aimee Young, Mei-Ying Zhang & Shu-Lan Qin. The Effects of Acarbose on Non-Diabetic Overweight and Obese Patients: A Meta-Analysis, <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01602-9>, Adv Ther 38, 1275–1289, (2021).
40. Zhang S., Li XZ., Inhibition of α -glucosidase by polysaccharides from the fruit hull of *Camellia oleifera*, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.059>, Carbohydr Polym, 115 (22), 38-43, (2015).