



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Tesis de Diploma

Obtención de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. con actividad antifúngica y antioxidante



Autora: Susett La Rosa González

Tutora: MSc., Ing. Janet Quiñones Galvez

Santa Clara

2015-2016



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Tesis de Diploma

Obtención de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. con actividad antifúngica y antioxidante

Autora: Susett La Rosa González

Tutora: MSc., Ing. Janet Quiñones Galvez

Santa Clara

2015-2016

Dedicatoria

A mi mamá por ser mi guía, mi apoyo incondicional en cada paso y la fuerza que me ayuda a superar todos los obstáculos que se me imponen.

A Lázaro por asumir la tarea de papá durante todos estos años, por guiarme y aconsejarme en el camino de la vida.

A toda mi familia por estar a mi lado en cada momento.

Agradecimientos

A mi tutora Janet por todo lo que me ha enseñado, por su apoyo en los momentos de estrés y sin la cual esta tesis no hubiera sido posible.

A Claudia por darme ánimos cada vez que pensaba que todo estaba perdido y brindarme su ayuda sin dudar en cada momento que la necesité.

A Martha, Yemey, Geeysi, Maribel y Yanelis que con su tiempo y consejos contribuyeron a la realización de esta tesis.

Al Centro Bioplantas por acogerme desde tercer año y contribuir a mi formación como estudiante y profesional.

A Yani mi hermanita adoptiva que a pesar de la distancia que nos separa siempre ha estado para mí incondicionalmente.

A Sarita, Claudia e Ivis por secar mis lágrimas en los momentos de tristeza, por compartir conmigo los momentos más locos de mi vida, por hacer de mí una niña grande, porque estos años junto a ustedes han sido los mejores y aunque el tiempo pase, siempre seremos las pachulis y las petunias.

A mis compañeros de aula que a pesar de nuestras diferencias hemos formado esta gran familia y cuya unidad nos ha permitido que casi todos los que comenzamos hace cinco años ahora lleguemos a la meta, junto a otros que se han incorporado en el camino.

A los profesores de la carrera y demás personas que de una forma u otra han apoyado mi preparación personal y la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las plantas son fuente de metabolitos secundarios con usos potenciales en la agricultura, la alimentación y formulación de medicamentos. Se conoce que los alimentos derivados de *Theobroma cacao* L. (*T. cacao*), son ricos en productos naturales de alto valor agregado entre los que se destacan los compuestos fenólicos. En el Centro de Bioplantitas se desarrollaron un conjunto de experimentos con el objetivo de obtener extractos fenólicos crudos con actividad antifúngica y antioxidante a partir de la selección del mejor solvente y método de extracción en hojas y semillas de *T. cacao*. Para ello se determinó el contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos y metanólicos de hojas y semillas de *T. cacao*, obtenidos de extracciones con y sin soxhlet. Se seleccionó el solvente y método de extracción, de acuerdo a los perfiles metabólicos determinados por cromatografía de capa fina (*TLC*) y se determinó la actividad antifúngica y antioxidante *in vitro* de extractos fenólicos de hojas y semillas seleccionados. Los mayores contenidos de compuestos fenólicos se registraron para los extractos metanólicos de semillas de *T. cacao* y extracción con soxhlet, seguidos por los de hojas. En los extractos de semillas y hojas analizados por *TLC*, se demostró la presencia de altos contenidos de compuestos fenólicos de naturaleza química diferente, sin diferencias entre los metanólicos y etanólicos. Se seleccionó como solvente el etanol comercial y como método de extracción el soxhlet. Se demostró que los extractos evaluados tienen actividad antioxidante y antifúngica, en relación con su composición química. Los extractos de semillas presentaron mayor actividad antioxidante y antifúngica (contra *Stemphylium solani* y *Sarocladium oryzae*) que los de hojas. Los extractos de hojas solo fueron activos frente a *Rhizoctonia solani*.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, soxhlet, fenoles, antifúngica, antioxidante.

ABSTRACT

Plants are a source of secondary metabolites with potential uses in agriculture, food and drug formulation. It is known that foods derived from *Theobroma cacao* L. (*T. cacao*), are rich in natural products with high added value among which include phenolic compounds. The experiments were developed in Bioplant Center, with the aim of obtaining phenolic extracts with antifungal and antioxidant activity from the selection of the best solvent and extraction method for leaves and seeds of *T. cacao*. For this, the content of phenolic compounds in methanolic and ethanolic extracts of leaves and seeds of *T. cacao*, obtained with and without soxhlet extractions were determined. The solvent and extraction method, according to metabolic profiles by thin layer chromatography (TLC) was selected. *In vitro* antifungal and antioxidant activity of selected leaves and seeds phenolic extracts were determined. The higher content of phenolic compounds were recorded for the methanol extracts of *T. cacao* seeds and soxhlet extraction, followed by leaves. In extracts of seeds and leaves analyzed by TLC, the presence of high levels of phenolic compounds of different chemical nature showed no differences between the methanolic and ethanolic extracts. It was selected as the commercial ethanol solvent and the soxhlet extraction method. It showed that evaluated extracts have antioxidant and antifungal activity, in relation to its chemical composition. Seed extracts showed higher antioxidant and antifungal activity (against *Stemphylium solani* and *Sarocladium oryzae*) than leaves. The leaf extracts were only active against *Rhizoctonia solani*.

Keywords: *Theobroma cacao*, soxhlet, phenols, antifungal, antioxidant.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.0. Taxonomía, origen e importancia de la planta <i>T. cacao</i>. | 4 |
| 2.1. Extracción de compuestos fenólicos. | 6 |
| 2.2. Identificación de compuestos fenólicos. | 6 |
| 2.3 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de planatas | 7 |
| 2.4. Enfermedades de importancia agrícola y su control. | 8 |
| 2.4.1 Uso de plaguicidas químicos para el control de enfermedades fungosas de importancia agrícola. | 8 |
| 2.4.2 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de plantas. | 8 |
| 2.4.3. Métodos para determinar actividad antifúngica de metabolitos secundarios de plantas | 9 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| 3.0. Procedimientos generales | 11 |
| 3.1 Aislamiento e identificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i>. | 11 |
| 3.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i> | 12 |
| 3.1.2 Identificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i> | 12 |
| 3.2 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de <i>T. cacao</i>. | 13 |
| 3.3 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de <i>T. cacao</i>. | 14 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 16 |
| 4.1 Aislamiento e identificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i>. | 16 |
| 4.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i> | 16 |
| 4.1.2 Identificación de compuestos fenólicos en extractos de <i>T. cacao</i> | 19 |
| 4.2 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de <i>T. cacao</i>. | 22 |
| 4.3 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de <i>T. cacao</i>. | 23 |
| 5. CONCLUSIONES | 29 |
| 6. RECOMENDACIONES | 30 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos químicos, por lo que se convierten en una fuente importante de diversidad natural. Muchos de los compuestos naturales que se obtienen de plantas, son útiles en la agricultura, la medicina humana, en la preservación de alimentos, y en el control de enfermedades (Lara-Viveros *et al.*, 2014). Estos químicos pueden ser metabolitos primarios o secundarios. Los secundarios no son necesarios para el crecimiento pero tienen funciones importantes en la interacción de las plantas con el medio ambiente que la rodea. Sirven como atrayentes de insectos polinizadores, en la defensa al ataque por patógenos y en la respuesta ante diferentes tipos de estrés (Cheynier *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios usualmente se clasifican por sus rutas biosintéticas en: fenoles, terpenos, glicósidos y alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009). Los compuestos fenólicos en las plantas presentan varias funciones biológicas: actividad antioxidante (Kelebek y Selli, 2014) actividad antifúngica (Céspedes *et al.*, 2014) y anticancerígena (Cai *et al.*, 2004), entre otras. Los fenoles de *Theobroma cacao* L. son ampliamente estudiados a causa de sus propiedades, son portadores de una amplia gama de actividad biológicas como antimicrobianos y antifúngicos (Céspedes *et al.*, 2013), lo cual representa una alternativa viable para el control de plagas y enfermedades causadas por hongos.

A partir de las semillas de cacao se obtiene el tan gustado chocolate, la manteca de cacao y diversas bebidas muy populares en el mercado, lo que revisten producciones importantes en el mundo tropical (Motamayor *et al.*, 2002) De igual forma se conocen las propiedades antisépticas, diuréticas y antiparasitarias de esta planta (Rojas *et al.*, 2015). Sus semillas y hojas se utilizan para tratar diferentes afecciones como heridas, erupciones, quemaduras, fatiga, asma, fracturas, inapetencia, malaria y envenenamiento (Zujko y Witkowska, 2014). Los productos asociados al cacao son ricos en metabolitos secundarios, destacándose dentro de estos los fenoles.

El uso de productos naturales para el control de enfermedades de las plantas es un método alternativo para el control de las mismas debido a sus bajos impactos sobre el ambiente (Lara-Viveros *et al.*, 2014). Los extractos de plantas, además de su bioactividad sobre un amplio número de patógenos de plantas, son productos biodegradables, no tóxicos y están disponibles para su uso en programas de manejo de plagas y enfermedades (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012). Consecuentemente, algunos investigadores enfocan su trabajo hacia la búsqueda de técnicas

alternativas, surgiendo de esta forma los llamados controles biológicos o plaguicidas botánicos. Una característica importante de este control lo constituye su alta capacidad biodegradable, mayor especificidad y menor impacto económico-ambiental.

Determinar las actividades antimicrobianas de los compuestos naturales de plantas es un tema al que hay que prestar gran atención para poder formular y proponer plaguicidas de origen botánico. Siendo necesario el respaldo de estas investigaciones por diferentes ensayos experimentales entre los que se encuentran la microdilución (Chaparro *et al.*, 2010).

En la actualidad existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas para la obtención de compuestos naturales con actividad antimicrobiana, por vías económicas y sin afectar el medio ambiente, para reducir el uso de pesticidas de origen químico. En Cuba existen programas, que tienen entre sus estrategias la obtención de productos naturales con diferentes aplicaciones para contribuir a solucionar este problema sin causar efectos negativos en los recursos naturales (Capote *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la importancia de los compuestos fenólicos aislados del cacao, así como su actividad biológica, se realizó la presente investigación a partir de la comprobación de la siguiente:

Hipótesis: La selección de solventes y métodos para la extracción de compuestos fenólicos de *T. cacao*, permite obtener extractos crudos con potencial actividad antifúngica y antioxidante.

Para la comprobación de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Obtener extractos fenólicos crudos con actividad antifúngica y antioxidante a partir de la selección del mejor solvente y método de extracción en hojas y semillas de *T. cacao*.

Objetivos específicos:

1. Determinar el contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos y metanólicos de hojas y semillas de *T. cacao*, obtenidos de extracciones con y sin soxhlet.
2. Seleccionar el solvente y método de extracción, de acuerdo a los perfiles metabólicos determinados por cromatografía de capa fina (TLC).
3. Determinar la actividad antifúngica y antioxidante *in vitro* de extractos fenólicos de hojas y semillas seleccionados.

Novedad Científica: Se demuestra la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos fenólicos de hojas y semillas de *T. cacao* sobre el crecimiento de tres hongos fitopatógenos, en dependencia con la composición química. Se seleccionó el mejor solvente y método de extracción para la obtención de compuestos fenólicos de hojas y semillas de *T. cacao*.

Valor Práctico: La actividad antifúngica de los extractos fenólicos hojas y semillas de plantas en ambiente natural, crean una base experimental para la futura formulación de nuevos pesticidas en el manejo integrado de plagas agrícolas. Los resultados permiten seleccionar un solvente con menor toxicidad (alcohol comercial) y el método más efectivo para la obtención de extractos fenólicos crudos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.0. Taxonomía, origen e importancia de la planta *T. cacao*.

La clasificación taxonómica actual de *T. cacao* (APG, 2009) es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Tribu: Theobromeae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. es el nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero, planta de hoja perenne de la familia Malvaceae (Argout *et al.*, 2011). El cacao se originó como una especie de árbol del bosque tropical lluvioso, cuyo origen se ubica en la cuenca amazónica superior (Ford y Wilkinson, 2012). En esta región existe una gran diversidad genética, evidenciada por técnicas enzimáticas y de biología molecular (Motamayor *et al.*, 2002).

La hipótesis más aceptada sobre la domesticación del cacao sugiere que comenzó en Mesoamérica y su distribución va desde el Amazonas hasta el sudeste de México. Esta opinión se justifica en los datos históricos e iconográficos del cultivo del cacao durante tiempos prehispánicos en Mesoamérica, empleado por la cultura maya en el desarrollo de sus actividades políticas, económicas y sociales (Motamayor *et al.*, 2013).

En el período 2013-2014, se produjo en el mundo 4 370 000 t de semilla seca. Los países con mayor producción están en África (Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún), América

(Ecuador y Brasil), Asia y Oceanía (Indonesia y Papúa Nueva Guinea), con 3 198 000 t, 722 000 t y 450 000 t, respectivamente.

La fecha de introducción en Cuba no se conoce con exactitud. Algunas hipótesis plantean que fue introducido por Cabaiguán, actual provincia de Santi Spíritus, en 1540 desde México, durante la etapa de la colonización española (Márquez y Aguirre, 2003), otras sustentan el criterio de que fueron los franceses quienes establecieron las primeras plantaciones en la zona de Ti Arriba, en la antigua provincia de Oriente (Castilla, 1981).

A partir del año 1771 el cacao en nuestro país toma un auge, con la entrada de los franceses que procedían de Haití y se asentaron en la región oriental del país, creando grandes áreas de cultivo en las provincias de Guantánamo (75%) y dentro de ella en el municipio de Baracoa, Santiago de Cuba (14%), Granma (8%) y Holguín (3%), con un área total de 8 383 hectáreas (Marquéz y Aguirre, 2010). Hasta el 2013, Cuba tenía 4 303,00 ha de área cultivada de *T. cacao*, un rendimiento de 0,33 t·ha⁻¹ y una producción de 1425,00 t, lo que representa un 0,03% de la producción mundial, (FAOSTAT, 2013).

Entre las causas de los bajos rendimientos en Cuba se encuentran la carencia de material de propagación y clones altamente productivos, el manejo inadecuado de la plantación y las afecciones por plagas y enfermedades (Menéndez *et al.*, 2002). Las áreas de cultivo se concentran principalmente en la región oriental del país, que ocupan los macizos montañosos Nipe-Sagua-Baracoa y Sierra Maestra. Dentro de éstos, la mayor zona productora se encuentra en la provincia Guantánamo, que representa un 76 % del área y un 91 % de la producción nacional, Santiago de Cuba, Granma y Holguín (Suárez *et al.*, 2015).

Variedades comerciales

Los árboles de cacao tienden a agruparse por tradición en tres grupos principales llamados: Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales se desarrollan muchos híbridos. Basados en las características morfológicas y agronómicas de las plantaciones de *T. cacao*, varios investigadores (Motamayor *et al.*, 2013), coincidieron en plantear la existencia de estos tres grupos de cacao. Las investigaciones más recientes (utilizando el mapa genético) indican que hay por lo menos 10 familias principales de cacao. El criollo es conocido por tener una alta calidad, debido a sus propiedades organolépticas, que influyen en el aroma del chocolate que de él se obtiene. Este tipo de cacao es de escaso rendimiento, bajo contenido en taninos y poca resistencia a plagas y

enfermedades. El forastero contiene un mayor nivel de taninos, es más resistente y poco aromático, mientras que el trinitario es un híbrido que heredó la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo.

Theobroma cacao es una planta de gran importancia económica en más de 50 países del mundo, sus productos se utilizan en la industria para la obtención de chocolate, confituras, colorantes, saborizantes y cosméticos (Allegre *et al.*, 2012). La calidad del cacao depende en gran medida de sus propiedades organolépticas, que están muy relacionadas con la composición química, en especial con su contenido de aceites, proteínas, almidón y metabolitos secundarios como: fenoles y terpenos (Argout *et al.*, 2011).

2.1. Extracción de compuestos fenólicos.

Para aislar compuestos fenólicos de plantas se pueden utilizar diferentes métodos. La extracción con solventes orgánicos e inorgánicos es la más usada, los alcoholes (metanol, etanol y propanol), acetona, acetato de etilo, agua y sus mezclas son los más frecuentes. La extracción se puede realizar asistida por soxhlet, agitación, ultrasonido, entre otros (Khoddami *et al.*, 2013), siendo el soxhlet uno de los más utilizados en los últimos años por su eficiencia. Para obtener estos compuestos a partir de material vegetal de *T. cacao* se han utilizado varias combinaciones: 1) Con acetona: agua 60% (60:40 v/v), en agitación (Onomo *et al.*, 2015); 2) Con agua:2-propanol 60% (60:40, v/v), en baño ultrasónico (Rojas *et al.*, 2015); 3) Con un reflujo de agua hirviendo, en soxhlet (Luna *et al.*, 2002) y 4) Con un reflujo de metanol, en soxhlet (Edwards *et al.*, 2005).

2.2. Identificación de compuestos fenólicos.

Existen varios métodos analíticos para cuantificar e identificar compuestos fenólicos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), o su combinación con espectrometría de masas (MS) son los dos métodos más usados comúnmente.

Otras técnicas relevantes son ensayos de espectrofotometría, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) (Ristivojević *et al.*, 2014). La HPLC es un método sencillo, debido a que no es necesario derivatizar las muestras. Sin embargo, en comparación con el detector de espectrometría de masas, el detector UV-Vis no suministra suficiente exactitud en la identificación. Por lo tanto, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) puede proporcionar resultados más precisos aunque ambos métodos se utilizan en el análisis de extractos de plantas. El análisis por GC-MS de los

compuestos fenólicos no volátiles y termolábiles presupone su conversión en volátiles y termotolerantes por derivatización química (Proestos y Komaitis, 2013). La técnica de *TLC* también es muy utilizada y complementa las de HPLC y GC. Además, es de bajo costo, rápida y muy útil para identificar el material vegetal y determinar su calidad a través del perfil cromatográfico. La mayor ventaja radica en la posibilidad de analizar varias muestras en la misma placa y compararlas con los compuestos estándar, en un período de tiempo corto y con poco gasto de solventes. También se garantiza precisión en el análisis, al estar todas las muestras bajo condiciones idénticas. Para esta técnica es muy importante seleccionar correctamente el sistema de solventes para la separación de los compuestos del extracto, los agentes de revelado y la luz (blanca o UV (254 ó 366 nm)) a la que debe observarse el resultado (Milojković-Opsenica *et al.*, 2013).

2.3 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de plantas

T. cacao es una planta a la que se le atribuyen propiedades antioxidantes, que se relacionan con sus funciones cardioprotectivas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Andújar *et al.*, 2012). Dicha actividad está dada principalmente por la presencia de compuestos fenólicos, que pueden actuar como moléculas antioxidantes, jugando así un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres (Alviano *et al.*, 2008), la reducción de la incidencia de cáncer (Pieme *et al.*, 2010), la diabetes (Kusirisin *et al.*, 2009) y la razón de mutagénesis en células humanas (Sawadogo *et al.*, 2012). Lee *et al.*, (2003) demostraron que *T. cacao* tiene un contenido de flavonoides y actividad antioxidante superior al vino tinto (2 veces), té verde (2-3 veces), y té negro (4-5 veces). Crozier *et al.*, (2011) compararon los fenoles y la actividad antioxidante de polvos y jugos de las frutas *Euterpe oleracea*, *Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium macrocarpon* Ait, *Punica granatum*, con el polvo, bebida natural y chocolate negro obtenidos de *T. cacao*. El polvo de cacao y el chocolate negro mostraron mayor actividad antioxidante que el resto de los jugos y polvos evaluados, por lo que el cacao se considera una “super fruta.” La actividad antioxidante de *T. cacao* se ha estudiado ampliamente en las últimas décadas. No obstante, estos estudios se realizan fundamentalmente en semillas o productos obtenidos de ellas, como el polvo de chocolate u otros similares.

Para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos naturales se utilizan métodos cualitativos y cuantitativos como: método del fosfomolibdeno; método del tiocianato; ensayo de

reducción del radical libre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrilhidrazilo); ensayo de capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), de reducción del radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico); ensayo de inhibición de la lipoproteína humana de baja densidad (LDL + VLDL), entre otros (Meot-Duros *et al.*,2008).

2.4. Enfermedades de importancia agrícola y su control.

2.4.1 Uso de plaguicidas químicos para el control de enfermedades fungosas de importancia agrícola.

Más de 800 millones de personas en países en vías de desarrollo no presentan un adecuado suplemento nutricional y al menos el 10% de los alimentos se pierde debido a enfermedades de las plantas. El uso de fungicidas químicos es un método convencional para el control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos. Sin embargo, varios agentes antifúngicos (agroquímicos) son tóxicos, presentan efectos no deseables sobre otros organismos y el ambiente (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012). El desarrollo de la resistencia de organismos patógenos hacia diferentes agroquímicos, provoca actualmente grandes pérdidas en cultivos agrícolas de interés y por tanto aumento en los costos de producción, además de problemas de desequilibrio ambiental, contaminación de aguas y suelos y afectaciones a la salud humana (Shukla y Dwivedi, 2013). Por lo que existe la necesidad de disponer de alimentos más saludables sin dejar de proteger los cultivos de las enfermedades (Lara-Viveros *et al.*, 2014).

Una solución a este problema puede ser el uso de derivados botánicos, pues contienen metabolitos secundarios activos frente a una amplia gama de enfermedades, además son económicos, biodegradable y pesar de que pueden tener algún grado de toxicidad, no tienen un efecto residual prolongado.

2.4.2 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de plantas.

En el mundo existen grandes pérdidas en los rendimientos de los cultivos agrícolas a causa de enfermedades fungosas. Los extractos fenólicos de plantas se han evaluado como potentes antifúngicos, son menos persistentes en el medio ambiente, más seguros para mamíferos y otros organismos y se les reconoce un efecto poco o no tóxico para los humanos (Ademe *et al.*, 2013). Actualmente se realizan diversas investigaciones relacionadas con la búsqueda de actividades de extractos vegetales para el control de hongos patógenos de plantas.

Guerrero-Rodríguez *et al.*, (2007) demostraron que un extracto etanólico de hojas frescas de *Flourensia cernua* inhibió el crecimiento de micelio y afectó la producción de conidios de *C. gloesporioides* y *Penicillium digitatum*. Céspedes *et al.*, (2014) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de plantas de especies de *Calceolaria integrifolia* sensu lato. La actividad encontrada contra *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solani* y *Trichophyton mentagrophytes*, se relacionó con la composición química de los extractos, siendo los compuestos mayoritarios los flavonoides y ácidos fenólicos.

Se conoce la actividad antifúngica *in vitro* de compuestos fenólicos como ácido salicílico, fenol y ácido benzoico contra *Fusarium udum* y *Fusarium oxysporum*, la cual es mayor para el ácido benzoico (Shukla y Dwivedi, 2013). Las antraquinonas de raíces *ex vitro* e *in vitro* de *Morinda royoc* mostraron actividad antifúngica contra *F. oxysporum* (Borroto *et al.*, 2010).

La fenilamida N-cinamoil triptamina (CinTrp) y el flavonoide sakuranetina son fitoalexinas de naturaleza fenólica sintetizadas en plantas de *Oryza sativa* en respuesta a estrés (Park *et al.*, 2014). Ambas tienen actividad antifúngica, sakuranetina inhibe el crecimiento micelial *Rhizoctonia solani* y CinTrp inhibe el crecimiento micelial de *B. oryzae* (Cho y Lee, 2015). Extractos crudos de semillas fermentadas de *T. cacao* mostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias *Salmonella choleraesuis* y *Pseudomonas aeruginosa*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Moniliophthora perniciosa*. Los compuestos mayoritarios asociados a dichas actividades fueron fenoles y alcaloides (Santos *et al.*, 2014). En extractos etanólicos de semillas sin fermentar y desgrasadas, se encontró actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, lo que asocian con daños causados por los fenoles presentes en el extracto, al ADN de la bacteria (Ariza *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce de investigaciones relacionadas con la actividad antifúngica de extractos fenólicos de *T. cacao* contra *Sarocladium oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Stemphylium solani*.

2.4.3. Métodos para determinar actividad antifúngica de metabolitos secundarios de plantas

Para determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos ricos en metabolitos secundarios, se utilizan diferentes métodos como: bioluminiscencia de ATP (Finger *et al.*, 2012), prueba de letalidad (Pfaller *et al.*, 2004), citofluorometría de flujo (Paparella *et al.*, 2008), TLC-

bioautografía (Dewanjee *et al.*, 2015), difusión en agar (Meera y Balabaskar, 2012) y dilución (Gatto *et al.*, 2013).

El método de microdilución es más recomendable a causa de sus ventajas. Se realiza en placas de 96 pocillos, lo que permite evaluar distintas muestras a diferentes concentraciones (Scorzoni *et al.*, 2007). Además, cada extracto o compuesto se mezcla con un medio líquido apropiado que se inocular previamente con el microorganismo. La actividad se puede evaluar por la turbidez que ocasiona el microorganismo, ya sea visual o por absorbancia en espectrofotómetro (Balouiri *et al.*, 2016). Las diluciones se pueden usar para evaluar posteriormente si el extracto es fungicida o fungistático, es un método más reproducible y por tanto más recomendable para evaluar la actividad de productos naturales (Scorzoni *et al.*, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0. Procedimientos generales

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica del Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey, Cuba.

Material vegetal

El material vegetal se colectó en el banco de germoplasma de la Estación Experimental de Cacao de Baracoa, Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Baracoa, Cuba. Se seleccionaron hojas y semillas de frutos inmaduros del clon UF677 (Trinitarios) de *T. cacao* (Márquez y Aguirre, 2010). Las plantas tenían una edad de 4 años con buen estado fitosanitario.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) (versión 20 para Windows, SPSS Inc.) (IBM SPSS, 2011). Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA de un factor y bifactorial). Se aplicaron pruebas de Tukey HSD en los casos en los cuales los ANOVA presentaron diferencias significativas. Previamente se demostró que los datos de cada tratamiento cumplían los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, según las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente para $p \leq 0,05$. Los detalles del tratamiento estadístico aparecen en cada figura o tabla de resultados y discusión.

3.1 Aislamiento e identificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

Aislamiento de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

Se realizó el aislamiento y cuantificación de compuestos fenólicos a partir de hojas y semillas del clon UF677 de *T. cacao*. Para ello, cada material vegetal se secó previamente en estufa a 65 °C, por 72 h (hasta masa seca constante) y se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Las muestras se desengrasaron con éter de petróleo 40-80 ° (Merk) durante 2 h, agitando en intervalos de 15 min. Una vez que se extrajo la fase orgánica, el material vegetal desengrasado se secó en campana de extracción de gases. Posteriormente se realizó la extracción (por triplicado) con metanol 100% (Merck) y alcohol comercial (etanol: agua 90%, v:v; 90:10).

Se utilizaron además dos métodos de extracción (con y sin soxhlet). Las extracciones en soxhlet se realizaron a 65 °C por 3 h (6 lavados) (Ahmad *et al.*, 2010). Para ello se utilizaron 10 g de cada material vegetal seco, desengrasado y macerado, con 30 volúmenes de cada solvente. Las extracciones sin soxhlet se realizaron por 72 h y utilizando 10 g de material vegetal y 10 volúmenes de cada solvente (Friend, 1992). Los extractos filtrados se concentraron hasta 10 mL, en sistema de rotoevaporación a vacío (Heidolph 94200, Bioblock Scientific), con baño de María a 60 °C. Posteriormente se llevaron a sequedad, alícuotas de 1 mL, en sistema de vacío (Speed Vac SC100, Savant). Las muestras sin concentrar se utilizaron para cuantificar los compuestos fenólicos, las concentradas hasta 10 mL para separar los compuestos por Cromatografía de capa fina (*TLC*) y las secas para determinar la actividad antifúngica.

3.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

Cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación de fenoles se realizó en espectrofotómetro (T70, UV/VIS *spectrometer*, PG *Instruments* Ltd., China) según el procedimiento de Friend, (1992). A 100 µL del extracto vegetal, se le adicionaron 900 µL de agua destilada y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar durante 5 min, luego se agregaron 600 µL de una solución de 1 mol·L⁻¹ NaOH saturada con Na₂CO₃ y se incubó por 1 h a 25°C para permitir el desarrollo del color. Se midieron las absorbancias en espectrofotómetro a 725 nm. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg de fenoles por g de masa seca (mg·g⁻¹ ms), referidos a una curva patrón de ácido clorogénico.

3.1.2 Identificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

Con el objetivo de identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de *T. cacao*, se realizó el análisis de las muestras por *TLC*. Las muestras se filtraron (0,45 µm) para eliminar las impurezas. La concentración de los compuestos fenólicos en las muestras se expresó en ng·µL⁻¹, referidos a una curva patrón de ácido clorogénico.

Cromatografía en capa fina.

La *TLC* de los extractos fenólicos se realizó de acuerdo a los métodos descritos por (Wagner y Bladt, 1996), y (Srivastava, 2011). Se realizaron tres réplicas por muestra. Se utilizaron placas de sílica gel 60 Å de 20 x 10 cm (*HPTLC-Fertigplatten UV_{254nm} Nano- Adamant* 0,2 mm de *Macherey-Nagel*). Se preparó una mezcla de compuestos estándares (ácido clorogénico, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p-coumárico, quercetina, catequina y naringenina) disueltos en metanol a $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de cada estándar.

En la cromatoplaque se aplicó la mezcla de estándares (8,0 μg de cada uno) para comparar con los compuestos presentes en los extractos crudos de fenoles. Se aplicaron 10 μL de cada extracto fenólico concentrado. Se emplearon dos sistemas de solventes (I y II) para evaluar presencia de ácidos fenólicos, cumarinas y flavonoides:

I. Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:12)

II. Tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (50:70:12)

Las placas se revelaron con dos sistemas de solventes:

1. Reactivo de PN/PEG, que consiste en: 2-aminoetil difenilborinato (PN) (1%) en metanol (v:v) y polietilenglicol 400 (PEG) (5%) en etanol (v:v) y se observaron a luz UV_{366 nm}.
2. Reactivo Anisaldehído/Ácido sulfúrico, que conciste en: anisaldehído/ácido sulfúrico (0.5ml), ácido acético glacial (10ml), metanol (85ml), ácido sulfúrico (5ml).

El factor de retención (*R_f*) se calculó como el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto desde el origen y la distancia recorrida por el frente del disolvente.

3.2 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de *T. cacao*.

Para determinar la actividad antioxidante, los extractos se separaron por *TLC*. Las placas desarrolladas se revelaron con 2,2-Diphenyl-1-picrilhidrazilo (DPPH) 0,2% en etanol (m:v) y se observaron en presencia de luz blanca. La ausencia de color indica actividad de reducción del radical DPPH (Srivastava *et al.*, 2011). La actividad antioxidante cuantitativa de los extractos fenólicos de *T. cacao* se midió en términos de donación de hidrógeno o habilidad de reducir el radical, usando el DPPH estable como reactivo de acuerdo al método descrito por Kirby y Schmidt, (1997). Los extractos fenólicos secos se diluyeron en etanol a diferentes concentraciones (0,5-500,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y se les adicionó la solución de DPPH (0,2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ en

etanol) como fuente de radical libre. La absorbancia se midió a 517 nm después de 60 min de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad. El blanco se preparó de igual forma pero sustituyendo la muestra por etanol. La quercetina (0,5-500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se usó como control positivo. La actividad de reducción se midió por el monitoreo del decrecimiento de absorbancia a 517 nm. En esta forma, el radical DPPH tiene una absorción que va desapareciendo en la medida en que se reduce. La actividad de reducción del radical DPPH (Reducción DPPH, %), se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Reducción DPPH (\%)} = \frac{[A_0 - A_1]}{A_0} \cdot 100$$

Donde A_0 es la absorbancia del blanco y A_1 es la absorbancia de los extractos fenólicos de *T. cacao*. La concentración efectiva de los extractos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que provocan el 50% de inhibición del DPPH (CE50) se calculó graficando la actividad de reducción contra la concentración de los fenoles. El ensayo se realizó a partir de tres extracciones por muestra y el análisis se replicó tres veces.

3.3 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de *T. cacao*.

El objetivo de estos experimentos fue determinar la actividad antifúngica de los extractos de hojas y semillas de *T. cacao*. Se dispuso de aislados puros monospóricos, crecidos en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y procedentes del cepario del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey, Cuba.

Las suspensiones de hongos se obtuvieron, lavando con agua destilada estéril, los cultivos frescos de los diferentes hongos con presencia de suficiente micelio y conidios. Se determinó la concentración de los mismos por conteo en cámara de *Neubauer* (Cerón *et al.*, 2006). Los patógenos utilizados fueron los hongos: *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw. (*S. oryzae*) (5×10^4 esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$), *Rhizoctonia solani* (5×10^5 propágulos $\cdot\text{mL}^{-1}$), *Stemphyllium solani* Webber (6×10^5 propágulos $\cdot\text{mL}^{-1}$).

Método de microdilución:

Se utilizó el método de microdilución en placa, descritos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Rex *et al.*, 2008). Los extractos crudos secos se disolvieron en 30 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se adicionó medio de cultivo líquido hasta la concentración deseada (200 μg de extracto $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de DMSO 3%). Para la realización del ensayo de microdilución se

utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos. En cada uno de los pocillos se colocaron inicialmente 100 μL del medio de cultivo de cada microorganismo. Posteriormente en el primer pocillo se añadieron 100 μL de extracto y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas para evaluar concentraciones de 50 a 1, $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de cada extracto. Por último se agregó 100 μL de la suspensión de cada microorganismo que se obtuvo preparando una dilución de cada patógeno en agua destilada estéril y se midió a $\text{DO}_{595\text{nm}}=0,1$. Las placas se incubaron a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. La cuantificación del crecimiento del microorganismo se determinó por análisis de espectrofotometría mediante la lectura, a $\text{DO}_{595\text{nm}}$, en un lector de placas de ELISA (Broekaert *et al.*, 1990). Las lecturas se realizaron cada 24 h y hasta que el hongo alcanzó la fase de meseta en su crecimiento.

En todos los ensayos se colocaron los siguientes controles: 1) control de esterilidad de medio (200 μL de medio de cultivo), 2) control de crecimiento de cada cepa (100 μL de medio de cultivo y 100 μL de la cepa), 3) control de solvente (DMSO) (100 μL de medio de cultivo y 100 μL DMSO 3%). y 4) control de color del extracto (100 μL de medio de cultivo y 100 μL de cada extracto en todas las concentraciones). Cada muestra se replicó cuatro veces.

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC, %) según lo informado por (Terras *et al.*, 1992), mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{PIC} = ((\text{DO}_{595\text{nm}} \text{ Control} - \text{DO}_{595\text{nm}} \text{ Tratamiento}) / \text{DO}_{595\text{nm}} \text{ Control}) \cdot 100$$

En la fórmula la DO control corresponde al valor obtenido al restar la densidad óptica del control de solvente menos la del control de esterilidad de medio. La DO tratamiento corresponde al valor de la resta de la densidad óptica de cada tratamiento menos la del control de color del extracto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

4.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*

En la figura 1 se observan los valores de la concentración de fenoles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms) en extractos metanólicos y etanólicos de hojas de *T. cacao* empleando dos técnicas, con y sin soxhlet.

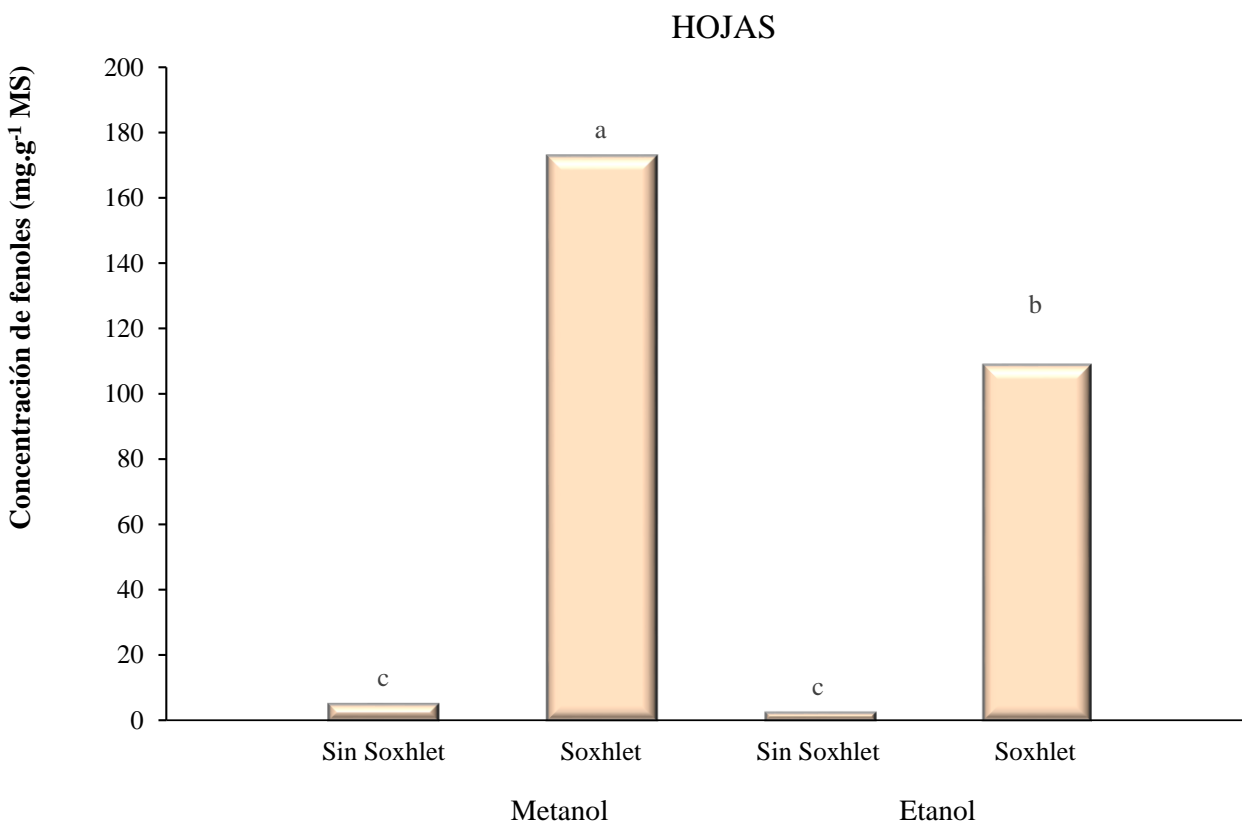


Figura 1. Concentración de fenoles ($\text{mg}\cdot\text{g}$ MS) de extractos de hojas de *T. cacao* obtenidos con dos solventes (metanol y etanol 90%) y con extracciones con y sin soxhlet. Medias con letras distintas difieren significativamente (*ANOVA* bifactorial y *Tukey* para $p \leq 0,05$).

Al analizar los resultados de la concentración de fenoles se obtuvo que los mayores valores corresponden a aquellos donde se utilizó el soxhlet como método de extracción, con $172,87 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms en extractos metanólicos y $108,85 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms en los etanólicos, en ambos casos muy

superiores a los extraídos sin soxhlet. El metanol fue el solvente más eficiente, con diferencias significativas con respecto al etanol comercial (90%).

En la figura 2 se observan los valores de la concentración de fenoles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms) en extractos metanólicos y etanólicos de semillas de *T. cacao* empleando dos técnicas, con y sin soxhlet.

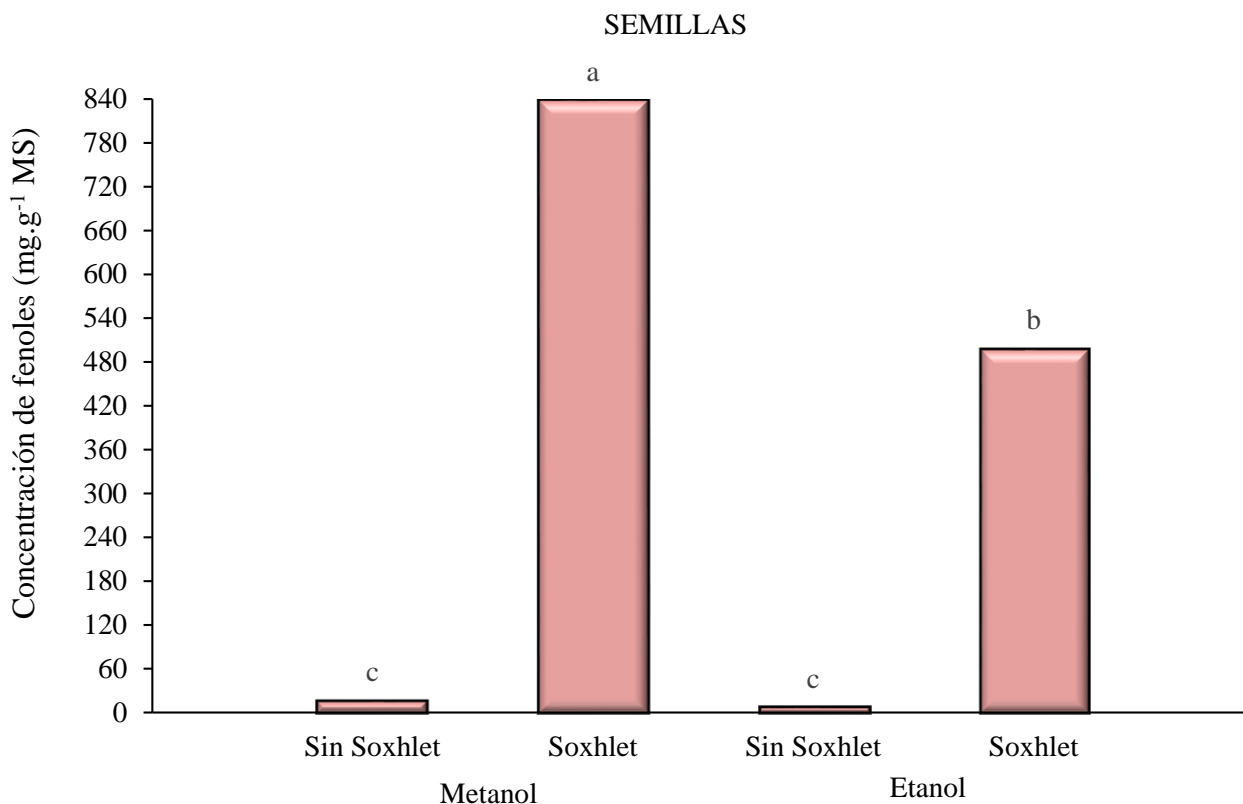


Figura 2. Concentración de fenoles ($\text{mg}\cdot\text{g}$ MS) de extractos de semillas de *T. cacao* obtenidos con dos solventes (metanol y etanol 90%) y con extracciones con y sin soxhlet. Medias con letras distintas difieren significativamente (*ANOVA* bifactorial y *Tukey* para $p \leq 0,05$).

Al igual que para los extractos de hojas, en los de semillas los de mayores valores se registraron para los extractos donde se empleó como solvente el metanol y como técnica de extracción el soxhlet ($839,35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms). Esta técnica también favoreció la extracción con etanol comercial ($499.88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ms), siendo las concentraciones muy superiores a las obtenidas sin el uso de soxhlet. Estos resultados coinciden con lo planteado por (Khoddami *et al.*, 2013), que explican

que los fenoles pueden ser extraídos con diferentes solventes y métodos, dentro de los cuales los alcoholes son muy eficientes y el soxhlet un método con el que se alcanzan buenos rendimientos. En ambos órganos se observó que el soxhlet aumenta en gran medida la eficiencia de la extracción con el uso de metanol con respecto al método convencional, lo cual también se logra con el etanol comercial. Estos resultados tienen gran importancia considerando que el etanol comercial es un solvente no tóxico y de bajo costo con respecto al metanol. Por lo que si la composición química de los extractos es similar con ambos solventes, se podría validar el etanol comercial para su uso en la extracción por soxhlet.

Por otra parte, el tipo de órgano (hojas y semillas) también influyó en el comportamiento que tuvo la concentración de fenoles. Esto puede estar dado por la especialización que tiene cada uno de estos órganos para cumplir su función fisiológica en la planta y la relación de los fenoles con ella. (Carvalho *et al.*, 2013) apoyan esta afirmación al encontrar diferencias en los pigmentos fenólicos presentes en hojas, flores, semillas y frutos de seis especies de *Theobroma*, las cuales plantean que dependen del órgano y la especie.

Andújar *et al.*, (2012) refieren que en extractos de semillas secas, sin fermentar y desgrasadas, los fenoles pueden variar desde 150-200 mg·g⁻¹ ms, mientras que (Ackar *et al.*, 2013) informan valores entre 120 y 180 mg·g⁻¹ ms. Sin embargo, en otros estudios se informa un rango más amplio.

Como se ha mencionado anteriormente, la cuantificación de fenoles por espectrofotometría demostró un mayor contenido de fenoles en aquellos extractos donde se empleó el soxhlet y el metanol. No obstante, estos resultados no son suficientes para conocer la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos y seleccionar el método y el solvente, debido a que en solventes alcohólicos, se extraen además otras clases de metabolitos. Se ha demostrado que en alcoholes como metanol, etanol y n-butanol se logran extraer terpenos en exudados foliares de *Nicotiana tabacum* L. (Capdesuñer *et al.*, 2015). Por lo que es necesario realizar además la identificación de los compuestos para corroborar que los componentes mayoritarios en los extractos son del grupo de los fenoles.

4.1.2 Identificación de compuestos fenólicos en extractos de *T. cacao*.

En la figura 3 se muestra la separación de compuestos, en placas de *TLC*, de extractos metanólicos y etanólicos de hojas y semillas de *T. cacao* empleando los métodos con y sin soxhlet, usando como sistema de solventes: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: H₂O (100:11:11:12) y revelado con Anisaldehido/H₂SO₄.

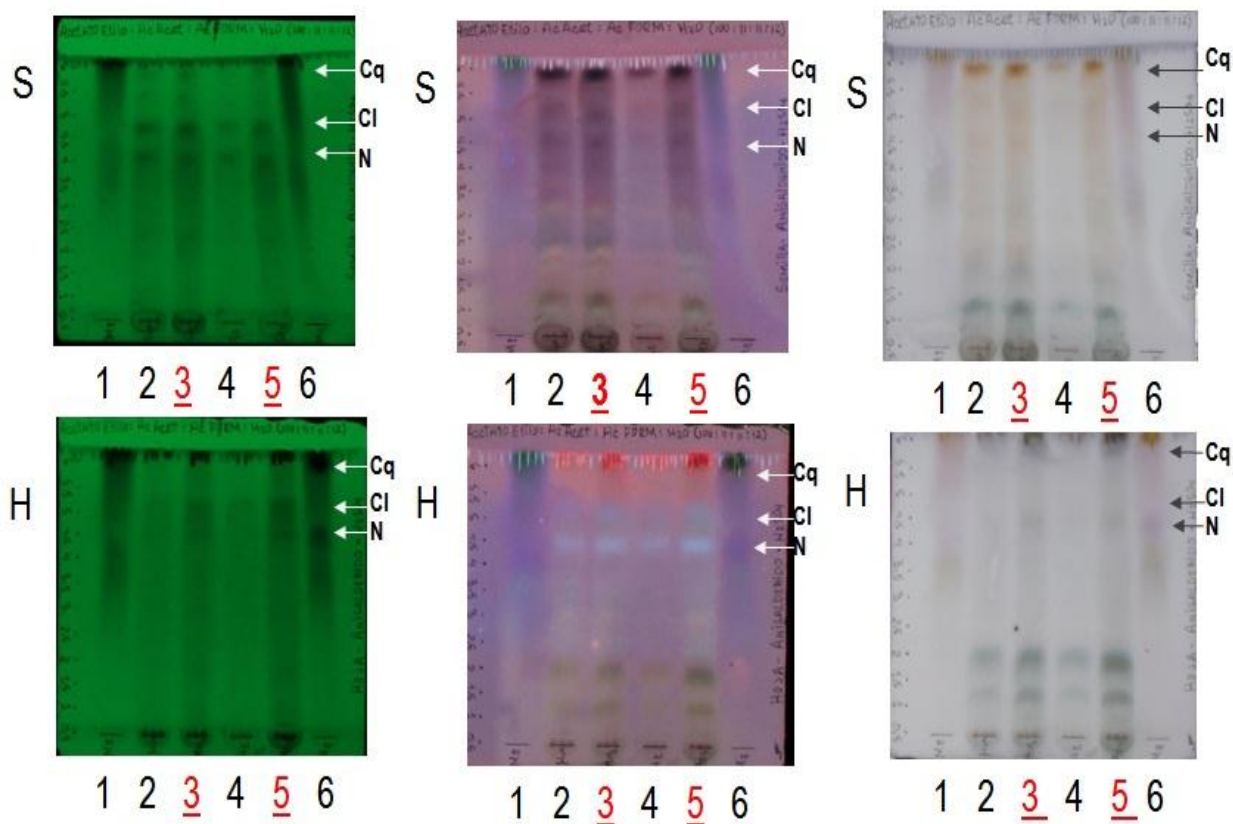


Figura 3. Separación, en placa de *TLC* analítica de 7 x 7 cm, de extractos fenólicos de semillas (S) y hojas (H) de *T. cacao*. (1 y 6) Mezcla de estándares de naringenina (N), quercetina (Q), catequina (Cq) y ácidos cafeico (Cf), clorogénico (Cl), rosmarínico (R), gálico (G) y p-cumárico (C) (2,0 µg). Extractos: metanólico sin soxhlet (2), metanólico con soxhlet (3), etanólico sin soxhlet (4) y etanólico con soxhlet (5). Sistema de solventes: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: H₂O (100:11:11:12). Revelado con Anisaldehido/H₂SO₄. Imágenes de placas de *TLC*: UV254 nm (sin revelar), UV366 nm (revelada) y blanca (revelada).

En extractos fenólicos tanto de semillas como de hojas se pueden observar bandas a diferentes R_f y con variedad de colores: grises y rojas que se asocian a componentes de aceites esenciales; azules asociadas a ácidos fenólicos o cumarinas; rojo-café asociadas a flavonoides y verdes-amarillos asociadas a glicósidos de flavonoides y catequina. De igual manera se puede observar que la mayor intensidad de las bandas se presenta en los extractos donde se usó el soxhlet con ambos solventes (metanol y etanol 90%), sin diferencias en la composición química entre ambos. En semillas se encontró mayor variedad de compuestos mientras que en hojas hay menor variedad y mayor presencia de compuestos azules (ácidos fenólicos y/o cumarinas). Sin embargo, compuestos más polares que estén presentes en los extractos, como la quercetina y los ácidos cafeico, clorogénico, rosmarínico, gálico y p-cumáricos, utilizados como estándares en las *TLC*, migran con el frente de corrida para este sistema de solventes.

Con el fin de analizar otros compuestos que son más polares se empleó otro sistema de solvente menos polar.

En la figura 4 se muestra la separación, en placas de *TLC*, de compuestos metanólicos y etanólicos de hojas y semillas de *T. cacao* empleando los métodos con y sin soxhlet, usando como sistema de solventes: tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (50:70:12) y revelado con Anisaldehído/ H_2SO_4 .

Se pueden observar bandas que no se corresponden con los R_f de los estándares utilizados, que tienen color gris y se asocian a la presencia de componentes de aceites esenciales. En luz blanca se observa, en semillas, la presencia de bandas de color naranja con similar R_f al del estándar catequina utilizado, que puede estar asociadas a la presencia de la misma. Mientras que a ultravioleta 366 nm se detectó presencia de ácido cafeico en semillas y quercetina en hojas. De igual forma se confirma que la mayor intensidad de bandas corresponde a aquellos extractos donde se empleó el soxhlet como método de extracción para ambos tipos de solventes (metanol y etanol 90%).

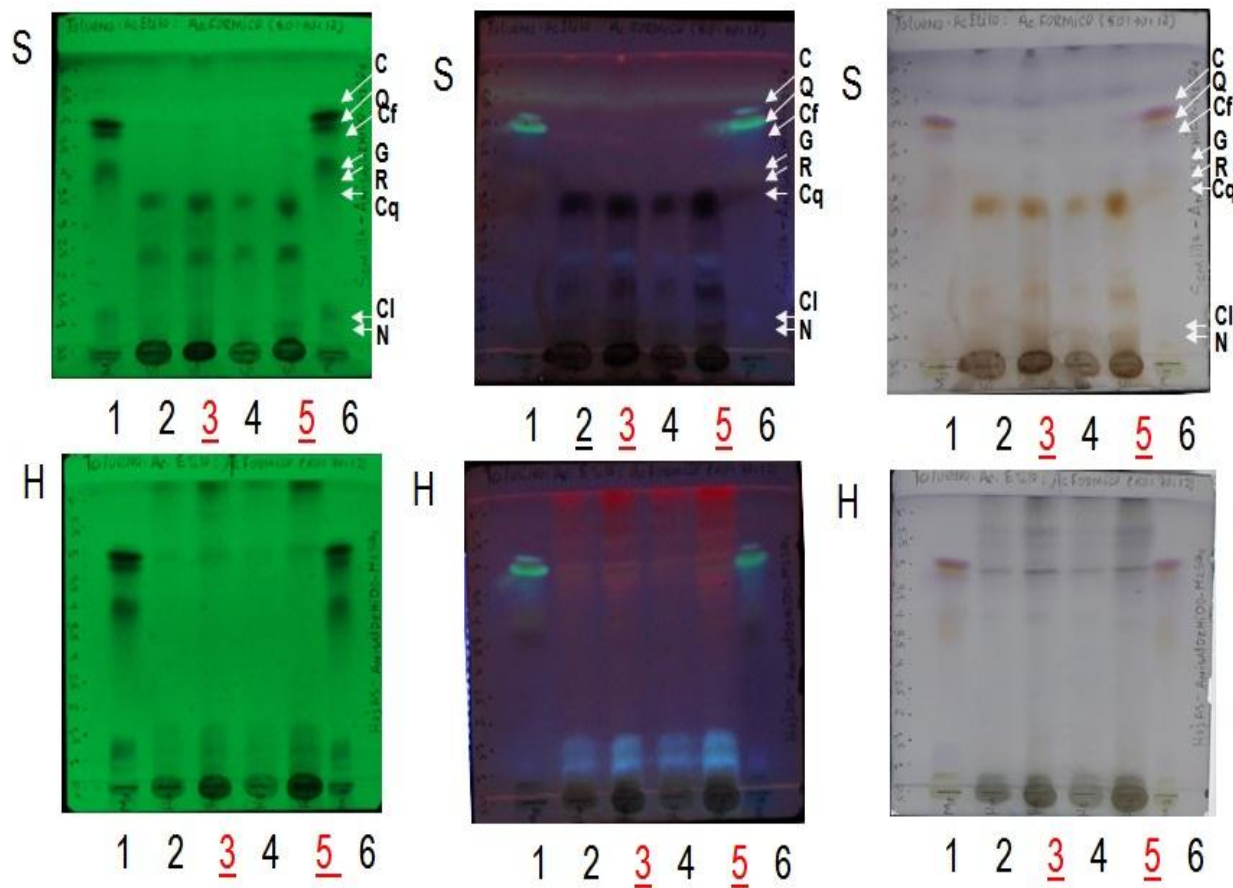


Figura 4. Separación, en placa de *TLC* analítica de 7 x 7 cm, de extractos fenólicos de semillas (S) y hojas (H) de *T. cacao*. (1 y 6) Mezcla de estándares de naringenina (N), quercetina (Q), catequina (Cq) y ácidos cafeico (Cf), clorogénico (Cl), rosmarínico (R), gálico (G) y p-cumárico (C) (2,0 μ g). Extractos: metanólico sin soxhlet (2), metanólico con soxhlet (3), etanólico sin soxhlet (4) y etanólico con soxhlet (5). Sistema de solventes: tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (50:70:12). Revelado con Anisaldehido/H₂SO₄. Imágenes de placas de *TLC*: UV254 nm (sin revelar), UV366 nm (revelada) y blanca (revelada).

Investigaciones informadas por (Wagner y Bladt, 1996) y (Ristivojevic *et al.*, 2014) coinciden con los resultados que aquí se muestran. Con similar sistema de solventes y tinción, se obtuvieron

igualmente bandas que caracterizan la presencia de compuestos fenólicos y componentes de aceites en plantas medicinales y de fenoles en propoleo, respectivamente. Además, (Lattanzio *et al.*, 2009) plantea que en semillas es común obtener altos contenidos de compuestos fenólicos como reserva para la germinación.

En ambos órganos se corroboró que el soxhlet aumenta la eficiencia de la extracción para ambos solventes (metanol y etanol 90%), sin diferencias en la composición química entre ellos. Es por ello que se selecciona el etanol 90% para los experimentos siguientes.

4.2 Actividad antioxidante de compuestos fenólicos de *T. cacao*.

En la figura 5 se muestra la actividad antioxidante de los extractos fenólicos de hojas y semillas de *T. cacao*. Concentración efectiva de extracto que reduce el 50% de DPPH (CE_{50}).

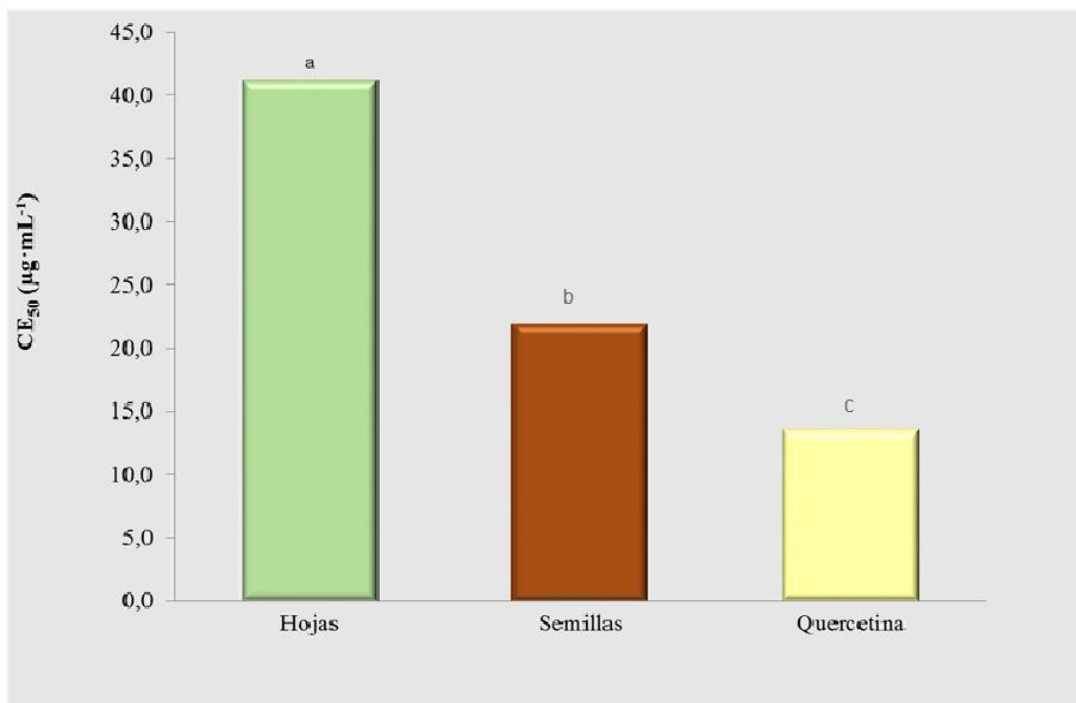


Figura 5. Actividad antioxidante de los extractos fenólicos de hojas y semillas del clon UF677 de *T. cacao*. Concentración efectiva de extracto que reduce el 50% de DPPH (CE_{50}). Medias con letras distintas difieren significativamente (*ANOVA simple* y *Tukey para $p \leq 0,05$*).

Al cuantificar la actividad de reducción del DPPH de los extractos fenólicos crudos obtenidos de hojas y semillas, se encontró mayor actividad para los extractos de semillas en comparación con los de hojas, con una actividad cercana a la de la quercetina (flavonoide con reconocida actividad antioxidante). Lo que puede estar dado porque en las semillas hay presencia de ácido cafeico y catequina, compuestos fenólicos reconocidos por su actividad antioxidante. Mientras que en hojas la actividad debe estar relacionada con la presencia de otros compuestos como la quercetina al que también se atribuye dicha actividad.

Los resultados confirman lo planteado por (Cozier *et al.*, 2011) que plantea que cacao es una superfruta, por tener en las bebidas y chocolate obtenidos de sus semillas, mayor actividad antioxidante que otros frutos de reconocida actividad antioxidante. Además, (Li *et al.*, 2012) plantean que el chocolate tiene mayor actividad antioxidante que el té y el vino.

4.3 Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de *T. cacao*.

En la figura 6 se muestra la actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) ($50-1,5 \mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$) de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, (B) ($1,5 \mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$), frente al hongo *Sarocladium oryzae*.

Al determinar la actividad antifúngica se detectó que solo las semillas tuvieron actividad inhibitoria, siendo mayor para las concentraciones de 25 y 12 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$ sin diferencias significativas con 50 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$ (figura 6 A). Esta actividad podría estar asociada con el contenido de ácido cafeico y catequina presente en las mismas, que como se muestra en la figura 6 B, pueden lograr hasta un 100% de inhibición del microorganismo a una concentración de 1,5 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$. Sin embargo, en los extractos crudos hay mezclas de diferentes compuestos, donde el ácido cafeico y la catequina deben estar en concentraciones inferiores a las ensayadas en los estándares.

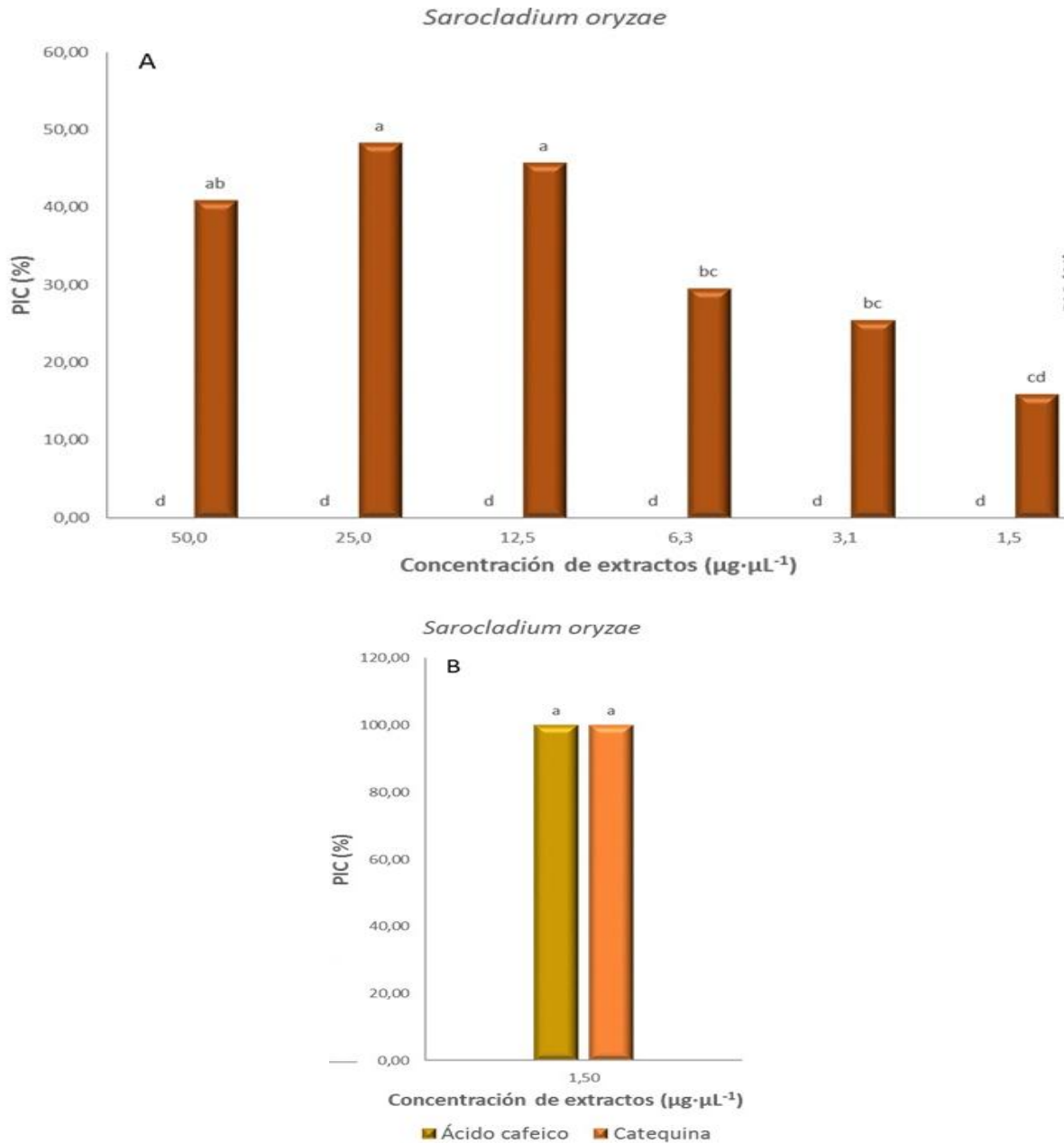


Figura 6. Actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) (50-1,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) del clon UF677 de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, B) (1,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Porcentaje de inhibición del crecimiento (%) de *S. oryzae*. Medias con letras distintas difieren significativamente (ANOVA bifactorial y Tukey para $p \leq 0,05$, $n=4$)

En la figura 7 se muestra la actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) (50-1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, B) (1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), frente al hongo *Stemphylium solani*.

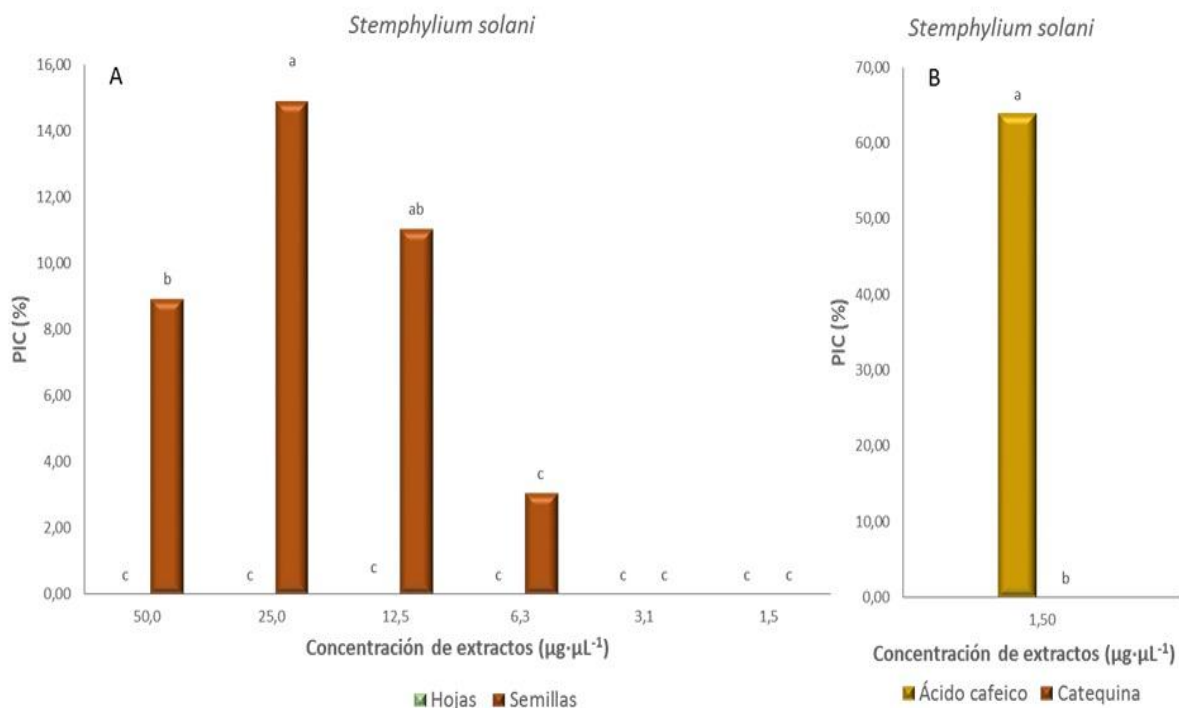


Figura 7. Actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) (50-1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) del clon UF677 de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, B) (1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Porcentaje de inhibición del crecimiento (%) de *S. solani*. Medias con letras distintas difieren significativamente (*ANOVA bifactorial* y *Tukey para $p \leq 0,05$, $n=4$*)

Al determinar la actividad antifúngica se encontró un resultado similar al anterior, la mayor inhibición del hongo se obtuvo para los valores de 25 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ sin diferencias con los de 50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Es importante destacar que para este caso el porcentaje de inhibición disminuyó en comparación con el anterior y este resultado puede estar explicado porque para este hongo la catequina no mostró inhibición alguna.

En la figura 8 se muestra la actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) (50-1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, B) (1,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), frente al hongo *Rhizoctonia solani*.

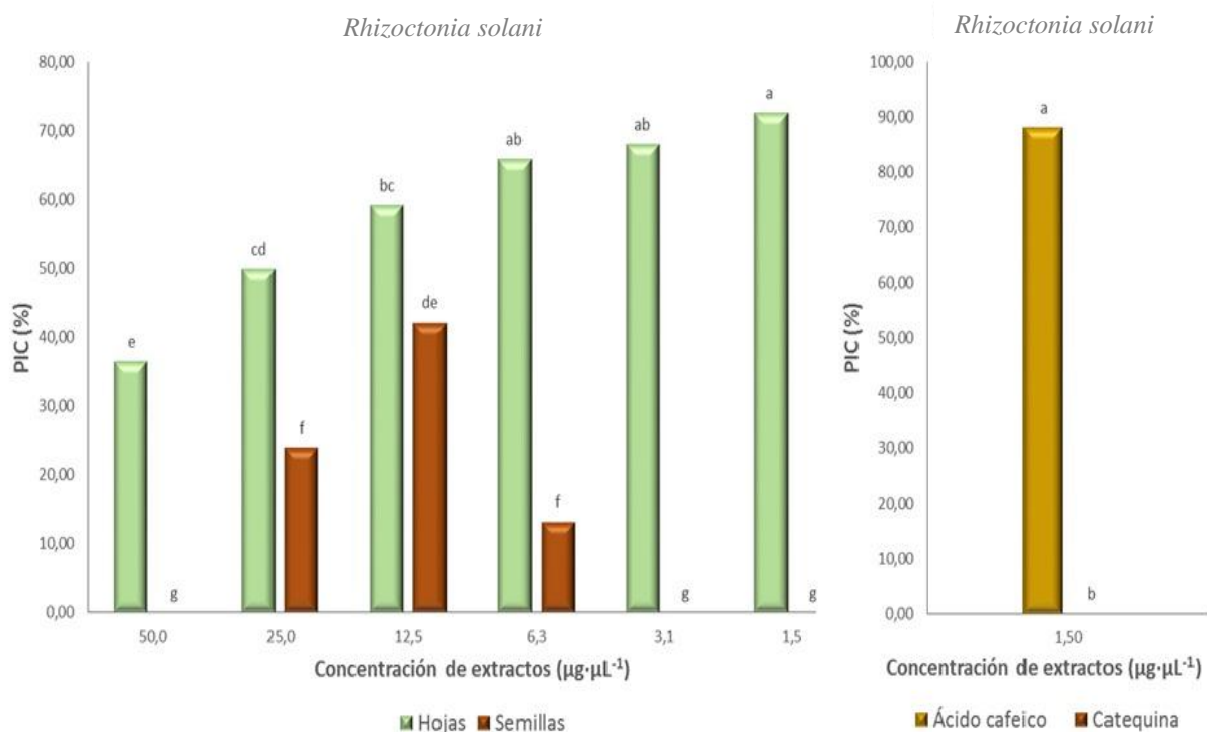


Figura 8. Actividad antifúngica *in vitro*, de extractos de hojas y semillas (A) (50-1,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) del clon UF677 de *T. cacao* y estándares de compuestos fenólicos (ácido cafeico y catequina, B) (1,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Porcentaje de inhibición del crecimiento (%) de *R. solani*. Medias con letras distintas difieren significativamente (*ANOVA bifactorial* y *Tukey para $p \leq 0,05$, $n=4$*)

Al determinar la actividad antifúngica se encontró que ambos extractos tenían actividad inhibitoria pero que los mayores valores correspondían a las hojas. Se puede notar que a medida que disminuye la concentración del extracto aumenta el porcentaje de inhibición, este resultado puede estar asociado con que en extractos crudos hay variedad de compuestos de diferente naturaleza, por lo que podría estar existiendo un antagonismos entre ellos que dificulte la inhibición de los compuestos activos cuando los extractos estan a altas concentraciones. Mientras que al disminuir la concentración puede favorecerse su actividad inhibitoria. Igualmente destaca que el estándar de ácido cafeico presenta actividad antifúngica en este caso pero no se demostró su presencia en las hojas en las *TLC* realizadas. Es por ello que la actividad en hojas debe estar asociada con otros compuestos como por ejemplo componentes de aceites esenciales, los cuales

han sido informados en la literatura como poseedores de actividades biológicas y que pudieran estar influyendo en los resultados obtenidos.

Extractos etanólicos de semillas, raíces y cortezas de diferentes plantas (*Alhagi mauronum*, *Capparis spinosa*, *Punica granatum*) presentaron actividad antifúngica frente a *Rhizoctonia solani* y otros hongos (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma destructiva* y *Sclerotium rolfsii*). Los de semillas de *A. mauronum*, seguido de los de *P. granatum*, a la mayor concentración ensayada ($9 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) mostraron la mayor actividad, la que se asoció fundamentalmente a la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, antraquinonas y otros compuestos como esteroides, alcaloides, saponinas y glicósidos en los extractos (Aziz y Al-Askar, 2012). Mientras que los resultados de las figura 8 muestran que los extractos de semillas de *T. cacao* tienen actividad inhibitoria (entre 10 y 40% con concentraciones de 25-6,3 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) aunque menor que los de hojas, con un rango entre 35 y 70% que aumentó al disminuir la concentración, como se mencionó anteriormente.

Extractos de antraquinonas de raíces *ex vitro* e *in vitro* de *Morinda royoc* mostraron actividad antibacteriana y antifúngica de ambos extractos frente a varios patógenos, con una alta actividad antimicrobiana, de la cual fueron responsables las antraquinonas presentes, fundamentalmente la morindona a una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Borroto *et al.*, 2010). En los resultados de esta investigación se encontró actividad antimicrobiana contra los hongos (*S. oryzae*, *S. solani* y *R. solani*) pero con una actividad mayor en semillas para los dos primeros y en hojas para el último.

Los resultados positivos alcanzados en la potencial actividad antifúngica de los extractos están relacionados con la composición fenólica de los extractos, donde hay presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y fenilpropanoides, compuestos a los que se les conoce su alta actividad antibacteriana y antifúngica, por ejemplo la quercetina en extractos de *Calceolaria integrifolia* mostró una potente actividad antifúngica a $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Céspedes *et al.*, 2014). Por lo que la presencia de este metabolito en los extractos analizados de *T. cacao* pudo influir en la actividad antifúngica encontrada.

Por otra parte, los flavonoides en general tienen una amplia gama de actividades biológicas. Por ejemplo, se han encontrado flavonoides con actividad antifúngica contra *F. oxysporum* (Steinkellner y Mammerler, 2014). La genisteína y sus derivados mostraron actividad antimicrobiana (Li *et al.*, 2008) y antifúngica contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Goyal *et al.*, 2012). Además, la gliciteína reduce el desarrollo micelial de *Aspergillus ochraceus* (Goyal *et al.*, 2012), lo que es indicativo de que las actividades encontradas en los extractos pudieran también estar asociadas con la presencia de estos compuestos.

De los fitopatógenos evaluados, *R. solani* y *S. solani* atacan fundamentalmente tomate y papa, mientras que *S. oryzae* el arroz. En este sentido, se ha demostrado que diferentes flavonoides y ácidos fenólicos tienen actividad antifúngica contra *R. solani* y que la quercetina en extractos de *Calceolaria integrifolia* mostró una potente actividad antifúngica (Céspedes *et al.*, 2014).

5. CONCLUSIONES

1. Los mayores contenidos de compuestos fenólicos se registraron para los extractos metanólicos de semillas de *T. cacao* con el uso de metanol como solvente y extracción con soxhlet. Para los extractos de hojas el comportamiento fue similar.
2. En los extractos de semillas y hojas analizados por *TLC*, se demostró la presencia de altos contenidos de compuestos fenólicos de naturaleza química diferente, entre los metanólicos y etanólicos. Se seleccionó como solvente el etanol comercial y como método de extracción el soxhlet.
3. Se demostró que los extractos evaluados tienen potencial actividad antioxidante y antifúngica, en relación con su composición química. Los extractos de semillas presentaron mayor actividad antioxidante y antifúngica (contra *Stemphylium solani* y *Sarocladium oryzae*) que los de hojas. Los extractos de hojas solo fueron activos frente a *Rhizoctonia solani*.

6. RECOMENDACIONES

1. Utilizar el etanol comercial y la extracción por soxhlet para estudios de escalado.
2. Confirmar las actividades biológicas en condiciones de casas de cultivo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackar D, Valek Lendič K, Valek M, Šubarič D, Miličević B, Babič J, Nedič I (2013) Cocoa polyphenols: Can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *Journal of Chemistry*, 2013:1-7. ISSN: 2090-9071.
- Ademe A, Ayalew A, Woldetsadik K (2013) Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya antracnose (*Collectotrichum gloeosporioide*). *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4(10): 1-4. ISSN: 2157-7471.
- Ahmad A, Alkarkhi AFM, Hena S, Siddique BM, Dur KW (2010) Optimization of soxhlet extraction of Herba leonuri using factorial design of experiment. *International Journal of Chemistry* 2(1): 198-205. ISSN: 1916-9698.
- Allegre M, Argout X, Boccara M, Fouet O, Roguet Y, Bérard A, Thévenin JM, Chauveau A, Rivallan R, Clement D, Courtois B, Gramacho K, Boland-Augé A, Tahi M, Umaharan P, Brunel D, Lanaud C (2012) Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. *DNA Research*, 19, 23-35. ISSN: 1340-2838.
- Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano CS, Farias LM, Carvalho MAR, Souza MMG, Bolognese AM (2008). In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*, 53(6): 545-552. ISSN: 0003-9969.
- Andújar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL (2012) Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012: 906252. e-ISSN: 1942-0994. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/906252>
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group) (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121. ISSN: 0024-4074.
- Argout X, Salse J, Aury JM, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova S, Abrouk M, Murat F, Fouet O, Poulain J, Ruiz M, Roguet Y, Rodier-Goud M, Barbosa-Neto JF, Sabot F, KudrnaD, Ammiraju JSS, Schuster SC, Carlson JE, Sallet E, Schiex T, Dievart A, Kramer M, Gelley L, Shi Z, Berard A, et al. (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2): 101-108. ISSN: 1061-4036.

- Ariza BTS, Mufida DC, Fatima NN, Hendrayati TI, Wahyudi T, Misnawi (2014) In vitro antibacterial activity of cocoa ethanolic extract against Escherichia coli. *International Food Research Journal*, 21(3): 935-940. ISSN: 1985-4668.
- Ávalos A, Pérez-Urria CE (2009) Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal, 2 (3): 119-145. ISSN 1989-3620.
- Aziz A, Al-Askar A (2012) In vitro antifungal activity of three Saudi plant extracts against some pathogenic fungi. *Journal of Plant Protection Research*, 52(4): 458-462. ISSN: 1427-4345.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. e-ISSN: 2320-0812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Borroto J, Salazar R, Pérez A, Quiros Y, Hernandez M, Waksman N, (2010) Antimicrobial activity of the dichloromethane extract from in vitro cultured roots of Morinda royoc and its main constituents. *Natural Product Communications*, 5(5): 809-810. ISSN: 1934-578X.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69: 55–60. ISSN: 0378-1097.
- Cai Y, Qiong L, Mei S, Harold C (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74: 2157-2184.
- Capdesuñer Y, Rivas M, Rodríguez E, Gallo M, Quiñones Galvez J, Yanes E, Hernández M (2015) In vitro antibacterial effect of tobacco leaf exudates against two bacterial plant pathogens. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17 (1): 91-100. ISSN: 0123-3475.
- Capote A; Pérez-Alonso N; Pérez A; Barbón R; Salas E; Wilken D; Gerth A; Müller-Kuhrt L; Jiménez E. (2008). Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos in vitro y plantas de campo de Morinda royoc L., Psidium guajava L. y Morus alba L. *Biotecnología Vegetal*. 8: 119 – 121.
- Carvalho, H. A. S., Ribeiro, L. F., Pirovani, C. P., Gramacho, K. P. y Micheli, F. (2013) Activity of polygalacturonases from Moniliophthora perniciosa depends on fungus culture conditions and is enhanced by Theobroma cacao extracts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 83: 40-50.

- Castilla, J. (1981). Fitotecnia del cacao (1 ed.). La Habana. Editorial Pueblo y Educación.
- Cerón LE, Higuera BL, Sánchez J, Bustamante S, Buitrago G (2006) Growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* during culture in liquid medium. *Acta Biológica Colombiana*, 11 (1): 99-109. ISSN: 0120-548X.
- Céspedes CL, Muñoz E, Lamilla L, Molina SF, Alarcon J (2013) Insect growth regulatory, molting disruption and insecticidal activity of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae) and *Condalia microphylla* Cav@ (Rhamnaceae). En: Céspedes CL, Sampietro DA, Seigler DS, Rai MK (Eds), Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants. *Cabi Publishing, Wallingford, UK*, pp. 214-238, ISBN: 978-1-78064-233-8.
- Céspedes, C. L., Salazar, J. R., Ariza-Castolo, A., Yamaguchi, L., Ávila, J. G., Aqueveque, P., Kubo, I. y Alarcón, J. (2014) Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environmental Research*. 132: 391-406. ISSN: 0013-9351.
- Chaparro, A. P. (2010): Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. [Tesis de diploma]. Bogotá, Colombia.
- Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 1-20. ISSN: 0981-9428.
- Cho MH, Lee SW (2015) Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 29120–29133. ISSN: 1422-0067.
- Crozier SJ, Preston AG, Hurst JW, Payne MJ, Mann J, Hainly L, Miller DL (2011) Cacao seeds are a “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal*, 5(5): 1-6. ISSN: 1752-153X.
- Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK (2015) Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2): 75-84. ISSN: 2347-2340.
- Edwards HGM, Villar JSE, de Oliveira LFC, Le Hyaric M (2005) Analytical Raman spectroscopic study of cacao seeds and their chemical extracts. *Analytica Chimica Acta*, 538: 175-180. ISSN: 0003-2670.

- FAO STAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2013). Production of cocoa beans. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Consultado: 13 Diciembre 2015.
- Finger S, Wiegand C, Buschmann HJ, Hipler UC (2012) Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 1(436): 851-856. ISSN: 0378-5173.
- Ford CS, Wilkinson MJ (2012) Confocal observations of late-acting self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Plant Reproduction*, 25(3): 169-183. ISSN: 2194-7953.
- Friend J (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls. En: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (Eds), *Molecular Plant Pathology: a practical approach*, Oxford: IRL Press, vol. 2, pp. 51- 59. ISBN 10: 0199633517.
- Gatto, M. A., Sanzani, S. M., Tardia, P., Linsalata, V., Peralice, M., Sergio, L. y Venere, D. D. (2013) Antifungal activity of total and fractionated phenolic extracts from two wild edible herbs *Natural Science*. 5(8): 895-902. ISSN: 0974-9411.
- Goyal S, Lambert C, Cluzet S, Mérillon JM, Ramawat KG (2012) Secondary metabolites and plant defence. En: Mérillon JM, Ramawat KG (Eds.), *Plant Defence: Biological Control*, pp. 109-138. *Springer Netherlands*. ISBN: 978-94-007-1932-3.
- Guerrero-Rodríguez E, Solís-Gaona S, Hernández-Castillo FD, Flores-Olivas A, Sandoval-López V (2007) Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1): 48-53. ISSN: 0185-3309.
- IBM SPSS (2011) *Statistics for Windows*. CD Room. Ver. 20. [Armonk, N.Y.]: IBM Corp, 2011. Programa Informático.
- Kelebek H, Selli S (2014) Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6): 1094-1101. ISSN: 0022-1155.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. y Roberts, T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 18: 2328-2375. ISSN: 1420-3049.

- Kusirisin W, Srichairatanakool S, Lerttrakarnnon P, Lailerd N, Suttajit M, Jaikang C, Chaiyasut C (2009) Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Medicinal Chemistry*, 5(2): 139-147. ISSN: 1573-4064.
- Lara-Viveros FM, Nieto-Ángel D, Nava-Díaz C, Gutiérrez-Alonso G, Ayala-Garay ÓJ, Aguilar-Pérez LA, Martínez-Damián T (2014). Efecto del glucorafano aislado de floretes de brócoli sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 37(2): 141-147. ISSN: 0187-7380.
- Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D (2009) Plant phenolics: secondary metabolites with diverse functions. En: Daayf F, Lattanzio V (Eds), *Recent Advances in Polyphenol Research*, Vol. 1, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 1-35. ISBN: 978-1-4051-5837-4.
- Lee K, Kim YS, Lee HJ, Lee CY (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25): 7292-7295. ISSN: 0021-8561.
- Li HQ, Xue JY, Shi L, Gui SY, Zhu HL (2008) Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of deoxybenzoin derivatives from genistein. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(3): 662-667. ISSN: 0223-5234.
- Li Y, Feng Y, Zhu S, Luo C, Ma J, Zhong F (2012) The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis* 25(1): 17–23. ISSN: 0889-1575.
- Luna F, Crouzillat D, Cirou LC, Bucheli P (2002) Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3527-3532. ISSN: 0021-8561.
- Márquez Rivero, J. J., y Aguirre Gómez, M. B. (2003). *Manual Técnico de Cosecha y Beneficio del Cacao* (1 ed.). Ciudad de La Habana: Unidad Producciones Gráficas MINREX.
- Márquez Rivero, J. J., y Aguirre Gómez, M. B. (2010). *Cacao con Denominación de Origen. Metodología para su obtención en el Consejo Popular de Sabanilla en el Municipio de Baracoa*. (1 ed.): Editora Agroecológica.

- Meera T, Balabaskar P (2012) Antifungal activity of botanicals against *Sarocladium oryzae* causing rice sheath rot disease. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 2 (1): 121-127. ISSN: 2277-209X.
- Menéndez, M., Lambertt, W., y Columbié, Y.(2002). Selección de clones de *Theobroma cacao* con alto potencial productivo y de calidad industrial. *Café y cacao*, 3(1), 64-66.
- Meot-Duros L, Le Floch G, Magné C (2008) Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2): 258-262. ISSN: 0378-8741.
- Meyuhas S, Assali M, Huleihil M, Huleihel M (2015) Antimicrobial activities of caffeic acid phenethyl ester. *Journal of Molecular Biochemistry* 4, 21-31.
- Milojković-Opsenica D, Ristivojević P, Andrić F, Trifković J (2013) Planar chromatographic systems in pattern recognition and fingerprint analysis. *Chromatographia* 76:1239–1247. ISSN: 0009-5893.
- Motamayor JC, Risterucci A, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5): 380-386.
- Motamayor, J. C., Mockaitis, K., Schmutz, J., Haiminen, N. y III, D. L. (2013) The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology*. 14 (6): r53. ISSN: 1465-6906.
- Onomo PE, Niemenak N, Djogogue PF, Ondobo ML, Ndoumou DO (2015) Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *African Journal of Biotechnology*, 14(36): 2672-2682. ISSN: 1684-5315.
- Pabón LC, Hernández-Rodríguez P (2012) Chemical importance of *Jatropha curcas* and its biological, pharmacological and industrial applications. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2): 1-16. ISSN (online): 1028-4796.
- Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I, Chaves-López C, Serio A, Marsilio F, Suzzi G (2008) Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19(12): 1174-1182. ISSN: 0956-7135.
- Park HL, Yoo Y, Hahn TR, Bhoo SH, Lee SW, Cho MH (2014) Antimicrobial activity of UV-induced phenylamides from rice leaves. *Molecules*, 19: 18193–18151. ISSN: 1420-3049.

- Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH (2004) Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2): 268-280. ISSN: 0893-8512.
- Pieme CA, Penlap VN, Ngogang J, Costache M (2010) In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(3): 223-228. ISSN: 1382-6689.
- Proestos Ch, Komaitis M (2013) Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after silylation. *Foods*, 2: 90-99. ISSN: 2304-8158.
- Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Espinel-Ingroff A, Knapp CC, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller MA, Sheehan DJ, Walsh TJ (2008) Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards-third edition. En: *Clinical and Laboratory Standards Institute (CCSI) CLSI document M27-A3*, Wayne, Pennsylvania, USA. 28 (14): 6-12. ISBN 1-56238-666-2.
- Ristivojević P, Andrić FL, Trifković JD, Vovk I, Stanisavljević LZ, Tešić ZL, Milojković-Opsenica DM (2014) Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. *Journal of Chemometrics*, 28(4): 301-310. ISSN: 0886-9383.
- Rojas LF, Gallego A, Gil A, Londoño J, Atehortúa L (2015) Monitoring accumulation of bioactive compounds in seeds and cell culture of *Theobroma cacao* at different stages of development. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 51:174–184.
- Santos RX, Oliveira DA, Sodr  GA, Gosmann G, Brendel M, Pungartnik C (2014) Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3): 7725-7735. ISSN: 1676-5680.
- Sawadogo WR, Maciuk A, Banzouzi JT, Champy P, Figadere B, Guissou IP, Nacoulma OG (2012) Mutagenic effect, antioxidant and anticancer activities of six medicinal plants from Burkina Faso. *Natural Product Research*, 26(6): 575-579. ISSN: 1478-6419.
- Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS (2007) Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and

- Cryptococcus sp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(1): 25-34. ISSN 1808-4532.
- Shukla A, Dwivedi SK (2013) Antifungal approach of phenolic compounds against *Fusarium udum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *African Journal of Agricultural Research*, 8(7): 596-600. ISSN: 1991-637X.
- Srivastava MM (2011) An overview of HPTLC: a modern analytical technique with excellent potential for automation, optimization, hyphenation, and multidimensional applications. En: *High-Performance Thin-Layer Chromatography*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp. 3-24. ISBN: 978-3-642-14025-9.
- Steinkellner S, Mammerler R (2007) Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Interactions*, 2(1): 17-23. ISSN: 1742-9145.
- Suárez GM, Soto F, Garea E, Solano OJ (2015) Mountain massif agroclimatic characterization Nipe-Sagua-Baracoa, according to the zoning agroecological for cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Cultivos Tropicales*, 36 (1): 23-28. ISSN: 0258-5936.
- Terras FR, Schoofs HM, De Bolle MF, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22): 15301-15309. ISSN: 0021-9258.
- Wagner H, Bladt S (1996) *Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas* (Segunda Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. ISBN: 3-540-58676-8.
- Zujko ME, Witkowska AM (2014) Antioxidant potential and polyphenol content of beverages, chocolates, nuts, and seeds. *Int J Food Prop*, 17:86–92.