



XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



CyTAL[®]-ALACCTA 2019



20 al 22 de Noviembre de 2019
Universidad Católica Argentina
Sede Puerto Madero
Buenos Aires - Argentina



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES A PARTIR DE ESPECIES SILVESTRES ASISTIDA POR ENZIMAS CARBOHIDROLASAS

B. Leclercq¹, O. B. Micheloni¹, A. Gallo², A. E. Farroni³

*1 Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional del Noroeste de la
Provincia de Buenos Aires, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.*

*2 Universidad Nacional de Luján, Cátedra de Introducción a la Ingeniería en Alimentos
Luján, Buenos Aires, Argentina*

*3 Laboratorio de Calidad de Alimentos Suelos y Aguas. EEA Pergamino. INTA. Av.
Fronidizi Km 4,5 Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
e-mail: farroni.abel@inta.gob.ar*

RESUMEN

La utilización de enzimas carbohidrolasas es una metodología innovadora para la obtención de compuestos activos en extractos vegetales. Estas enzimas tienen un rango óptimo de temperatura entre 25-55 °C y actúan disgregando la pared celular vegetal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la obtención de extractos vegetales con actividad biológica, comparando el uso de enzimas y diferentes temperaturas. Las especies *Dipsacus fullonum* (DF) y *Lantana cámara* (LC) se recolectaron, secaron por liofilización y trituraron. Se realizaron extracciones utilizando un complejo enzimático pectinasa-hemicelulasa a pH 4 a 25 °C y 40 °C durante 1 h. Se determinó la cantidad de sólidos solubles por refractometría expresándolos como °Brix, masa seca, polifenoles totales y actividad antioxidante. Se realizó una caracterización cualitativa por autografía para inhibidores de polifenol oxidasa y ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid). El uso de enzimas en la extracción produjo un aumento de la masa total de extracto obtenido (499±45 mg vs 710±45 mg) y los sólidos disueltos (2,7±0,2 vs 3,7±0,2) (promedio ambas temperaturas) respecto del control en ambas especies. Los sólidos disueltos sólo presentaron efecto de la temperatura en DF (3,5±0,6 a 25°C vs 3,9±0,7 a 40°C). La cantidad de polifenoles (13,8±0,5 vs 10,3±0,2 para DF y 14±1 vs 9,2±0,9 para LC) y actividad antirradicalaria (7,7±0,9 vs 5,4±0,5 para DF y 3,5±0,9 vs 2,3±0,2 para LC) aumentaron al utilizar enzimas. La extracción asistida podría realizarse a 25° C sin una reducción importante en el rendimiento. La autografía de ABTS⁺ mostró la aparición de nuevos compuestos con capacidad antioxidantes luego de la extracción con enzimas. La autografía de polifenol oxidasa (PPO) reveló que todos los extractos de DF (tratados con enzimas y controles) mostraron actividad inhibidora de PPO.

Palabras claves: extracción asistida enzimas, autografía, pardeamiento enzimático, antioxidantes

1. Introducción

Muchas especies vegetales silvestres que crecen en los terrenos y banquinas de la región del noroeste de la provincia de Buenos Aires son consideradas malezas. Sin embargo, algunas de ellas fueron utilizadas por diferentes culturas como alimentos (Rapoport E. y col., 2009). Se ha reportado que algunas especies silvestres tienen proporciones significativamente mayores de metabolitos (Odhav B., 2007; Flyman M. y Afolayan A., 2006) y son más ricas en fibras y compuestos con actividad antioxidante (Schmeda-Hirschmann G., 2005) que las especies cultivadas, lo que las hace candidatas interesantes para la búsqueda de extractos con actividad biológica aplicable a la industria de los alimentos.

La incorporación a las técnicas extractivas de enzimas carbohidrolasas que favorecen la disrupción de la pared celular vegetal mejoran la extracción de los metabolitos secundarios y por lo tanto permiten un aumento de la actividad biológica de la mezcla. Estas enzimas tienen un rango óptimo de temperatura entre 25-55 °C. Sin embargo, lograr extractos asistidos por enzimas a temperatura ambiente con interesante actividad biológica es un desafío poco explorado que permitirá disminuir los costos de la industria de alimentos y realizar prácticas productivas amigables con el medio ambiente.

En la última década los consumidores han incrementado la demanda de vegetales y frutas frescas, como consecuencia del aumento en su calidad de vida y de las evidencias médicas que relacionan un consumo regular de estos alimentos con una disminución en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas (Vinson J. y col., 2001, Ghasemzadeh A. y col., 2010; Astley S., 2003). Esta tendencia mundial de consumo ha producido un incremento en la producción de cortes frescos vegetales, sin embargo durante el almacenamiento se producen reacciones que modifican el aspecto y la calidad de estos impactando negativamente sobre la comercialización y la aceptación. Una de estas reacciones es el pardeamiento enzimático que genera un oscurecimiento indeseable en la superficie. En esta reacción participa la enzima polifenoloxidasas (PPO) y su acción es muy relevante en términos de calidad de frutos y vegetales mínimamente procesados (Jang J. y Moon K., 2011).

Las técnicas autográficas sobre placas cromatográficas son de gran utilidad para el estudio de nuevas mezclas naturales con actividad biológica ya que presentan la posibilidad de realizar ensayos de screening y separación preliminar (Dewanjee S. y col., 2014). En los últimos tiempos se han desarrollado varias autografías para la búsqueda de inhibidores de diferentes enzimas (Ramallo, y col 2015; Rhee, y col, 2001; Ramallo, y col, 2006; Ramallo, y col 2012; Salazar & Furlan, 2007; Salazar, y col, 2011; Hassan,

2012; García & Furlan, 2015; Wangthong, y col, 2007 y Micheloni O y col 2018).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la obtención de extractos vegetales con actividad biológica, comparando el uso de enzimas y diferentes temperaturas.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico se compraron en Biopack, Bs. As., Argentina. Polivinilpolipirrolidona (PPVP), Vizcozyme L., 3-metil-2-benzothiazolinona hidrazona (MBTH), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), catecol, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) fueron comprados en Sigma (St Louis, MO, USA). L-DOPA fue comprador en Saporiti (Buenos Aires, Argentina). Ácido ascórbico, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, etanol, fueron comprados en Cicarelli (Rosario, Argentina). Placas de sílica gel 60 F254 para cromatografía en capa delgada (CCD) marca en Merck (Darmstadt, Germany). Agarosa fue comprada en Biodynamics (Buenos Aires, Argentina). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

2.2. Material vegetal

Se recolectaron las partes aéreas de las especies de las especies *Dipsacus fullonum* (DF) y *Lantana cámara* (LC). Un ejemplar fue determinado botánicamente y depositado como *voucher specimen* en el herbario de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Rosario. El resto del material vegetal fue secado por liofilización, triturado en un molino tipo Wiley con malla de 2 mm y almacenado en bolsas plásticas a -25 °C hasta su utilización.

2.3. Preparación de extractos. Determinación de °Brix y masa total

Para realizar la extracción 1.5 gr de material vegetal fueron suspendidos en 30 mL de buffer citrato/cítrico a pH=4. Posteriormente se agregaron 40 uL de Viscozyme L y la mezcla se mantuvo durante una hora a dos temperaturas diferentes (25 y 40°C). Para cada especie y temperatura se realizó un control sin el agregado de enzima. Al finalizar el tiempo de extracción se inactivo la enzima con el agregado hidróxido de sodio 10N hasta alcanzar pH 8. Los extractos obtenidos se filtraron y se determinó la cantidad de sólidos solubles por refractometría expresándolos como °Brix. Posteriormente las soluciones fueron liofilizadas y se registró la masa seca del extracto.

2.4. Determinación de polifenoles totales.

El contenido de fenoles totales se determinó utilizando la técnica de Folin-

Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar. A 2,4 mL de solución acuosa de extracto (25 mg/mL) se agregó 0,20 mL de reactivo de Folin. Luego de 5 minutos se agregó 2,4 mL de carbonato de sodio al 10%. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 30 minutos y se registró la absorbancia de esta a 760 nm usando un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por g de material vegetal liofilizado.

2.5. Determinación de actividad captadora de radicales libres

La capacidad captadora de radicales libres fue determinada mediante el método de DPPH utilizando ácido ascórbico como estándar. Brevemente, se utilizó una solución formada por 985 μ L de solución de DPPH (3%) en etanol y 15 μ L de extracto a una concentración de 25 mg/mL. Se incubó durante 25 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se centrifugó en un mini spin durante 5 minutos. Posteriormente se registró la absorbancia a 518 nm para medir la concentración de DPPH remanente. Los resultados se expresaron como gramo de ácido ascórbico por gramo de material vegetal liofilizado

2.6. Autografía para inhibidores de PPO

Se realizó un *screening* autográfico para detectar extractos con capacidad inhibitoria de la enzima polifenoloxidasas. Se utilizó el procedimiento descrito por Micheloni y col, (2018). Brevemente la enzima PPO se extrajo de manzanas en medio buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6,8 y se agregó Polivinilpolipirrolidona (PPVP) a una concentración final del 4%. La actividad de la polifenol oxidasa se midió espectrofotométricamente utilizando catecol 0,2 M como sustrato y registrando la absorbancia a 420 nm de forma continua durante 2 minutos (Zauberman et al., 1991). Una unidad enzimática (U) de actividad de PPO se definió como un aumento de la absorbancia a 420 nm por 0.001/min. Se realizó un ensayo por puntos sobre placas de CCD sembrando 500 μ g de extracto y cubriendo con una solución de tinción en agar compuesta por 1,05 mg de agar y 10 μ g de MBTH disueltos en 0,13 mL de buffer de fosfato pH 6,8 (80 °C) a la que se agregaron 20 μ L de 15 mM de solución acuosa de L-DOPA. La solución de agar se enfrió a 45 ° C, se agregaron 2,71 μ L de PPO (4.0 U). Luego de incubar 1 hora en cámara húmeda las zonas de inhibición se observaron como una mancha clara sobre un fondo color rojizo. Todas las cantidades de la autografía de esta sección se expresaron por cm^2 .

2.7. Cromatografía y autografía ABTS

Se realizó un análisis de detección de compuestos captadores de radicales libres previa

separación por CCD. La solución de tinción fue preparada de acuerdo a Zampini, I. y col 2010 con algunas modificaciones. El catión radical (ABTS⁺) se generó mezclando 36 mg de ABTS y 6 mg de persulfato de potasio en 10 mL de agua con agitación y en la oscuridad durante 16 h. Luego se disolvieron 1.05 mg de agar en 0,15 mL de agua a 80 °C, la solución se enfrió a 45 °C y se agregaron 2 µL de la solución de ABTS⁺ (cantidades expresadas por cm²). Los extractos se corrieron sembrando 50 µg en placas de CCD de 21 cm² utilizando acetonitrilo: agua (90:10) y posteriormente se vertió uniformemente 3,2 mL de la solución de tinción de ABTS⁺ sobre la placa. Los compuestos antioxidantes se observaron como una mancha clara sobre un fondo azul. Además las placas se revelaron utilizando luz UV (254 y 356 nm).

2.8. Análisis de imágenes

Las imágenes de las CCD fueron digitalizadas utilizando una cámara Panasonic Lumix, modelo DMC-FH20 de 14 megapíxeles. La iluminación a 254 y 365 nm se realizó en una cámara oscura con lámpara UV marca UVP modelo UVLS-28 (2UV). Las autografías fueron fotografiadas en una cabina de igualación visual colorlux utilizando una lámpara D65.

2.9. Análisis estadísticos

Los resultados se analizaron utilizando análisis de varianza y test de Tukey para determinar diferencias significativas. Se utilizó el software InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3. Resultados y discusión

En la figura 1 (a) se observa los resultados de la masa total de extracto obtenida luego el agregado de Viscozyme L. Al comparar, en promedio, los extractos tratados con enzimas vs los controles se observó un aumento de la masa total de extracto obtenido (710±45 mg vs 499±45 mg). No se observó efecto significativo de la temperatura. La adición de enzimas pectinolíticas en la obtención de jugo de tres variedades de mora por prensado en frío aumento sustancialmente la extracción de jugo de esta fruta con respecto a los controles (Granada y col 2001). El uso de estas enzimas también aumento el rendimiento de extracción en manzanas (Nogueira y col., 2003). En la figura 1 (b) se observan los resultados de los sólidos totales disueltos expresados como °Brix. Cuando se analizaron los promedios para ambas especies se observó que la adición de enzimas aumentó significativamente la extracción de sólidos disueltos (3,66±0,23 vs. 2,66±0,23 °Brix) mientras que no se observó efecto de la

temperatura. Cuando se analizó el efecto en las especies por separado se observó que DF mostró mayor valor de sólidos totales a 25 °C mientras que LC lo hizo a 40 °C. La extracción asistida por enzimas también aumento aumentó los sólidos solubles totales del jugo de varias frutas en condiciones optimizadas (Vaidya D y col. 2009; Sagu S y col. 2014; Mieszczakoeska-Frac y col. 2012; Yusof S y col. 1994). El aumento de estos está relacionado con el mayor grado de desintegración de los tejidos vegetales que lleva a producir un aumento de liberación de compuestos de ocurrencia natural (Prerna y col, 2015).

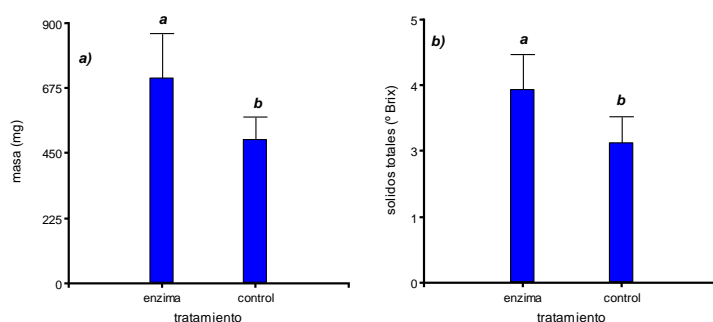


Figura 1: Masa de extracto seco (a) y sólidos totales expresados como °Brix (b) obtenidos por calentamiento con enzima comparado con el control sin enzima (promedio para ambas especies estudiadas). Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

En la figura 2 (a) se observan los valores obtenidos para polifenoles totales. Se obtuvo mayor cantidad de polifenoles en los extractos tratados con enzimas comparados con los extractos controles ($13,8 \pm 0,9$ vs. $9,7 \pm 0,9$). El efecto de la temperatura fue significativo pero la diferencia fue pequeña (11 ± 2 a 25° vs. 12 ± 2 a 40°). El agregado de pectinasas y celulasas al proceso de molienda de frutas en la preparación de jugos frutales aumento en un 90% la cantidad de compuestos fenólicos extraídos (Nogueira y col., 2003). Landbo y Meyer (2004) concluyeron que el rendimiento de extracción de antocianinas dependía de la cantidad de enzima agregada en el proceso de extracción, la temperatura y el tiempo del proceso de extracción.

Los valores de actividad antirradicalaria no presentaron diferencias significativas para tratamiento ni temperatura cuando se analizaron los promedios para ambas especies, por esto se decidió analizarlas por separado (figura 2 b). Ambas especies mostraron un aumento significativo de la recuperación de actividad captadora de DPPH al utilizar enzimas en la extracción. DF mostró mayor actividad antioxidante comparada con LC ($7,7 \pm 0,9$ para DF y $3,5 \pm 0,9$ para LC) cuando se utilizó enzima y en

el control. Mushtaq M y col 2015 reportaron que la extracción asistida por enzimas y fluidos supercríticos en piel de granada mejoraron significativamente la recuperación de capacidad antioxidante. El efecto de la temperatura fue significativo solo para el ensayo de DPPH y cuando las especies se analizaron por separado mostrando mayores valores a 40 °C.

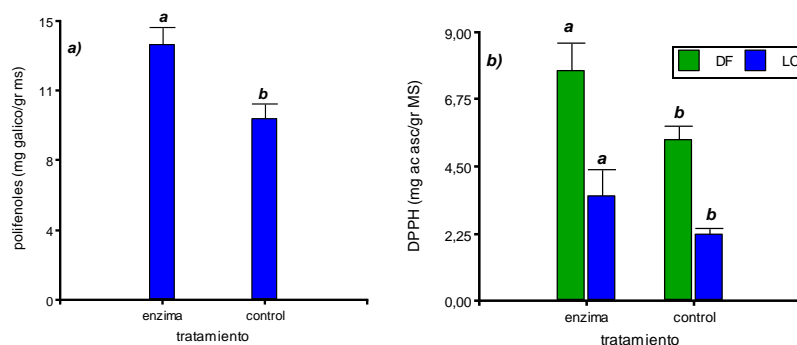


Figura 2: (a) Contenido de polifenoles promedio para ambas especies expresado como mg de ácido gálico por gr de materia seca. (b) y actividad antirradicalaria medida como captación de DPPH separada por especie (verde, DF; azul, LC) obtenidos por calentamiento con enzima comparado con el control sin enzima. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$) dentro de cada especie.

Con la finalidad de observar el efecto inhibitorio del pardeamiento enzimático, se realizó un estudio autográfico preliminar por puntos de los extractos obtenidos. Todos los extractos de DF mostraron un halo de inhibición en el screening, mientras que los extractos de LC no presentó efecto inhibitorio. En las condiciones propuestas la extracción asistida con enzimas y la temperatura no modificaron la presencia de los compuestos inhibidores del pardeamiento enzimático.

En la figura 3 y 4 se pueden observar los resultados de la autografía de $ABTS^+$ luego de desarrollar las placas de CCD con acetonitrilo: agua (90:10). Cuando los extractos de DF (figura 3) se revelaron a 365 nm se observó la desaparición de compuestos de Rf 0.6 (indicado con un ovalo, calle 1 y 3) en los extractos tratados con enzimas a 25 y 40 °C. Esto sugiere que estos compuestos fueron hidrolizados por Vizcozyme L.

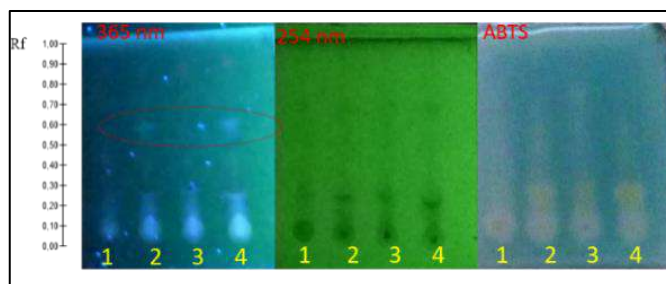


Figura 3: Cromatografías obtenidas sembrando 50 ug se extracto de DF, eluidas con acetonitrilo: agua (90:10) y reveladas bajo diferentes condiciones. Extractos asistidos por enzimas (calle 1 a 25 °C y 3 a 40 °C) sus respectivos controles (calle 2 y 4).

En la figura 4 se puede observar los resultados de los extractos de la especie LC. Los extractos obtenidos por tratamiento con Viscozyme L., permitieron visualizar compuestos captadores de $ABTS^+$ con Rf 0.8 (calle 1 y 3, zona amarilla) los cuales no estaban presentes en los controles a 25 y a 40 °C (calle 2 y 4, zona amarilla) lo que sugiere que el tratamiento enzimático modificó la composición química del extracto original. Lopez y col 2007; Salazar M y col 2009; Mendez L. 2010; Ramallo A y col 2011; Ramallo y col 2012; Garcia y col 2016) reportaron que se puede generar nueva actividad biológica por alteración en la composición química de las mezclas naturales tratando extractos inactivos con diferentes reactivos químicos. Además, la autografía de $ABTS^+$ evidenció la presencia de compuestos con actividad antirradicalaria que no son visibles bajo luz ultravioleta (indicados con rojo en la figura 4).

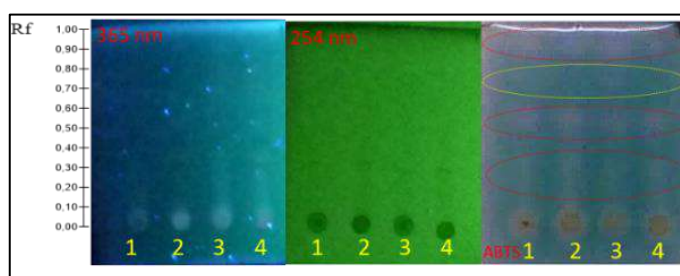


Figura 5: Placas cromatográficas obtenidas sembrando 50 ug se extracto de LC, eluidas con acetonitrilo: agua (90:10) y reveladas bajo diferentes condiciones. Extractos asistidos por enzimas (calle 1 a 25 °C y 3 a 40 °C) sus respectivos controles (calle 2 y 4).

4. Conclusiones

La extracción asistida por enzima aumentó los sólidos disueltos totales, masa, polifenoles y actividad antioxidante de ambas especies. El efecto de la temperatura no fue significativo para solidos disueltos, masa y actividad antirradicalaria, lo que

sugiere que podría trabajarse a 25° C sin una reducción importante en el rendimiento, lo que facilita el proceso y genera ahorro energético. La especie DF presentó capacidad inhibitoria de PPO independientemente del tratamiento utilizado. La autografía de ABTS⁺ reveló que, para la especie LC, la utilización de enzimas carbohidralasas generó un extracto de composición química diferente al original con mayor capacidad antioxidante. Es interesante ampliar los estudios para identificar los compuestos nuevos con capacidad antioxidante cuantificar su actividad.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires e INTA PNAIyAV 1130043.

Referencias

- Astley S. (2003). Dietary antioxidants—past, present and future? *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 93-98.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75-84.
- Flyman M. and Afolayan A. (2006). The suitability of wild vegetables for alleviating human dietary deficiencies. *South African Journal of Botany*, 72(4), 492-497.
- García, P., Salazar, M. O., Ramallo, I. A., & Furlan, R. L. (2016). A new fluorinated tyrosinase inhibitor from a chemically engineered essential oil. *ACS combinatorial science*, 18(6), 283-286.
- García, P., & Furlan, R. L. E. (2015). Multiresponse optimization applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26(4), 287-292.
- Ghasemzadeh A., Jaafar, H., Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15(6), 4324-4333
- Granada, G.L., Vendruscolo, J.L., Treptow, R.O., 2001. Caracterizacáo química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp L.). *Current Agricultural Science and Technology*, 7(2).
- Hassan, A. M. S. (2012). TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 23(4), 405-407.
- Jang J. and Moon K. (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124(2), 444-449.
- Landbo, A.K., Meyer, A.S., 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 503513.
- López, S. N., Ramallo, I. A., Sierra, M. G., Zacchino, S. A., & Furlan, R. L. (2007). Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 441-444.
- Méndez, L., Salazar, M.O., Ramallo, I.A. y Furlán R.L.E. Brominated extracts as source of bioactive compounds. *ACS combinatorial science*, 2010, 13(2), 200-204.
- Mieszczakowska-Fraç, M., Markowski, J., Zbrzeźniak, M., & Płocharski, W. (2012). Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 251-256.

- Michelsoni, O. B., Farroni, A. E., García, P., & Furlan, R. L. (2018). Rapid autographic method for detection of enzymatic browning inhibitors based on enzyme immobilization. *Food chemistry*, 269, 638-643.
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.
- Nogueira, A., Santos, L. D., Wiecheteck, F. V. B., Guyot, S., & Wosiacki, G. (2009). Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. *Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, 9(3).
- Odhav B., Beekrum S., Akula U. and Baijnath H. (2007). Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 430-435.
- Prerna, N., Eldho, V., Charanjit, K., 2015. Optimisation of enzymatic maceration for extraction of carotenoids and total phenolics from sweet pepper using surface response methodology. *Indian Journal of Horticulture*, 72 (4), 547552.
- Ramallo, I. A., Zacchino, S. A., & Furlan, R. L. E. (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*, 17(1), 15–19.
- Ramallo, I. A., Salazar, M. O., Mendez, L., & Furlan, R. L. (2011). Chemically engineered extracts: source of bioactive compounds. *Accounts of chemical research*, 44(4), 241-250.
- Ramallo, I. A., Sierra, M. G., & Furlan, R. L. (2012). Discovery of β -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, 8(1), 112-117.
- Ramallo, I. A., Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2015). Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26(6), 404–412.
- Rapoport, E. H., Marzocca, A., & Drausal, B. S. (2009). Malezas comestibles del cono sur: y otras partes del planeta (No. 635.1/. 8). INTA.
- Rhee, I. K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1–2), 217–223
- Sagu, S.T., Nso, E.J., Karmakar, S., De, S., 2014. Optimization of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. *Food Chemistry*. 151, 182190.
- Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18(3), 209–212.
- Salazar, M. O., Michelsoni, O., Escalante, A. M., & Furlan, R. L. E. (2011). Discovery of a β - glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15(3), 713–719.
- Salazar, M. O., Ramallo, I. A., Michelsoni, O., Sierra, M. G., & Furlan, R. L. (2009). Chemically engineered extracts: Bioactivity alteration through sulfonylation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(17), 5067-5070.
- Schmeda-Hirschmann G., Feresin G., Tapia A., Hilgert N. and Theoduloz C. (2005). Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentinian Yungas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(8), 1357-1364.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Vaidya, D., Vaidya, M., Sharma, S., Ghanshayam, V., 2009. Enzymatic treatment for juice extraction and preparation and preliminary evaluation of Kiwifruits wine. *Natural Product Radiance* 8 (4), 380385.
- Vinson J., Su X., Zubik L., y Bose P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49(11), 5315-5321.
- Yusof, S., Ibrahim, N., 1994. Quality of sensory juice after pectinase enzyme treatment. *Food Chemistry*. 51, 8388.
- Wangthong, S., Tonsiripakdee, I., Monhaphol, T., Nonhabenjawan, R., & Wanichwecharungruang, S. P. (2007). Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomedical Chromatography*, 21(1), 94–100.

- Wu J., Cheng K., Li E., Mingfu W. and Ye W. (2008). Antibrowning activity of MRPs in enzyme and fresh-cut apple slice models. *Food Chemistry*, 109, 379–385.
- Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I., & Fuchs, Y. (1991). Postharvest retention of the red colour of litchi fruit pericarp. *Scientia Horticulturae*, 47(1–2), 89–97.
- Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS^{•+} immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1159-1163.