

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CARAMBOLA (*Averrhoa carambola* L.)

IN VITRO ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF CARAMBOLA (*Averrhoa carambola* L), EXTRACTS

Luis Angel Xoca-Orozco¹, Víctor Zamora-Gasga¹, Gabriela Espinosa-Alonso², Rita María Velázquez-Estrada¹, Ulises López-García¹, Sonia Sáyago-Ayerdi¹ y Alejandra Chacón-López^{1*}

¹ Instituto Tecnológico de Tepic. Laboratorio Integral en Investigación en Alimentos. Av. Tecnológico # 2295 Lagos del Country. Tepic, Nayarit, México. E-mail: alei.chacon@gmail.com

² Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR U-Sinaloa. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Colonia San Juachin. Guasave, Sinaloa. México.

RESUMEN

Se llevó a cabo la obtención de extractos de hoja de carambola (*Averrhoa carambola* L.) con el objetivo de evaluar su actividad antioxidante y capacidad antifúngica. La extracción fue asistida por ultrasonidos. Se aplicaron tres diferentes tratamientos, donde el tiempo de extracción, el ciclo de pulso y la amplitud de sonicación fueron evaluados. Una vez obtenidos los extractos a las diferentes condiciones de sonicación, se determinó para cada uno de ellos el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por tres métodos: DPPH, ABTS y FRAP. Además se evaluó la actividad antifúngica de los extractos, lo cual fue determinado mediante su capacidad de inhibir el desarrollo de *Colletotrichum* sp en condiciones *in vitro*. Los resultados indican que los extractos logran una inhibición de hasta el 53% del crecimiento micelial del hongo *in vitro*, así como una reducción en la esporulación del fitopatógeno. Estos resultados contribuyen a la generación de evidencia para el desarrollo de nuevas alternativas para el control de enfermedades poscosecha utilizando hojas de carambola como fuente de compuestos con capacidad antifúngica.

Palabras clave: Carambola, Ultrasonidos, Antifúngico, *Colletotrichum*, Poscosecha,

ABSTRACT

We obtained carambola leaf (*Averrhoa carambola* L.) extracts with the objective of evaluate the antioxidant activity and antifungal capacity. Extraction was assisted by ultrasound. Three different treatments were applied, where extraction time, pulse cycle and sonication amplitude were evaluated. Once the extracts were obtained at different sonication conditions, the content of total phenols and antioxidant activity were determined in each of them using three methods: DPPH, ABTS and FRAP. In addition, the antifungal activity of the extracts was evaluated, which was determined by their capacity to inhibit *in vitro* the development of *Colletotrichum* sp. The results indicate that the extracts achieve an inhibition of up to 53% of mycelial growth of the fungus in petri dish, as well as a reduction in phytopathogen sporulation. These results contribute to the generation of evidence

for the development of new alternatives in order to control post-harvest diseases using leaves of carambola as source of antifungal compounds.

Key words: Carambola, Ultrasounds, Antifungal, *Colletotrichum*, Postharvest.

INTRODUCCIÓN

Averrhoa carambola L., conocido comúnmente como carambola, pertenece a la familia oxalidaceae, este frutal es originario de Asia y actualmente se encuentra presente en numerosos lugares de los trópicos y subtrópicos. En México, siendo un cultivo introducido, se ha ido incrementando la comercialización del carambola desde hace algunos años (Pérez-Barraza *et al.*, 2005). Existen reportes sobre el contenido de diversos compuestos con alta actividad antioxidante, presentes tanto en frutos como en hojas de *A. carambola* (Wei *et al.*, 2014; Lim y Lee, 2013), lo que se ha atribuido al alto contenido de polifenoles, principalmente procianidinas y proantocianidinas. Sin embargo, una de las limitaciones para la obtención de los compuestos antioxidantes es el método de extracción ya que son sensibles a las altas temperaturas. Annegowda *et al.* (2012), determinaron que un método de extracción de compuestos fenólicos asistido con sonicación resultó ser altamente eficiente ya que los extractos obtenidos mediante este método mostraron mayor capacidad antioxidante comparada con sus controles. Una de las ventajas del uso de la extracción de fitoquímicos asistida por sonicación, es que se propicia una mayor eficiencia en la ruptura celular, proporcionando una mejor interacción de disolventes dentro y fuera de la matriz vegetal, favoreciendo así el arrastre de los compuestos de interés (Annegowda *et al.*, 2012; Vilkhue *et al.*, 2008), debido al fenómeno de implosión producido por la cavitación con el consecuente colapso de burbujas que se producen en el proceso. Otra ventaja de los métodos de extracción aplicando sonicación, es que se mejora el rendimiento de extracción empleando solventes, aún a bajas temperaturas (Albu *et al.*, 2004; Gimbin *et al.*, 2014). En estudios previos se ha reportado la optimización de la extracción utilizando ultrasonidos en hojas de carambola, pudiendo determinar las mejores condiciones para obtener

extractos con mejor capacidad antioxidante (Zamora-Gasga *et al.*, 2016). En los últimos años se han reportado estudios sobre la efectividad antimicrobiana y antifúngica de diferentes tipos de extractos de *A. carambola* (Saghir *et al.*, 2013), estos estudios se han enfocado en la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos de humano, tales como bacterias gram negativas, por ejemplo *E. coli*, *P. auriginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. dysenteriae* (Mia *et al.* 2007) y gram positivas como *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *Klebsiella sp* (Sripanidkulchai *et al.*, 2002), mientras que en hongos se ha visto su efecto antifúngico ante *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Mia *et al.*, 2007; Dasgupta *et al.*, 2013). Prácticamente a la fecha no existen reportes de estudios donde se haya determinado el efecto antifúngico de los extractos de hojas de carambola sobre patógenos de frutos tropicales como *Colletotrichum sp.*, hongo que representa uno de los fitopatógenos más importantes en productos hortofrutícolas, ya que es el agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis que se presenta en diversos frutos causando cuantiosas pérdidas en el rendimiento, lo que se refleja en perjuicios económicos. Para aminorar el problema, los cultivos se tratan con antifúngicos químicos que dañan el medio ambiente y su uso exacerbado ha propiciado la aparición de cepas resistentes. Por lo tanto, resulta pertinente buscar alternativas en el control de estos tipos de hongos fitopatógenos. El objetivo de este trabajo se centró en evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de extractos de hojas de *A. carambola* obtenidos mediante una extracción asistida por sonicación sobre el desarrollo de *Colletotrichum sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron hojas maduras de tres árboles de *Averrhoa carambola L.*, en el campus del Instituto Tecnológico de Tepic, México. Después de la colecta las hojas de los diferentes árboles fueron mezcladas y lavadas con agua destilada para posteriormente someterlas a un proceso de deshidratación en un horno de secado convencional (Scorpion Scientific, WTR910) a 50°C por 35 h. Terminado el periodo de secado se molieron en un procesador de alimentos (NUTRIBULLET, NB-101B) y se tamizaron con un tamaño de malla de 0.05 mm.

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos antioxidantes

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) de compuestos antioxidante fue adaptada de acuerdo a la metodología propuesta por Wei *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Para llevar a cabo la extracción se utilizó un sonicador con frecuencia de 24 kHz y 400 Watts, con escala en amplitud de sonicación (UP400S, Hielscher, EE.UU.). Las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción con acetona-agua (7:3, v/v), aplicando una proporción sólido-solvente de 1:15 (p/v), la muestra fue mantenida en un baño recirculador (B401L, Firstek) de agua fría para mantener el control de la temperatura. Se utilizó un sonotrodo (H7 Tip 7, Hielscher) con amplitud máxima de 175 μm y una densidad

de poder acústico de 300W/cm². El calor generado durante la sonicación fue compensado por un baño de hielo, manteniendo la temperatura de extracción a 30°C \pm 2. Posterior a la extracción, las muestras fueron filtradas a través de un papel filtro No.1 (F1-125 Faga-Lab) usando una bomba de vacío (WP6211560, Millipore). El permeado fue colectado y mantenido a 38°C para remover el solvente mediante el empleo de un equipo de evaporación a vacío (Buchi Rotavapor R-124 Flawil). El concentrado fue congelado a -20°C para su liofilización (FreeZone 6, Labconco, USA), después fue molido, tamizado (500 micras) y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis. El polvo fue resuspendido en agua destilada y la suspensión fue analizada para determinar el contenido de fenoles totales (CFT), se midió la actividad antioxidante por tres métodos: DPPH, ABTS y FRAP, para finalmente evaluar la actividad antifúngica de este extracto.

Tratamientos empleados para la obtención de extractos de *Averrhoa carambola* asistida por ultrasonidos

Se aplicaron tres diferentes tratamientos (A, B y C). El tiempo de extracción (X_{TE}), el ciclo de pulso (X_{CP}) y la amplitud de sonicación (X_{AS}) fueron evaluados. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento A; X_{TE} = 15 min, X_{CP} = 0.7s y X_{AS} = 100%, tratamiento B; X_{TE} = 30 min, X_{CP} = 0.4s y X_{AS} = 70% y tratamiento C; X_{TE} = 45 min, X_{CP} = 1s y X_{AS} = 40% (Tabla 1). Las condiciones fueron dadas de acuerdo a la optimización realizada en trabajos anteriores (Zamora-Gasga *et al.*, 2016). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado.

Evaluación del contenido de fenoles totales (CFT)

Para evaluar la eficiencia en la extracción se determinó el CFT en los extractos por el ensayo Folin-Ciocalteu, utilizando la metodología propuesta por Alvarez-Parrilla *et al.*, (2010). Un volumen de 250 μL de extracto o estándar (ácido gálico) se hizo reaccionar con 1000 μL de solución de carbonato de sodio [75 g/L]; después de 5 minutos de reacción, 1250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu [100 mL/L] fueron adicionados y la mezcla se agitó usando un vortex. La reacción fue incubada en oscuridad a 50°C por 15 min. La absorbancia fue medida a 750 nm usando un lector de microplaca con detección múltiple (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, USA) con el programa Gen 5. Los resultados fueron expresados en mg-equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto en base seca (EAG; mg/g extracto bs) y se calcularon a partir de una curva estándar en un rango de concentración de 0.0125 a 0.2 mg/mL.

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenido de *A carambola*.

Para la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de carambola se utilizaron tres ensayos diferentes: actividad de captación del radical 1,1-Difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) (Prior *et al.*, 2005); la habilidad para captar el radical 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS) (Re *et al.*, 1999) y el análisis de poder reductor de Hierro (FRAP) (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011). El trolox (en un rango de concentración de 37.5 a 600 μM) fue usado como

Tabla 1. Efecto de los tratamientos (TMT) de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales (CFT) y actividad antioxidante en extractos de hojas de *A. carambola*¹.**Table 1.** Effect of Ultrasonic Assisted Extraction Treatments (TMT) on total phenol content (CFT) and antioxidant activity in leaf extracts of *A. carambola*¹.

TMT	Condiciones ²			Variables de respuesta ⁵			
	X _{TE} (min)	X _{CP} (s)	X _{AS} (%)	CFT ³ (mg EAG/g)	DPPH ⁴ (mmol ET/g)	ABTS ⁴ (mmol ET/g)	FRAP ⁴ (mmol ET/g)
A	15	0.7	100	373.24 ± 4.77 ^a	690.18 ± 8.16 ^a	243.07 ± 1.89 ^a	227.00 ± 4.82 ^a
B	30	0.4	70	355.12 ± 4.48 ^b	225.45 ± 5.97 ^b	215.49 ± 9.24 ^b	355.12 ± 1.16 ^b
C	45	1	40	383.30 ± 6.74 ^a	553.64 ± 3.73 ^c	250.59 ± 0.77 ^a	241.74 ± 3.93 ^a

¹Los valores son presentados como la media ± desviación estándar (n=3).²Tiempo de extracción (X_{TE}), Ciclos del pulso (X_{CP}) y Amplitud de sonicación (X_{AS}).³Equivalentes de Ácido Gálico (EAG mg/g extracto bs).⁴Equivalentes Trolox (ET mmol / g extracto bs).⁵Letras iguales no tienen diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05).

estándar para la curva de calibración y la actividad DPPH, ABTS y FRAP fue expresada como equivalentes de trolox por gramo de extracto en base seca (ET mmol / g extracto bs).

Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos obtenidos de *A. carambola*

Para evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos, se utilizó una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* aislada en trabajos previos (Xoca-Orozco *et al.*, 2017). Se realizaron cuatro tratamientos: un control sin extracto y tres tratamientos con extracto a diferentes concentraciones, 0.5, 1.0 y 1.5 % (p/v), éstas se refieren a la concentración final en el medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) contenido en cajas petri para realizar los ensayos. El concentrado del extracto se filtró usando papel WHATMAN de 0.2 µm. Para la inoculación del hongo en las cajas petri, se tomaron discos de 8 mm de diámetro de la periferia del micelio del hongo previamente puesto a crecer en una caja sin tratamiento, para luego sembrarlos individualmente en el centro de las cajas de petri (conteniendo el extracto a las concentraciones previamente mencionadas) correspondientes a cada tratamiento y finalmente las cajas fueron incubadas a 25 °C durante 9 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se determinó el diámetro de crecimiento micelial *in vitro* (CMP) el cual se midió cada 24 h por 9 días empleando un vernier. Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM) se utilizó la siguiente formula:

$$(1) \%ICM = \frac{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro colonia de tratamiento}}{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro del sacabocados}} \times 100$$

También fue evaluada la esporulación del hongo, esto se llevó a cabo transcurridos los 9 días de incubación, a cada caja de los diferentes tratamientos incluyendo el control, se les colocó 10 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie del micelio desarrollado con ayuda de una varilla de vidrio estéril, estas suspensiones se filtraron a través de gasas estériles, depositándose después en tubos de ensayo, para poder determinar la esporulación final (esporas*mL⁻¹) utilizando una cámara de Neubauer. Posteriormente se realizó

una transformación logarítmica mediante log₁₀, para reducir la varianza dada por los valores de la esporulación final.

Análisis estadístico

Los resultados de la extracción de CFT y actividad antioxidante fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) de Fisher (p ≤ 0.05, n=3), empleando el programa STATISTICA, V8.0. Los resultados de la actividad antifúngica fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de comparación de medias Tukey (p ≤ 0.05, n=3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tecnología de los ultrasonidos se ha venido aplicando con diversos fines, uno de ellos para hacer más eficiente la extracción de compuestos de interés a partir de una matriz vegetal, sin embargo, es necesario establecer los parámetros más adecuados dependiendo de la fuente de extracción, para obtener los mejores resultados. En este estudio, la extracción de CFT fue más eficiente en los tratamientos A (X_{TE}= 15 min, X_{CP}= 0.7 s, X_{AS}= 100%) y C (X_{TE}= 45 min, X_{CP}= 1 s, X_{AS}= 40%), observándose una relación inversa, ya que a X_{TE} cortos se requiere una X_{AS} más alta, mientras que a X_{TE} largos son necesarios menores porcentajes de X_{AS}, para hacer más eficiente la extracción de CFT. Para evaluar la eficiencia de extracción se determinó la capacidad antioxidante del extracto, asumiendo que una mayor capacidad antioxidante representa mayor concentración de compuestos fenólicos. El método DPPH es muy empleado para evaluar *in vitro* la actividad de captación de radicales libres de los extractos de plantas. En la Tabla 1, se muestra que la actividad del radical DPPH es mayor al aplicar el tratamiento A, mientras que en el tratamiento B el valor de la actividad de dicho radical es más bajo. De igual manera se observó el mismo comportamiento para la actividad eliminadora del radical ABTS lo cual está en proporción a la concentración de CFT obtenidos mediante estos tratamientos (A y C). De manera contradictoria en el ensayo FRAP, el cual determina la capacidad reductora de antioxidantes, se observó un mayor poder reductor férrico

en los extractos obtenidos mediante el tratamiento B que contenía una menor concentración de CFT, esto puede deberse a la posible presencia de sustancias capaces de donar un radical hidrógeno a la molécula oxidante y que no son de naturaleza fenólica.

Los extractos provenientes de los diferentes tratamientos fueron evaluados para determinar su actividad antifúngica sobre *Colletotrichum sp.*, los resultados muestran que al aplicar concentraciones de 0.5% (p/v) no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el CMP entre tratamientos (Figura 1a), sin embargo, a concentraciones de 1.0 y 1.5% (p/v) (Figura 1b y 1c), sí se observaron diferencias significativas, de manera que los tratamientos A y B presentan menor CMP durante el periodo de incubación. Para todos los tratamientos al emplear una concentración de extracto de 0.5% (p/v) su %ICM fue menor al 30%, esta porcentaje de inhibición no se considera positivo pues no representa eficacia antifúngica. El tratamiento A con 1% (p/v) de concentración resultó ser el más efectivo sobre el %ICM (Tabla 2 A), logrando una inhibición del 53%, siendo el tratamiento con mayor inhibición. Wei *et al.* (2014) identificaron mediante análisis de HPLC, MALDI-TOF-MS y RMN que los principales compuestos antioxidantes presentes en extractos de hojas de carambola son procianidinas y proantocianidinas los cuales consisten principalmente en unidades de epicatequinas, así como una cantidad considerable de ácido α -linolénico. El mecanismo de acción de compuestos fenólicos sobre la actividad antifúngica no está del todo aclarada, sin embargo se ha reportado que la actividad antibacteriana de catequinas y epicatequinas es debida a la fracción de la molécula de ácido gálico presente en su estructura así como al grupo hidroxilo (Ikigai *et al.*, 1993; Hirasawa and Takada, 2004), mientras que su mecanismo de acción se relaciona con la liberación de pequeñas moléculas atrapadas en el espacio intraliposomal causando fusión y por lo tanto un daño a la membrana del patógeno (Ikigai *et al.*, 1993). Otros autores reportan que la actividad antimicrobiana está relacionada con la inactivación de enzimas del microorganismo el cual causa cambios en la permeabilidad de la membrana. Asimismo, se ha reportado que estos compuestos pueden romper las membranas y causar lisis de los conidios e hifas resultando en una pérdida de la integridad celular y eventualmente la muerte celular (Moreno *et al.*, 2006; Toyoshima *et al.*, 1994). En diversas investigaciones se ha reportado la efectividad de extractos vegetales para inhibir fitopatógenos, como el publicado por Silva *et al.* (2008), donde reportan que extractos obtenidos a partir de *Digitalis lanata*, *Origanum majorana*, *Plantago lanceolata* y *Stevia rebaudiana* a concentraciones del 0.3 a 0.5 g*mL⁻¹ logran una inhibición de la esporulación de *C. gloeosporioides* (aislado de café) de hasta un 96%.

La esporulación, constituye un evento sumamente importante del desarrollo fúngico ya que son estructuras esenciales para su reproducción, por ello es importante evaluar el efecto de los extractos en la esporulación del hongo. Al aplicar una concentración de extracto de 1.5% independiente del tratamiento de extracción, se registró una disminución significativa en el número de esporas, sin em-

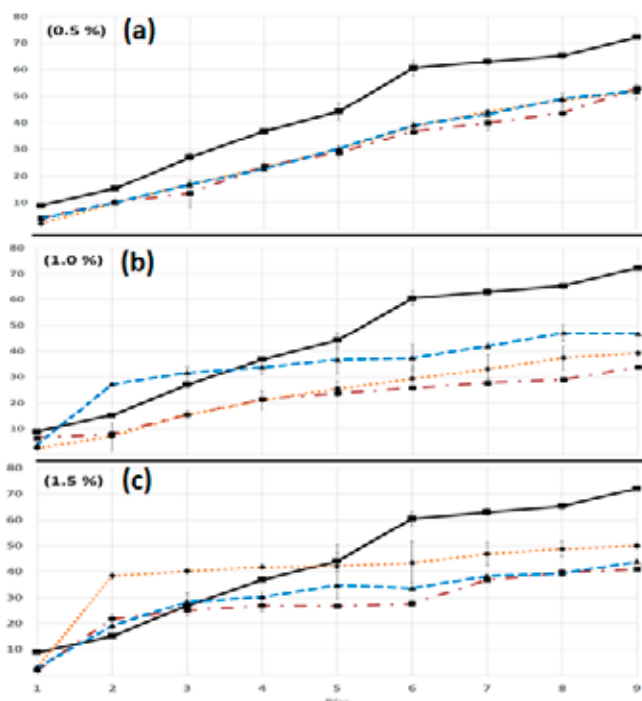


Figura 1. Crecimiento micelial de *Colletotrichum sp* *in vitro*, para los tratamientos A (guinda), B (azul) y C (rojo) de los extractos obtenidos con las diferentes condiciones de sonicación. Línea continua de color negro representa el comportamiento del tratamiento testigo. (a) 0.5 %, (b) 1.0% y (c) 1.5% p/v. Tratamientos a igual concentración con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$, $n = 3$).

Figure 1. Mycelial growth of *Colletotrichum sp* in petri dish, for treatments A (cherry color), B (blue) and C (red) of the extracts obtained with different sonication conditions. Solid black line represents the behavior of the control treatment. (a) 0.5%, (b) 1.0% and (c) 1.5% w / v. Treatments at the same concentration with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, $n = 3$).

bargo, el extracto proveniente del tratamiento A resultó ser el más efectivo en la inhibición de la esporulación del hongo, presentando una reducción de 1.5 logaritmos respecto al tratamiento testigo (Tabla 2B).

Bazie *et al.* (2014) reportan una inhibición de *C. musae* (causante de la antracnosis en plátano) utilizando extractos de *Acacia albida* y *Prosopis juliflora* a 100 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Diana *et al.* (2016) reportan la actividad antifúngica de extractos obtenidos de diversas especies vegetales (salvia, ajo, chile, *Ginkgo biloba*, entre otros) reportando una mayor eficiencia de inhibición para los fitopatógenos *Chalara paradoxa* y *Fusarium guttiforme* (fitopatógenos que afectan al cultivo de piña) a partir de extractos a una concentración de 83 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Kalidindi *et al.* (2015), reportan una inhibición de *Alternaria alternata*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Microsporum canis* y *Aspergillus niger* utilizando extractos de *Annona squamosa* a concentraciones de 1 a 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, determinando la presencia de compuestos como glicósidos, saponinas, taninos, flavonoides y fenoles, los cuales pueden estar participando en la actividad antifúngica de los extractos. En nuestro caso de estudio, el efecto de inhibición del crecimiento micelial, así como de la disminución considerable de la producción de

Tabla 2. Efecto *in vitro* de los diferentes extractos de carambola en el porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (A) y esporulación final de *Colletotrichum* sp (B).**Table 2.** *In vitro* effect of the different carambola extracts in % Inhibition of Micelial Growth (A) and final sporulation of *Colletotrichum* sp (B).

A				B		
% ICM ¹				Esporulación ⁴		
Testigo	0.0 ± 0.0			8.21 ± 0.05		
Tratamiento	A ³	B	C	A	B	C
0.5 %	26.3 ± 0.7 ^{Aa}	27.9 ± 1.4 ^{Aa}	28.2 ± 2.5 ^{Aa}	7.8 ± 0.17 ^{Aa}	7.7 ± 0.02 ^{Aa}	8.1 ± 0.20 ^{Aa}
1 %	53.2 ± 0.8 ^{Ba}	35.2 ± 1.2 ^{Bb}	45.5 ± 0.8 ^{Cc}	7.6 ± 0.03 ^{Aa}	7.5 ± 0.00 ^{Aa}	7.7 ± 0.03 ^{Aba}
1.5 %	42.9 ± 0.5 ^{Ca}	38.9 ± 1.6 ^{Ba}	30.7 ± 1.8 ^{Ab}	6.7 ± 0.15 ^{Ba}	7.2 ± 0.01 ^{Aa}	7.3 ± 0.72 ^{Ba}

¹Los valores son presentados como la media ± desviación estándar (n=3).²Tratamientos a igual concentración con igual letra minúscula (renglón) no son significativamente diferentes entre sí (p<0.05, n=3).³Tratamiento a diferente concentración con igual letra mayúscula (columna) no son significativamente diferentes entre sí (p<0.05, n=3).⁴Datos de esporulación transformados mediante log₁₀.

esporas, es un indicativo de que los procesos moleculares en el fitopatógeno están siendo afectados por la presencia de compuestos fenólicos en el medio. Existe poca información referente a la capacidad antifúngica de extractos de carambola de fitopatógenos como *Colletotrichum* sp., sin embargo se ha reportado que este frutal contiene una importante concentración de compuestos fenólicos presentes en diferentes tejidos de la planta. Así, en este trabajo se evaluó el efecto de los compuestos antioxidantes obtenidos partir de las hojas, lo cual propone una alternativa para el aprovechamiento no solo del fruto, sino de otras partes de la planta. Por otro lado, es importante generar evidencia que apoye la aplicación de nuevos productos de origen natural que ayuden al combate de las principales enfermedades, como lo es la antracnosis que afecta a diferentes cultivos, ocasionando una pérdida económica considerable.

CONCLUSIONES

La extracción asistida por ultrasonidos es un método viable para la obtención de compuestos fenólicos con actividad antifúngica. La inhibición del crecimiento micelial *in vitro* fue mayor en los extractos donde se utilizó a concentraciones de 1% p/v, del tratamiento de extracción A y C, mientras que la esporulación final disminuyó considerablemente utilizando concentraciones de 1.5 %. Los resultados de este estudio contribuyen a la generación de evidencia para el desarrollo de nuevas alternativas para el control de enfermedades poscosecha, y dan la pauta para seguir estudiando diversas estructuras de la planta en busca de alternativas en el control de fitopatógenos. Sin embargo, es pertinente desarrollar más estudios para poder definir su potencial aplicación *in vivo*, tanto a nivel de laboratorio en frutos de interés comercial, como potencialmente a nivel de campo.

REFERENCIAS

Albu, S., E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, and T. J. Mason. 2004. "Potential for the Use of Ultrasound in the Extraction of

Antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the Food and Pharmaceutical Industry." *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (3-4):261-65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.015>.

Alvarez-Parrilla, Emilio, Laura A. De La Rosa, Ryszard Amarowicz, and Fereidoon Shahidi. 2011. "Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (1):163-73. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>.

Alvarez-Parrilla, Emilio, Laura A. De La Rosa, Patricia Legarreta, Laura Saenz, Joaquín Rodrigo-García, and Gustavo A. González-Aguilar. 2010. "Daily Consumption of Apple, Pear and Orange Juice Differently Affects Plasma Lipids and Antioxidant Capacity of Smoking and Non-Smoking Adults." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61 (4):369-80. <https://doi.org/10.3109/09637480903514041>.

Annegowda, H. V., Rajeev Bhat, Liong Min-Tze, A. A. Karim, and S. M. Mansor. 2012. "Influence of Sonication Treatments and Extraction Solvents on the Phenolics and Antioxidants in Star Fruits." *Journal of Food Science and Technology* 49 (4). Springer-Verlag:510-14. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0435-8>.

Bazie, Setu, Amare Ayalew, and Kebede Woldetsadik. 2014. "Antifungal Activity of Some Plant Extracts against (*Colletotrichum Musae*) the Cause of Postharvest Banana Anthracnose." *Plant Pathology & Microbiology* 5 (2):2-5. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000226>.

Dasgupta, P, P Chakraborty, and N N Bala. 2013. "Averrhoa Carambola: An Updated Review." *International Journal of Pharma Research & Review IJPRR* 2 (27):54-63.

Diana, Cerqueira Sales María, Helber Barcellos Costa, Patrícia Machado Bueno Fernandes, José Aires Ventura, and Debora Dummer meira. 2016. "Antifungal Activity of Plant Extracts with Potential to Control Plant Pathogens in Pineapple." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (1):26-31. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026>.

Gimbun, J, N F Ishak, N I S Muhammad, S F Pang, M A A Kadir, H Ramli, M F Abdullah, Z Gimán, and Z Khadisah. 2014. "Ultrasonic Assisted Extraction Polyphenols and Antioxidant from *Nigella Sativa* Seed." *Journal of Engineering and Technology* 5 (2):17-26.

- Hirasawa, Masatomo, and Kazuko Takada. 2004. "Multiple Effects of Green Tea Catechin on the Antifungal Activity of Antimycotics against *Candida Albicans*." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (2). Oxford University Press:225–29. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh046>.
- Ikigai, Hajime, Taiji Nakae, Yukihiko Hara, and Tadakatsu Shimamura. 1993. "Bactericidal Catechins Damage the Lipid Bilayer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1147 (1). Elsevier:132–36. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R).
- Kalidindi, Narasimharaju, Nagarasanakote Venkataswamy, Nagepally Venkataramareddy, Ramaiah Nandeep, Sathyanarayana Swetha, and Bharat Kalidindi. 2015. "Antifungal and Antioxidant Activities of Organic and Aqueous Extracts of *Annona Squamosa* Linn . Leaves." *Journal of Food and Drug Analysis* 3. Elsevier Ltd:795–802. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.012>.
- Lim, Yin Sze, and Shi Ting Lee. 2013. "In Vitro Antioxidant Capacities of Star Fruit (*Averrhoa Carambola*), an Underutilised Tropical Fruit." *Journal of Biology* 1 (1):21–24.
- Mia, Md Masum, Mohammad S. Rahman, Kohinur Begum, Bilkis Begum, and Mohammad A. Rashid. 2007. "Phytochemical and Biological Studies of *Averrhoa Carambola*." *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 6 (2):125–28.
- Moreno, Silvia, Tamara Scheyer, Catalina S. Romano, and Adrián A. Vojnov. 2006. "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosemary Extracts Linked to Their Polyphenol Composition." *Free Radical Research* 40 (2):223–31. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>.
- Pérez-Barraza, M. H., V. Vázquez-Valdivia, and J. Osuna-García. 2005. "El Cultivo Del Carambolo (*Averrhoa Carambola* L .): Alternativa Para El Tropicó Seco." *Revista Chapingo* 11 (1):83–87.
- Prior, Ronald L., Xianli Wu, and Karen Schaich. 2005. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10):4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Re, Roberta, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, and Catherine Rice-Evans. 1999. "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay." *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9):1231–37. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Saghir, S A M, A Sadikun, K Y Khaw, and V Murugaiyah. 2013. "Star Fruit (*Averrhoa Carambola* L.): From Traditional Uses to Pharmacological Activities." *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas* 12 (3):209–19. http://www.embase.com/search/results?subaction=view_record&from=export&id=L368881952%5Cnhttp://www.blacpma.usach.cl/images/docs/012-003/002_revision.pdf.
- Silva, Polyanna Alves, Denilson Ferreira Oliveira, Ney Taironi do Prado, Douglas Antonio de Carvahó, and Gilvane Aparecida De Carvalho Carvalho. 2008. "EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY BY PLANT EXTRACTS AGAINST *Colletotrichum Gloeosporioides* PENZ." *Cienc. Agro., Lavras* 32 (2):420–28.
- Sripanidkulchai, Bungorn, Unchalee Tattawasart, Pisamai Laupattarakasem, and Varina Wongpanich. 2002. "Anti-Inflammatory and Bactericidal Properties of Selected Indigenous Medicinal Plants Used for Dysuria." *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 26:33–38.
- Toyoshima, Y, S Okubo, M Toda, Y Hara, and T Shimamura. 1994. "[Effect of Catechin on the Ultrastructure of Trichophyton Mentagrophytes]." *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 68 (3):295–303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8176271>.
- Vilkhu, Kamaljit, Raymond Mawson, Lloyd Simons, and Darren Bates. 2008. "Applications and Opportunities for Ultrasound Assisted Extraction in the Food Industry — A Review." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (2):161–69. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>.
- Wei, Shu-Dong, Hui Chen, Ting Yan, Yi-Ming Lin, and Hai-Chao Zhou. 2014. "Identification of Antioxidant Components and Fatty Acid Profiles of the Leaves and Fruits from *Averrhoa Carambola*." *LWT - Food Science and Technology* 55 (1):278–85. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.013>.
- Xoca-Orozco, Luis-Ángel, Esther Angélica Cuellar-Torres, Sandra González-Morales, Porfirio Gutiérrez-Martínez, Ulises López-García, Luis Herrera-Estrella, Julio Vega-Arreguín, and Alejandra Chacón-López. 2017. "Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea Americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-*Colletotrichum*." *Frontiers in Plant Science* 8 (June): 1–13. doi:10.3389/fpls.2017.00956.
- Zamora-Gasga, Victor Manuel, Mitsuky Soraya Serafín-García, Jorge Alberto Sánchez-Burgos, Rita María Velázquez Estrada, and Sonia Guadalupe Sáyago-Ayerdi. 2016. "Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Starfruit (*Averrhoa Carambola* L) Leaves." *Journal of Food Processing and Preservation* 0:1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13093>.