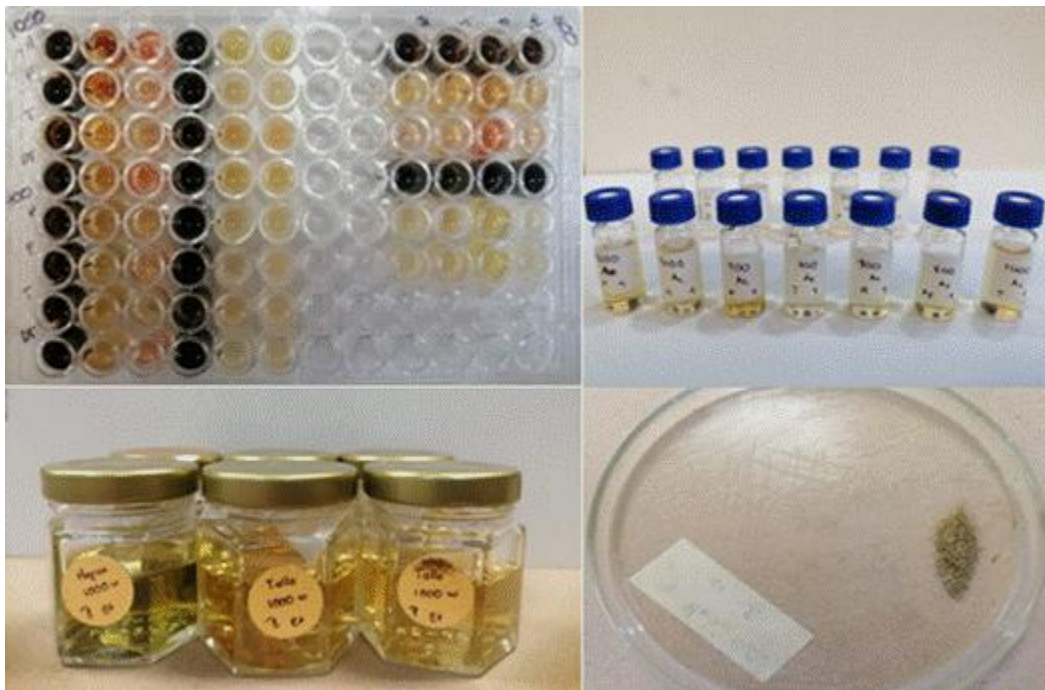


Caracterización fisicoquímica de metabolitos secundarios obtenidos a partir de la extracción acuosa de *Rosa gallica*

Physicochemical characterization of secondary metabolites obtained from the aqueous extraction of *Rosa gallica*



Luis A. Vázquez-Olvera^a, Alejandra I. Vargas-Segura^b, Rodolfo Ramos-González^a,
Anna Iliná^a, Elda P. Segura-Ceniceros^{a*}

^a Universidad Autónoma de Coahuila 1, Facultad de Ciencias Químicas, Ing. J. Cárdenas Valdez
S/N, Col. República, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México.

^b Universidad Autónoma de Coahuila 1, Facultad de Odontología, Dra. Cuquita Cepeda de
Dávila, Adolfo López Mateos, C.P. 25125, Saltillo, Coahuila, México.

*Correspondencia para autor: Elda P. Segura-Ceniceros
Universidad Autónoma de Coahuila
Correo electrónico: psegura@uadec.edu.mx

Resumen

La *Rosa gallica* también conocida como “Rosa de castilla”, es fácil de cultivar en suelos muy drenados con exposición al sol o a media sombra y puede resistir fríos de hasta 25 °C bajo cero; son conocidas en todo el mundo y se utilizan ampliamente como plantas medicinales ya que tiene propiedades antiinflamatorias y se suele tomar en infusión. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de extractos acuosos de diferentes partes de la planta *Rosa gallica* por la técnica de extracción asistida por microondas a diferentes condiciones de potencia y tiempo, así como la identificación de los compuestos obtenidos mediante ensayos fitoquímicos cualitativos, HPLC-MS. Los resultados obtenidos con las diferentes condiciones de extracción muestran un mayor porcentaje de rendimiento (98%) en extracciones acuosas de flor y hojas usando una potencia de 1000 W y 700 W respectivamente y los principales metabolitos secundarios identificados por HPLC en los diferentes extractos obtenidos de *Rosa gallica* pertenecen en su mayoría a la familia de los flavonoides y aceites esenciales.

Palabras clave: *Rosa gallica*, Compuestos bioactivos, Extractos, Tecnologías de extracción.

Abstract

Rosa gallica, also known as "Rosa de castilla", is easy to grow in very drained soils with exposure to the sun or partial shade and can withstand cold temperatures of up to 25 ° C below zero; They are known throughout the world and are widely used as medicinal plants since it has anti-inflammatory properties and is usually taken as an infusion. The aim of the present work was obtaining aqueous extracts from different parts of the *Rosa gallica* plant by the microwave-assisted extraction technique at different power and time conditions, as well as the identification of the compounds obtained through qualitative phytochemical tests, HPLC-MS. The results obtained with the different extraction conditions show a higher percentage of yield (98%) in aqueous extractions of flower and leaf using a power of 1000 W and 700 W respectively and the main secondary metabolites identified by HPLC in the different extracts obtained from *Rosa gallica* belong mostly to the family of flavonoids and essential oils.

Key words: *Rosa gallica*, Bioactive Compounds, Extracts, Extraction Technologies.

Introducción

La *Rosa gallica* es un rosal de porte bajo con una altura de aproximadamente 1 metro de altura con hojas oscuras, espinoso, con pétalos rosados, tiene estambres muy perfumados en sus flores, y es una planta que florece a finales de primavera o principios de invierno.

Se ha demostrado en ciertos estudios que tiene una capacidad curativa con ciertas enfermedades, todo esto se debe a la composición de la planta y que en cada una de estas partes por la que está conformada. Podemos encontrar algunas moléculas conocidas como “compuestos bioactivos” que produce la planta como adaptación al medio ambiente que la rodea que tienen alta capacidad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, entre otras (Soto, 2015).

La taxonomía de *Rosa gallica* se puede observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Taxonomía de Rosa gallica.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Rosa
Especie	<i>gallica</i>

La planta, como lo es la *Rosa gallica*, es una gran fuente de metabolitos secundarios (compuestos bioactivos) Rosales y col., (2019) que son encontrados en pequeñas cantidades y se producen como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). En México, existe gran variedad de plantas que son recolectadas y estudiadas Santiago y col., (2019), muchas de ellas reconocidas como medicinales; algunas son utilizadas por las personas para aliviar ciertos malestares del cuerpo humano por sus componentes y otras lastimosamente no son aprovechadas por no ser reconocidas por la población.

Estos compuestos bioactivos son producidos por el metabolismo secundario de la planta, que, a diferencia del metabolismo primario, este tipo de metabolismo no siempre está presente en todas las plantas, ya que no es vital para que la planta lleve a cabo sus procesos de supervivencia.

Algunos compuestos bioactivos derivados del metabolismo secundario mayormente reportados en *Rosa gallica* son: Flavonoides: Actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria (Ochir y col., 2013). Aceites esenciales: Generalmente encontrados en los pétalos con propiedades

analgésicas y antiinflamatorias (Koczka y col., 2018). Otros compuestos fenólicos han sido reportados por Song y col. (2020).

Para la identificación de estos compuestos bioactivos se realizan extractos a partir de disolventes. Dentro de las extracciones vegetales se obtiene un complejo sistema de sustancias activas de diferente procedencia, por lo que son líquidos, semisólidos o polvos, relativamente impuros. Dependiendo del proceso empleado para realizar la extracción y del grado de concentración de los extractivos, se encuentran preparaciones conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, tinturas, extractos semisólidos y extractos en polvo (Guerra, 2005).

Actualmente diversos estudios para el área agronómica y biotecnológica han demostrado de manera benéfica que los extractos vegetales etanólicos, metanólicos y acuosos brindan resultados efectivos para inhibir el crecimiento de diversas bacterias. De acuerdo con Valdés, (2017) un procedimiento no estandarizado en la extracción puede provocar la desnaturalización o degradación de las sustancias activas presentes en las plantas, provocando a su vez variaciones en los resultados disminuyendo la confiabilidad del experimento, por lo que hay que definir cuidadosamente los parámetros en los que se trabajará la extracción y bajo que técnicas, algunas de ellas son las tecnologías de extracción alternativas, como son la extracción asistida por microondas.

Según Wong-Paz y col. (2017) la tecnología de extracción por ultrasonido y por microondas son muy utilizadas, ya que son más fáciles de operar, más fáciles de conseguir y lo más importante, la obtención de altos rendimientos de compuestos bioactivos. Las ventajas que ofrecen estas tecnologías es reducción en el uso de disolventes y reducción en el tiempo de extracción además que son más amigables con el ambiente por ser consideradas tecnologías verdes de extracción. La técnica de extracción asistida por microondas (EAM) es una de las alternativas de extracción más empleadas para compuestos bioactivos de plantas, en este caso en géneros de Rosa es ampliamente utilizado para extraer compuestos de alto valor agregado Mao y col., (2021). Este método de extracción ofrece múltiples beneficios; como son:

- Tiempos cortos de extracción.
- Reducción considerable en el consumo de energía
- Gasto mínimo en el empleo de disolventes.
- Obtención de mejores rendimientos de los compuestos bioactivos.
- Puede realizarse una extracción híbrida con ultrasonido.

Para la identificación de compuestos bioactivos se realizan estudios de perfil fitoquímico cualitativo estandarizado por estudios reportados en literatura, así como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas (HPLC-MS) y la identificación de grupos funcionales mediante infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

En este trabajo se hace una caracterización fisicoquímica de algunos compuestos por HPLC-MS.

Metodología

Obtención y pretratamiento del material vegetal

Los ejemplares de *Rosa gallica* fueron obtenidos del mismo proveedor, el material vegetal se lavó varias veces con agua de la llave para remover impurezas y polvo; posteriormente se separó en hojas, flores y tallo donde se sometieron a un tratamiento de secado al sol por 4 días y se molió para reducir el tamaño de partícula, tamizando a un tamaño de 2 mm con la finalidad de obtener un mismo tamaño de partícula y obtener una mayor superficie de contacto para la extracción.

Preparación de extractos acuosos

Se colocó la planta previamente seca, pulverizada y tamizada de cada parte de la planta a una concentración del 2 % (2g de muestra / 100 mL de agua destilada) en un recipiente estéril de vidrio, empleando como disolvente agua destilada.

Obtención de extractos acuosos mediante la técnica asistida por microondas

Las extracciones se realizaron por triplicado, se realizó la extracción en un microondas doméstico bajo diferentes condiciones de potencia y tiempo (Loredo y col., 2017; Puertas y col., 2013) las cuales se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Parámetros definidos para la extracción acuosa asistida por microondas de Rosa gallica.*

Potencia (w)	1000	700	500
Tiempo (min)	1	3	5

Una vez terminada la extracción acuosa por microondas, la mezcla obtenida se depositó en un tubo cónico y se centrifugó (Centrífuga IEC-MULTI RF) a 3000 rpm por 15 min para la separación sólido-líquido, luego se filtró a través de papel filtro (Whatman N°4). El filtrado acuoso se liofilizó (Jayasri y col., 2009) y se conservó a una temperatura de congelación de -10 °C.

Caracterización fitoquímica de los extractos de *Rosa gallica*

Se realizaron ensayos fitoquímicos (**Tabla 3**) empleando una microplaca de 96 pozos (**Figura 1**), colocando en cada pocillo 50 µL de reactivo con 50 µL de extracto (el extracto fue preparado a 2000 µg/mL), esperando un cambio de coloración que da un indicativo de los metabolitos secundarios contenidos en los extractos. Se ha reportado en la literatura que los cambios de coloración dan un análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en los extractos (Carvajal y col., 2009).

Tabla 3. *Ensayos fitoquímicos.*

Ensayo	Metabolitos
Liebermann-Burchard	Triterpenos
Salkowsky	Esteroles
Shinoda	Flavonoides
KMnO ₄	Insaturaciones
FeCl ₃	Compuestos Fenólicos, Taninos
NaOH 10%	Cumarinas

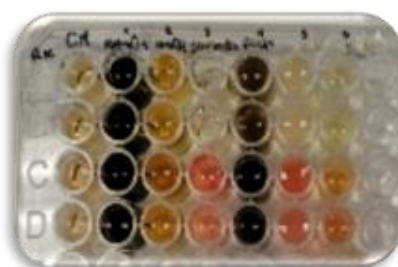


Figura 1. *Coloración de las distintas pruebas fitoquímicas cualitativas de Rosa gallica en microplaca de 96 pocillos.*

Análisis de metabolitos secundarios por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas (HPLC-MS)

Los análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento se realizaron en un sistema de HPLC-MS Varian que incluía un muestreador automático (Varian ProStar 410, EE. UU.), una bomba ternaria (Varian ProStar 230I, EE. UU.) y un detector de arreglo de diodos (Varian ProStar 330, EE. UU.). También se utilizó un espectrómetro de masas con trampa de iones para cromatografía de líquidos (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer, EE.UU) equipado con una fuente de iones por electropulverización. Se inyectaron muestras (5 µL) en una columna de fase reversa Denali C18 (150 mm x 2.1 mm, 3 µm, Grace, EE. UU.). La temperatura del horno se mantuvo a 30 ° C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2%, v / v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3% B; 0-5 min, 9% B lineal; 5 a 15 min, 16% de B lineal; 15-45 min, 50% B lineal. Luego, la columna se lavó y se reacondicionó. El caudal se mantuvo a 0.2 ml / min y la elución se monitoreó a 245, 280, 320 y 550 nm. Se inyectó todo el efluente (0.2 ml / min) en la fuente del espectrómetro de masas, sin dividirlo. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5.0 kV y el voltaje capilar y la temperatura fueron 90.0 V y 350 ° C, respectivamente. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de barrido completo adquiridas en el rango m / z 50-2000. (Ascacio y col., 2016).

Para esta técnica se utilizaron los extractos acuosos previamente liofilizados, a una concentración de 2000 µg/mL. Una vez hecho esto, se tomaron 3 mL de la disolución anterior para ser esterilizados por filtración con el uso de un filtro de membrana de 0.22 µm (Millipore, México; Segura y col., 2015), descartando las primeras 3-5 gotas de cada extracto para evitar partículas no disueltas, el filtrado se colocó en un vial para correr la muestra (**Figura 2**). De acuerdo con los distintos tiempos de retención y las relaciones masa/carga se determinaron cualitativamente los compuestos contenidos en los extractos de *Rosa gallica*.

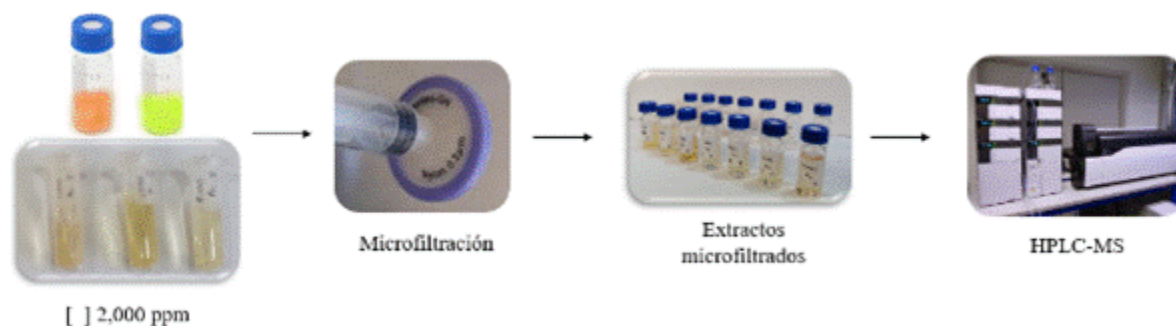


Figura 2. Preparación de extractos de *Rosa gallica* para HPLC-MS.

Resultados y Discusión

Rendimientos de los extractos acuosos de *Rosa gallica*

Los recipientes utilizados en donde se vertieron los extractos obtenidos fueron pesados primeramente vacíos mediante una balanza analítica para obtener datos reales, posteriormente una vez que se adicionó los extractos fueron pesados nuevamente y por diferencia pesos se obtuvo el rendimiento del extracto (**Ecuación 1**). En la **Tabla 4** se observa el porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos liofilizados en los cuales, la parte de la flor de los extractos acuosos arrojan los mejores rendimientos en comparación con la planta total donde se observan rendimientos más bajos en cada uno de los tratamientos usados.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100 \% \quad (1)$$

De acuerdo con los reportado en la literatura por Loredo y col., (2017) la extracción asistida por microondas genera mejores rendimientos en materiales vegetales, además, que es una técnica que se considera amigable con el medio ambiente, ya que minimizan el uso de disolventes, energía, tiempos de extracción y aumenta la calidad del extracto, lo que se puede observar en los resultados obtenidos en la flor de *Rosa gallica*. Por otro lado, los estudios de Rubio y Rodríguez, (2018) redactan que la aplicación de la tecnología con microondas (MW) se presenta como una de las técnicas más eficaces y prometedoras para la recuperación de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales.

Tabla 4. Por ciento de rendimiento obtenido de los extractos acuosos usando diferentes potencias del microondas.

Tratamiento (potencia)	Rendimiento (%)	Planta
1000 watts	4.20 ± 1.83	Hojas
	98.0 ± 2.50	Flor
	2.93 ± 0.41	Tallo
	28.48 ± 6.55	Planta total
700 watts	97.33 ± 4.54	Hojas
	74.27 ± 3.54	Flor
	9.53 ± 3.45	Tallo
	14.27 ± 6.50	Planta total
500 watts	15.29 ± 1.36	Hojas
	26.33 ± 2.58	Flor
	7.30 ± 6.85	Tallo
	13.0 ± 4.02	Planta total

Tabla 5. Metabolitos secundarios presentes en extractos de *Rosa gallica*.

Extracto / Prueba fitoquímica	Insaturaciones	Cumarinas y Lactonas	Flavonoides	Oxidrilos fenólicos y Taninos	Esteroides	Triterpenos
	KMnO ₄	NaOH 10%	Shinoda	FeCl ₃	Liebermann-Burchard	Salkowski
1000 W						
Ac (100) hojas	+++	+	+++	+++	++	-
700 w						
Ac (100) hojas	+++	++	++	+++	++	-
500 w						
Ac (100) tallo	+++	++	+	+++	+	-

Caracterización fitoquímica de los extractos de *Rosa gallica*

Alves y col., (2012) y Ochir y col., (2010) reportan que ciertas investigaciones en estudios fitoquímicos, el contenido de la familia de los flavonoides en *Rosa gallica* es mayor que en otras especies del género “Rosa”. En la **Tabla 5** se muestran los tratamientos en los que se observó una mejor coloración por cada parte de la planta a cada potencia contemplada para la extracción en microondas, lo que da un indicativo de los metabolitos obtenidos de manera cualitativa. La intensidad de la coloración se expresó de la siguiente manera: (+) coloración poco apreciable; (++) coloración apreciable; (+++) coloración intensa.

Los resultados arrojan compuestos bioactivos en su mayoría por compuestos fenólicos, taninos e insaturaciones, dentro de los compuestos fenólicos también se observa coloración para los flavonoides en el extracto en todas las potencias empleadas; y de acuerdo con Pava (2016) los flavonoides tienen alta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos por formar algunas uniones entre proteínas solubles y extracelulares de la membrana bacteriana. Según lo descrito por Díaz Solares y col. (2015) en un estudio similar se reporta que en los extractos con etanol se puede observar una presencia mínima de coloración o nula de agrupamientos lactónicos. Los fenoles y/o taninos por otra parte, se reportan como coloraciones intensas, lo cual se puede observar en estos resultados.

Tabla 6. *Compuestos obtenidos por HPLC-MS.*

Muestra	Tiempo de retención (min)	Relación masa/carga (masa/carga)	Compuesto	Familia
Extracto acuoso	3.8	342	Ácido cafeico 4-O-glucósido	Ácidos hidroxicinámicos
	16.91	256.2	Pinocembrina	Flavonones
	28.65	371	Sesaminol	Lignanos
	32.23	372	Sinensetina	Metoxiflavonas
	36.97	597.3	Delfinidina 3-O-sambubiosido	Antocianinas

Análisis de compuestos bioactivos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas (HPLC-MS)

En la **Tabla 6** se observa que los compuestos bioactivos expresados son en su mayoría compuestos de la familia de los flavonoides. Bajkacz y col., (2018), reportan que los compuestos fenólicos, como los flavonoides tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes.

Conclusiones

Los mejores rendimientos de los extractos de *Rosa gallica* se obtuvieron por microondas a una potencia de 700 W y tiempo de 3 minutos. Por otro lado, en los análisis fitoquímicos cualitativos de *Rosa gallica* se muestra que existe variedad de compuestos bioactivos de interés, entre ellos, de la familia de los flavonoides, esto se confirma mediante el análisis de HPLC-MS. Los compuestos bioactivos obtenidos permitirán seguir con ciertos estudios, como es la evaluación del efecto inhibitorio sobre ciertas cepas de la cavidad bucal causantes de enfermedades.

Referencias

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Villareal, C. F., Soares, M. B. P., De Queiroz, L. P., & Aguiar, R. M. (2012). Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). *Quimica Nova*, 35: 1137–1140. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600013>

Bajkacz, S., Baranowska, I., Buszewski, B., Kowalski, B., & Ligor, M. (2018). Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method. *Food Analytical Methods*, 11: 3563–3575. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1332-9>

Carvajal-Rojas, L., Hata-Uribe, Y., Sierra-Martinez, N., & Rueda-Niño, D. (2009). Preliminart phytochemical analisis of Cupatá (*Strycnos schultesiana krukoff*) stems and seeds. En *Revista Colombia Forestal* (Vol. 12, pp. 161–170).

Díaz Solares, M., Cazaña Martínez, Y., Pérez Hernández, Y., Valdivia Ávila, A., Prieto Abreu, M., & Lugo Morales, Y. (2015). Qualitative evaluation of secondary metabolites in extracts of *morus alba* L. (Mulberry) varieties and hybrids. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20: 358–366.

Guerra Corado, E. A. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. *Universidad De San Carlos De Guatemala*, 1: 55–60. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf

Jayasri, M. A., Mathew, L., & Radha, A. (2009). A report on the antioxidant activity of leaves and rhizomes of *Costus pictus* D . Don Plant material. *International Journal of Integrative Biology*, 5: 20–26. <https://pdfs.semanticscholar.org/9230/0a57a1ed6b21cf28faad83e72211f9508e92.pdf>

Koczka, N., Stefanovits, B., & Ombódi, A. (2018). Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some *Rosa* Species. *Medicines (MDPI)* 5030084 (Pp. 10). <https://doi.org/10.3390/medicines5030084>

Loredo, M., Hernandez, J., & Barragan, B. (2017). Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (*stenocereus stellatus*) aplicando prettratamientos con microondas, ultrasonido y enzimaticos. *Redalyc*, 51: 135–151.

Mao, Y., Robinson, J., & Binner, E. (2021). Understanding heat and mass transfer processes during microwave- assisted and conventional solvent extraction. *Chemical Engineering Science*, 233: 116418 (Pp. 13). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.116418>

Ochir, S., Ishii, K., Park, B., Matsuta, T., Nishizawa, M., Kanazawa, T., Funaki, M., & Yamagishi, T. (2010). Botanical origin of Mei-gui Hua (petal of a *Rosa* species). *Journal of Natural Medicines*, 64: 409–416. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0422-9>

Ochir, S., Yuki, T., Kanazawa, T., Nishizawa, M., & Yamagishi, T. (2013). Two galloylated

flavonoids as antioxidants in rosa gallica petals. *Chemistry of Natural Compounds*, 49: 940–942.
<https://doi.org/10.1007/s10600-013-0787-6>

Pava-Angel, T. (2016). Actividad Antimicrobiana de extracto vegetal. *Enfásis Alimentación*, Año XXIX (9): 44-47. <http://es.calameo.com/read/001393942186baecd251e>

Puertas, M., Ríos, Y., & Rojano, B. (2013). Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L .) de alto consumo en Antioquia- Determination of anthocyanins by microwave assisted extraction in beans (*Phaseolus vulgaris* L .) comm. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18: 288–297.

Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1720–1731). <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>

Rosales, C., Arnáez, E., Moreira, I., Garro, G., Agüero, A., Jiménez, K., Abdelnour, A., & Calvo, L. (2019). Investigaciones en plantas con potencial bioactivo Investigations on plants with bioactive potential. *Tecnología en Marcha (CIB)*, 32: 12–21.

Rubio, J., (2018). “Extracción de compuestos bioactivos mediante pre- tratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas. Valorización del raspón de la uva.” Tesis de Grado. Tutoras: Rodríguez, S. & Romero, R. *Universidad de Valladolid*, Pp. 75.

Santiago, Y., Hernández, A., López, C., Garrido, J., Alatorre, J., & Monroy, R. (2019). Importancia nutricional y actividad biológica de los compuestos bioactivos de quelites consumidos en México. *Revista Chilena de Nutrición*, 46: 593–605.

Segura, E., Alejandra, I., & José, L. (2015). Effect of *Carya illinoensis*, *Quercus rubra* and *Smilax glycyphylla* extracts , pectin , and papain on the dental biofilm microorganisms. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 3: 118-129.

Song, Y., Lim, W., Han, A., Lee, M., Shin, E. J., Lee, K., Nam, T., & Lim, T. (2020). Rose Petal Extract (*Rosa gallica*) Exerts Skin Whitening and Anti-Skin Wrinkle Effects. *Journal of Medicinal Food*, 23: 1–9. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.4705>

Soto Vásquez, M. R. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. In *Crescendo, Institucional*, 6: 33-43. <https://doi.org/10.21895/incres.2015.v6n1.04>

Valdés, R. (2017). Desarrollo de un producto biotecnológico con aplicación inhibitoria para bacterias fitopatógenas del cultivo de tomate. *ABA Journal*, 102(4), 24–25

Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Aguilar-Zárate, P., Cruz, K., Reyes-Luna, C., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2017). Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies. In *Ingredients Extraction by Physico-Chemical Methods in Food*. Cap. 5. 259-252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00005-3>