



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

TESIS

**EFFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICO DE LOS
COMPUESTOS VOLÁTILES DEL HIDROLATO DE TALLOS Y
HOJAS DE *Verbesina sphaerocephala* (ASTERACEAE)**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

BIOL. YOLANDA AGUILAR MEJIA

Director de Tesis

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán; Agosto 2023

OFICIO DE FIRMAS ACEPTACIÓN TESIS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia.

Proyecto financiado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH



LAB. DE BIOTECNOLOGIA
VEGETAL

DEDICATORIA

Para mis amados padres, quienes con su infinito cariño me han guiado hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mi director de tesis, el Dr. Rafael Salgado Garciglia por brindarme la oportunidad y las herramientas necesarias para realizar esta investigación. Agradezco toda la ayuda y conocimiento compartido durante estos años.

A los miembros del comité sinodal conformado por la Dra. Patricia Ríos Chávez, la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, la Dra. Martha Estrella García y el Dr. José Roberto Medina Medrano, por sus aportaciones para mejorar esta investigación, en especial al Dr. José Roberto por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio.

Agradezco especialmente a mis padres Yolanda Mejía y Javier Aguilar por todo su esfuerzo para ayudarme a salir adelante, son mi mayor motivación y ejemplo a seguir. Gracias por su confianza, sus palabras de ánimo y sus abrazos cuando más lo necesito, son lo mejor que tengo en la vida, los amo. Gracias a mi hermana Nadia por ser siempre mi confidente y mi mejor amiga, a Eder y José Carlos por ser tan buenos hermanos y cuidarme.

A Diego por ser mi fortaleza y estar conmigo cuando más lo necesito. Gracias por todo el apoyo, la motivación para continuar y por todo el cariño que me has brindado durante tanto tiempo, eres muy especial en mi vida.

A mi gatita Shiro, por acompañarme en mis noches de desvelo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal; a mi buena amiga Solecito, Erika, Rodrigo y Miguel.

A Karina, Christian y Agustín por su amistad y ser los mejores y más divertidos compañeros de posgrado, pero en especial agradezco a Kathia por todo el apoyo durante la parte experimental y conocimientos compartidos, por ser una excelente amiga y apoyarme hasta en los momentos más difíciles.

A la Dra. Alejandra Hernández García, responsable del laboratorio de Biotecnología Vegetal por su apoyo y aportaciones para mejorar.

A la Bióloga Yolanda García por la realización del análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Hongos fitopatógenos de importancia agrícola	4
2.1.1. <i>Botrytis cinerea</i> Persoon: Fries	5
2.1.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc.	6
2.1.3. <i>Fusarium oxysporum f.sp. fragariae</i>	8
2.2. Antifúngicos de origen vegetal.....	9
2.3. Aceites esenciales e hidrolatos con actividad antifúngica y antioxidante.....	12
2.3.1. Terpenos con actividad antifúngica y antioxidante	15
2.3.2. Relación entre la actividad antioxidante, pro-oxidante y antifúngica	18
2.4. <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	26
5.1.1. Objetivos específicos.....	26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1. Capítulo I. Determinación de la actividad antifúngica, antioxidante y del contenido de compuestos totales de los hidrolatos de hoja y de tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	28
Resumen.....	28
Introducción	29
Materiales y Métodos	31
Resultados y discusión.....	38
Conclusiones	50
Literatura citada.....	51
7.2. Capítulo II. Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> con mayor actividad antifúngica y antioxidante.	54
Resumen.....	54
Introducción	56
Materiales y métodos	57

Resultados y discusión.....	63
Conclusiones	78
Literatura citada.....	79
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	81
8.1. Actividad antifúngica de hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	81
8.2. Actividad antioxidante de hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	82
8.3. Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	84
8.4. Identificación y contenido de compuestos volátiles de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	86
9. CONCLUSIÓN GENERAL	89
10. LITERATURA CITADA GENERAL.....	90

Cuadro 1. Productos fungicidas elaborados con compuestos de origen vegetal.....	11
Cuadro 2. Hidrolatos y sus compuestos mayoritarios con actividad antioxidante y antifúngica de la familia Asteraceae	17
Cuadro 3. Valores de IC ₅₀ e IC ₁₀₀ de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> , en hongos fitopatógenos	41
Cuadro 4. Valores de actividad antioxidante de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> por los métodos FRAPy TAC	48
Cuadro 5. Contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	49
Cuadro 6. Principales compuestos identificados de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i> obtenidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas	66
Cuadro 7. Valores de IIC ₅₀ e IC ₁₀₀ de las fracciones de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> sobre el hongo <i>B. cinerea</i>	69
Cuadro 8. Correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de las fracciones del hidrolato de hoja, con la actividad antioxidante por los métodos DPPH*, ABTS ⁺ , TAC y FRAP y la actividad antifúngica contra <i>B. cinerea</i>	75
Cuadro 9. Correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de las fracciones del hidrolato de tallo, con la actividad antioxidante por los métodos DPPH*, ABTS ⁺ , TAC y FRAP y la actividad antifúngica contra <i>B. cinerea</i>	76
Cuadro 10. Principales compuestos identificados de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i> por cromatografía de gases-espectrometría de masas, de las fracciones metanólica, acetato de etilo y hexánica.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> bajo cultivo <i>in vitro</i>	6
Figura 2. Crecimiento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> bajo cultivo <i>in vitro</i> (Fotografías propias).	7
Figura 3. Crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. fragariae en cultivo <i>in vitro</i>	8
Figura 4. Efecto intracelular de agentes antioxidantes y pro-oxidantes	19
Figura 5. Planta de <i>Verbesina sphaerocephala</i> y sus partes.....	22
Figura 6. Ejemplar herborizado de <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray	31
Figura 7. Proceso de obtención de los hidrolatos apartir de hojas y tallos de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	32
Figura 8. Ensayos antifungicos <i>in vitro</i> de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> sobre <i>F. oxysporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i>	39
Figura 9. Crecimiento del micelio en <i>F. oxysporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> con diferentes concentraciones del hidrolato de hoja de <i>V. sphaerocephala</i>	40
Figura 10. Crecimiento del micelio en <i>F. oxysporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> con diferentes concentraciones del hidrolato de tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	41
Figura 11. Porcentajes de inhibición y curvas de concentraciones del hidrolato de hoja de <i>V. sphaerocephala</i> para la determinación de IC ₅₀ y IC ₁₀₀ sobre los hongos <i>F. oxysporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i>	42
Figura 12. Porcentajes de inhibición y la curva de concentraciones del hidrolato de tallo de <i>V. sphaerocephala</i> para la determinación de IC ₅₀ y IC ₁₀₀ sobre los hongos <i>F. oxysporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i>	43
Figura 13. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>B. cinerea</i> con la aplicación de los hidrolatos de tallo y hoja de <i>V. sphaerocephala</i>	46
Figura 14. Porcentajes de la actividad antioxidante de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i> , determinados por el método DPPH* y ABTS**	47
Figura 15. Cromatogramas de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> obtenidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas.....	65
Figura 16. Porcentajes de inhibición y curvas de concentraciones de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> para la determinación de IC ₅₀ y IC ₁₀₀ sobre el hongo <i>B. cinerea</i>	68
Figura 17. Crecimiento de micelio en <i>B. cinerea</i> , con las diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo de hoja, la fracción de hexano de hoja y la fracción de acetato de etilo de tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	69
Figura 18. Porcentajes de la actividad antioxidante de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> , determinados por el método DPPH* y ABTS**	71
Figura 19. Actividad antioxidante de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i> , determinados por el método FRAP y TAC	72
Figura 20. Contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales, en las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de <i>V. sphaerocephala</i>	74

RESUMEN

Verbesina sphaerocephala A. Gray (Asteraceae) es una planta endémica de México, que contiene compuestos fenólicos y terpénicos, con actividad tanto antifúngica como antioxidante, pero se desconocen dichas propiedades en los hidrolatos de hojas y tallos. En la presente investigación, se obtuvieron hidrolatos por hidrodestilación en un equipo Clevenger tanto de hoja como de tallo para evaluar la actividad antifúngica sobre los hongos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. Además, se evaluó la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH^{*}, ABTS^{**}, FRAP y TAC; y se determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides. Posteriormente, se identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles por CG-EM de ambos hidrolatos y de tres fracciones (metanólica, de acetato de etilo y hexánica), obtenidas por bipartición líquido-líquido. Los rendimientos obtenidos fueron de 1.49 g (peso fresco) y 0.21 g (peso fresco), en hoja y tallo, respectivamente. Se constató un 100 % de inhibición sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* con la aplicación de 10 mg/mL tanto del hidrolato de hoja como de tallo, los que ejercieron un 40 % y 50 % de inhibición sobre *F. oxysporum*, respectivamente. *B. cinerea* resultó ser más sensible al hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* con un valor de IC₅₀ e IC₁₀₀ de 1.3 mg/mL y 2.7 mg/mL, respectivamente. La mayor actividad antioxidante se obtuvo en el hidrolato de hoja, mostrando los valores más altos en DPPH^{*} (73 %) y ABTS^{**} (71 %), así como con los métodos de FRAP y TAC. Así mismo, el hidrolato de hoja presentó el mayor contenido de fenoles, flavonoides y terpenos en comparación con el hidrolato de tallo. La mayor actividad antioxidante se obtuvo en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja con los métodos utilizados (DPPH^{*}, 44 %; TAC, 47 mg AG/mL; FRAP, 33.7 mg AA/mL). Con respecto a ABTS^{**} hubo diferencias significativas entre las tres fracciones, sin embargo, las tres fracciones obtuvieron porcentajes de inhibición más altos comparados con las fracciones del hidrolato de tallo. Aunque las tres fracciones inhibieron el crecimiento de *B. cinerea*, la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo presentó los valores más bajos de IC₅₀ (3 mg/mL) y de IC₁₀₀ (5.4 mg/mL). Del mismo modo, las fracciones acetato de etilo y metanol, del hidrolato de hoja fueron también consideradas efectivas. La fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos mostraron el contenido más importante de fenoles totales y de flavonoides, mientras que la fracción hexánica mostró el mayor contenido de terpenos totales. La caracterización química por CG-EM, mostró diferencias en el contenido y composición de los principales compuestos volátiles de ambos hidrolatos. En el hidrolato de hoja, los volátiles mayoritarios son el nerolidol (12.89 %), isoledeno (15.18 %), santonina (10.58 %), humuleno (10.09 %) y ambrosina (20.66 %). En el hidrolato de tallo, los compuestos mayoritarios son santonina (8.78 %), humuleno (9.02 %), ledeno (10.24 %), damsina (10.82 %) y ambrosina (20.22 %). En la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja se determinaron como compuestos mayoritarios el metileugenol, el canfeno, el timol, el nerolidol, el isoledeno, β-bisabolol, el espatulenol y el ledeno. El nerolidol, el cariofileno, el isoledeno, el α-santalol, el β-bisabolol, el espatulenol, la santonina, el humuleno, el ledeno, la ambrosina y la damsina, también se presentaron en el hidrolato de tallo. Estos resultados demuestran que la mayor actividad antioxidante se debe al alto contenido de fenoles y compuestos terpénicos determinado en el hidrolato de hoja; sin encontrar una relación directa con la alta actividad antifúngica del hidrolato de tallo sobre *B. cinerea*. La fracción de acetato de etilo tanto de hoja como de tallo mostró la mayor actividad antioxidante y el mayor contenido de compuestos fenólicos que se relacionó con la actividad antioxidante.

Palabras Clave: Antifúngicos, antioxidantes, compuestos volátiles, hidrolatos, *Verbesina sphaerocephala*

ABSTRACT

Verbesina sphaerocephala A. Gray (Asteraceae) is an endemic plant to Mexico, which contains phenolic and terpene compounds, with both antifungal and antioxidant activity, but these properties are unknown in the hydrolates of leaves and stems. In this investigation, hydrosols from the leaf and the stems were obtained by hydrodistillation in a Clevenger equipment, to evaluate the antifungal activity against the fungi *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. In addition, the antioxidant activity was evaluated using the DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, and TAC assays; and the total content of phenolic acids, flavonoids and terpenoids was determined. Subsequently, the volatile compounds were identified and quantified by GC-MS in both hydrosols and their three fractions (methanol, ethyl acetate and hexanic), obtained by liquid-liquid partitioning. The obtained yields were 1.49 g (fresh weight) and 0.21 g (fresh weight), in leaf and stem, respectively. A 100 % inhibition was found on *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* with the application of 10 mg/mL of both leaf and stem hydrosols, which exerted 40 % and 50 % inhibition on *F. oxysporum*, respectively. *B. cinerea* was determined to be more sensitive against *V. sphaerocephala* stem hydrosol with an IC₅₀ and IC₁₀₀ value of 1.3 mg/mL and 2.7 mg/mL, respectively. The highest antioxidant activity was obtained in the leaf hydrosol, showing the highest values in DPPH[•] (73 %) and ABTS^{•+} (71 %), as well as with the FRAP and TAC methods. Likewise, the leaf hydrosol had the highest content of phenols, flavonoids and terpenes compared to the stem hydrosol. The highest antioxidant activity was obtained in the ethyl acetate fraction of the leaf hydrosol with the methods used (DPPH[•], 44 %; TAC, 47 mg AG/mL; FRAP, 33.7 mg AA/mL). Regarding ABTS^{•+} method there were significant differences between the three fractions, however, the three fractions showed higher inhibition percentages compared to the stem hydrosol fractions. Although the three fractions inhibited the growth of *B. cinerea*, the ethyl acetate fraction from the stem hydrosol exhibited the lowest IC₅₀ (3 mg/mL) and IC₁₀₀ (5.4 mg/mL) values. Similarly, the ethyl acetate and methanol fractions of the leaf hydrosol were also considered effective. The ethyl acetate fraction of both hydrosols showed the highest content of total phenols and flavonoids, while the hexanic fraction showed the highest content of total terpenes. The chemical characterization by GC-MS, showed differences in the content and composition of the main volatile compounds contained in of both hydrosols. In the leaf hydrosol, the major volatiles are nerolidol (12.89 %), isodene (15.18 %), santonin (10.58 %), humulene (10.09 %) and ambrosin (20.66 %). In the stem hydrosol, the major compounds are santonin (8.78 %), humulene (9.02%), ledene (10.24 %), damsin (10.82 %) and ambrosin (20.22 %). In the ethyl acetate fraction of the leaf hydrosol, methyleugenol, camphene, thymol, nerolidol, isodene, β-bisabolol, spatulenol and ledene were determined to be as major compounds. Nerolidol, caryophyllene, isodene, α-santalol, β-bisabolol, spatulenol, santonin, humulene, ledene, ambrosin, and damsin, were also present in stem hydrosol. These results show that the highest antioxidant activity is due to the high content of phenols and terpenes determined in the leaf hydrosol; without finding a direct relationship with the high antifungal activity of stem hydrosol on *B. cinerea*. The ethyl acetate fraction of both the leaf and the stem showed the highest antioxidant activity and the highest content of phenolic compounds that was related to the antioxidant activity.

Keywords: Antifungals, antioxidants, hydrolates, *Verbesina sphaerocephala*, volatile compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una gran diversidad de hongos que son considerados patógenos por causar enfermedades en las plantas, que pueden ocasionar graves pérdidas en la producción agrícola tanto en pre- como poscosecha, lo que se estima entre un 20 y 50 %. Se sabe que existen más de 19,000 especies de hongos fitopatógenos, entre los más comunes están las especies de los géneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* y *Aspergillus* (Jain *et al.*, 2019).

Con el propósito de reducir las pérdidas que estos hongos causan en los cultivos agrícolas, se aplican fungicidas químicos sintéticos, los que, por su uso desmedido, se acumulan en las plantas, en el suelo y contaminan los mantos acuíferos, por lo que son considerados compuestos tóxicos potencialmente dañinos para el humano y el medio ambiente, contribuyendo también a la aparición de cepas fúngicas resistentes (Singh *et al.*, 2007). Debido a esto, con el fin de contribuir a la disminución de la contaminación que este tipo de fungicidas causan, así como bajar la emergencia de nuevas especies de hongos resistentes a éstos, es imprescindible realizar investigaciones que propongan alternativas viables como la aplicación de compuestos derivados de plantas, los que potencialmente muestran actividad antifúngica y una menor toxicidad al humano y una baja contaminación al ambiente (Mahlo *et al.*, 2010).

En los últimos años, con la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas de origen vegetal, se ha confirmado la efectividad de éstas contra hongos fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que, los extractos derivados de plantas son de interés para ser utilizados durante el crecimiento, desarrollo y producción de alimentos, o bien en los alimentos durante su vida de anaquel (Márquez *et al.*, 2007; Centeno-Briceño y Carrera-Jaspe, 2013). El uso de aceites esenciales derivados de diferentes partes de las plantas, principalmente de la parte aérea (tallos y hojas), es una de las mejores alternativas para sustituir o alternar la aplicación de fungicidas sintéticos del mercado actual como los imidazoles y triazoles, ya que son considerados seguros para

consumo o *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*), por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), por su baja o nula toxicidad tanto para el ambiente como para la salud humana y animal (Mahlo *et al.*, 2010; Omar y Kordali, 2019).

Con la aplicación de aceites esenciales o de hidrolatos, obtenidos por hidrodestilación sin el uso de disolventes, de diversas plantas, se ha confirmado en ensayos *in vitro* su potencial antimicrobiano. Dentro de las plantas que producen este tipo de compuestos, se encuentran las de la familia Lamiaceae como *Calamintha nepeta* y *Satureja hortensis* que presentan actividad antibacteriana contra varias especies fitopatógenas del género *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Xanthomonas* (Gomez *et al.*, 2015), dentro de esta familia también se encuentra *Ocimum basilicum* que inhibe el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* (Cordero *et al.*, 2018). Además, de algunas especies del género *Nepeta* se ha demostrado que muestran un efecto inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium maydis* (Kumar *et al.*, 2014).

Así mismo, estudios fitoquímicos y de actividad antifúngica, se han realizado con especies de la familia Asteraceae. En nuestro grupo de trabajo, se ha estudiado el efecto fungicida del aceite esencial de diversas plantas medicinales de esta familia, como *Tagetes lucida* (pericón o Santa María), del que se ha demostrado su actividad sobre diversos hongos como *Botrytis cinerea*, hongo causal del moho gris en plantas y frutos de fresa (Céspedes *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013; Cázares-Chávez, 2017).

Dambolena *et al.* (2010) y otros investigadores, relacionan esta actividad antifúngica de diversos metabolitos secundarios de plantas, con la actividad antioxidante, por lo que es importante realizar investigaciones para confirmar esta relación. Se ha demostrado que existe una relación entre la actividad antioxidante y antifúngica, ya que estos efectos se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos y terpénicos y su posible interacción o sinergismo entre ellos, lo que hace a los aceites esenciales e

hidrolatos, ideales para su uso como fungicidas (Vargas-Sánchez *et al.*, 2013). Solís-Silva *et al.* (2018), encontraron una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en *Opuntia oligacantha* con la actividad antioxidante y el efecto de inhibición sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. En otro estudio realizado por Ramón-Valderrama y Galeano-García (2020), compararon el efecto de extractos vegetales de *Solanum* spp. y se destaca la presencia de flavonoides, como antocianinas que junto con ácidos fenólicos y taninos en extractos *S. mammosum*, presentaron una correlación positiva entre la actividad antioxidante y la actividad antifúngica.

Aunque se han realizado diversas investigaciones en plantas de la familia Asteraceae, en las especies del género *Verbesina*, como *V. sphaerocephala*, son pocos los estudios fitoquímicos y de actividad biológica. Recientemente, se reportó que esta especie contiene sesquiterpenos (ej. Cadinenos) y flavonoides entre otros compuestos fenólicos (ej. Rutina) que pudieran estar relacionados con la actividad tanto antimicrobiana como antioxidante (Arciniegas *et al.*, 2020; Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021). Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021), demostraron actividad antibacteriana de extractos metanólicos sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En nuestro grupo de trabajo, es de interés la búsqueda de compuestos con actividad antifúngica producidos por plantas endémicas o nativas mexicanas, particularmente de aquellas que producen compuestos de tipo terpénico o fenólico, constituyentes principales de los aceites esenciales e hidrolatos, con el propósito de estudiar su rango de acción, las concentraciones mínimas activas, así como sus mecanismos de acción sobre hongos fitopatógenos. Por lo que, el objetivo general de este estudio fue determinar la actividad antifúngica y antioxidante del hidrolato de hojas y tallos de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray sobre tres hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*), así como cuantificar el contenido e identificar los principales compuestos volátiles responsables de la actividad biológica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hongos fitopatógenos de importancia agrícola

En la agricultura, los hongos fitopatógenos causan deterioro de frutos, hojas, tallos y raíces, y se conocen alrededor de 19,000 especies de estos microorganismos que provocan enfermedades en plantas, denominados fitopatógenos, que pueden atacar durante la pre- y poscosecha, causando pérdidas económicas desde el 2 al 25 % en países desarrollados y en países en desarrollo del 20 al 50%. Esto es un problema grave para los agricultores y consumidores, ya que se aumentan los costos de producción y se establecen medidas para su control, como la aplicación de productos químicos dañinos o tóxicos para el ambiente y para la salud humana, además de que muchas especies de hongos han generado resistencia a estos productos, lo que dificulta su manejo y aumenta el riesgo de nuevas infecciones (Jain *et al.*, 2019; FHIA, 2007). Debido a esto, es necesario buscar alternativas biológicas que sean menos dañinas para controlar el desarrollo o proliferación de hongos fitopatógenos que causan pérdidas en los cultivos de alimentos, y así disminuir la aplicación de fungicidas químicos sintéticos (Salinas, 2016).

Muchos hongos han sido identificados como fitopatógenos y entre los principales géneros destacan *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* y *Aspergillus*, considerados los de mayor relevancia o que ocasionan mayores pérdidas a nivel mundial, así como su gran capacidad de reproducción y dispersión, lo que hace difícil su control (García, 2004). Estos producen diferentes síntomas de enfermedad, pueden ser de tipo local, afectando una pequeña porción de tejido, o pueden ser generales ya que afectan por completo a toda la planta. Dentro de una misma planta se puede producir primero un efecto local y después uno generalizado, causando la muerte del tejido o necrosis, lo que puede llevar a la muerte de la planta (García, 2004; Juárez-Becerra *et al.*, 2010). A continuación, se describe cada uno de los hongos en estudio: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, que son causales de las principales enfermedades de frutos que

se cultivan en la región (Estado de Michoacán) como fresa, zarzamora, arándano y aguacate.

2.1.1. *Botrytis cinerea* Persoon: Fries

El hongo *Botrytis cinerea* y otras especies del género *Botrytis* son importantes patógenos de más de 200 especies de plantas, entre ellas plantas de importancia agrícola y ornamental, lo que representa serias pérdidas económicas antes y después de las cosechas. Es causante de la podredumbre gris en diferentes órganos de las plantas como flores, frutos, hojas y raíces, es común el ataque de este patógeno en cultivos como fresa, uva, frambuesa, plantas ornamentales, entre otros y puede crecer incluso después de largos periodos en congelación (Williamson *et al.*, 2007). Un síntoma característico de este patógeno es la rápida aparición de moho gris y produce lesiones marrones sobre diferentes tejidos vegetales, causando putrefacción acuosa por lo que fácilmente afecta a los tejidos de las plantas o frutos circundantes hasta infectar completamente (Juárez-Becerra *et al.*, 2010). El género *Botrytis* se encuentra clasificado dentro de los hongos superiores del Phylum Ascomycota, Clase Discomycetes, Orden Heliotales, Familia Sclerotiniaceae. Género *Botryotinia* (*Botrytis* anamórfo), Especie *Botryotinia fuckeliana* Whetzel (fase sexual) o *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (fase asexual) (Kendrick, 2000).

B. cinerea presenta mayor una actividad destructiva en tejidos senescentes de plantas dicotiledóneas, antes de causar la pudrición en los tejidos (fase necrótropa), puede permanecer quiescente durante un tiempo considerable, por lo que hace el ciclo de infección complejo y de difícil manejo. Hiberna mediante esclerocios melanizados (aprox. 4 mm), resistiendo condiciones ambientales hostiles. Una vez que el entorno es favorable, tal como las temporadas húmedas interrumpidas en primavera, los esclerocios germinan para producir micelio y conidios. *B. cinerea* también produce clamidosporas hialinas de paredes gruesas que varían en tamaño y forma y se encuentran en forma intercalada o en los extremos de las hifas, soportan períodos de sequía de hasta tres meses; y, germinan para producir hifas o microconidios (Cotes *et*

al., 2018). El micelio es ramificado, septado, hialino a pardo. Los conidióforos que surgen del micelio son altos, delgados e irregularmente ramificados en la porción terminal, con células apicales agrandadas o redondeadas, que portan grupos de conidios simultáneamente en dentículos cortos. Los conidios son lisos, hialinos o grises, en forma de huevo con una longitud de 10 μm y una anchura de 5 μm (Romanazzi y Feliziani, 2014) Figura 1.

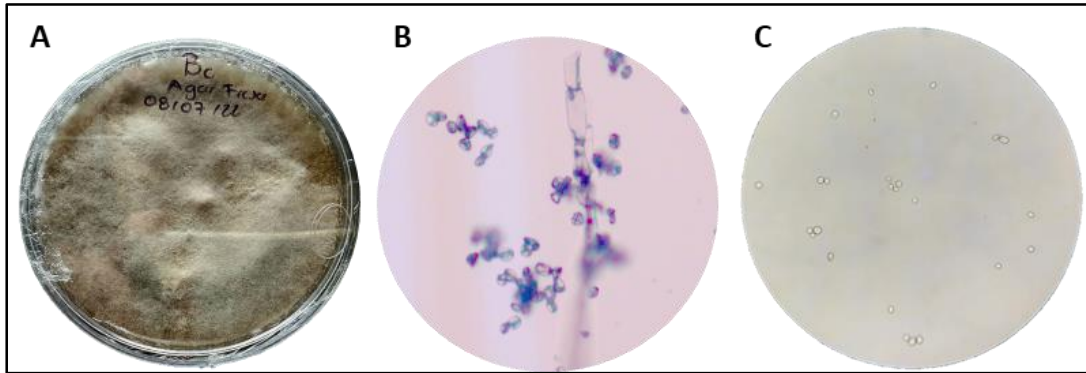


Figura 1. Crecimiento micelial de *B. cinerea* (A), conidióforos (B) y esporas (C) aislado de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupy) bajo cultivo *in vitro* (Fotografías propias).

2.1.2. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (NCBI, 2007), *C. gloeosporioides* pertenece al reino Fungi, Phylum Ascomycota; Clase Sordariomycetes; Subclase Sordariomycetes incertae sedis; Orden Phyllachorales, Familia Phyllachoraceae, Género *Glomerella*, Especie *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk. (fase teleomórfica, sexual o perfecta) o Género *Colletotrichum* y Especie *C. gloeosporioides* (fase anamórfica, asexual o imperfecta). Es un hongo cosmopolita, que forma conidios generalmente oscuros y es uno de los principales patógenos de plantas responsable de antracnosis. Esta enfermedad provoca manchas hundidas de forma circular o irregular de color pardo, las cuales tienden a agrandarse, producir marchitez y llevando a la muerte a los tejidos de la planta infectada. Este hongo se ve favorecido por condiciones de humedad e infecta a muchos cultivos de importancia económica, frutos tropicales

como el mango, papaya, café, cítricos, plantas ornamentales, entre otros. Esto representa una limitante en la producción provocando pérdidas de hasta el 50 % en productos pre- y poscosecha, a pesar de que la infección ocurra en las primeras etapas de desarrollo, los síntomas se presentan hasta la maduración. Este hongo invade principalmente tejidos lesionados o débiles y los conidios se dispersan por la lluvia y riego (Bussaman *et al.*, 2012; Ajay, 2014).

Este hongo presenta un ciclo de vida complejo con diferentes fases o patrones es estilo de vida que están regulados por factores genéticos e interacciones bioquímicas entre el hongo y su hospedero. Estos estilos de vida son el necrotrófico, hemibiotrófico, quiescente y endofítico. *C. gloeosporioides* se caracteriza por tener estructuras reproductivas o esporas llamadas conidios, que poseen una forma cilíndrica, recta, con ápices obtusos y sin septos; estos conidios tienen un tamaño que oscila entre 9 y 24 μm de largo por 3-6 μm de ancho, y se forman en fiálides cilíndricas de apariencia hialina. Los conidios están dispuestos en acérvulos setosos que presentan una forma variable que va desde redondeada hasta alargada o irregular, con un diámetro que no supera los 500 μm (Prescott *et al.*, 2009) (Figura 2).

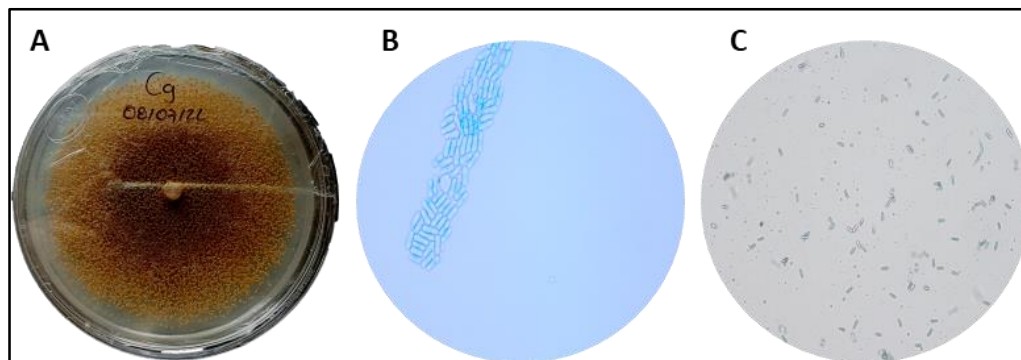


Figura 2. Crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (A), conidióforos (B) y conidias (C) bajo cultivo *in vitro* (Fotografías propias).

Las setas por su parte, son marrones, con una longitud que rara vez excede de 200 μm . Posee hifas septadas y produce apresorios de aspecto claviforme, triangular o

irregular, algunas veces lobulados, con pigmentos oscuros de color café y cuyas dimensiones oscilan entre 4 a 12 μm de longitud (Prescott *et al.*, 2009).

2.1.3. *Fusarium oxysporum f.sp. fragariae*

La especie *Fusarium oxysporum* y otras especies del mismo género son importantes hongos filamentosos patógenos de plantas con diversas técnicas de infección, produce enfermedades que afectan a la agricultura y horticultura en todo el mundo, lo que lo hace un hongo que provoca pérdidas económicas. Este hongo crece y es capaz de sobrevivir como micelio o esporas durante largos periodos de tiempo en la rizosfera de muchas plantas. La cepas de *F. oxysporum* penetran a las raíces invadiendo el sistema vascular causando marchitez, tizón y pudrición de tallo y raíz, muchas veces solamente penetra las raíces, pero no llega a invadir el sistema vascular ni causar enfermedades (Fravel *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Brown y Proctor, 2013).

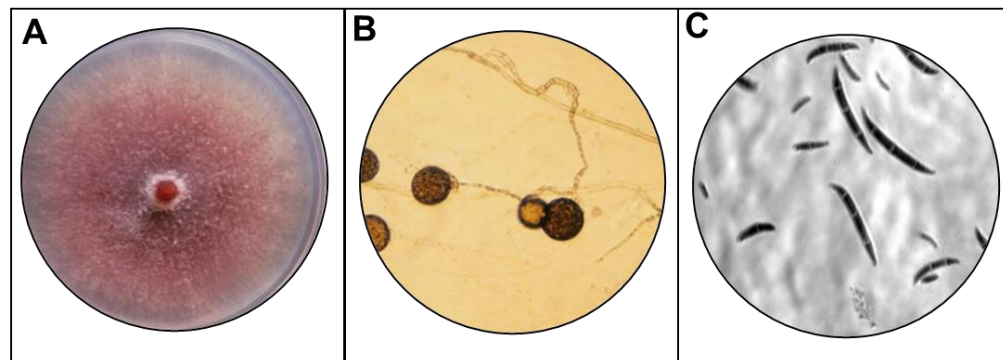


Figura 3. Crecimiento micelial de *F. oxysporum f.sp. fragariae* (3A), clamidosporas (3B) y macroconidias (3C) (Fotografías de Dr. Ángel Rebollar Alviter, Universidad Autónoma de Chapingo. iasolutions.com.mx).

F. oxysporum pertenece al Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae, Género *Fusarium* (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/24677>). Este hongo crece y es capaz de sobrevivir como micelio o esporas durante largos periodos de tiempo en la rizosfera de muchas plantas. La cepas de *F. oxysporum* penetran a las raíces invadiendo el sistema vascular causando marchitez, tizón y pudrición de

tallo y raíz, muchas veces solamente penetra las raíces, pero no llega a invadir el sistema vascular ni causar enfermedades (Brown y Proctor, 2013). En la figura 3 se observa el crecimiento micelial *in vitro*, de las clamidosporas y los macroconidios de este hongo.

2.2. Antifúngicos de origen vegetal

En la agricultura es común el uso de fungicidas sintetizados químicamente, lo que ha producido efectos negativos sobre la salud humana, debido a sus efectos carcinógenos y de toxicidad, además de graves daños al ambiente, ya que provoca pérdida de la biodiversidad, tienden a acumularse como residuos, causando contaminación de suelo, agua, aire y productos agrícolas. Además, generan resistencia en los hongos, los cuales se vuelven más difíciles de controlar y en consecuencia se elevan los costos de producción y se producen mayores pérdidas económicas (Mesa *et al.*, 2019). El uso excesivo de productos químicos ejerce presión sobre los ecosistemas que resulta insostenible para el ambiente, por esta razón es necesario desarrollar nuevas alternativas de manejo que resulten inocuas para el medio ambiente y con ello reducir la dependencia de los fungicidas sintéticos (Villa-Martínez *et al.*, 2014).

Una alternativa al uso de químicos sintéticos para el control de hongos fitopatógenos son los metabolitos secundarios vegetales con propiedades antimicrobianas, ya que están constituidos por una mezcla de compuestos, que al utilizarse en concentraciones mínimas adecuadas, la generación de resistencia puede reducirse. Las plantas poseen mecanismos de respuesta en contra del ataque de microorganismos patógenos y herbívoros. Estos mecanismos de defensa incluyen barreras físicas como la lignificación y la suberización, que son formadas antes del ataque de patógenos, además de barreras químicas que se conocen como metabolitos secundarios, los cuales se pueden encontrar de forma constitutiva en la planta o pueden activarse por medio de mecanismos de señalización en presencia de

organismos dañinos como bacterias, hongos y virus, así como también ante situaciones de estrés abiótico (Mesa *et al.*, 2019).

Todos estos compuestos son sintetizados por rutas bioquímicas del metabolismo secundario, que aunque la gran mayoría de ellos no resultan esenciales para llevar a cabo las funciones vitales de las plantas, como los derivados del metabolismo primario, se relacionan también con el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas, ya que son importantes en los mecanismos de defensa y dan protección contra patógenos, depredadores y contra diferentes tipos de estrés. Entre los metabolitos secundarios de mayor cantidad y diversidad en las plantas, están los compuestos aromáticos volátiles como son terpenos, los de tipo fenólico y los compuestos nitrogenados, como los alcaloides. Éstos han sido identificados con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, dentro de las más comunes (Martínez, 2012; Villa-Martínez *et al.*, 2014).

Los metabolitos secundarios se distribuyen en diferentes órganos de las plantas como raíces, semillas, frutos, tallos, hojas y flores, y pueden ser extraídos por diferentes métodos, de acuerdo al peso molecular y a la polaridad. La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria químico y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación, son los más utilizados (Azmir *et al.*, 2013). Dentro de los estudios previamente realizados con un gran número de especies vegetales, se ha demostrado que algunos poseen propiedades antifúngicas contra hongos patógenos de plantas que causan grandes pérdidas en cultivos agrícolas (Mesa *et al.*, 2019). Estos compuestos bioactivos, generalmente son degradables e inocuos para el ambiente y en dosis adecuadas no presentan efectos negativos sobre la salud de los humanos y animales (Montes-Belmont, 2009; Pedroso *et al.*, 2012).

En el cuadro 1 se presentan algunos compuestos antifúngicos de origen vegetal que se aplican en la agricultura contra hongos fitopatógenos y sus posibles mecanismos

de acción. Sin embargo, diversas investigaciones muestran el gran potencial de antifúngicos de origen vegetal, que corresponden a compuestos de diversos grupos como los terpenos, los polifenoles y algunos compuestos nitrogenados como los alcaloides o derivados (Mesa *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Productos fungicidas elaborados con compuestos de origen vegetal.

Planta	Compuesto	Hongos fitopatógenos	Mecanismos de acción	Producto comercial	Referencias
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Resveratrol	<i>Alternaria solani</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Inactiva ATPasas e induce disociación de proteínas del citoesqueleto. Actúan como desacopladores de la cadena de transporte de electrones y de fosforilación.	REGALIA® Milsana®	Gambini <i>et al.</i> , 2013 Zaker, 2016
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>p</i> -cimeno 1, 8-cineol Linalool Timol α -pineno	<i>Alternaria alternata</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Causan daños en la membrana a través de los compuestos lipofílicos.		Özcan y Chalchat, 2008 Zaker, 2016
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol	<i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis cinerea</i>		Sporan™	Valdés-Pérez <i>et al.</i> , 2016 Zaker, 2016
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Linalool Carvacrol	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Aspergillus</i> spp <i>Mucor</i> spp	Provocan lesiones en las membranas fúngicas y reduce la síntesis de ergosterol. Inhibe las enzimas ATPasas lo que propicia la muerte celular.		Zaker, 2016 Küete, 2017
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpinenol Terpinoleno 1, 8-cineol	<i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp		TimorexGold®	Zaker, 2016

Por esto, las nuevas alternativas están orientadas a la extracción de compuestos bioactivos vegetales mediante distintas técnicas para el control de las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos, debido a su efectividad, amigables con el ambiente y la salud humana, así como un menor costo (Porras-Loaiza y López-Malo, 2009).

2.3. Aceites esenciales e hidrolatos con actividad antifúngica y antioxidante

Los aceites esenciales de plantas son mezclas complejas de metabolitos secundarios, de naturaleza química polar y no polar, son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos, estos compuestos son volátiles y son los responsables del aroma de las plantas. Se pueden sintetizar en todos los órganos de las plantas como flores, hojas, tallos, raíces, semillas y frutos. Se conocen alrededor de 3,000 aceites esenciales, de los cuales aproximadamente 300 son utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y sanitaria. Existen diversas técnicas para su extracción como la percolación, hidrodestilación, el arrastre con vapor y extracción con distintos disolventes (Bakkali *et al.*, 2008; Mesa *et al.*, 2019).

La producción y contenido de aceites esenciales en las plantas es variable de acuerdo con el tipo de suelo, variaciones estacionales, ubicación geográfica, condiciones climáticas e interacciones biológicas a las que se encuentran expuestas, debido a esto algunas plantas producen bajas concentraciones de aceites esenciales, tal es el caso de *Taraxacum officinale* (Asteraceae) conocida como diente de león, esta planta sintetiza hidrocarburos volátiles en el tallo y las hojas, desde donde migran a las flores, ya que su función en este caso es para atraer a los polinizadores, por esta razón la acumulación del aceite esencial en el diente de león es en los frutos y semillas. Esto indica que aunque en la mayoría de las plantas exista la producción de aceites esenciales, la acumulación de este va depender de los requerimientos de la planta y el contenido de aceite y composición va a variar de acuerdo con la parte de la planta.

El método de extracción más común para los aceites esenciales es por hidrodestilación, que aunque no ofrece un alto rendimiento, no se utilizan herramientas y equipos sofisticados, o disolventes no aprobados para sus uso en alimentos o cosméticos, como el hexano, el acetato de etilo y el metanol, principalmente. Durante este proceso se obtiene una fase acuosa que son comúnmente conocidos como hidrolatos, hidrosoles, aguas florales o aromáticas; en la industria cosmética se comercializa el agua de rosas que se considera un agua floral o hidrosol, sin embargo, por lo regular este producto es poco valorado y es desechado pero se ha demostrado que existen diversos compuestos del aceite esencial que quedan disueltos en los hidrolatos, en su mayoría compuestos oxigenados aromáticos que presentan actividad biológica (Aćimović *et al.*, 2020).

La composición de los aceites esenciales y en consecuencia de los hidrolatos, determina su actividad antimicrobiana y antioxidante, ya que al ser producto del metabolismo secundario puede haber cambios en su producción de acuerdo con los requerimientos de cada planta, así como también influyen factores como la época de cosecha, la localización geográfica, la temperatura, los fertilizantes, la tierra de cultivo, el proceso de extracción y el almacenamiento. Sin embargo, los componentes principales de los hidrolatos suelen ser completamente diferentes a los presentes en los aceites esenciales, esto debido a la polaridad de los compuestos. En su mayoría los hidrolatos contienen compuestos aromáticos solubles en agua principalmente alcoholes monoterpénicos, aldehídos, cetonas y sesquiterpenos (Bakkali *et al.*, 2008; Usano-Alemaný *et al.*, 2014; D'Amato *et al.*, 2017; Aćimović *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que los compuestos terpénicos constituyen el grupo más abundante dentro de los aceites esenciales e hidrolatos, y son los principales responsables de la actividad antifúngica debido a su composición química, los más bioactivos son los que presentan aldehídos o cetonas en su estructura. Estos compuestos pueden actuar a nivel de la pared y membrana celular de los hongos provocando alteraciones de la membrana, lo que conduce a la pérdida del contenido celular, a la desnaturalización de proteínas citoplasmáticas, a la inactivación de

enzimas celulares, a la inhibición de bombas de flujo o causando la disfunción de la mitocondria (Ludwiczuk, 2017; Nazzaro, 2017).

Estos compuestos aromáticos actúan sinérgicamente en los hidrolatos, por lo que suelen encontrarse algunos en mayor proporción que otros. Entre los más reconocidos se encuentran terpenos como α -pineno, α -terpineno, 1,8-cineol, citral, carvacrol, canfeno, alcanfor, -borneol, *p*-cimeno, mirceno, mentona, acetato de geranilo, linalool, carvona, limoneno, entre otros. Éstos han sido identificados con propiedades antimicrobianas que tienen el potencial de ser utilizados para el control de enfermedades que reducen el rendimiento de los cultivos agrícolas (González-López *et al.*, 2016).

Las principales especies vegetales que producen aceites esenciales e hidrolatos con propiedades antimicrobianas, pertenecen a las familias Apiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Piperaceae, Verbenaceae y Rutaceae (Linde *et al.*, 2016).

En diversas investigaciones se han realizado ensayos *in vitro* para probar la actividad antifúngica y antioxidante de estas diversas especies de plantas. Dentro de los ensayos *in vitro* para probar el efecto de los hidrolatos sobre hongos patógenos, se utiliza con mayor frecuencia el método de difusión en pozos en cajas Petri con agar “agar well diffusion assay”, descrito por Magaldi *et al.* (2004). Éste consiste en hacer pozos y colocar dentro una cantidad conocida del aceite esencial o extracto vegetal, posterior a esto se coloca un fragmento del micelio del hongo en el pozo y se deja incubar, pasadas 24 h se hacen mediciones del efecto de inhibición, para determinar el porcentaje de inhibición.

Algunos resultados han demostrado que los hidrolatos poseen una fuerte actividad antifúngica, esta eficacia puede atribuirse al entorno hidrófilo que promueve una mayor disponibilidad de compuestos terpénicos oxigenados (Aćimović *et al.*, 2020). La determinación de la actividad biológica de éstos se ha realizado y en algunas

investigaciones se ha encontrado una relación positiva entre la actividad antifúngica con la antioxidante (Bakkali *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2022). Para evaluar la actividad antioxidante de los aceites esenciales o hidrolatos, se utilizan los métodos de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Barriada-Bernal *et al.* (2014), ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) descrito por Rufino *et al.* (2010) y TAC (Capacidad Antioxidante Total) descrito por Prieto *et al.* (1999), entre otros.

2.3.1. Terpenos con actividad antifúngica y antioxidante

Los terpenos están constituidos por unidades de isopreno que es una molécula con 5 átomos de carbono, lo que da origen a diferentes categorías como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) y politerpenos (C_{5n}). Estos compuestos presentan una gran diversidad en sus estructuras y desempeñan diversas funciones importantes para las plantas como pigmentos fotosintéticos, acarreadores de electrones, reguladores de crecimiento, en la glicosilación de proteínas y como elementos funcionales de la membrana celular. Además de que son reconocidos por su actividad biológica de protección contra el estrés y han sido identificados con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, insecticidas, entre otras (González-López *et al.*, 2016).

La actividad antioxidante de los aceites esenciales e hidrolatos depende de la presencia y estructura de compuestos como los terpenos. Se ha destacado el interés por la búsqueda de antioxidantes naturales por sus numerosos beneficios a la salud y en los alimentos, ya que los agentes antioxidantes protegen al organismo de los radicales libres, que son moléculas altamente reactivas que atacan a nivel celular y son responsables de enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión, la obesidad y algunos tipos de cáncer, entre otras, que cursan con estrés oxidativo (Padilla *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2010).

Muchos de los compuestos terpénicos de los aceites esenciales e hidrolatos que presentan actividad antifúngica también han sido identificados con propiedades

antioxidantes, como por ejemplo el timol y el carvacrol presentes en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, demostraron una excelente actividad antioxidante además de que ejercen un efecto protector contra la toxicidad de aflatoxinas (Kuate, 2017). De acuerdo con Torres-Martínez *et al.* (2018) se demostró la actividad antioxidante del aceite esencial de *Satureja macrostema* (nurite) e identificaron al timol como el compuesto que presentó la mayor actividad antioxidante, seguido del cariofileno, linalool, pulegona y mentona, los cuales son compuestos terpénicos. Muchos compuestos terpénicos que componen los aceites esenciales e hidrolatos provenientes de diversas especies vegetales han sido identificados tanto con propiedades antioxidantes y antifúngicas.

El uso de compuestos volátiles terpénicos como agentes antimicrobianos y antioxidantes ha recibido gran interés, ya que la mayoría de ellos no resultan ser tóxicos para el humano y el medio ambiente, su extracción es de bajo costo, tienen una alta disponibilidad en diferentes especies vegetales y presentan diversos efectos biológicos, además de que muchos de ellos no alteran las propiedades organolépticas y aumentan la vida útil de los alimentos (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Dentro de las plantas de mayor interés para la obtención de compuestos terpénicos se encuentra la familia Asteraceae, que ha sido ampliamente estudiada a nivel químico debido a la gran variedad de metabolitos secundarios que produce, destacando especies que principalmente producen compuestos volátiles de tipo terpeno, que presentan propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Funk *et al.*, 2009). Algunas son importantes por la producción de aceites esenciales e hidrolatos a partir de hojas, tallos y flores, de las que se ha confirmado la actividad antifúngica y antioxidante (Cuadro 2).

Existen diversos reportes que muestran una relación directa entre las propiedades antifúngicas y antioxidantes de los aceites esenciales, hidrolatos o de los compuestos terpénicos, por lo que son considerados ideales para el uso como fungicidas. Además,

su uso tanto en la agricultura como en productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos, está aprobado por la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, siglas en inglés de *Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos de América, así como por su amplia disponibilidad, lo que ha facilitado la rápida comercialización de éstos (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014).

Cuadro 2. Hidrolatos y sus compuestos mayoritarios con actividad antioxidante y antifúngica derivados de especies de la familia Asteraceae.

Planta	Compuestos	Actividad	Referencia
<i>Baccharis</i> spp	α -tujeno α y β -pineno sabineno β -mirceno limoneno terpinen-4-ol	Antioxidante Antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Abad y Bermejo, 2007
<i>Artemisa</i> spp	1,8-cineol α -pineno borneol linalool carvacrol alcanfor	Antioxidante Antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i>	Lopes-Lutz <i>et al.</i> , 2008
<i>Calendula arvensis</i>	zingibereno 1 β -curcumeno (E)-fitol eremoligeno zingibereno 2 T-cadinol Farnesol	Antioxidante Antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium expansum</i>	Belabbes <i>et al.</i> , 2017
<i>Eupatorium serotinum</i>	Cyclocolorenona D-germacreno Palustrol	Antioxidante Antifúngico contra <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Lawson <i>et al.</i> , 2020

El aceite esencial de cítricos, particularmente el de naranja, ha mostrado una alta actividad antioxidante y antifúngica, que se atribuye a la presencia del α -tocoferol y D-limoneno (Guédez *et al.*, 2014). Los aceites esenciales de plantas como albahaca, canela, clavo, nuez moscada, orégano y tomillo, poseen tanto propiedades antioxidantes como antifúngicas, debido a sus principales terpenos (Kulisic *et al.*, 2004). Recientemente, Gehan *et al.* (2019) reportaron que el limoneno y el mirceno, son de los terpenos con una mayor actividad antifúngica, lo que correlaciona positivamente con la actividad antioxidante.

2.3.2. Relación entre la actividad antioxidante, pro-oxidante y antifúngica

Los antioxidantes son definidos como moléculas capaces de neutralizar moléculas inestables que poseen una fuerte capacidad oxidante llamadas radicales libres, que se encuentran en forma de especies reactivas de oxígeno (ERO). Cuando existe un desequilibrio entre los antioxidantes y las ERO, se produce estrés oxidativo, un fenómeno causado por la producción y acumulación de ERO como son los radicales anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020; Ortiz y Medina, 2020).

Cuando existe estrés oxidativo a nivel celular sin un control antioxidante, se puede generar un daño irreversible en las principales moléculas biológicas como los lípidos de membrana, en las proteínas y en el ADN, lo que finalmente lleva a la muerte celular o a la apoptosis. A pesar de que las ERO son consideradas moléculas mensajeras que regulan la proliferación, diferenciación, apoptosis y como respuesta del sistema inmune, en altas cantidades ejercen un efecto perjudicial que puede desencadenar en diversas enfermedades, mediante un proceso contrario al ejercido por los antioxidantes, denominado pro-oxidación (Carvajal-Carvajal, 2019)

Se ha revelado que los compuestos vegetales que se extraen en los aceites esenciales e hidrolatos son fuente de antioxidantes que actúan mediante diferentes mecanismos de acción, como la eliminación directa de ERO, activación de enzimas

antioxidantes, quelación de iones metálicos, reducción de radicales α -tocoferilo, inhibición de oxidasas y mitigación del estrés causado por el óxido nítrico, además de que los hidrolatos al ser una mezcla de diversos compuestos pueden ejercer efecto antioxidante en múltiples sitios de acción (Procházková *et al.*, 2011; Basavegowda, 2021).

Los antioxidantes bajo determinadas circunstancias pueden actuar como agentes pro-oxidantes y por lo tanto promover la oxidación. Las propiedades pro-oxidantes de los compuestos vegetales dependen de la concentración, la estructura química y el desequilibrio redox celular. Los pro-oxidantes inducen estrés oxidativo por generación de ERO o inhibición de los mecanismos antioxidantes, las ERO inducen la peroxidación de lípidos e inducen una reacción en cadena de autopropagación de ERO que causan daño a la membrana y pérdida del contenido celular, la interacción de ERO con las proteínas provoca modificaciones e inactivación y en los ácidos nucleicos, éstas provocan lesiones y roturas en el ADN, lo que favorece la producción de proteínas no funcionales que finalmente llevan a la muerte celular, como se muestra en la figura 4 (Bakkali *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2022).

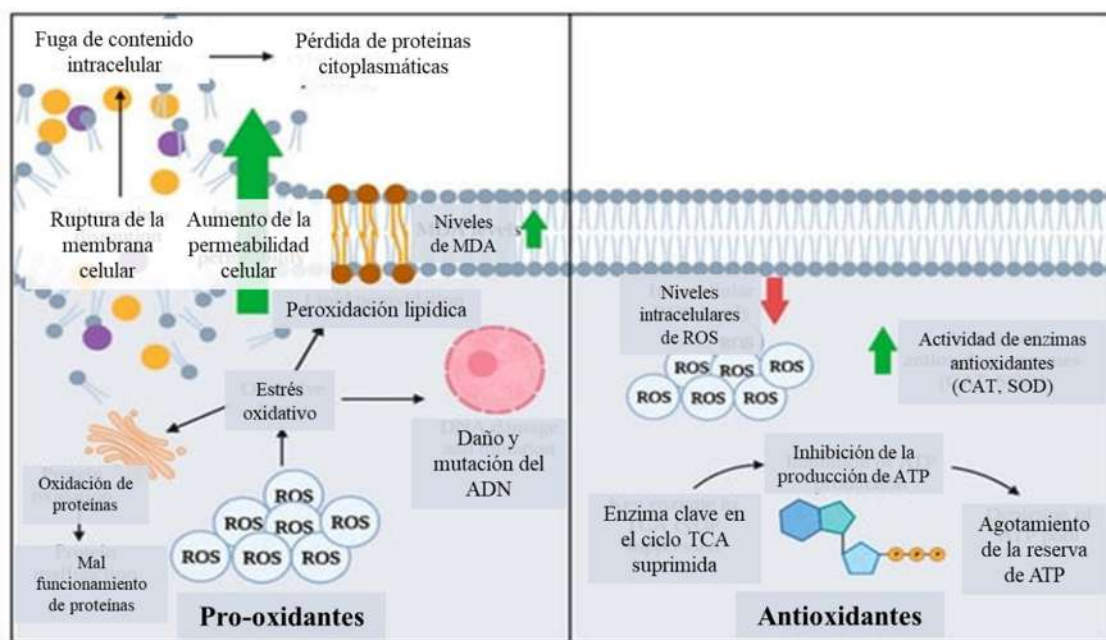


Figura 4. Efecto intracelular de agentes antioxidantes y pro-oxidantes (Kong *et al.*, 2022).

Las ERO pueden producirse intracelularmente por vías biológicas o extracelularmente por medios exógenos, en general los antimicrobianos tienen la capacidad de inducir la producción de estas especies reactivas para provocar daño a patógenos y previenen la formación de biopelículas. Por lo que se sugiere el uso de ERO en función de la actividad antimicrobiana contra un amplio número de patógenos, ya sea bacterias y hongos, entre ellos los fitopatógenos (Yun y Lee, 2017; Kong *et al.*, 2022).

En un estudio realizado por Yun y Lee (2017), se reportó que la silimarina, componente bioactivo de *Silybum marianum* (Asteraceae) que se utiliza en el tratamiento de trastornos hepáticos y como antimicrobiano contra *Candida albicans* tiene la capacidad de inducir lesiones en la membrana celular y aumentar la permeabilidad de la membrana lo que favorece la fuga de K⁺ intracelular, además de causar la peroxidación de lípidos que se correlaciona directamente con por la sobreproducción de ERO que causa estrés oxidativo en las células fúngicas. A pesar de que reportes previos demuestran que la silimarina es antioxidante, muchos fitoquímicos pueden tener un efecto pro-oxidante y antioxidante bajo ciertas condiciones como la concentración. Por lo tanto, mencionaron que la silimarina induce a la acumulación de ERO a partir de 10 µg/mL como la concentración más baja.

Como ya se mencionó, una gran cantidad de especies de la familia Asteraceae han sido estudiadas con el propósito de determinar su perfil químico, así como sus diversas actividades biológicas. Dentro del género *Verbesina*, algunas de sus especies han mostrado potencial por poseer actividad antimicrobiana y antioxidante (Niño *et al.*, 2006; Satish *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2015; Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017; Ramseyer *et al.*, 2017; de Veras *et al.*, 2021), por lo en la presente investigación se tuvo el interés de estudiar estas propiedades en los hidrolatos de la especie *V. sphaerocephala*,

2.4. *Verbesina sphaerocephala* A. Gray

En México, la familia Asteraceae (=Compositae) es una de las más extensas que conforman la flora nacional, se estima que existen un poco más de 3,000 especies, de las cuales, 1988 son endémicas, siendo Michoacán el quinto estado con mayor número de especies (837) (Villaseñor, 2018). El género *Verbesina* es el segundo género más grande de esta familia en México, con 164 especies nativas y 138 endémicas. *V. sphaerocephala* es una planta conocida también como capitana, capitaneja, vara de agua, entre otros. Es una especie que se desarrolla en bosques de pino, tropical caducifolio y matorral, formando asociaciones con otras plantas. Florece de julio a diciembre y crece en alturas de 1650 a 2600 m. Al igual que otras especies del género *Verbesina*, se emplean como plantas melíferas en la apicultura por su producción de néctar y polen, y también es usada como una planta medicinal por diversas comunidades en el estado de Michoacán (Rzedowski *et al.*, 2011; Bello-González *et al.*, 2015).

V. sphaerocephala (Figura 5) es una planta arbustiva de 0.6-1.5 a 3-4 m de altura, presenta tallos erectos de color verde amarillento en las partes jóvenes y pardo en las zonas maduras, los tallos son alados con ramificación opuesta, lo que es característico de la especie (Figura 5A).

Las hojas son opuestas o alternas, sésiles o sobre peciolo, la lámina es ovada o lanceolada de 5-7 a 15-18 cm de largo y 2-4 a 8-9 cm de ancho con un ápice agudo y el margen es dentado con 15 a 40 dientes irregulares de 1.5 mm, la nervación es pinnada de color amarillento y prominentes en el envés, el haz es áspero con pelos en la base y el envés es pubescente (Figura 5B).

Las cabezuelas están dispuestas en cimas de 3 a 9, esféricas, de 2.5 a 3.5 cm de diámetro, involucro de 1.8 a 2.5 cm de ancho, con 8 brácteas exteriores, ovadas, foliosas de 1.5 cm de alto y de 0.3-1 cm de ancho, verdes; las brácteas interiores son elípticas, escariosas de 8 a 9 mm de largo y de 2.5 a 5 mm de ancho, de color blanco-

amarillento, el ápice es amarillo-verdoso, lobado, receptáculo cónico de 2.5 mm de ancho y 2 mm de alto. Posee de 8 a 12 flores liguladas, fértiles o estériles, limbo elíptico de 6-10 mm de largo y de 3 mm de ancho, de color amarillo (Figura 5C). Las flores del disco son de 30 a 70, con corolas tubulares de 8-9 mm de largo, los lóbulos son de 1.5 a 2 mm de largo de color café oscuro a negro. Los aquenios de las flores del disco son aplanados, obovados, de 4 mm de largo y 2.5 mm de ancho, glabros, rara vez con alas de color pajizo, ciliadas, adonadas a la base de las aristas del vilano.



Figura 4. Planta de *Verbena sphaerocephala* y sus partes; A) Tallo alado, B) Hojas, C) Cabezuelas de inflorescencias (Fotografías propias).

El aceite esencial de pocas especies de *Verbena* ha mostrado actividad antimicrobiana, de las que se han identificado los compuestos volátiles mayoritarios por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, como el de *V. macrophylla* obtenido por hidrodestilación, que mayormente está compuesto por sesquiterpenos (de Veras *et al.*, 2021); y, el de *V. negrensis* por monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, principalmente por α -pineno, α -humuleno (13.8%) y limoneno (4.6%) (Mora *et al.*, 2015).

Aunque existen pocos antecedentes sobre investigaciones de *V. sphaerocephala* relacionadas a su uso, así como a su composición química, los estudios etnobotánicos indican su empleo para el tratamiento de afecciones de la piel, diabetes, úlceras, várices, heridas, por sus propiedades antiinflamatorias y antidiarreicas (Velasco-Ramírez *et al.*, 2019). También ha sido evaluada la actividad nematocida (*Naccobus*

aberrans) (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2018) y algunos extractos de diferentes partes o tejidos de especies de *Verbesina* como *V. encelioides*, *V. nudipes*, y *V. lanata*, poseen compuestos con actividad antimicrobiana, de los cuales algunos han sido caracterizados como terpenos y fenólicos (Niño *et al.*, 2006; Satish *et al.*, 2008; Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017; Ramseyer *et al.*, 2017).

Un estudio realizado por Arciniegas *et al.* (2020) analizaron el contenido de las partes aéreas de *V. sphaerocephala* y se identificaron seis lactonas sesquiterpénicas de tipo cadineno como verocephol, 8- desoxiverocephol, 1-desoxiverocephol, 9-deshidro-8-deshidroxiverocefol, 8 - O –metilverocefol y 8,8'-bis-8-desoxiverocefol.

Recientemente, Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2019) determinó el contenido fenólico total, la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas y flores de *V. sphaerocephala*, reportando la presencia de flavonoides y taninos, mismos que presentaron gran actividad antioxidante. De igual manera, los extractos mostraron actividad antimicrobiana significativa (90 % y 95 %) en las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Así mismo, Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2022) demostraron que diversos extractos de flores, hojas, tallos y raíces presentan actividad antifúngica sobre tres hongos fitopatógenos (*B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*), reportando que el extracto acuoso de tallo mostró una mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, el extracto acuoso de tallo contiene tanto compuestos fenólicos como terpénicos volátiles, con una relación positiva con la actividad antioxidante. Sin embargo, no hay reportes del perfil de volátiles terpénicos de los hidrolatos de partes aéreas como hojas y tallos de esta planta, así como de su actividad antifúngica y antioxidante.

3. JUSTIFICACIÓN

Los hidrolatos son considerados como seguros para su uso en alimentos y consumo humano, lo que garantiza su potencial utilización sobre el control alternativo de hongos fitopatógenos. Investigaciones sobre los aceites esenciales e hidrolatos de diversas especies vegetales, en particular de la familia Asteraceae y del género *Verbesina*, demuestran que poseen compuestos con alta actividad antifúngica que los ubica como candidatos para su uso en el control de enfermedades fungosas y disminuir el uso de los fungicidas sintéticos.

V. sphaerocephala es una planta endémica del estado de Michoacán y es empleada en la medicina tradicional de varias comunidades del estado, además es una planta melífera importante para los apicultores, pero se desconoce el contenido y tipo de compuestos volátiles que constituyen el hidrolato de tallos y hojas, por lo que además de determinar su actividad antioxidante y antifúngica, resulta de interés la identificación de los principales compuestos activos, así como su contenido y los responsables de la actividad antifúngica.

4. HIPÓTESIS

Los hidrolatos de tallo y hoja de *Verbesina sphaerocephala* contienen compuestos volátiles, responsables tanto de la actividad antifúngica como de la antioxidante.

5. OBJETIVOS

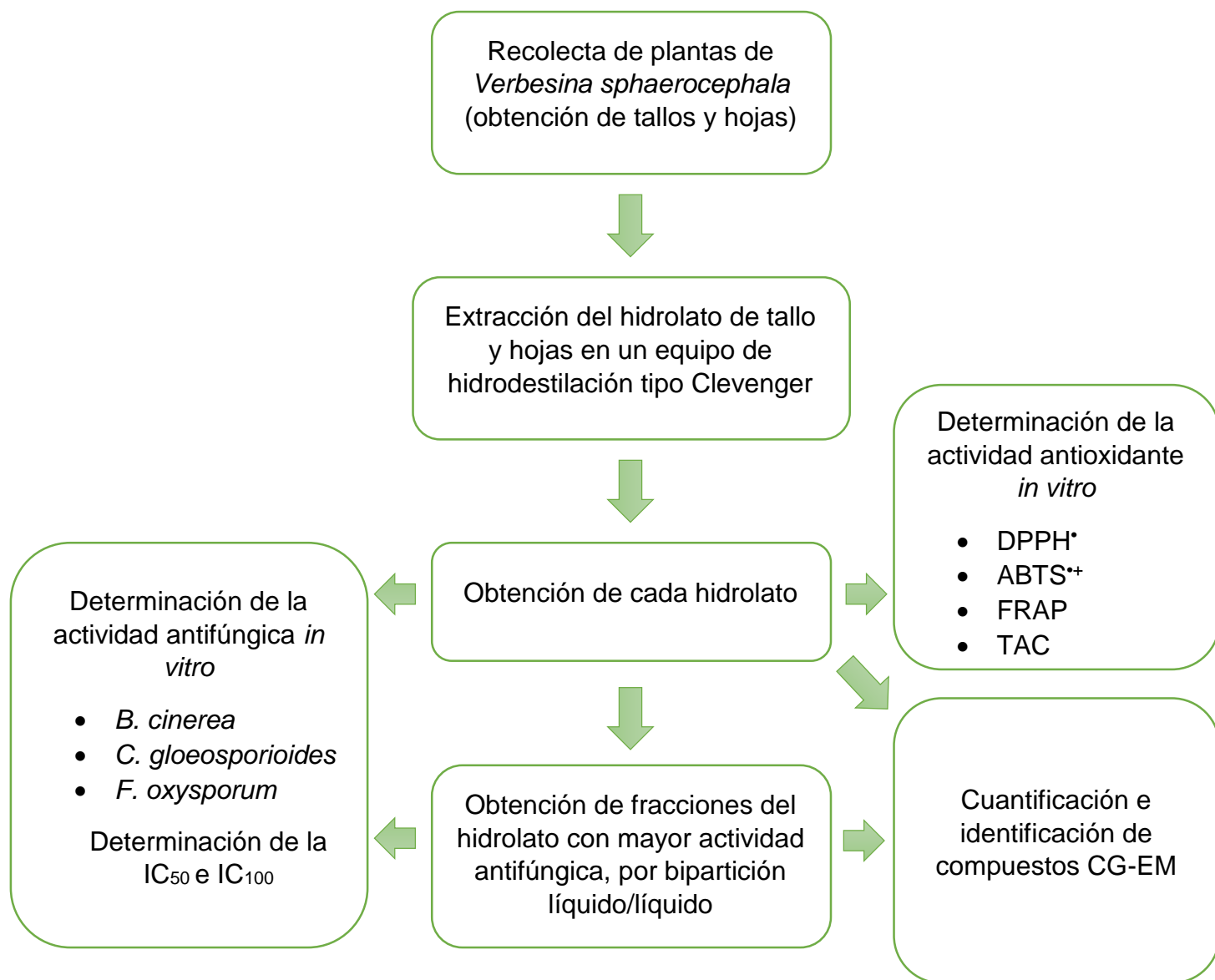
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica y antioxidante del hidrolato de tallos y hojas de *Verbesina sphaerocephala* e identificar los principios activos volátiles.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antifúngica y antioxidante *in vitro* del hidrolato de tallos y hojas de *V. sphaerocephala*.
2. Analizar el perfil químico de los principales compuestos volátiles del hidrolato de tallos y hojas de *V. sphaerocephala*.
3. Identificar y cuantificar los compuestos volátiles responsables del hidrolato de *V. sphaerocephala* con mayor actividad antifúngica y antioxidante.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. Capítulo I. Determinación de la actividad antifúngica, antioxidante y del contenido de compuestos totales de los hidrolatos de hoja y de tallo de *Verbesina sphaerocephala*

Resumen

Verbesina sphaerocephala A. Gray (Asteraceae) es una planta endémica de México, que contiene compuestos fenólicos y terpénicos, con actividad tanto antifúngica como antioxidante, pero se desconocen dichas propiedades en los hidrolatos de las partes aéreas. En la presente investigación, se obtuvieron hidrolatos tanto de hoja como de tallo de *V. sphaerocephala* para evaluar la actividad antifúngica sobre los hongos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH*, ABTS*+, FRAP y TAC, por métodos espectrofotométricos. Los hidrolatos se obtuvieron por hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger, obteniendo un rendimiento de 1.49 g (peso fresco) y de 0.21 g (peso fresco), en hoja y tallo, respectivamente. Mediante el ensayo antifúngico por el método de pozas, se observó un 100 % de inhibición sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* con la aplicación de 10 mg/mL tanto del hidrolato de hoja como de tallo, los que ejercieron un 40 % y 50 % de inhibición sobre *F. oxysporum*, respectivamente. De ambos hidrolatos se determinó la IC₅₀ e IC₁₀₀ para cada hongo, encontrando que *B. cinerea* resultó ser el más sensible al hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* con un valor de IC₅₀ e IC₁₀₀ de 1.3 mg/mL y 2.7 mg/mL, respectivamente. Con la determinación de la actividad antioxidante a las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/mL, se observaron los más altos porcentajes de actividad en el hidrolato de hoja, mostrando valores de 73 % y 71 % con las pruebas de DPPH* y ABTS*+, respectivamente, similares a los presentados con Trolox (90 %) y Ácido ascórbico (92 %). Para la determinación de las pruebas de FRAP y TAC el hidrolato de hoja fue el que obtuvo un mejor efecto reductor. Por otra parte, en la determinación de compuestos totales se demostró que el hidrolato de hoja presentó la mayor cantidad de fenoles, flavonoides y terpenos en comparación con el tallo. Estos resultados demuestran que la mayor actividad antioxidante se debe al alto contenido de compuestos totales tanto fenólicos como terpénicos, observado en el hidrolato de hoja; sin encontrar una relación directa con la alta actividad antifúngica del hidrolato de tallo sobre *B. cinerea*.

Palabras clave: Antifúngicos, Antioxidantes, Asteraceae, Fenólicos, Terpenos.

Abstract

Verbesina sphaerocephala A. Gray (Asteraceae) is an endemic plant of Mexico, which contains phenolic and terpene compounds, with both antifungal and antioxidant activity, but these properties are unknown in the hydrosols of the aerial parts. In the present investigation, hydrolates of both leaves and stems of *V. sphaerocephala* were obtained to evaluate the antifungal activity on the fungi *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*, the antioxidant activity through DPPH*, ABTS*+, FRAP and TAC assays. The hydrosols were obtained by hydrodistillation in a

Clevenger type equipment, obtaining a yield of 1.49 g (fresh weight) and 0.21 g (fresh weight), in leaf and stem, respectively. Through the antifungal assay by the well diffusion test, 100 % inhibition was observed on *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* with the application of 10 mg/mL of both leaf and stem hydrolates, which exerted 100 % and 50 % inhibition on *F. oxysporum*, respectively. From both hydrosols the IC₅₀ and IC₁₀₀ were determined for each fungus, finding that *B. cinerea* was the most sensitive to the stem hydrosol of *V. sphaerocephala* with a value of IC₅₀ and IC₁₀₀ of 1.3 mg/mL and 2.7 mg/mL, respectively. With the determination of the antioxidant activity at concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL, the highest percentages of activity were observed in the leaf hydrolate, showing values of 73 %, 71 %, with the tests of DPPH[•] and ABTS^{•+}, respectively, similar to those presented with Trolox (90 %) and ascorbic acid (92 %). For the determination of the FRAP and TAC tests, the leaf hydrolate obtained a greater reducing effect. On the other hand, the determination of total compounds showed that the leaf hydrolate had a higher number of phenols, flavonoids and terpenes compared to the stem. These results show that the higher antioxidant activity is due to the high content of total compounds both phenolic and terpene, observed in the leaf hydrolate; without finding a direct relationship with the high antifungal activity of the stem hydrolate on *B. cinerea*.

Keywords: Antifungals, Antioxidants, Asteraceae, Phenolic acids, Terpenes.

Introducción

En años recientes, la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos de origen natural se ha incrementado. Las implicaciones económicas, ambientales y sociales causadas por los hongos fitopatógenos han llevado a intentar reemplazar los compuestos sintéticos por algunos derivados naturales, principalmente de origen vegetal, ya que se han identificado numerosos compuestos bioactivos con un alto potencial antifúngico (Juárez-Becerra *et al.*, 2010; D'Amato *et al.*, 2018). Tal es el caso de los aceites esenciales e hidrolatos derivados de diferentes especies de plantas, los cuales son reconocidos como algunos de los productos con un alto potencial de efectividad contra los hongos fitopatógenos (Nazzano *et al.*, 2017). Los hidrolatos son también conocidos como hidrosoles o aguas florales que se producen durante el proceso de hidrodestilación de los aceites esenciales, en los que algunos componentes importantes del aceite esencial o el aceite esencial por sí mismo se encuentra disuelto parcialmente en los hidrolatos. Los principales componentes químicos de los hidrolatos son compuestos aromáticos volátiles solubles en agua como alcoholes

monoterpénicos y sesquiterpénicos, además de aldehídos y cetonas, así como fenilpropanoides (Aćimović *et al.*, 2020), grupos que aumentan la bioactividad de los compuestos terpénicos (Ludwiczuk, 2017).

Se ha probado la capacidad de los hidrolatos de distintas plantas, entre ellas, algunas de la familia Asteraceae, para inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Se ha reportado la efectividad *in vitro* del hidrolato de *Calendula arvensis* (Asteraceae) contra los hongos fitopatógenos *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger*, este hidrolato mostró un efecto inhibitorio del 100 % a una concentración de 30 mg/mL, mientras que el aceite esencial tuvo un efecto de total inhibición en *P. expansum* a una concentración de 60 mg/mL e inhibió el crecimiento de *A. niger* en un 86.6 % (Belabbes *et al.*, 2017).

Dambolena *et al.* (2010) y otros investigadores relacionan esta actividad antifúngica de diversos metabolitos secundarios de plantas, con la actividad antioxidante, por lo que es importante realizar investigaciones para confirmar esta relación, que se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y terpénicos y su posible interacción o sinergismo entre ellos, lo que hace a los aceites esenciales, pero mayormente a los hidrolatos, como los ideales para su uso como fungicidas, ya que pueden ejercer un efecto pro-oxidante, aumentando el estrés oxidativo, posible mecanismo de la muerte celular de los hongos (Vargas-Sánchez *et al.*, 2013).

Arciniegas *et al.* (2020), utilizaron partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) de *V. sphaerocephala*, las cuales secaron y molieron para obtener extractos con éter de petróleo y metanol. Encontraron la presencia de cadinenos y aislaron seis lactonas sesquiterpénicas, lo que confirma la presencia de terpenos en esta planta, pero no realizaron pruebas antifúngicas. Recientemente, Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) reportaron que los extractos de metanólicos de hoja y flores de *V. sphaerocephala* presentan un alto contenido de compuestos fenólicos como la rutina, los que muestran un alto potencial antimicrobiano, específicamente contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, Además, que los extractos acuosos de tallo poseen actividad

antifúngica principalmente sobre *B. cinerea* y una alta actividad antioxidante, reportando la presencia de compuestos terpénicos, mayormente del grupo de los sesquiterpenos, sugiriéndolos como los responsables de esta actividad biológica. Se desconoce si estos compuestos están presentes en los hidrolatos de esta planta, así como la relación de la actividad antifúngica y antioxidante de éstos (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2022). En la presente investigación se evaluó la actividad antifúngica y antioxidante *in vitro* de los hidrolatos de tallos y hojas de *V. sphaerocephala*.

Materiales y Métodos

Material biológico

Las partes aéreas (hojas y tallos) de *V. sphaerocephala* fueron recolectadas en los meses de octubre-noviembre de 2021, en la antigua carretera a Pátzcuaro, Morelia, Michoacán (19°37'46.6"N, -101°14'48.8"O). Se preparó un ejemplar de herbario para confirmar el género y especie, en el herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Figura 6) el cual fue correctamente identificado como la especie *Verbesina sphaerocephala* A. Gray y fue incorporado a la colección con el número de folio **31383**. La recolecta de hojas y tallos se realizó durante el periodo de floración.



Figura 5. Ejemplar herborizado de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (Fotografía de EBUM).

Obtención de los hidrolatos

Los hidrolatos se obtuvieron a partir de 1000 g de hojas y de tallos por separado, de *V. sphaerocephala*, utilizando un hidrodestilador tipo Clevenger, en donde se colocaron 200 g de materia vegetal fresca por proceso de hidrodestilación que se llevó a cabo durante 6 h en 2 L de agua a una temperatura de 90 °C. Los hidrolatos fueron concentrados en un rotavapor a una temperatura de 50 °C (Figura 7), para finalmente, ser preparados en metanol a una concentración de 100 mg/mL y almacenarlos 4 °C en oscuridad hasta su posterior uso y análisis.

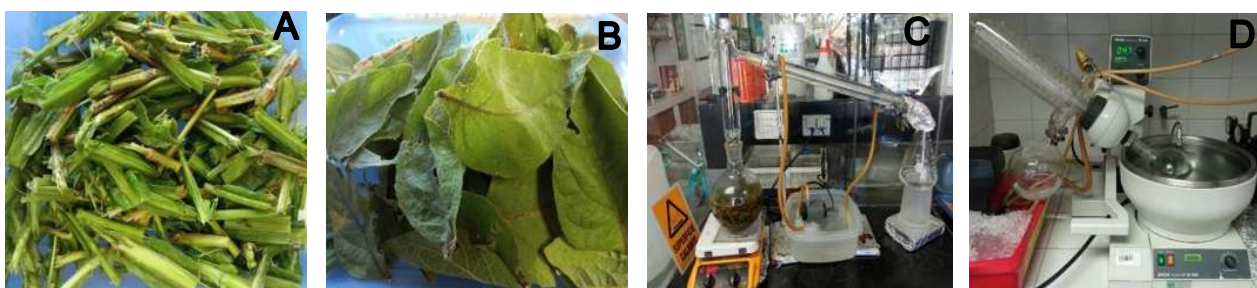


Figura 6. Proceso de obtención de los hidrolatos: A y B) Selección de 200 g de tallos y hojas de *V. sphaerocephala*, respectivamente; C) Proceso de hidrodestilación (hidrodestilador tipo Clevenger), se llevó a cabo durante 6 h a 90 °C; D) Evaporación en rotavapor a 50 °C.

Determinación de la actividad antifúngica in vitro

La determinación de la actividad antifúngica se realizó mediante ensayos con el método de difusión en pozos “*agar well diffusion assay*”, utilizando cajas Petri con medio PDA (Magaldi *et al.*, 2004), que consiste en hacer pozos en el medio de cultivo con una pipeta Pasteur como sacabocado y se vertieron 100 μ L del hidrolato (tanto de hojas como de tallos) previamente resuspendido en metanol, para posteriormente colocar discos de micelio (0.5 cm de diámetro) de los diferentes hongos bajo estudio. Como control positivo para la inhibición del crecimiento de los hongos en estudio, se utilizó el fungicida comercial BenomyI® (10 mg/mL), para considerarlo como 100 % de inhibición. Como control negativo se utilizó metanol, que también fue utilizado como disolvente de cada hidrolato. Los bioensayos fueron incubados a 28 ± 2 °C.

Los resultados se reportaron como el porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) cada 24 h. Se calculó de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{crecimiento de control} - \text{crecimiento de tratamiento})}{\text{crecimiento de control}} \times 100$$

De igual manera se obtuvieron las concentraciones letales media y total (IC₅₀ e IC₁₀₀), mediante una curva de concentración del extracto contra los porcentajes de inhibición para cada hongo.

Determinación del efecto de los hidrolatos de hoja y tallo sobre el micelio de B. cinerea

Se determinó el efecto de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* sobre el micelio del hongo *B. cinerea* por ser el más susceptible, de acuerdo con el valor de IC₅₀ e IC₁₀₀. Para esto se preparó medio líquido caldo nutritivo y se colocaron 500 µL de medio en tubos Eppendorf estériles. Para la prueba con micelio se colocó un fragmento de micelio de 2.5 mm y posteriormente, se agregaron 17 µL del hidrolato de tallo (IC₁₀₀ de 2.7 mg/mL) y 124 µL del hidrolato de hoja (IC₁₀₀ de 7.12 mg/mL) a cada tubo y se dejaron incubar durante 7 días. Una vez transcurridos los 7 días se tomaron 100 µL de cada tubo y se colocaron sobre cajas Petri con medio Papa-Dextrosa-Agar y se dejaron en incubación otros 7 días para observar finalmente observar el efecto de los hidrolatos. Se utilizó metanol como control negativo y Benomyl® (10 mg/mL) como control positivo.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro

Método de actividad captadora de radicales libres DPPH^{*}. - Para medir la capacidad de captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}) de los hidrolatos se realizó de acuerdo con Barriada-Bernal *et al.* (2014). Se preparó la solución de DPPH^{*}

(98 µg/mL en metanol). Se mezclaron 450 µL del reactivo DPPH* con 50 µL de cada hidrolato de *V. sphaerocephala* a concentraciones de 1, 5, y 10 mg/mL. Después de 20 min de incubación se midió la absorbancia a 517 nm con un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Se utilizaron el ácido ascórbico y Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como comparativos de antioxidantes sintéticos, a una concentración de 10 mg/mL y como blanco se utilizó metanol. Los resultados se muestran como el porcentaje de la capacidad de eliminación de radicales libres que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia del DPPH* mezclado con cada hidrolato y A_{blanco} es la absorbancia del DPPH* más metanol.

Método de actividad captadora de radical catiónico ABTS*+.- Para medir la actividad antioxidante por el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) de los hidrolatos se realizó según lo descrito por Rufino *et al.* (2010). Se generó el radical ABTS*+ mediante una reacción de oxidación del ABTS (7.4 mM) y K₂S₂O₈ (persulfato de potasio) (2.4 mM), en una relación 1:1, se puso en agitación en un frasco ámbar y en oscuridad durante 2 horas, a temperatura ambiente. La solución de ABTS*+ se diluyó con agua desionizada hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.01 a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Una vez que se obtuvo el radical, se mezclaron 450 µL de la solución de ABTS*+ y 50 µL de cada hidrolato de *V. sphaerocephala* a concentraciones de 1.5 y 10 mg/mL, después de 7 min de incubación se midió el valor de absorbancia de cada muestra a 734 nm. Se utilizaron el ácido ascórbico y Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como comparativos de antioxidantes sintéticos, a una concentración de 10 mg/mL y como blanco se utilizó metanol. Los resultados se muestran como el

porcentaje de la capacidad de eliminación de radicales libres que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia del ABTS^{•+} mezclado con cada hidrolato y A_{blanco} es la absorbancia del ABTS^{•+} más metanol.

Método de capacidad antioxidante total (TAC).- La capacidad antioxidante total se realizó de acuerdo con el método reportado por Prieto *et al.* (1999), Se mezclaron 50 μL de cada hidrolato de *V. sphaerocephala* a concentraciones de 10 mg/mL para tallo y a 1 mg/mL para hoja, con 500 μL de una solución de ácido sulfúrico (0.6 M), fosfato de sodio (28 mM) y molibdato de amonio 4 mM. Las muestras se pusieron en incubación en un termoblock (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) a una temperatura de 95 °C durante 90 min. Después las muestras se colocaron a temperatura ambiente para medir la absorbancia de las muestras a 694 nm en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA). Se generó una curva estándar de ácido ascórbico $A_{694} = 0.00015[\text{Ácido ascórbico}] - 0.0144, r = 0.9966$ a partir de diez concentraciones de ácido ascórbico (0.04-0.4 mg AA/mL). Los valores totales de la capacidad antioxidante se expresarán en miligramos de ácido ascórbico por mililitro (mg AA/mL).

Método del poder reductor férrico (FRAP).- La determinación del poder reductor férrico de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* se utilizó la metodología establecida por Mokrani *et al.* (2016) con modificaciones. Se mezclaron 100 μL de cada hidrolato (10 mg/mL) con 100 μL de buffer de fosfatos (0.2 M con pH 6.6) más 100 μL de ferrocianuro potásico (1 % m/v). Se dejó en incubación por 20 min a 50 °C en un *termoblock* digital (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Posteriormente se añadieron 100 μL de ácido tricloroacético (10 % m/v) más 200 μL de agua desionizada. Por último, se agregaron 40 μL de cloruro férrico (0.1 % m/v) y se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA).

El poder reductor férrico se calculó a partir de dos curvas de calibración $A_{700} = 0.0002[\text{Ácido gálico}] - 0.0013$, $r = 0.9748$ construida con seis concentraciones de ácido gálico (0.15 – 0.9 mg AG/mL) y otra curva $A_{700} = 0.0001[AG] - 0.0212$, $r = 0.9746$ construida con seis concentraciones de ácido gálico (0.3 – 1.8 mg AG/mL). Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por mililitro (mg AG/mL).

Determinación del contenido total de ácidos fenólicos (método de Folin-Ciocalteu)

Se determinó el contenido fenólico total usando el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Singleton *et al.* (1999) con modificaciones. Se mezclaron 250 μL de cada hidrolato de *V. sphaerocephala* y 1250 μL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 62.5 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se agitó por 5 min. Finalmente, se añadieron 185.5 μL de una solución de Na_2CO_3 al 20 % (m/v) y se dejaron incubando en oscuridad por 2 h, a temperatura ambiente. Se midieron las absorbancias en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA) a 760 nm. Para determinar los compuestos fenólicos en los extractos de *V. sphaerocephala* se evaluaron usando dos curvas de ácido gálico $A_{760} = 0.0009 [\text{Ácido gálico}] - 0.00005$, $r = 0.991$, obtenida usando diez concentraciones (0.01 – 0.1 mg AG/mL) y $A_{760} = 0.0007 [\text{Ácido gálico}] - 0.0037$, $r = 0.991$, obtenida usando diez concentraciones (0.03 – 0.3 mg AG/mL). El contenido fenólico total se expresó en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seca (mg EAG/g PS).

Determinación del contenido total de flavonoides

Para la determinación del contenido de flavonoides totales se utilizó el método descrito por Lamaison y Carnetl (1990). Se mezclaron 250 μL de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* con 250 μL de solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La absorbancia se midió después de 10 min en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA) a 430 nm. El total de flavonoides se expresó en

miligramos equivalentes de rutina por gramo de peso seco (mg R/g PS). El contenido de flavonoides totales se determinó empleando dos curvas de rutina $A_{430} = 0.0055 [Rutina] + 0.0002, r = 0.9938$ que se obtuvo usando diez concentraciones de rutina (0.001- 0.01 mg R/mL) y otra curva $A_{430} = 0.0059 [Rutina] + 0.0222, r = 0.9835$ que se obtuvo usando diez concentraciones de rutina (0.01 - 0.1 mg R/mL).

Determinación del contenido total de terpenoides

La determinación de terpenoides totales de los hidrolatos de hojas y tallos de *V. sphaerocephala*, se realizó de acuerdo con el método de Ghorai *et al.* (2012). Se mezclaron 250 μ L de cada hidrolato con 2.5 mL de cloroformo, se dejó reposar durante 1 min sobre una capa de hielo, para después agregar 100 μ L de ácido sulfúrico y se dejó reposar durante 1 h en oscuridad. Posteriormente midió la absorbancia de las muestras a 558 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS VELAB-VE51000UV). El contenido de terpenoides totales se determinó empleando una curva de linalool $A_{558} = 0.041 [Linalool] - 0.0408, r = 0.9665$, que se obtuvo a partir de siete concentraciones de linalool (1 - 30 mg/mL). El total de terpenoides se expresó en miligramos equivalentes de linalool por gramo de peso seco (mg L/g PS)

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (n=3), con la realización de cada experimento al menos dos veces. Éstos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía; las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, usando el software JMP.

Resultados y discusión

Debido a que no se obtuvo un óptimo rendimiento del aceite esencial tanto de hoja como de tallo de *V. sphaerocephala*, pero sí un alto rendimiento de los hidrolatos, éstos fueron utilizados para la determinación de la actividad antifúngica y antioxidante. Del hidrolato de hoja se obtuvo un rendimiento de 1.4984 g (peso fresco) y de tallo 0.2169 g (peso fresco).

Actividad antifúngica de hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Los resultados de inhibición se obtuvieron mediante la medición del diámetro (cm) del crecimiento, tomando como 100 % de inhibición cuando no se presentó crecimiento de micelio, similar al observado con el control positivo (C⁺, Benomyl®) y sin inhibición (0 %) al observado con el control negativo (C⁻, metanol o sin disolvente), con el que se mostró un crecimiento de 2 cm de diámetro (Figura 8).

Los hidrolatos de hojas de *V. sphaerocephala* mostraron un 100 % de inhibición sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, y solo un 40 % sobre *F. oxysporum*; la respuesta fue similar con el hidrolato de tallo, que ejerció el 100 % de actividad sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, y un 50 % en *F. oxysporum* (Figura 8), con la aplicación de 100 µL de cada hidrolato, obteniendo esta inhibición a una concentración de 10 mg/mL. En la figura 8B se muestran los porcentajes de inhibición de cada hidrolato sobre los tres hongos, en *Fusarium oxysporum* el Benomyl no mostró un efecto inhibitorio a 10 mg/mL (Figura 8C).

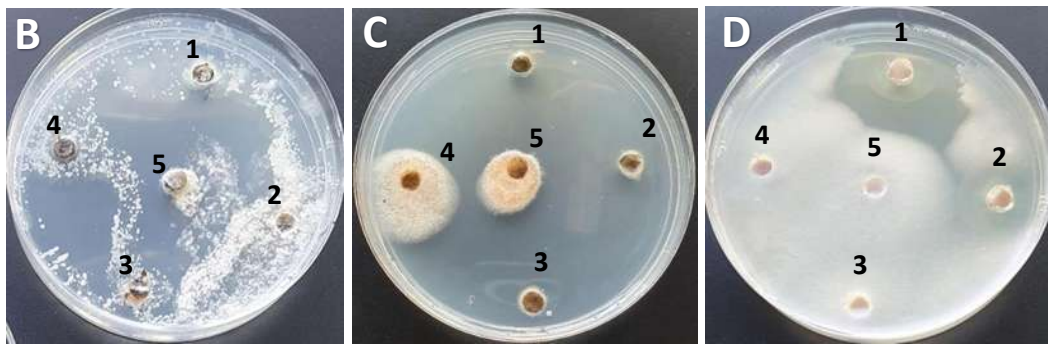
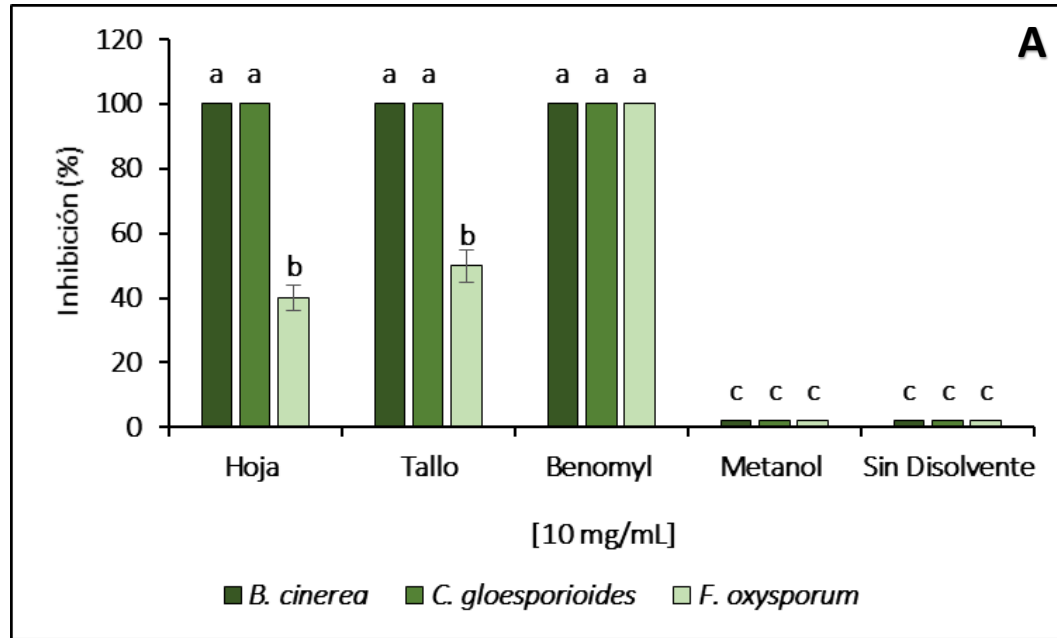


Figura 7. Crecimiento de micelio en *F. oxysporum* (A), *C. gloeosporioides* (B) y *B. cinerea* (C) en ensayos *in vitro* en PDA con la aplicación de metanol (Control -), Benomyl (Control +) y las diferentes concentraciones del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, a los 5 días del cultivo.

Valores de IC_{50} e IC_{100} de hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

La determinación de concentración inhibitoria 50 y 100 % (IC_{50} e IC_{100}) se realizó con los hidrolatos de hoja y tallo a diferentes concentraciones sobre los tres hongos en estudio, con la finalidad de identificar el hidrolato con el menor valor de IC_{50} y seleccionar el de mayor efectividad, para así mismo identificar el hongo más susceptible. En las figuras 9 y 10 se muestra el efecto de ambos hidrolatos sobre el crecimiento de micelio *in vitro* de los tres hongos en estudio, en la que se observan los diámetros de crecimiento correspondientes a los controles negativos (5 cm), control

positivo (0 cm) y a las diferentes concentraciones de cada hidrolato. Se observa que la inhibición es diferente en cada hongo y es dependiente de la concentración.

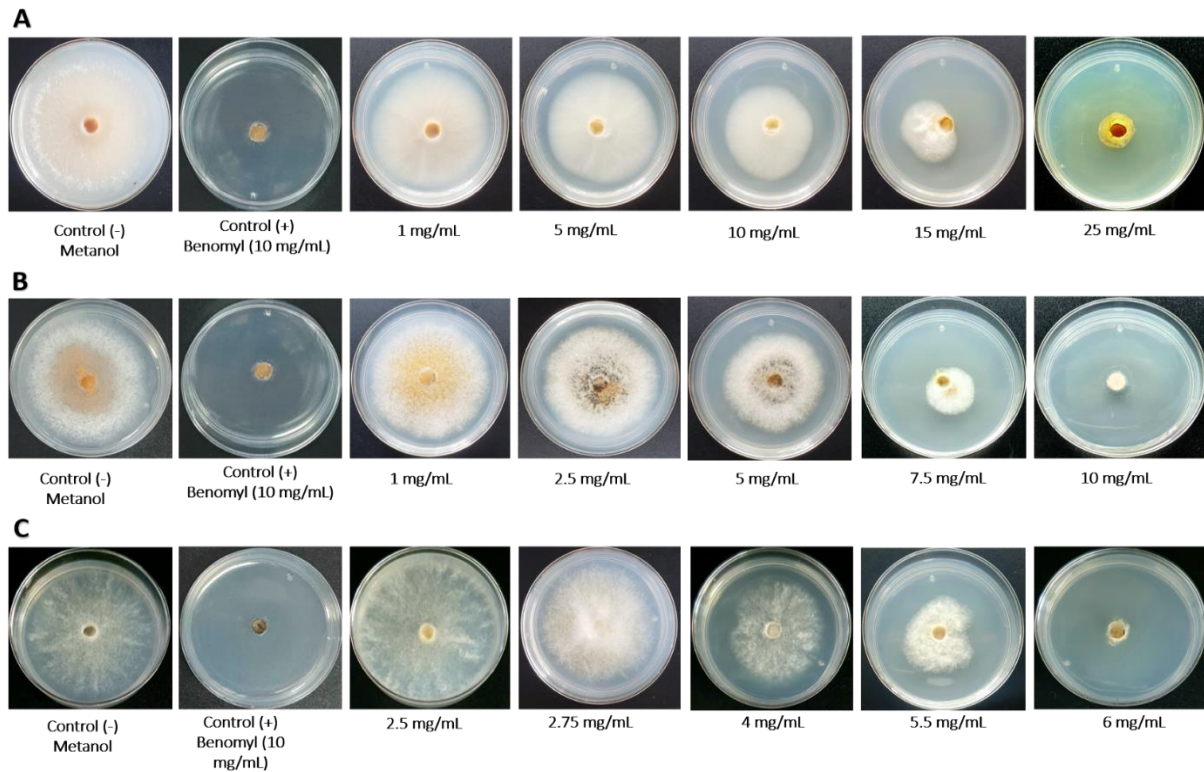


Figura 8. Crecimiento de micelio en *F. oxysporum* (A), *C. gloeosporioides* (B) y *B. cinerea* (C) en ensayos *in vitro* en PDA con la aplicación de metanol (Control -), Benomyl (Control +) y las diferentes concentraciones del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, a los 5 días del cultivo.

Para el hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala* se obtuvieron porcentajes de inhibición del 100 % a concentraciones de 20, 10 y 6 mg/mL sobre *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* (Figura 11) con valores de IC₅₀ de 12.4, 5.7 y 4.8 mg/mL, respectivamente (Cuadro 3). La IC₁₀₀ calculada para *B. cinerea* fue de 7.1 mg/mL. El hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* también mostró un efecto antifúngico dependiente de la concentración, ya que con las concentraciones de 20 mg/mL y 2.5 mg/mL, se obtuvieron valores de inhibición del 100 % para *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* (Figura 12). Los valores de IC₅₀ fueron de 11.3 y 9.1 mg/mL para los hongos *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, respectivamente. Para *B.*

cinerea se obtuvieron los valores más bajos de IC₅₀ (1.3 mg/mL) y de IC₁₀₀ (2.7 mg/mL) (Cuadro 3).

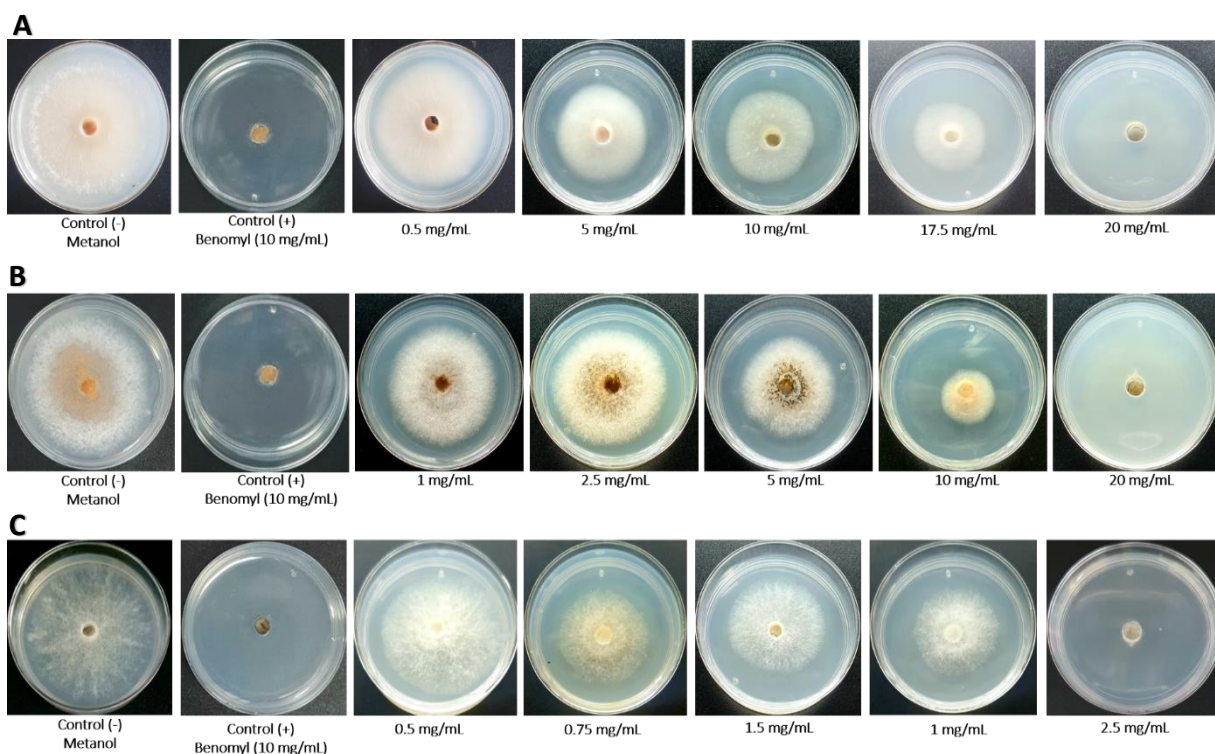


Figura 9. Crecimiento de micelio en *F. oxysporum* (A), *C. gloeosporioides* (B) y *B. cinerea* (C) en ensayos *in vitro* en PDA con la aplicación de metanol (Control -), Benomyl (Control +) y las diferentes concentraciones del hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala*, a los 5 días del cultivo.

Cuadro 3. Valores de la concentración letal media (IC₅₀) y concentración letal total (IC₁₀₀) de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*, observados en hongos fitopatógenos.

HONGO	HOJA		TALLO	
	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀
<i>Fusarium oxysporum</i>	12.4 mg/mL	25 mg/mL	11.3 mg/mL	25.6 mg/mL
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5.7 mg/mL	10.1 mg/mL	9.1 mg/mL	19.3 mg/mL
<i>Botrytis cinerea</i>	4.8 mg/mL	7.1 mg/mL	1.3 mg/mL	2.7 mg/mL

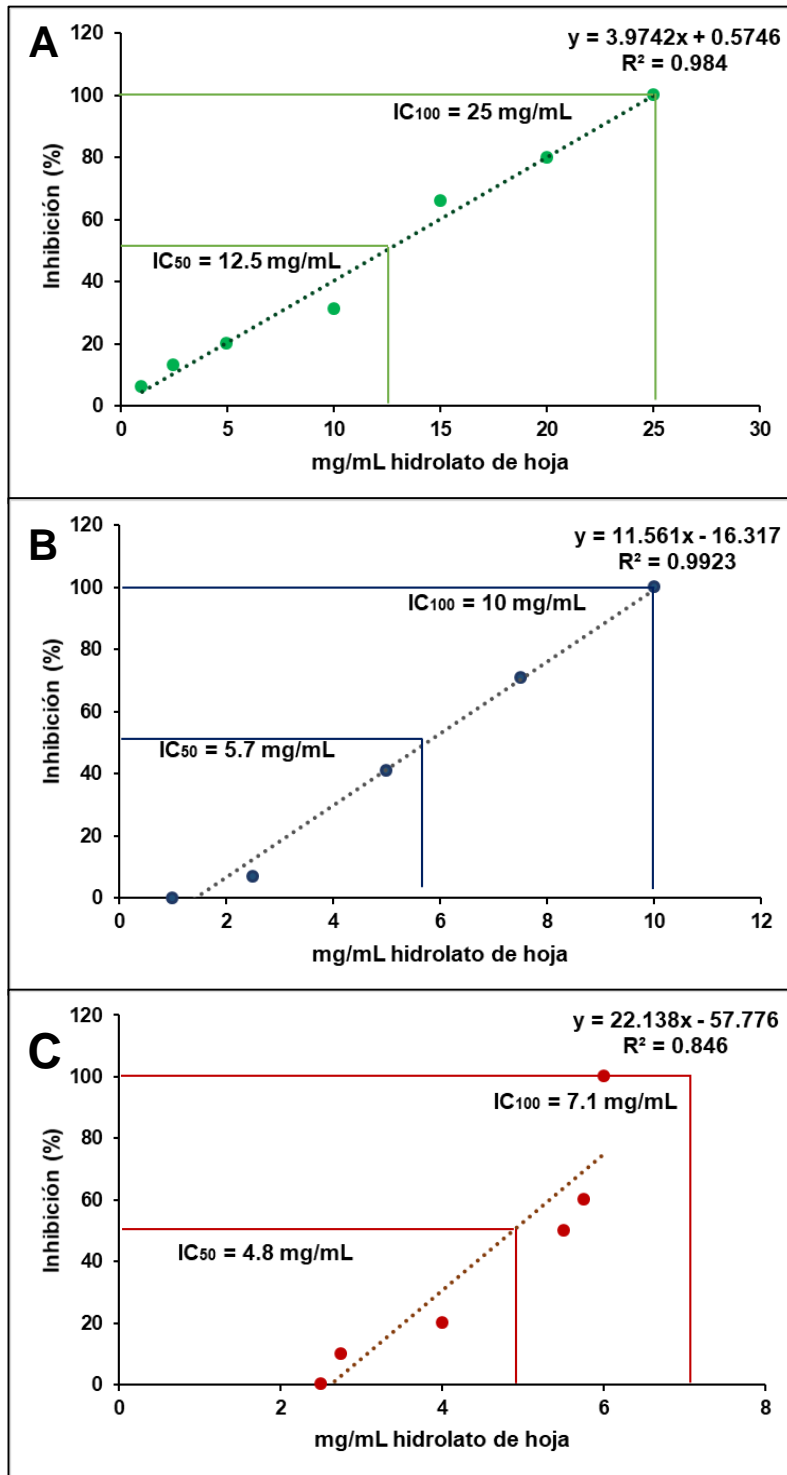


Figura 10. Porcentajes de inhibición y curvas de concentraciones del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala* para la determinación de IC_{50} y IC_{100} sobre los hongos A) *Fusarium oxysporum*, B) *Colletotrichum gloeosporioides* y C) *Botrytis cinerea*.

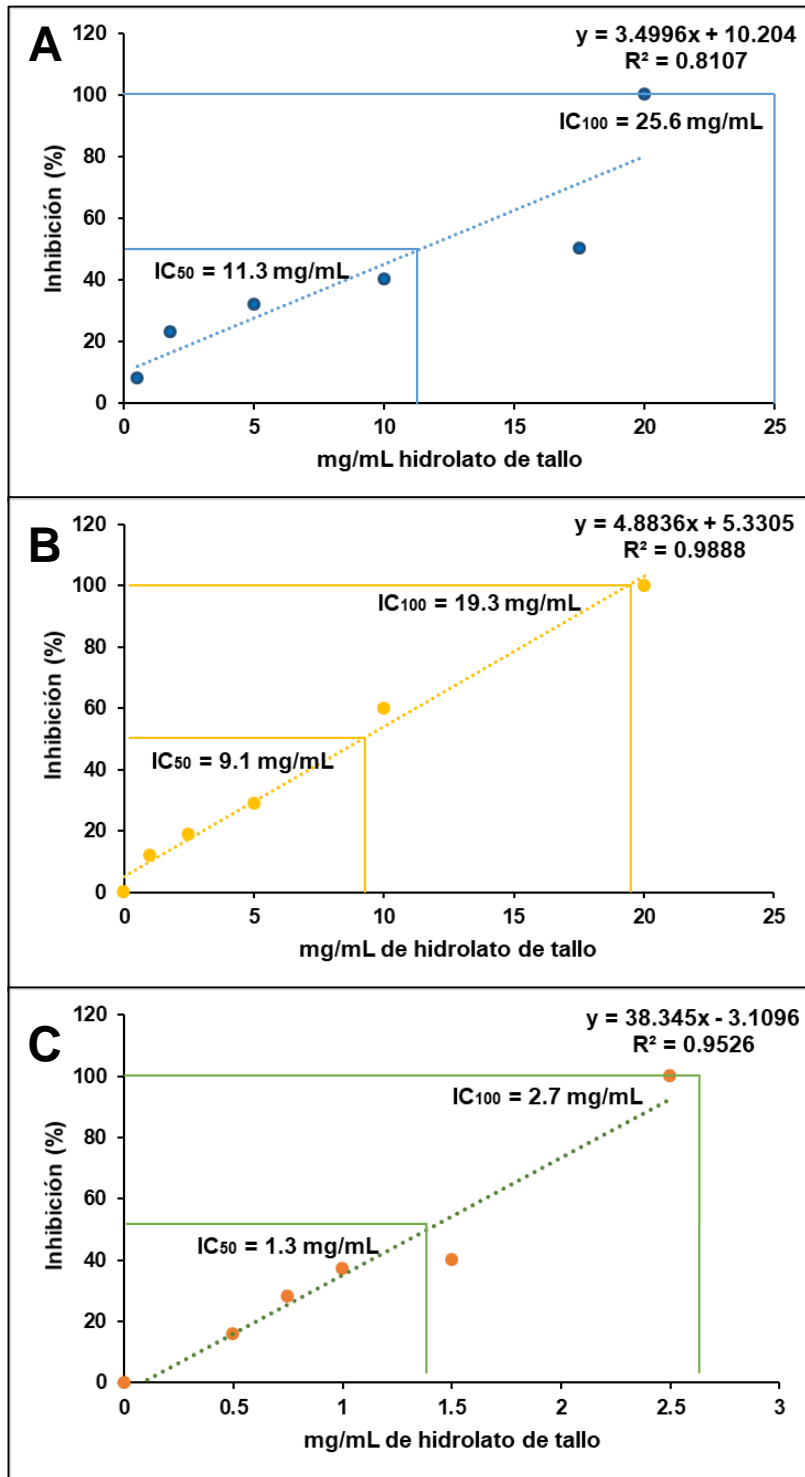


Figura 11. Porcentajes de inhibición y la curva de concentraciones del hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* para la determinación de IC_{50} y IC_{100} sobre los hongos A) *Fusarium oxysporum*, B) *Colletotrichum gloeosporioides* y C) *Botrytis cinerea*.

Con los resultados obtenidos se confirma el efecto antifúngico de los hidrolatos de hoja y de tallo de *V. sphaerocephala*, ya que para todos los hongos bajo estudio se obtuvieron porcentajes del 100 % de inhibición. Sin embargo, de acuerdo con el valor de IC₅₀ e IC₁₀₀ calculada existen diferencias entre los hidrolatos. La IC₅₀ del hidrolato de tallo sobre *B. cinerea* fue identificada como la más baja con un valor de 1.3 mg/mL (Cuadro 3).

Se ha demostrado que los hidrolatos derivados de diferentes partes de las plantas presentan un alto potencial de inhibición sobre hongos fitopatógenos, esto por la presencia de diversos compuestos químicos volátiles como monoterpenos y sesquiterpenos principalmente (Nazzaro *et al.*, 2017; Acimović *et al.*, 2020). Aunque existen pocas investigaciones enfocadas en la aplicación de los hidrolatos para la inhibición de hongos fitopatógenos, Belabbes *et al.* (2017) reportaron que el hidrolato de *Calendula arvensis* presentó porcentajes de inhibición del 100 % de *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger*, lo que demuestra la presencia de compuestos con actividad antifúngica en los hidrolatos.

Con los resultados obtenidos se confirma el efecto antifúngico de los hidrolatos de hoja y de tallo de *V. sphaerocephala*, ya que para todos los hongos bajo estudio se obtuvieron porcentajes del 100 % de inhibición. Sin embargo, de acuerdo con el valor de IC₅₀ e IC₁₀₀ calculada existen diferencias entre los hidrolatos. La IC₅₀ del hidrolato de tallo sobre *B. cinerea* fue identificada como la más baja con un valor de 1.3 mg/mL (Cuadro 3).

Se ha demostrado que los hidrolatos derivados de diferentes partes de las plantas presentan un alto potencial de inhibición sobre hongos fitopatógenos, esto por la presencia de diversos compuestos químicos volátiles como monoterpenos y sesquiterpenos principalmente (Nazzaro *et al.*, 2017; Acimović *et al.*, 2020). Aunque existen pocas investigaciones enfocadas en la aplicación de los hidrolatos para la inhibición de hongos fitopatógenos, Belabbes *et al.* (2017) reportaron que el hidrolato de *Calendula arvensis* presentó porcentajes de inhibición del 100 % de *Penicillium*

expansum y *Aspergillus niger*, lo que demuestra la presencia de compuestos con actividad antifúngica en los hidrolatos.

En otras investigaciones como la realizada por Ramírez-González *et al.* (2016), obtuvieron valores del 100 % de inhibición con el hidrolato de *Syzygium aromaticum* sobre *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* lo que coincide con los resultados obtenidos con los hidrolatos de tallo y hoja de *V. sphaerocephala*. Por otra parte, Paramalingam *et al.* (2021), reportaron porcentajes de inhibición del 64 % del hidrolato de *Melaleuca alternifolia* sobre *F. oxysporum*, un valor similar al obtenido con el hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* para el mismo hongo.

El hongo *B. cinerea* resultó ser el más susceptible al hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* con un 100 % de inhibición y un valor de IC₅₀ de 1.3 mg/mL. Esto coincide con el trabajo realizado por Zatlá *et al.* (2020), que demostraron la actividad antifúngica del hidrolato de *Marrubium vulgare*, observando una inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en un 85 % a una concentración de 0.15 mg/mL.

Efecto del hidrolato de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* sobre el micelio de *B. cinerea*

Se realizaron pruebas *in vitro* para observar el efecto de los hidrolatos de hoja y tallo sobre el micelio de *B. cinerea* y se observó que hubo un efecto fungicida sobre el hongo. Tanto el hidrolato de hoja como el de tallo (Figura 13A y 13B) inhibieron el crecimiento del hongo, evitando la formación de micelio, que es un efecto que se puede comparar con el obtenido con el control positivo Benomyl (Figura 13C). El micelio continuó su crecimiento al tratarse con el disolvente (metanol) (Figura 13C).

Actividad antioxidante de hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante de extractos vegetales, los que son desarrollados tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque unos pocos son los más utilizados por sus características de fácil aplicación, confiabilidad y que se

realizan en un tiempo relativamente corto (Huang *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2013; Shalaby y Shanab, 2013), tal es el caso de los métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, TAC y FRAP.

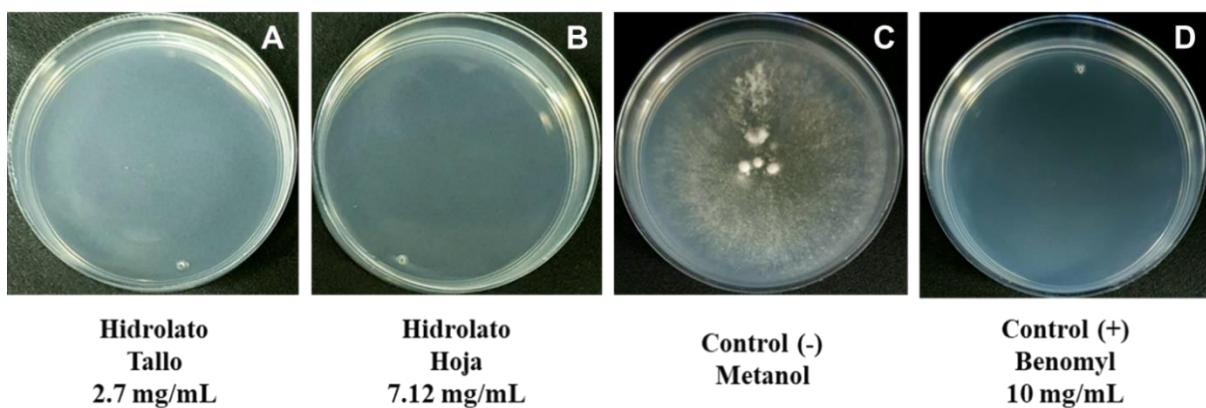


Figura 12. Inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* con la aplicación del hidrolato de tallo y hoja de *Verbesina sphaerocephala* y Benomyl (Control ⁺) en comparación con metanol (Control ⁻).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos por el método DPPH[•] y ABTS^{•+} a una concentración de 10, 5 y 1 mg/mL. Estos resultados se expresan como el porcentaje de inhibición para ambos radicales. Observando que para DPPH[•] (Figura 14A) los porcentajes de actividad del 73, 65 y 26 % del hidrolato de hoja a 10, 5 y 1 mg/mL, respectivamente, mientras que para el hidrolato de tallo fueron de 31, 18 y 11 % a las mismas concentraciones. No se observa diferencia significativa entre los controles Trolox y Ácido ascórbico comparado con el hidrolato de hoja a 10 mg/mL aunque es similar con la concentración de 5 mg/mL. Por otra parte, el hidrolato de tallo no alcanzó el 50 % de inhibición del radical DPPH[•] incluso a la concentración más alta (Figura 14A).

Para el método ABTS^{•+} (Figura 14B) el hidrolato de hoja alcanzó porcentajes de inhibición del 71 % a una concentración de 1 mg/mL, no se muestran los resultados obtenidos para las concentraciones de 10 y 5 mg/mL ya que la solución se sobresaturó.

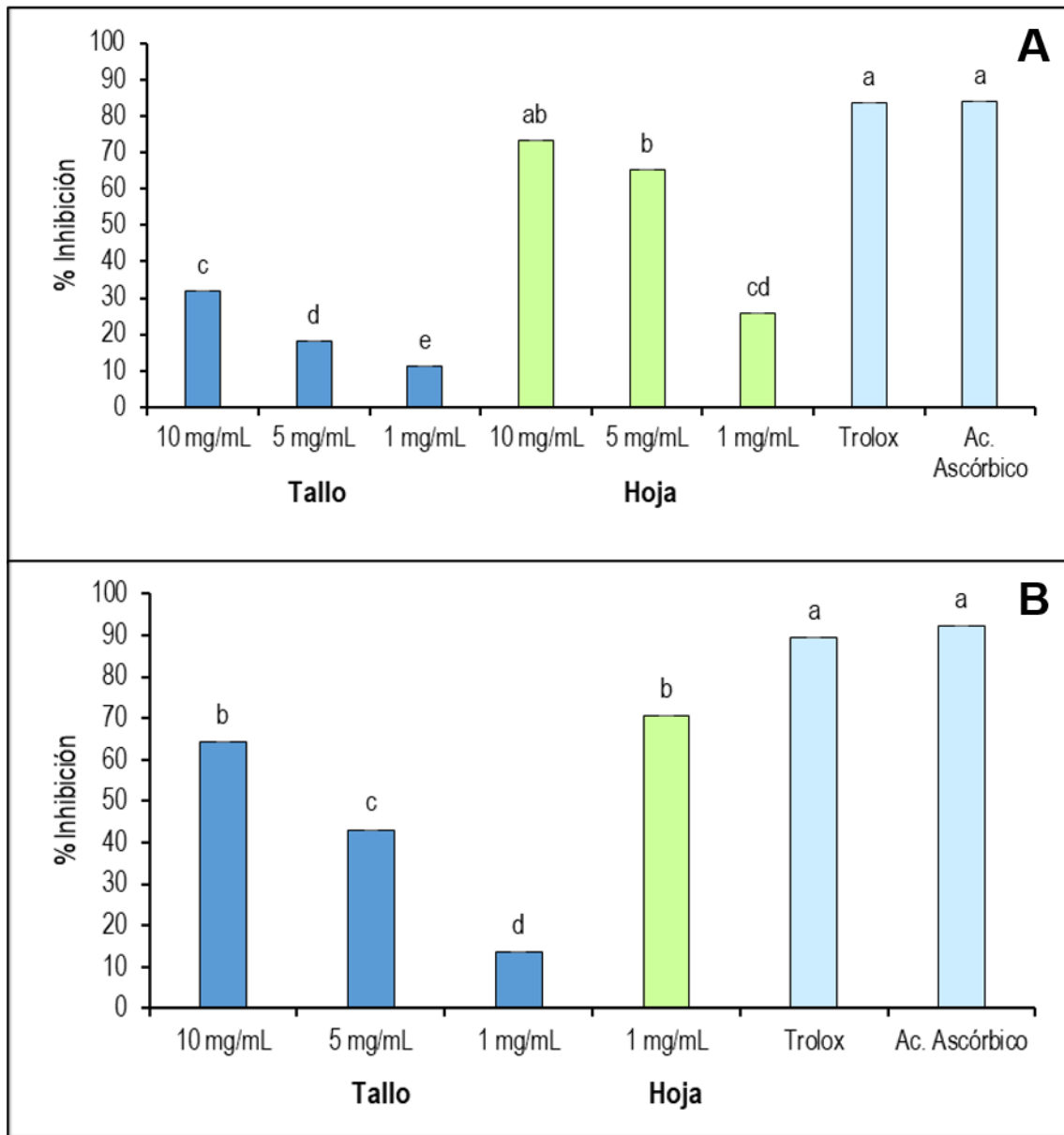


Figura 13. Porcentajes de la actividad antioxidante de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbena sphaerocephala*, determinados por el método DPPH[•] (A) y ABTS^{•+} (B). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Para el hidrolato de tallo de obtuvieron porcentajes de inhibición del 64, 43 y 13 % a 10, 5 y 1 mg/mL respectivamente. No se observó diferencia significativa entre el hidrolato de hoja (1 mg/mL) y tallo (10 mg/mL), estos valores fueron significativamente menores a los obtenidos con Trolox (86 %) y ácido ascórbico (92 %) (Figura 14B).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Shen *et al.* (2017) quienes reportaron que el hidrolato obtenido a partir de flores de *Areca catechu* alcanzó porcentajes de inhibición del 82 % para el radical DPPH*. Mientras que para ABTS*+ el hidrolato de flor de *Cocos nucifera* L. obtuvo porcentajes de inhibición del 64 %. La alta actividad antioxidante de los hidrolatos de hoja puede explicarse de acuerdo con un estudio previo realizado por Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) con *V. sphaerocephala* en donde demuestran que en las hojas hay un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, además de que las hojas mostraron también una alta actividad antioxidante por ambos métodos comparado con las flores.

Los resultados para la técnica de reducción de iones férricos (FRAP) y la capacidad antioxidante total (TAC) (Cuadro 4) se expresan en mg Ácido Gálico/mL para FRAP y para TAC en mg Ácido Ascórbico/mL. Como se observa el hidrolato de hoja obtuvo los valores más altos para FRAP y TAC con 25.11 y 31.11 respectivamente, lo que indica una mayor actividad antioxidante para ambos métodos, mostrando diferencias significativas con los valores del hidrolato de tallo.

Cuadro 4. Valores de actividad antioxidante de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* para la técnica de reducción de iones (FRAP) y capacidad antioxidante total (TAC).

Hidrolato	FRAP [mg AG/mL]	TAC [mg AA/mL]
Tallo	6.15 ± 0.03 ^b	3.08 ± 0.34 ^a
Hoja	25.11 ± 1.25 ^b	31.11 ± 1.27 ^b

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

De acuerdo con los resultados de FRAP y TAC las hojas tienen una mayor actividad antioxidante, esto que coincide con el trabajo de Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) en donde obtuvieron valores de hasta 51.05 mg EAA/g ES en extractos metanólicos de hojas para la técnica TAC, lo que se sugiere puede estar relacionado con el contenido de flavonoides.

Estos resultados muestran que la actividad antioxidante es mayor en el hidrolato de hoja con los diferentes métodos utilizados, en comparación a los valores mostrados por el hidrolato de tallo.

Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos en los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Se evaluó el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* y se observaron diferencias en el contenido de ambos, como se muestra en el Cuadro 5. Los resultados se expresan como mg Equivalentes de Ácido Gálico/g PS (peso seco), para flavonoides totales en mg Equivalentes de Rutina/g PS (peso seco) y para los terpenos en mg Equivalentes de Linalool/g PS (peso seco).

Cuadro 5. Contenido de fenoles totales (CFT), de flavonoides totales (CFVT) y de terpenos totales (CTT) de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*.

Hidrolato	CFT [mg EAG/g PS]	CFVT [mg ER/g PS]	CTT [mg L/g PS]
Tallo	5.71 ± 0.56	0.68 ± 0.05	1.13 ± 1.24
Hoja	22.69 ± 1.25	3.13 ± 0.21	8.93 ± 0.07

De acuerdo con los resultados observados para fenoles, flavonoides y terpenos totales, el hidrolato de hoja obtuvo una mayor concentración de los tres grupos de compuestos en comparación al hidrolato de tallo. Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) reportaron que las hojas de *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae) poseen un alto contenido de fenoles y flavonoides en hojas (10.17 mg EAG/ g ES) en relación con las

flores (7.94 mg EAG/ g ES). De igual manera Amari *et al.* (2014) demostraron que las hojas de *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae) contienen una mayor cantidad de flavonoides en las hojas (3.15 mg EQ/g) en comparación con los tallos (2.61 mg EQ/g), sin embargo, ocurrió lo contrario en el contenido de fenoles totales, en los tallos se obtuvieron concentraciones más altas (93.78 mg EAG/g) en comparación con las hojas (61.12 mg EAG/g). Por otra parte, en el trabajo realizado por Tandon y Gupta (2020) reportaron el contenido total de terpenos de tallos y hojas de *Sphaeranthus indicus* (Asteraceae) en donde demostraron que las en las hojas hay una mayor cantidad de terpenos (196.49 mg L/ g ES) comparado con los tallos (48.20 mg L/ g ES). Estas diferencias en el contenido de compuestos de una parte de la planta a otra se atribuyen a que estos metabolitos secundarios desempeñan diversas funciones para protegerse de factores externos, por lo que los cambios en las condiciones como la temperatura, exposición a la radiación UV, humedad, sequía y salinidad, además de las interacciones biológicas, tienen un impacto en su producción y acumulación (Isah, 2019; Thakur, 2019).

Debido a las diferencias encontradas entre los hidrolatos de hoja y tallo es necesario realizar un fraccionamiento para la separación de grupos de compuestos de acuerdo con su polaridad y con esto elucidar con mayor precisión su posible relación con sus propiedades bioactivas como la actividad antifúngica y antioxidante.

Conclusiones

Tanto el hidrolato de hoja como el de tallo de *V. sphaerocephala* mostraron un efecto inhibitorio del 100 %, sobre *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* a una concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, con el hidrolato de tallo se obtuvieron los valores más bajos de IC₅₀ (1.3 mg/mL) y IC₁₀₀ (2.7 mg/mL) sobre *B. cinerea*, considerándolo como el más efectivo. El hidrolato de hoja obtuvo una mayor actividad antioxidante en las técnicas DPPH*, ABTS*, FRAP y TAC, encontrando una relación directa con el alto contenido de fenoles, flavonoides y terpenos.

Literatura citada

- Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Amari, N. O., Bouzouina, M., Berkani, A., & Lotmani, B. (2014).** Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 104–109.
- Arciniegas A., Pérez-Castorena A.L., Villaseñor J.L., Romo de Vivara A. (2020).** Cadinenes and other metabolites from *Verbesina sphaerocephala* A. Gray. *Biochemical Systematics and Ecology*, 93: 104183.
- Aćimović, M. G., Tešević, V. V., Smiljanić, K. T., Cvetković, M. T., Stanković, J. M., Kiproovski, B. M., & Sikora, V. S. (2020).** Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced technologies*, 9(2), 54-70.
- Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., & Herrera-Arrieta, Y. (2014).** Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12(2), 105-114.
- Belabbes R., Dib M.E.A., Djabou N., Ilias F., Tabti B., Costa J., Muselli A. (2017).** Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from western Algeria. *Chemistry & biodiversity*, 14(5), e1600482.
- Chan W.-K., Tan L.T.-H., Chan K.-G., Lee L.-H., Goh B.-H. (2016).** Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, 21(2), 529.
- D'Amato S., Serio A., López C.C., Paparella A. (2018).** Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126-137.
- Dambolena J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Dzamic A., Sokovic M., Ristic M.S. (2009).** Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chem Nat Compd*, 45, 259–261.
- Edziri H., Maha M., Imed Ch., Mahjoub A. (2010).** Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Natural Product Research*, 24(9), 789-796.
- Félix E., Sánchez-Escalante J.J., Sánchez-Escalante A. (2014).** Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotechnia*, 16(1), 32-37.
- Ghorai N., Chakraborty S., Gucchait S., Saha S.K., Biswas S. (2012).** Estimation of total terpenoids concentration in plants tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*, 5(10), 1038.
- Huang W.Y., Zhang H.C., Liu W.X., Li C.Y. (2012).** Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102.
- Isah, T. (2019).** Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*, 52.
- Juárez-Becerra G.P., Sosa-Morales M.E., López-Malo A. (2010).** Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.

- Karamać M., Kosińska A., Pegg B.R. (2005).** Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 165-170.
- Kibwage I.O., Mwalukumbi J.M, Kariuki S.T. (2010).** Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Inn. Food. Sci. Emerging. Technol.*, 11, 410-414.
- Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. (2003).** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Lamaison, J. y Carnet, A. (1990).** Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) D. C. flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 65, 315-320
- Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev M.I. (2017).** Terpenoids. *In Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- McPhail D., Skibsted L., Tijburg L. (2001).** Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidants assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidants compounds. *European Food Research Technology*, 212(3), 319:328.
- Mokrani, A., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Tamsamani, H., Renouf, E., ... & Richard, T. (2016).** Phenolic contents and bioactive potential of peach fruit extracts. *Food Chemistry*, 202, 212-220.
- Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Feo V.D. (2017).** Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
- Paramalingam, P., Anuar, M. S. K., Baharum, N. A., Abdullah, J. O., Abd Aziz, J., & Saidi, N. B. (2021).** In vitro evaluation of antifungal activity of selected malaysian plants against the wilt pathogen of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Malaysian Journal Of Science*, 16-24.
- Prieto, P., Pineda, M. y Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.
- Ramírez González, S. I., López Báez, O., Espinosa Zaragoza, S., & Wong Villarreal, A. (2016).** Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(8), 1879-1891.
- Rodríguez-Valdovinos K.Y., Salgado-Garciglia R., Vázquez-Sánchez M., Álvarez-Bernal D., Oregel- Zamudio E., Ceja-Torres L.F., Medina-Medrano J.R. (2021).** Quantitative analysis of rutin by HPTLC and in vitro antioxidant and antibacterial activities of phenolic-rich extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants*, 10(3), 475.
- Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Medina-Medrano, J. R., Hernandez-García, A., Saavedra-Molina, F.A., Del Río-Torres, R.E.N., López-Mesa, J.E., García-Rodríguez, Y.M., Espinosa-García, F.J., Salgado-Garciglia, R. (2022).** Actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* y perfil de compuestos volátiles del extracto acuoso de tallo de *Verbesina sphaerocephala*. REDBIO, Mérida, Yucatán, México.
- Rufino, M. D. S. M., Pérez-Jiménez, J., Tabernero, M., Alves, R. E., De Brito, E. S., & Saura-Calixto, F. (2010).** Acerola and cashew apple as sources of antioxidants and dietary fibre. *International journal of food science & technology*, 45(11), 2227-2233.
- Rutiaga Q.J.G. (2001).** Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. *Buchverlag Gräffelfing*. München. p. 49.

Schawrz K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinomen M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., Serteser A., Paiva-Martins F., Lima J.L., Reis S., Borges F. (2009). Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *Grasas y Aceites*, 60(2), 147-154.

Shalaby E.A., Shanab S.M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(5), 556-564.

Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H., Song, F. (2017). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L. *Industrial Crops and Products*, 96, 110-119.

Tandon, D., & Gupta, A. K. (2020). Comparative assessment of antimicrobial and antioxidant activity between whole plant and parts of *Sphaeranthus indicus* Linn.(Asteraceae). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 1-15.

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.

Topal U., Sasaki M., Goto M., Otles S. (2008). Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plant obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8), 610-634.

Torres-Martínez R., Bello-González M.Á., Molina-Torres J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Lara-Chávez B.N., Salgado-Garciglia R. (2014). Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21), 122-134.

Vargas-Sánchez R.D., Torrescano-Urrutia G.R., Mendoza-Wilson A.M., Vallejo-Galland B., Acedo-Viuda-Martos M., Ruiz N., Sánchez Z., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spices plants widely used in a Mediterranean diet. *Journal of Flavour and Fragrance*, 25: 13-19.

Yang S.A., Jeon S.K., Lee E.J., Shim C.H., Lee I.S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151.

Zatla, A. T., Mami, I., Dib, M. E., & Sifi, M. E. A. (2020). Efficacy of essential oil and hydrosol extract of *Marrubium vulgare* on fungi responsible for apples rot. *Anti-Infective Agents*, 18(3), 285-293.

7.2. Capítulo II. Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* con mayor actividad antifúngica y antioxidante.

Resumen

Con el análisis del perfil químico de los principales compuestos volátiles de ambos hidrolatos, se observó una diferencia entre en la composición y el contenido de éstos. En el de hoja, los volátiles mayoritarios son nerolidol (12.89 %), isoledeno (15.18 %), santonina (10.58 %), humuleno (10.09 %) y ambrosina (20.66 %), que representan el 69.4 % del total de compuestos cuantificados. En el hidrolato de tallo, los compuestos mayoritarios son santonina (8.78 %), humuleno (9.02 %), ledeno (10.24 %), damsina (10.82 %) y ambrosina (20.22 %), que representan el 59.08 % del total de compuestos identificados, los cuales pertenecen en su mayoría al grupo de los sesquiterpenos, más específicamente lactonas sesquiterpénicas. Para determinar los posibles compuestos responsables de la actividad antifúngica, se realizó el fraccionamiento de los hidrolatos de hoja y tallo, utilizando un fraccionamiento líquido-líquido continua con los disolventes metanol, acetato de etilo y hexano. Con las fracciones de ambos hidrolatos a una concentración de 10 mg/mL se determinó la actividad antioxidante, observando que la fracción de acetato de etilo de hoja fue la que tuvo la mayor actividad con los métodos de DPPH^{*} (44 %), TAC (47 mg AG/mL) y FRAP (33.7 mg AA/mL), para ABTS⁺ hubo diferencias significativas entre las tres fracciones, sin embargo, las tres fracciones obtuvieron porcentajes de inhibición más altos comprados con las fracciones de tallo. Aunque las tres fracciones inhibieron el crecimiento de *B. cinerea*, la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo presentó los valores más bajos de IC₅₀ (3 mg/mL) y de IC₁₀₀ (5.4 mg/mL), aunque los valores para el 100 % de inhibición con la fracción hexánica, tanto de los hidrolatos de hoja como de tallo, son considerados también efectivos. La fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos mostraron los valores más altos de fenoles totales y de flavonoides, y solamente en la fracción hexánica se observó el mayor contenido de terpenos totales. Con el análisis del perfil químico por CG-EM, se observó una diferencia en el contenido y composición de los principales compuestos volátiles de ambos hidrolatos. En el de hoja, los volátiles mayoritarios son nerolidol (12.89 %), isoledeno (15.18 %), santonina (10.58 %), humuleno (10.09 %) y ambrosina (20.66 %). En el hidrolato de tallo, los compuestos mayoritarios son santonina (8.78 %), humuleno (9.02 %), ledeno (10.24 %), damsina (10.82 %) y ambrosina (20.22 %). Con el análisis de las fracciones de ambos hidrolatos, se determinaron el metileugenol, el canfeno, el timol, el nerolidol, el isoledeno, β -bisabolol, el espatulenol y el ledeno; el nerolidol, el cariofileno, el isoledeno, el α -santalol, el β -bisabolol, el espatulenol, la santonina, el humuleno, el ledeno, la ambrosina y la damsina, son los compuestos de mayor contenido en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, aunque se observaron también en el hidrolato de tallo.

Palabras clave: Antifúngicos, antioxidantes, compuestos volátiles, hidrolatos.

Abstract

With the analysis of the chemical profile of the main volatile compounds of both hydrolysates, a difference was observed between their composition and content. In the leaf hydrolate, the major volatiles are nerolidol (12.89 %), isodene (15.18 %), santonene (10.58 %), humulene (10.09 %) and ambrosine (20.66 %), which represent 69.4 % of the total quantified compounds. In the stem hydrolate, the majority compounds are santonin (8.78%), humulene (9.02%), ledene (10.24 %), dampsin (10.82 %) and ambrosine (20.22 %), representing 59.08 % of the total identified compounds, which mostly belong to the sesquiterpenes group, more specifically sesquiterpene lactones. To determine the possible compounds responsible for the antifungal activity, the leaf and stem hydrolates were fractionated using a continuous liquid-liquid fractionation with the solvents methanol, ethyl acetate and hexane. With the fractions of both hydrolysates at a concentration of 10 mg/mL the antioxidant activity was determined, observing that the fraction of leaf ethyl acetate had the highest activity with the DPPH[•] (44 %), TAC (47 mg AG/mL) and FRAP (33.7 mg AA/mL) methods, for ABTS^{•+} there were significant differences between the three fractions, however, the three fractions obtained higher inhibition percentages compared to the stem fractions. Although all three fractions inhibited the growth of *B. cinerea*, the ethyl acetate fraction of the stem hydrolate presented the lowest IC₅₀ (3 mg/mL) and IC₁₀₀ (5.4 mg/mL) values, although the values for 100 % inhibition with the hexane fraction of both leaf and stem hydrolysates are also considered effective. The ethyl acetate fraction of both hydrolysates showed the highest values for total phenols and flavonoids, and only in the hexane fraction was the highest content of total terpenes observed. With the analysis of the chemical profile by GC-MS, a difference in the content and composition of the main volatile compounds of both hydrolysates was observed. In the leaf hydrolate, the major volatiles are nerolidol (12.89 %), isodene (15.18 %), santonene (10.58 %), humulene (10.09 %) and ambrosine (20.66 %). In the stem hydrolate, the majority compounds are santonin (8.78 %), humulene (9.02 %), ledene (10.24 %), dampsin (10.82 %) and ambrosin (20.22 %). With the analysis of the fractions of both hydrolysates, methyleugenol, camphene, thymol, nerolidol, isodene, β -bisabolol, spatulenol and ledene were determined; nerolidol, caryophyllene, isodene, α -santalol, β -bisabolol, spatulenol, santonene, humulene, ledene, ambrosine, and dampsin, are the compounds with the highest content in the ethyl acetate fraction of the leaf hydrolate of *V. sphaerocephala*, although they were also observed in the stem hydrolate.

Key words: Antifungals, antioxidants, volatile compounds, hydrolates.

Introducción

En las plantas se sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios en respuesta a las interacciones que ocurren entre la planta y su entorno, así como también pueden ejercer un efecto protector y de defensa contra herbívoros y patógenos. Debido a esta amplia variedad de funciones en las plantas los compuestos que producen también son muy diversos, como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos y terpenoides, los cuales son de diferente naturaleza química y van a ejercer efectos biológicos de acuerdo con sus características (Thakur *et al.*, 2019).

Los metabolitos secundarios por su bioactividad han sido ampliamente estudiados para su aplicación en productos farmacéuticos, alimenticios y agroquímicos, por lo que muchos compuestos han sido aislados e identificados, ya que para su correcta utilización es necesario estudiar sus posibles mecanismos de acción (Nazlić *et al.*, 2022).

Existen diferentes métodos de extracción de metabolitos secundarios de plantas como es la maceración, infusiones, extracción con Soxhlet, hidrodestilación, entre otros. Con la hidrodestilación se pueden obtener sobre todo compuestos volátiles, en forma de aceites esenciales o hidrolatos (Oliveira *et al.*, 2019) esos compuestos son de gran interés ya que a muchos de ellos se les atribuyen excelentes propiedades antioxidantes y antifúngicas (Ieri *et al.*, 2019).

En la extracción por hidrodestilación se obtiene una mezcla de varios compuestos con distintas polaridades, por lo tanto, para su estudio y mayor conocimiento de sus posibles mecanismos de acción es necesario fraccionar los aceites esenciales o hidrolatos por grupos de compuestos de la misma naturaleza química o por tamaños moleculares similares (Apolo-Cumbicos, 2021). Esto se logra con el uso de técnicas cromatográficas o por la interacción de los compuestos con disolventes con afinidad polar (Goyal *et al.*, 2019).

Por lo tanto, en la presente investigación se realizó un fraccionamiento de cada hidrolato, utilizando tres diferentes disolventes (hexano, acetato de etilo y metanol) considerando la separación de compuestos de menor a mayor polaridad y determinar los posibles compuestos responsables de la mayor actividad antifúngica y antioxidante, así como su posible relación.

Materiales y métodos

Material biológico

Las partes aéreas (hojas y tallos) de *V. sphaerocephala* fueron recolectadas en los meses de octubre-noviembre de 2022, en la antigua carretera a Pátzcuaro, Morelia, Michoacán (19°37'46.6"N, -101°14'48.8"O). La recolecta de hojas y tallos se realizó durante el periodo de floración.

Obtención de los hidrolatos

Se obtuvieron hidrolatos a partir de 1000 g de hojas y de tallos por separado, de *V. sphaerocephala*, utilizando un hidrodestilador tipo Clevenger, en donde se colocaron 200 g de materia vegetal fresca por proceso de hidrodestilación que se llevó a cabo durante 6 h en 2 L de agua a una temperatura de 90 °C. Los hidrolatos se almacenaron a 4 °C para su posterior separación líquido-líquido.

Fraccionamiento de los hidrolatos de hoja y tallo por separación líquido-líquido

Se midió el volumen total de cada hidrolato (hoja y tallo) y se colocó en un embudo de separación, luego se agregó un volumen igual de disolvente, esto se realizó con tres solventes que fueron hexano, acetato de etilo y metanol, de menor a mayor polaridad para poder separar los compuestos de acuerdo con su polaridad. Una vez que la fase acuosa se separó completamente del solvente se recuperó el hidrolato y se almacenó, el solvente que se obtuvo se llevó a sequedad en un rotavapor a 50 °C y posteriormente se resuspendió cada fracción con su respectivo disolvente.

Identificación y cuantificación de compuestos volátiles (CG-EM)

La cuantificación e identificación de compuestos volátiles fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), siguiendo la metodología descrita por Torres-Martínez *et al.* (2014), que se realizó en el Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM, campus Morelia.

Un volumen de cada hidrolato y fracciones (de tallo y hoja de *V. sphaerocephala*) de 1 μL se inyectó en un equipo de cromatografía de gases (Agilent Technologies 7890A) acoplado a un detector de masas (Agilent 5975C), utilizando helio como gas portador, con un flujo de 1 mL/min, con una inyección dividida (50:1) a una temperatura de 250 °C en columna capilar no polar HP 5MS (30 m \times 0.25 mm de diámetro interno \times 0.25 μm), en las siguientes condiciones: temperatura inicial de 50 °C, seguida de una rampa de 5 °C/min para alcanzar una temperatura de 280 °C durante 1 min; y de otra rampa de 25 °C/min para elevar la temperatura a 380 °C, durante hasta 3 min. El tiempo de ejecución fue de 50 min, con una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un voltaje de ionización de 70 eV, a una temperatura de interfaz de 250 °C, en modo SCAN, y a un intervalo de masa de 50–500 m/z.

Determinación de la actividad antifúngica *in vitro*

La determinación de la actividad antifúngica se realizó mediante ensayos con el método de difusión en pozos “*agar well diffusion assay*”, utilizando cajas Petri con medio PDA (Magaldi *et al.*, 2004), que consiste en hacer pozos en el medio de cultivo con una pipeta Pasteur como sacabocado y se vertieron 100 μL de cada fracción (tanto de hojas como de tallos) previamente resuspendido en el disolvente de extracción que fue metanol, acetato de etilo y hexano, posteriormente se colocaron discos de micelio (0.5 cm de diámetro) del hongo *Botrytis cinerea*, debido a que este resultó ser el hongo más susceptible a los hidrolatos de hoja y tallo.

Como control positivo para la inhibición del crecimiento del hongo *B. cinerea*, se utilizó el fungicida comercial Benomyl® (10 mg/mL), para considerarlo como 100 % de inhibición. Como control negativo se utilizaron los diferentes disolventes de extracción que fueron metanol, acetato de etilo y hexano. Los bioensayos fueron incubados a 28 ± 2 °C.

Los resultados se reportaron como el porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) cada 24 h. Se calculó de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{crecimiento de control} - \text{crecimiento de tratamiento})}{\text{crecimiento de control}} \times 100$$

Se obtuvieron las concentraciones inhibitorias media y total (IC₅₀ e IC₁₀₀), mediante una curva de concentración de las fracciones contra los porcentajes de inhibición.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro de las fracciones

Método de actividad captadora de radicales libres DPPH·.- Para medir la capacidad de captación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·) de los hidrolatos se realizó de acuerdo con Barrida-Bernal *et al.* (2014). Se preparó la solución de DPPH· (98 µg/mL en metanol). Se mezclaron 450 µL del reactivo DPPH· con 50 µL de cada fracción los hidrolatos de *V. sphaerocephala* a una concentración 10 mg/mL. Después de 20 min de incubación se midió la absorbancia a 517 nm con un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Se utilizaron el ácido ascórbico y Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como comparativos de antioxidantes sintéticos, a una concentración de 10 mg/mL y como blanco se utilizó metanol. Los resultados se muestran como el porcentaje de la capacidad de eliminación de radicales libres que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Ablanco} - \text{Amuestra})}{\text{Ablanco}} \times 100$$

Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia del DPPH* mezclado con cada fracción y A_{blanco} es la absorbancia del DPPH* más metanol.

Método de actividad captadora de radical catiónico ABTS^{•+} Para medir la actividad antioxidante por el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo se realizó según lo descrito por Rufino *et al.* (2010). Se generó el radical ABTS^{•+} mediante una reacción de oxidación del ABTS (7.4 mM) y K₂S₂O₈ (persulfato de potasio) (2.4 mM), en una relación 1:1, se puso en agitación en un frasco ámbar y en oscuridad durante 2 horas, a temperatura ambiente. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con agua desionizada hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.01 a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Una vez que se obtuvo el radical, se mezclaron 450 µL de la solución de ABTS^{•+} y 50 µL de cada hidrolato de *V. sphaerocephala* a concentraciones de 1.5 y 10 mg/mL, después de 7 min de incubación se midió el valor de absorbancia de cada muestra a 734 nm. Se utilizaron el ácido ascórbico y Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como comparativos de antioxidantes sintéticos, a una concentración de 10 mg/mL y como blanco se utilizó metanol. Los resultados se muestran como el porcentaje de la capacidad de eliminación de radicales libres que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(A_{blanco} - A_{muestra})}{A_{blanco}} \times 100$$

Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia del ABTS^{•+} mezclado con cada fracción y A_{blanco} es la absorbancia del ABTS^{•+} más metanol.

Método de capacidad antioxidante total (TAC).- La capacidad antioxidante total se realizó de acuerdo con el método reportado por Prieto *et al.* (1999), Se mezclaron 50 µL de cada fracción de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* a una concentración de 10 mg/mL, con 500 µL de una solución de ácido sulfúrico (0.6 M), fosfato de sodio (28

mM) y molibdato de amonio 4 mM. Las muestras se pusieron en incubación en un termoblock (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) a una temperatura de 95 °C durante 90 min. Después las muestras se colocaron a temperatura ambiente para medir la absorbancia de las muestras a 694 nm en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA). Se generó una curva estándar de ácido ascórbico $A_{695} = 0.0002[\text{Ácido ascórbico}] + 0.0114$, $r = 0.9966$ a partir de diez concentraciones de ácido ascórbico (0.04 - 0.4 mg AA/mL). Los valores totales de la capacidad antioxidante se expresarán en miligramos de ácido ascórbico por mililitro (mg AA/mL).

Método del poder reductor férrico (FRAP).- La determinación del poder reductor férrico de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* se utilizó la metodología establecida por Mokrani *et al.*, (2016) con modificaciones. Se mezclaron 100 µL de cada fracción de los hidrolatos con 100 µL de buffer de fosfatos (0.2 M con pH 6.6) más 100 µL de ferrocianuro potásico (1 % m/v). Se dejó en incubación por 20 min a 50 °C en un termoblock digital (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Posteriormente se añadieron 100 µL de ácido tricloroacético (10 % m/v) más 200 µL de agua desionizada. Por último, se agregaron 40 µL de cloruro férrico (0.1 % m/v) y se midió la absorbancia a 700 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA). El poder reductor férrico se calculó a partir de dos curvas de calibración $A_{700} = 0.0002[\text{Ácido gálico}] - 0.0013$, $r = 0.9748$ construida con seis concentraciones de ácido gálico (0.15 – 0.9 mg AG/mL) y otra curva $A_{700} = 0.0002[AG] - 0.0212$, $r = 0.9746$ construida con seis concentraciones de ácido gálico (0.3 – 1.8 mg AG/mL). Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por mililitro (mg AG/mL).

Determinación del contenido total de ácidos fenólicos (método de Folin-Ciocalteu)

Se determinó el contenido fenólico total usando el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Singleton *et al.* (1999) con modificaciones. Se mezclaron 250 μL de cada fracción del hidrolato de *V. sphaerocephala* y 1250 μL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 62.5 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se agitó por 5 min. Finalmente, se añadieron 185.5 μL de una solución de Na_2CO_3 al 20 % (m/v) y se dejaron incubando en oscuridad por 2 h, a temperatura ambiente. Se midieron las absorbancias en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA) a 760 nm. Para determinar los compuestos fenólicos en los extractos de *V. sphaerocephala* se evaluaron usando dos curvas de ácido gálico $A_{760} = 0.0009[\text{Ácido gálico}] - 0.00005$, $r = 0.991$, obtenida usando diez concentraciones (0.01 – 0.1 mg AG/mL) y $A_{760} = 0.0007 [AG] - 0.0037$, $r = 0.991$, obtenida usando diez concentraciones (0.03 – 0.3 mg AG/mL). El contenido fenólico total se expresó en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/g PS).

Determinación del contenido total de flavonoides

Para la determinación del contenido de flavonoides totales se utilizó el método descrito por Lamaison y Carnetl (1990). Se mezclaron 250 μL de las fracciones de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* con 250 μL de solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La absorbancia se midió después de 10 min en un lector de microplaca (marca Thermo Scientific, modelo Multiskan FC, Waltham, MA, USA) a 430 nm. El total de flavonoides se expresó en miligramos equivalentes de rutina por gramo de peso seco (mg R/g PS). El contenido de flavonoides totales se determinó empleando dos curvas de rutina $A_{430} = 0.0055 [Rutina] + 0.0002$, $r = 0.9938$ que se obtuvo usando diez concentraciones de rutina (0.001- 0.01 mg R/mL) y otra curva $A_{430} = 0.0059 [Rutina] - 0.0222$, $r = 0.9835$ que se obtuvo usando diez concentraciones de rutina (0.01- 0.1 mg R/mL).

Determinación del contenido total de terpenoides

La determinación de terpenoides totales de las fracciones de los hidrolatos de hojas y tallos de *V. sphaerocephala*, se realizó de acuerdo con el método de Ghorai *et al.* (2012). Se mezclaron 1 mL de cada hidrolato con 3 mL de cloroformo, sometiéndolo a agitación en vortex para después agregar 200 μ L de ácido sulfúrico y se dejó reposar durante 1 h. Posteriormente midió la absorbancia de las muestras a 558 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS VELAB-VE51000UV). El contenido de terpenoides totales se determinó empleando una curva de linalool $A_{558} = 0.041 [Linalool] - 0.0408, r = 0.9665$, que se obtuvo a partir de siete concentraciones de linalool (1 – 30 mg/mL). El total de terpenoides se expresó en miligramos equivalentes de linalool por gramo de peso seco (mg L/g PS)

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (n=3), con la realización de cada experimento al menos dos veces. Éstos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía; las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, usando el software JMP.

Resultados y discusión

Identificación y contenido de compuestos volátiles de los hidrolatos de hoja y tallo

En la figura 15 se muestran los cromatogramas de los hidrolatos de hoja (Figura 15A) y tallo (Figura 15B) de *V. sphaerocephala*, obtenidos por cromatografía de gases, y en el cuadro 6 se presenta la composición de los compuestos volátiles principales de este extracto, los que se enlistan en orden de su elución, indicado el tiempo de retención (min). Éstos fueron identificados por espectrometría de masas, especificando su contenido en porcentaje del total del extracto. Los resultados muestran que algunos

de los volátiles mayoritarios son diferentes en ambos hidrolatos, encontrando en el hidrolato de hoja a Nerolidol (12.89 %), Isoledeno (15.18 %), Santonina (10.58 %), Humuleno (10.09 %) y Ambrosina (20.66 %), que representan el 69.4 % del total de compuestos cuantificados, con tiempos de retención de 24.80, 26.48, 30.48, 33.71 y 37.65 min, respectivamente (Figura 15A). El contenido de estos últimos tres compuestos es similar en los dos hidrolatos.

En el hidrolato de tallo se obtuvieron como compuestos mayoritarios a Santonina (8.78 %), Humuleno (9.02 %), Ledeno (10.24 %), Damsina (10.82 %) y Ambrosina (20.22 %), que representan el 59.08 % del total de compuestos identificados (Cuadro 4), con tiempos de retención de 30.48, 33.71, 37.01, 38.33 y 37.65 min, respectivamente (Figura 15B).

Los compuestos volátiles identificados con el análisis de CG-EM de los hidrolato de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* coinciden con lo reportado por Arciniegas *et al.* (2020), quienes identificaron sesquiterpén lactonas como la ambrosina y la damsina, no existen investigaciones que reporten otro tipo de compuestos volátiles en la especie bajo estudio. Otros de los compuestos como el humuleno, la santonina, el ledeno, el isoledeno y el nerolidol, fueron identificados como los mayoritarios y pertenecen al grupo de los sesquiterpenoides, los que son reportados con cierta actividad tanto antifúngica como antioxidante (Dambolena *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2016).

Hay muy pocas investigaciones de hidrolatos obtenidos de plantas de la familia Asteraceae, sin embargo se han encontrado resultados similares con algunos compuestos presentes en algunas especies pertenecientes a esta familia, como es el caso de *Ambrosia maritima* de la cual se aislaron dos sesquiterpen-lactonas (damsina y ambrosina), compuestos responsables de la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en un 100 %, ya que causaron un daño estructural en las esporas, evitando su germinación y se reportaron valores de IC₅₀ de 0.33 y 0.41 mg/mL, respectivamente (Abdelgaleil *et al.*, 2011).

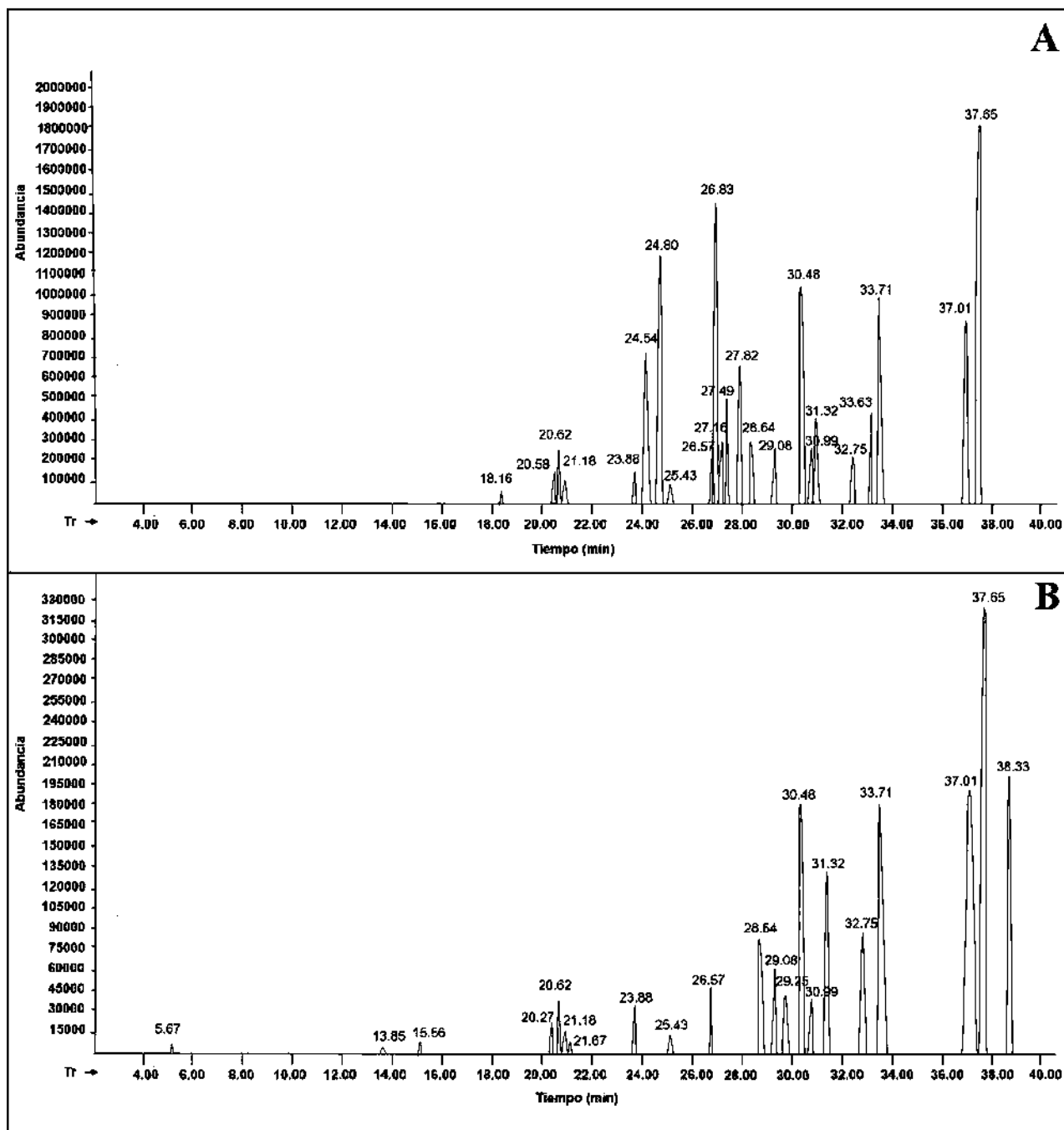


Figura 14. Cromatogramas de los hidrolatos de hoja (A) y tallo (B) de *Verbesina sphaerocephala* obtenidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Cuadro 6. Principales compuestos identificados de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbesina sphaerocephala* obtenidos por hidrodestilación usando cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Contenido (%)	
		Hoja	Tallo
5.67	L-Fenchona	-	0.40
13.85	1-Adamantanol	-	0.42
15.56	Ác. 1-adamantan acético	-	0.54
18.16	p-Vinilguaiacol	0.48	-
20.27	6-Canfenona	-	1.28
20.58	Cis-Jasmona	0.78	-
20.62	Metileugenol	2.66	2.52
21.18	Canfeno	1.11	0.82
21.67	Carvenona	-	0.68
23.88	Timol	1.48	2.38
24.54	Elemol	7.24	-
24.80	Nerolidol	12.89	-
25.43	Cariofileno	0.92	0.84
26.57	Cadinol	2.33	2.62
26.83	Isoledeno	15.18	-
27.16	Ledol	2.49	-
27.49	α -Santalol	5.23	-
27.82	β -Bisabolol	7.22	-
28.64	Espatulenol	2.37	4.28
29.08	β -Cedrenol	2.11	3.78
29.25	Cedrendiol	-	2.12
30.48	Santonina	10.58	8.78
30.99	Azuleno	2.27	2.26
31.32	Ledeno óxido	4.42	5.88
32.75	β -Guaieno	2.37	4.42
33.63	Estafiatina	4.67	-
33.71	Humuleno	10.09	9.02
37.01	Ledeno	8.89	10.24
37.65	Ambrosina	20.66	20.22
38.33	Damsina	-	10.82

Los compuestos timol, linalool y 1,8-cineol, extraídos de *Artemisa herba-alba* son los responsables de la actividad antifúngica sobre *B. cinerea*, inhibiendo la germinación de esporas (Boukhennoufa *et al.*, 2021), lo que sugiere que en el hidrolato de *V. sphaerocephala* pueden estar presentes compuestos de naturaleza terpénica con capacidad antifúngica. Además de que de acuerdo con el valor de IC₅₀ de 1.3 mg/mL para el hidrolato de tallo este se considera que es un buen antifúngico (Mesa, *et al.*, 2019).

El porcentaje de los componentes de los hidrolatos se determinó mediante la integración de las áreas de pico, los valores mostrados corresponden al valor promedio de tres inyecciones. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus índices de retención, en relación con los de los n-alcanos C8-C20, y por comparación con una biblioteca de espectros de masas con la biblioteca de espectros de masas NIST02 (por sus siglas en inglés, National Institute of Standards and Technology), así como por la comparación de sus índices de retención con los descritos por Adams (2007). La determinación cuantitativa se basó en el recuento total de iones detectado por el CG-EM.

Actividad antifúngica de las fracciones de hoja y tallo de V. sphaerocephala

Se realizaron pruebas antifúngicas *in vitro* utilizando las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbesina sphaerocephala* debido al efecto que tuvieron ambos hidrolatos contra el hongo *Botrytis cinerea*. Se probaron diferentes concentraciones de las fracciones de metanol, acetato de etilo y hexano de ambos hidrolatos para obtener los valores de IC₅₀ e IC₁₀₀ sobre el hongo de interés. De acuerdo con los resultados obtenidos, las fracciones tres fracciones mostraron actividad antifúngica, aunque en un porcentaje menor las metanólicas de ambos hidrolatos. Por otra parte, la fracción de acetato de etilo y hexano de hoja inhibieron el crecimiento del hongo en un 100 % a una concentración de 7.5 mg/mL (Figura 16A y 16B) y se obtuvieron los valores de IC₅₀ de 4.5 y 3.2 mg/mL, respectivamente (Cuadro 7).

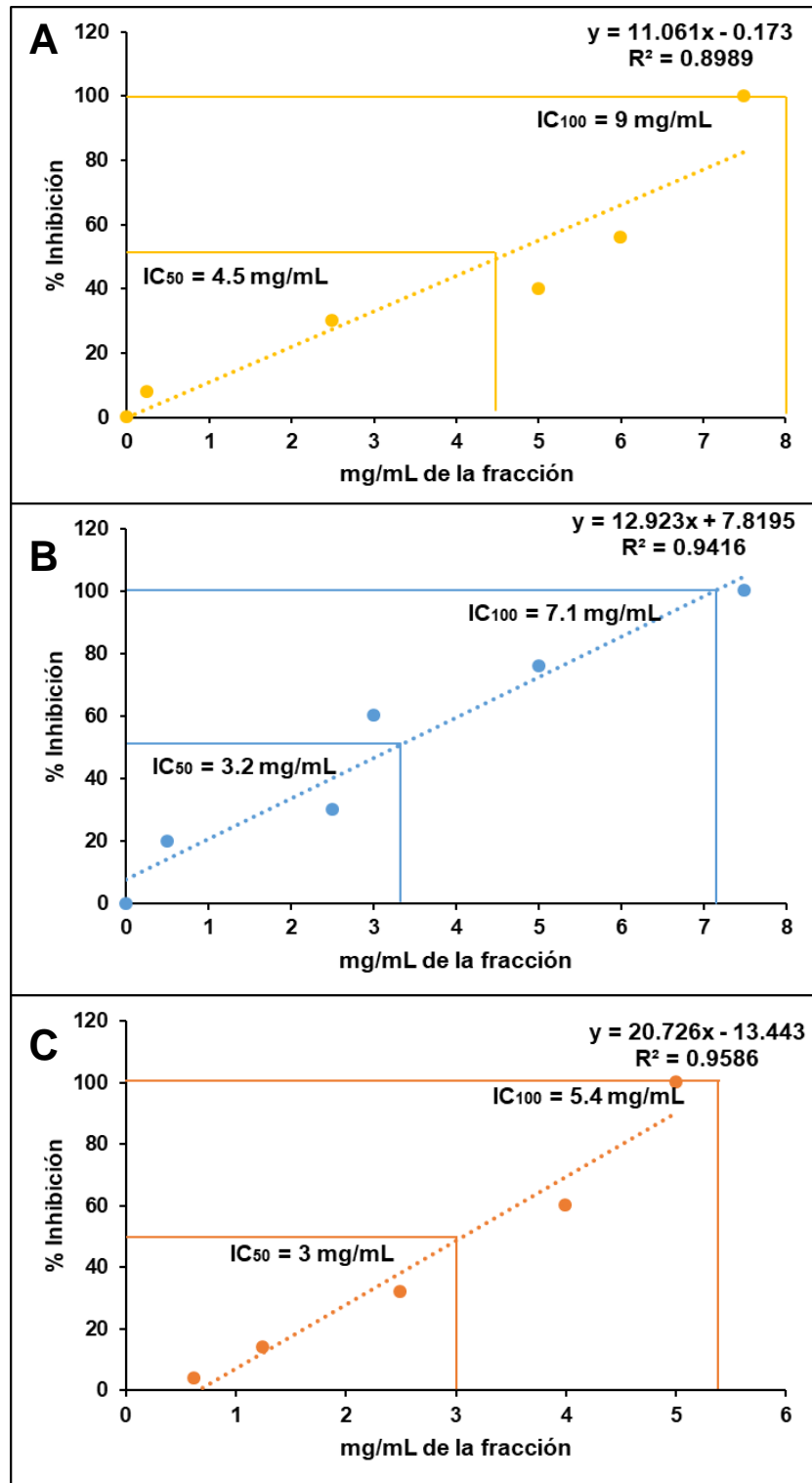


Figura 15. Porcentajes de inhibición y curvas de concentraciones de las fracciones de los hidrolatos de *V. sphaerocephala* para la determinación de IC_{50} y IC_{100} sobre el hongo *Botrytis cinerea*. A) Fracción de acetato de etilo de hidrolato de hoja, B) fracción de hexano de hidrolato de hoja y C) fracción de acetato de etilo de hidrolato de tallo.

Para el caso del hidrolato de tallo, la fracción de acetato de etilo resultó ser la más efectiva ya que inhibió el crecimiento del hongo en un 100 % a una concentración de 5.4 mg/mL (Figura 16C) y el valor de IC₅₀ fue de 3 mg/mL (Cuadro 7).

Cuadro 7. Valores de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración inhibitoria total (IC₁₀₀) de las fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* sobre el hongo *B. cinerea*.

FRACCIÓN	HOJA		TALLO	
	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀
Acetato de etilo	4.5 mg/mL	9 mg/mL	3 mg/mL	5.4 mg/mL
Hexano	3.2 mg/mL	7.1 mg/mL	–	–

En la Figura 17 se muestra el efecto de las fracciones de hoja y tallo sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, en la que se observan los diámetros de crecimiento correspondientes a los controles negativos (5 cm), control positivo Benomyl® (0 cm) y a las diferentes concentraciones de cada fracción.

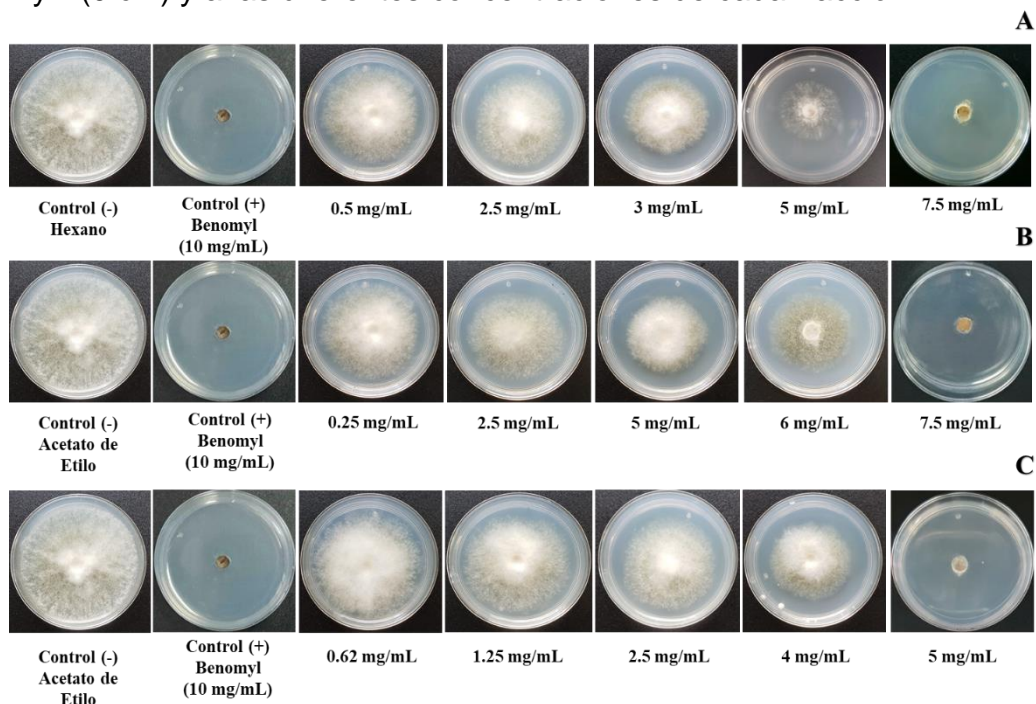


Figura 16. Crecimiento de micelio en *B. cinerea*, en ensayos in vitro en PDA con la aplicación de metanol (Control -), Benomyl (Control +) y las diferentes concentraciones de la fracción de acetato de etilo de hoja (A), la fracción de hexano de hoja (B) y la fracción de acetato de etilo de tallo (C), estas mediciones se realizaron a los 5 días del cultivo.

Actividad antioxidante de las fracciones de hoja y tallo de V. sphaerocephala

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos por el método DPPH[•] y ABTS^{•+} de las fracciones de metanol, acetato de etilo y hexano de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* a una concentración de 10 mg/mL. Estos resultados se expresan como porcentaje (%) de inhibición para ambas técnicas antioxidantes y se utilizaron Trolox (10 mg/mL) y Ácido ascórbico (10 mg/mL) como controles.

Para la actividad captadora del radical libre DPPH[•] (Figura 18A) los porcentajes de inhibición fueron del 44, 29 y 22 % para las fracciones de acetato de etilo, hexano y metanol del hidrolato de hoja, respectivamente. La fracción de acetato de etilo de hoja a pesar de presentar el porcentaje de inhibición fue significativamente menor a los porcentajes obtenidos con Trolox (83 %) y Ácido ascórbico (84 %). Para el hidrolato de tallo los porcentajes fueron del 10, 8 y 6 % con las fracciones de hexano, acetato de etilo y metanol, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las fracciones de tallo.

Para los resultados de determinación de la actividad antioxidante por la captación del radical catiónico ABTS^{•+} (Figura 18B)) se obtuvieron altos porcentajes de inhibición con el hidrolato de hoja, los cuales fueron 64, 60 y 55 % para las fracciones de acetato de etilo, hexano y metanol, respectivamente. A pesar de que los porcentajes fueron considerablemente altos no se observó diferencia significativa con Trolox (90 %) y ácido ascórbico (92 %). Con el hidrolato de tallo la fracción con mayor % de inhibición fue hexano (43 %) y no se observó diferencia significativa entre las fracciones de metanol (22 %) y de acetato de etilo (23 %).

Para la técnica de reducción de iones férricos (FRAP) y la capacidad antioxidante total (TAC) los resultados se expresan en mg Ácido Gálico/mL para FRAP y para TAC en mg Ácido Ascórbico/mL. Para el método FRAP, se observó que la fracción de acetato de etilo de hoja (47 mg AG/mL) tuvo mayor actividad, seguido de la fracción de acetato de etilo de tallo (26.9 mg AG/mL) (Figura 20).

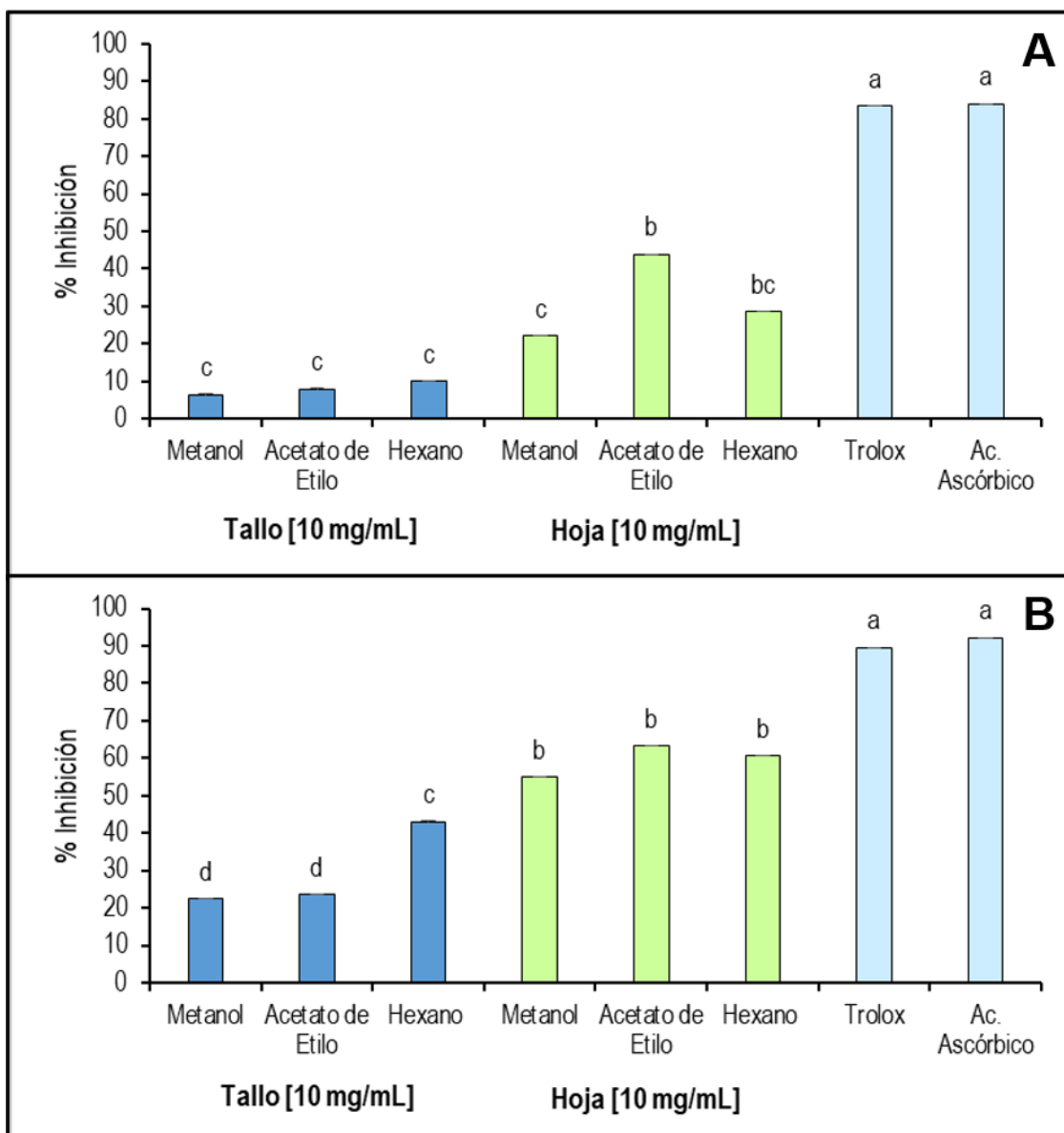


Figura 17. Porcentajes de la actividad antioxidante de las fracciones de metanol, acetato de etilo y hexano de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbena sphaerocephala*, determinados por el método DPPH^{*} (A) y ABTS⁺⁺ (B). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

En los resultados de la capacidad antioxidante total (TAC), y el poder reductor férrico (FRAP) se observó un comportamiento similar en ambos métodos. En el método de FRAP (Figura 19A) la fracción de acetato de etilo tuvo un mayor efecto reductor (47.1 mg AG/mL), seguida de la fracción de acetato de etilo de tallo (26.9 mg AG/mL). Para

TAC la fracción de acetato de etilo de hoja mostró mayor efecto (33.7 mg AA/mL) seguida de la fracción de acetato de etilo de tallo (7 mg/mL) (Figura 19B).

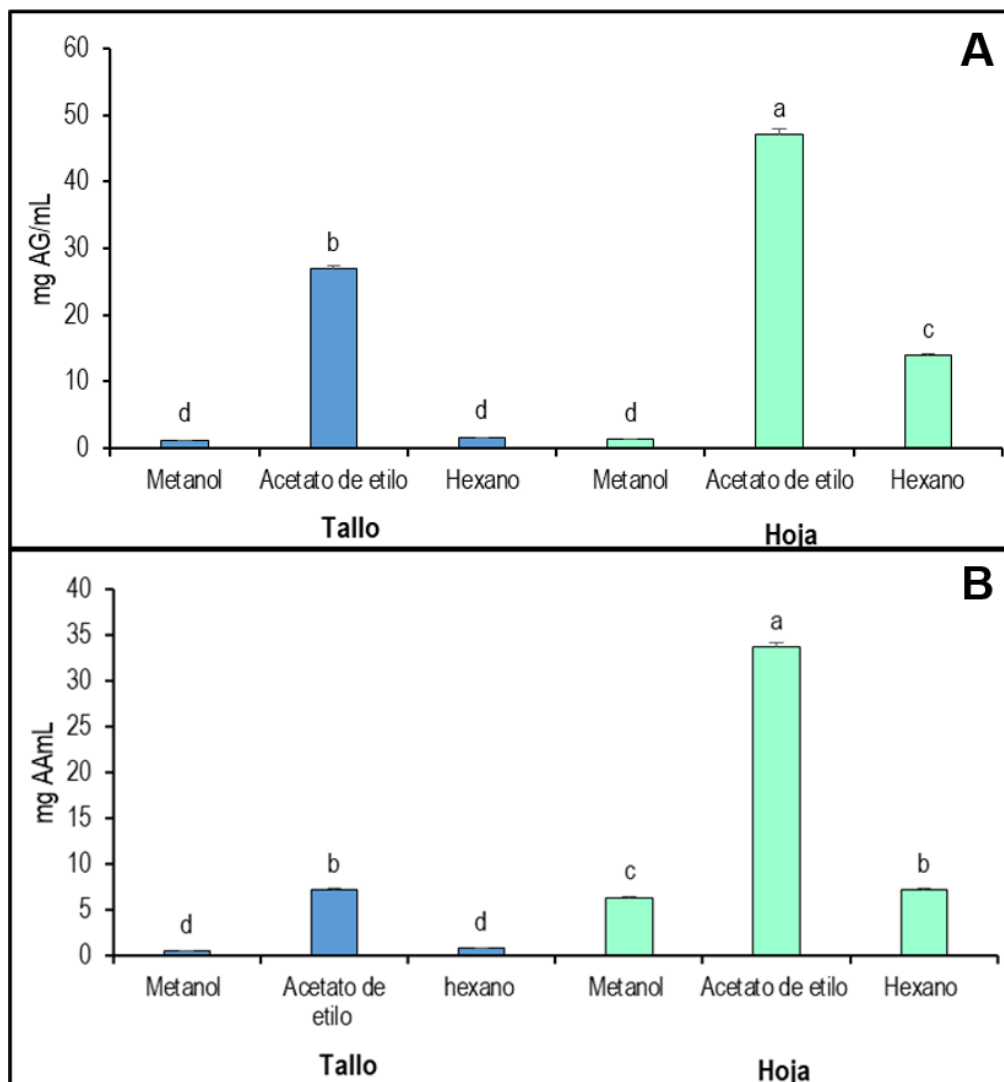


Figura 18. Actividad antioxidante de las fracciones de metanol, acetato de etilo y hexano de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbescina sphaerocephala*, determinados por FRAP (A) y TAC (B). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos en las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*, y se observaron diferencias en el

contenido de compuestos de acuerdo con el tipo de tejido y disolvente de fraccionamiento. Para fenoles totales los resultados se expresan como mg Equivalentes de Ácido Gálico/g PS (peso seco), para flavonoides totales en se expresan como mg Equivalentes de Rutina/g PS (peso seco) y para terpenos se expresan como mg Equivalentes de Linalool/g PS (peso seco).

De acuerdo con los resultados obtenidos para fenoles totales, la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja fue la fracción que mostró la mayor concentración de compuestos fenólicos (44.5 mg EAG/g PS) (Figura 20A), seguido de la fracción de acetato de etilo de tallo (26.4 mg EAG/g PS) (Figura 20A). Para la determinación de flavonoides totales se observó que hubo un mayor contenido en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo (1.82 mg ER/g PS), seguido de la fracción de metanol de hoja (1.10 mg ER/g PS) aunque esta fracción es similar estadísticamente con la fracción de acetato de etilo (1.02 mg ER/g PS) (Figura 20B).

Para la determinación del contenido de terpenos totales se observó que el tejido de hoja presentó un mayor contenido de terpenos en la fracción hexánica y de acetato de etilo con 21.59 y 18.88 mg L/g PS, respectivamente. De igual manera para tallo, la fracción que tuvo un mayor contenido fue la hexánica con 17.10 mg L/g PS, aunque es significativamente menor a lo obtenido en las hojas (Figura 20C).

De manera de resumen, la fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos mostraron los valores más altos de fenoles totales y flavonoides, y en la fracción hexánica se observó el mayor contenido de terpenos totales. Estos resultados concuerdan con la actividad antioxidante observada, ya que la fracción de acetato de etilo mostró los más altos porcentajes de actividad, sugiriendo que el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) son los de mayor responsabilidad en la propiedad antioxidante de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*. Esto puede explicar también, que las fracciones con un mayor contenido de compuestos fenólicos y terpenicos tuvieron la mayor actividad antifúngica, como puede observarse en la figura 17 y cuadro 7, en la que la fracción de acetato de etilo mostró la mayor efectividad.

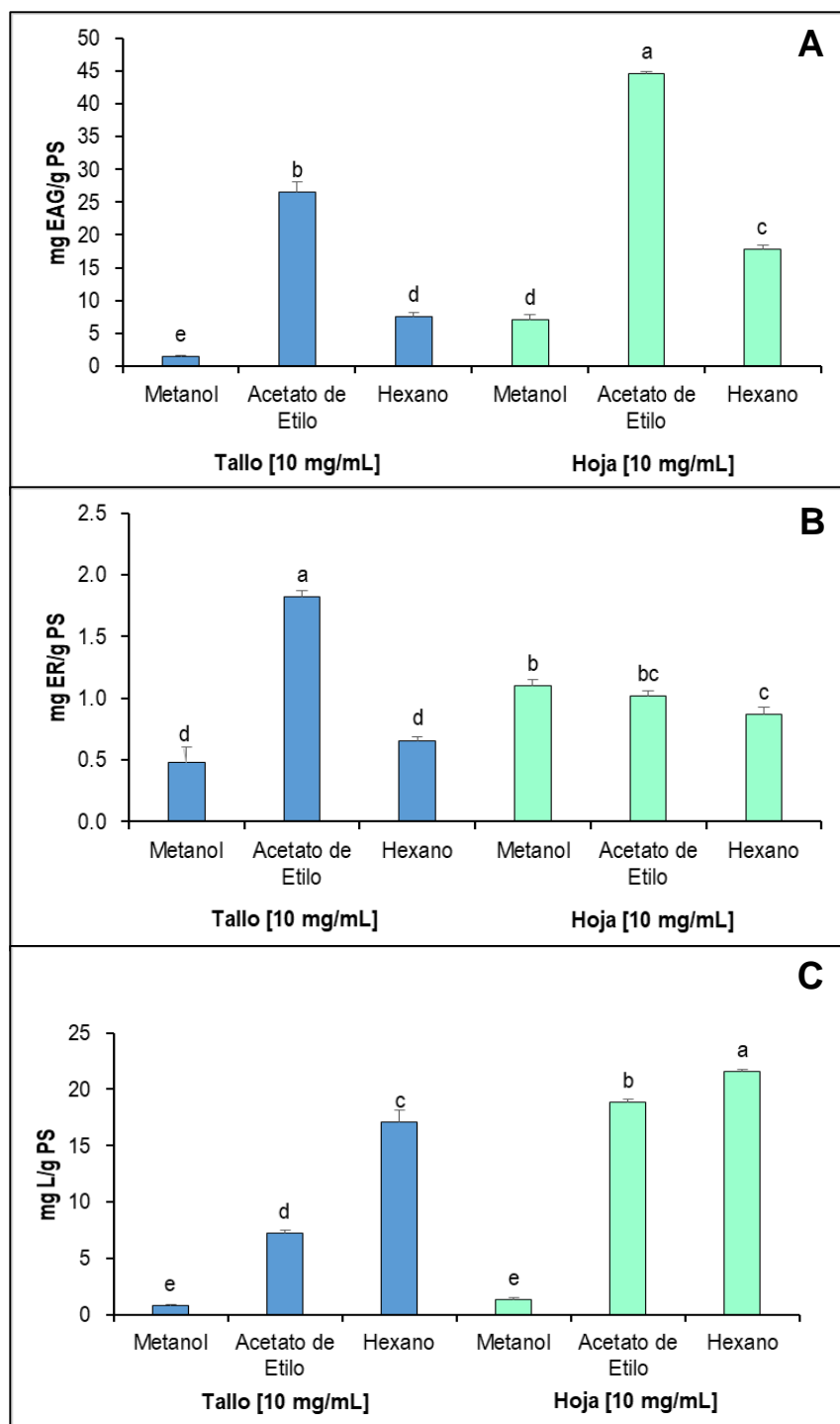


Figura 19. Contenido de fenoles totales (A), flavonoides totales (B) y terpenos totales (C), en las fracciones de metanol, acetato de etilo y hexano de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbescina sphaerocephala*, expresados en mg EAG/g PS, en mg ER/g PS y mg L/g PS, respectivamente. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

En el análisis de correlación de las fracciones de hoja, se observó una clara relación entre el contenido de terpenos y fenoles totales con el efecto antifúngico contra *B. cinerea* ($r=0.992$, $p<0.01$; $r=0.720$, $p<0.05$), asimismo se mostró una relación clara entre el contenido de fenoles totales con la actividad bloqueadora del radical DPPH[•], la capacidad antioxidante total (TAC) y el poder reductor férrico (FRAP) ($r=0.897$, $p<0.01$; $r=0.967$, $p<0.01$; $r=0.982$, $p<0.01$) (Cuadro 8). Estos resultados indican que a mayor concentración de fenoles y terpenos mayor será la capacidad antifúngica y antioxidante, por lo que se les puede atribuir dichas actividades. Por otro lado no se observó una clara relación entre el contenido de flavonoides totales, la actividad antioxidante y la actividad antifúngica.

Por otra parte el análisis de correlación de las fracciones de tallo presentó una relación clara entre el contenido de terpenos y fenoles totales con la actividad antifúngica de *B. cinerea* ($r=0.797$, $p<0.05$; $r=0.686$, $p<0.05$), de igual manera se observó una clara relación entre el contenido de terpenos totales y la actividad bloqueadora del radical ABTS^{•+} ($r=0.917$, $p<0.01$), mientras que la capacidad antioxidante total (TAC) y el poder reductor férrico (FRAP) mostraron una relación clara con el contenido de fenoles y flavonoides totales ($r=0.975$, $p<0.01$; $r=0.971$, $p<0.01$; $r=0.989$, $p<0.01$; $r=0.988$, $p<0.01$) (Cuadro 9). De acuerdo con estos resultados a mayor concentración de fenoles y terpenos mayor será la capacidad antifúngica, mientras que a una mayor concentración de fenoles y flavonoides mayor será la actividad antioxidante.

Cuadro 8. Correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de las fracciones del hidrolato de hoja, con la actividad antioxidante por los métodos DPPH[•], ABTS^{•+}, TAC y FRAP y la actividad antifúngica contra *B. cinerea*.

	CFT	CFLVT	CTT	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	TAC	FRAP	<i>B. cinerea</i>
CFT	1	-0.105	0.629	.897**	0.566	.967**	.982**	.720*
CFLVT	-0.105	1	-.769*	0.021	-0.307	0.131	-0.274	-.707*
CTT	0.629	-.769*	1	0.527	0.577	0.414	.763*	.992**
DPPH [•]	.897**	0.021	0.527	1	0.27	.886**	.871**	0.613
ABTS ^{•+}	0.566	-0.307	0.577	0.27	1	0.483	0.615	0.602
TAC	.967**	0.131	0.414	.886**	0.483	1	.904**	0.523
FRAP	.982**	-0.274	.763*	.871**	0.615	.904**	1	.837**
<i>B. cinerea</i>	.720*	-.707*	.992**	0.613	0.602	0.523	.837**	1

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Cuadro 9. Correlación de Pearson entre el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales de las fracciones del hidrolato de tallo, con la actividad antioxidante por los métodos DPPH*, ABTS**, TAC y FRAP y la actividad antifúngica contra *B. cinerea*.

	CFT	CFLVT	CTT	DPPH	ABTS	TAC	FRAP	<i>B. cinerea</i>
CFT	1	.985**	0.111	-0.202	-0.223	.975**	.971**	.686*
CFLVT	.985**	1	0	-0.191	-0.339	.989**	.988**	0.598
CTT	0.111	0	1	0.285	.917**	-0.087	-0.104	.797*
DPPH*	-0.202	-0.191	0.285	1	0.312	-0.29	-0.296	0.094
ABTS**	-0.223	-0.339	.917**	0.312	1	-0.411	-0.426	0.535
TAC	.975**	.989**	-0.087	-0.29	-0.411	1	1.000**	0.528
FRAP	.971**	.988**	-0.104	-0.296	-0.426	1.000**	1	0.513
<i>B. cinerea</i>	.686*	0.598	.797*	0.094	0.535	0.528	0.513	1

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Identificación y contenido de compuestos volátiles de las fracciones de los hidrolatos de hoja y tallo

En el cuadro 10 se muestran los compuestos principales volátiles de las tres fracciones (metanólica, acetato de etilo y hexánica) de los hidrolatos de hoja y de tallo de *V. sphaerocephala*, obtenidos por cromatografía de gases, los que se enlistan en orden de su elución, indicado el tiempo de retención (min), su identificación y los porcentajes del contenido. En las tres fracciones de ambos hidrolatos se encuentran el metileugenol, el canfeno, el timol, el nerolidol, el isoleveno, β -bisabolol, el espatulenol y el ledeno, con un mayor contenido en la fracción hexánica del hidrolato de hoja, aunque en diferentes porcentajes, observando los tres primeros con el más alto contenido den la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo; el nerolidol, el cariofileno, el isoleveno, el α -santalol, el β -bisabolol, el espatulenol, la santonina, el humuleno, el ledeno, la ambrosina y la damsina, son los compuestos de mayor contenido en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, aunque se observaron también en el hidrolato de tallo (Cuadro 10).

Otros de los compuestos volátiles se distribuyeron en las distintas fracciones, pero siempre el mayor contenido de los mayoritarios fue más alto en la fracción de acetato de etilo tanto del hidrolato de hoja, como se mencionó arriba, como en el de tallo, en

el que puede observarse un mayor porcentaje de algunos compuestos también antes mencionados (Cuadro 8). Estos resultados demuestran que el mayor contenido de compuestos sesquiterpenos, antes ya identificados en los hidrolatos, fueron separados o concentrados en la fracción de acetato de etilo, aunque con un mayor contenido en el de hoja.

Cuadro 10. Principales compuestos identificados de los hidrolatos de hoja y tallo de *Verbesina sphaerocephala* obtenidos por hidrodestilación usando cromatografía de gases-espectrometría de masas, de las fracciones metanólica (FMeOH), acetato de etilo (FACeT) y hexánica (FHex).

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Contenido (%)					
		Hoja			Tallo		
		FMeOH	FACeT	FHex	FMeOH	FACeT	FHex
20.62	Metileugenol	4.21	6.21	3.24	3.22	12.24	2.26
21.18	Canfeno	6.22	7.24	4.32	3.24	11.12	2.21
21.67	Carvenona	1.21	1.24	-	2.18	5.88	1.19
23.88	Timol	6.22	3.22	2.26	7.28	8.48	4.42
24.54	Elemol	-	1.22	5.22	-	-	1.18
24.80	Nerolidol	1.2	8.42	4.38	0.48	6.12	3.12
25.43	Cariofileno	-	8.64	2.68	-	-	4.42
26.57	Cadinol	-	1.18	4.56	-	-	2.24
26.83	Isoledeno	1.12	12.12	8.12	0.88	8.46	6.68
27.16	Ledol	-	2.1	4.42	-	-	1.18
27.49	α-Santalol	-	5.23	2.21	-	-	-
27.82	β-Bisabolol	2.24	7.68	6.24	1.02	6.24	5.22
28.64	Espatuleno	2.37	5.58	3.34	1.12	2.36	4.14
30.48	Santonina	-	8.94	5.42	-	2.44	1.88
33.71	Humuleno	-	12.12	6.44	-	7.24	6.44
37.01	Ledeno	2.44	8.24	4.22	1.86	5.46	6.89
37.65	Ambrosina	-	14.16	6.88	-	6.11	4.68
38.33	Damsina	-	6.42	4.21	-	3.12	2.14

Debido a que la mayor actividad antioxidante fue mostrada por la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, se sugiere que este tipo de compuestos son los responsables de dicha actividad y también de la actividad

antifúngica, aunque en una relación no directa, ya que no se encuentran en la fracción metanólica o en una concentración más baja en la fracción hexánica, fracciones con una menor actividad antifúngica y antioxidante.

La alta actividad antifúngica presentada por la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo (Cuadro 7), también puede explicarse por la presencia de estos mismos compuestos, además de metileugenol, canfeno y carvenona, que por sinergismo pueden estar aumentando la actividad biológica y debido a una menor concentración, la actividad antioxidante es menor que la del hidrolato de hoja.

Aunque con los resultados del análisis CG-EM no es posible destacar los compuestos responsables ya sea de la actividad antioxidante o de la antifúngica, se sugiere que los compuestos sesquiterpénicos tengan la mayor actividad antioxidante y los de naturaleza fenólica se relacionen mayormente con la actividad antifúngica.

Algunos de los compuestos identificados en ambos hidrolatos han sido reportados previamente con actividad antifúngica contra *B. cinerea*, lo que demuestra la importancia de la identificación de los compuestos bioactivos.

Conclusiones

La mayor actividad antioxidante se obtuvo con la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, en la que también se obtuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos totales, lo que se relacionó con la actividad antifúngica observada sobre *B. cinerea*.

Aunque la actividad antioxidante de la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala* fue menor a la del hidrolato de hoja, presentó la más alta actividad antifúngica, además de un alto contenido de fenoles y flavonoides totales, pero el más bajo de compuestos terpénicos. Esto último podría ser determinante para que la actividad antioxidante haya sido menor que la del hidrolato de hoja.

Literatura citada

- Abdelgaleil, S. A. M., Badawy, M. E. I., Suganuma, T., Kitahara, K., Abdelgaleil, S. A. M. (2011).** Antifungal and biochemical effects of pseudoguaianolide sesquiterpenes isolated from *Ambrosia maritima* L. *African Journal of Microbiology Research*, 5(21), 3385-3392.
- Adams R.P. (2007).** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Apolo Cumbicos, L. S. (2021).** Análisis comparativo de métodos de extracción de metabolitos secundarios producidos por tres especies de plantas medicinales nativas del Ecuador (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica).
- Arciniegas A., Pérez-Castorena A.L., Villaseñor J.L., Romo de Vivara A. (2020).** Cadinenes and other metabolites from *Verbesina sphaerocephala* A. Gray. *Biochemical Systematics and Ecology*, 93: 104183.
- Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., Herrera-Arrieta, Y. (2014).** Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12(2), 105-114.
- Boukhenoufa, A., Benmagnia, S., Maizi, Y., Touil, A. M. T., & Meddah, B. (2021).** Antifungal and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* Asso. *European Journal of Biological Research*, 11(4), 493-500.
- Chan W.-K., Tan L.T.-H., Chan K.-G., Lee L.-H., Goh B.-H. (2016).** Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, 21(2), 529.
- Dambolena J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Dzamic A., Sokovic M., Ristic M.S. (2009).** Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chem Nat Compd*, 45, 259–261.
- Goyal, M. R., Joy, P. P., Suleria, H. A. R. (Eds.). (2019).** *Plant secondary metabolites for human health: extraction of bioactive compounds*. CRC Press.
- Ieri, F., Cecchi, L., Giannini, E., Clemente, C., Romani, A. (2019).** GC-MS and HS-SPME-GC×GC-TOFMS Determination of the Volatile Composition of Essential Oils and Hydrosols (By-Products) from Four Eucalyptus Species Cultivated in Tuscany. *Molecules*, 24(2), 226.
- Lamaison, J. y Carnet, A. (1990).** Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) D. C. flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 65, 315-320.
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., Monsalve, Z. (2019).** Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 45(1), 23-30.
- Mokrani, A., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Tamsamani, H., Renouf, E., Richard, T. (2016).** Phenolic contents and bioactive potential of peach fruit extracts. *Food Chemistry*, 202, 212-220.
- Nazlić, M., Akrap, K., Kremer, D., Dunkić, V. (2022).** Hydrosols of verónica Species—Natural source of free volatile compounds with potential pharmacological interest. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1378.
- Oliveira, C., Schenkel, E., Mello, J., Mentz, L., & Petrovick, P. (2019).** Farmacognosia do producto natural ao medicamento. Sao Paulo.

Prieto, P., Pineda, M. y Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.

8. DISCUSIÓN GENERAL

8.1. Actividad antifúngica de hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Los hidrolatos de hoja y de tallo de *V. sphaerocephala* mostraron una mayor actividad antifúngica sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, con un 100 % a una concentración de 10 mg/mL, pero con los valores de la IC₅₀ (1.3 mg/mL) e IC₁₀₀ (2.7 mg/mL) del hidrolato de tallo se determinó una mayor efectividad sobre *B. cinerea*, 3.7 y 2.63 veces más activo que el hidrolato de hoja, respectivamente (Cuadro 3, Figura 8).

Estos resultados confirman el efecto antifúngico tanto del hidrolato de hoja como de tallo de *V. sphaerocephala*, ya que los valores de IC₅₀ e IC₁₀₀, aunque difieren, pueden ser considerados de alto valor antifúngico, de acuerdo a otras investigaciones reportadas ya sea con extractos, aceites esenciales o hidrolatos., en las que las concentraciones son mayores a 10 mg/mL. Ejemplo de eso es lo descrito por Javed *et al.* (2023) que observaron un 100 % de inhibición sobre *Aspergillus ornatus* con el extracto metanólico de hojas *Salix alba*, o bien, lo también recién reportado por Xi *et al.* (2022) que demostraron un 100 % de inhibición sobre *Fusarium solani* con un extracto de rizoma de jengibre a una concentración de hasta 20 mg/mL.

Respecto a estudios de actividad antifúngica de hidrolatos, aunque son pocas las investigaciones, hay reportes que indican su efectividad, la que depende de la especie, parte de la planta y la concentración (Nazzaro *et al.*, 2017; Acímović *et al.*, 2020). Con el hidrolato de *Mentha crispa* se obtuvo una alta inhibición con 15 mg/mL sobre *Aspergillus fumigatus* y muy baja sobre *B. cinerea* (Wojcik-Stopczynska y Jakowienko, 2012) y un 100 % de inhibición con el hidrolato de *Calendula arvensis* sobre *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger* (Acímović *et al.*, 2020) y de igual manera con el hidrolato de *Syzygium aromaticum* sobre *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* (Ramírez-González *et al.*, 2016), pero con concentraciones más altas a las presentadas por el hidrolato de tallo de *V. sphaerocephala*.

Con el fin de determinar los posibles compuestos responsables de la actividad antifúngica de ambos hidrolatos de *V. sphaerocephala*, se obtuvieron tres fracciones (metanólica, de acetato de etilo y hexánica), y se probaron diferentes concentraciones para obtener los valores de IC₅₀ e IC₁₀₀ sobre *B. cinerea*. Los resultados demostraron que la fracción de acetato de etilo tanto del hidrolato de hoja como de tallo fueron las de mayor efectividad con los valores más bajos de las concentraciones inhibitorias (Figura 17, Cuadro 7).

No puede descartarse lo observado con la fracción hexánica de hoja. Para el caso del hidrolato de tallo, la fracción de acetato de etilo resultó ser la más efectiva ya que presentó las IC₅₀ e IC₁₀₀ más bajas (3 mg/mL y 5.4 mg/mL, respectivamente). Sin embargo, hay que resaltar que la fracción de acetato de etilo de hoja también muestra una alta actividad antifúngica sobre *B. cinerea* debido a los valores de IC₅₀ (4.5 mg/mL) y de IC₁₀₀ (9 mg/mL) observados (Cuadro 7).

Lo anterior concuerda con la actividad antifúngica más alta mostrada por el hidrolato de tallo e incluso con el de hoja, sugiriendo que los compuestos que conforman la fracción de acetato de etilo de éstos, son los responsables de la actividad antifúngica. En diversos hidrolatos, se ha demostrado que los derivados de diferentes partes de las plantas presentan un alto potencial de inhibición sobre hongos fitopatógenos, por la presencia de diversos compuestos químicos volátiles como fenilpropanos, monoterpenos y sesquiterpenos principalmente (Nazzaro *et al.*, 2017; Acímović *et al.*, 2020).

8.2. Actividad antioxidante de hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

En general, la actividad antioxidante más alta con los métodos de análisis, se obtuvo con el hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala* con un 73 % en DPPH⁺ y un 71 % en ABTS⁺, observando menores porcentajes de la actividad antioxidante con el hidrolato de tallo, sin embargo, este hidrolato alcanzó un 64 % de actividad en el método de

ABTS^{•+} (Figura 14B). Estos resultados son similares a lo reportado para el hidrolato de flores de *Areca catechu*, que presentó un 82 % de inhibición para el radical DPPH[•], mientras que el hidrolato de *Cocos nucifera* solo obtuvo alta actividad antioxidante con ABTS^{•+} (64 %) (Shen *et al.*, 2017). La alta actividad antioxidante del hidrolato de hoja con el radical DPPH[•] y la alta actividad del hidrolato de tallo con ABTS^{•+}, se explica por la naturaleza de los compuestos que contiene cada uno. También, parte de estos resultados concuerdan con lo reportado Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021), que reportaron que el extracto de hoja *V. sphaerocephala* presentó un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, además de una alta actividad antioxidante.

Estos resultados muestran que la actividad antioxidante es mayor en el hidrolato de hoja con los diferentes métodos utilizados, en comparación a los valores mostrados por el hidrolato de tallo, aunque éste mostró una alta actividad con el método ABTS^{•+}.

La actividad antioxidante de las fracciones (metanólica, de acetato de etilo y hexánica) de los hidrolatos de hoja y de tallo de *V. sphaerocephala* tuvieron un comportamiento similar a lo obtenido por los hidrolatos, ya que las derivadas del de hoja, mostraron los más altos porcentajes (Figuras 19 y 20), pero son las fracciones de acetato de etilo, las que presentaron los valores más altos de porcentajes de inhibición, principalmente las del hidrolato de hoja. De igual manera, la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallo mostró un 43 % de actividad antioxidante con el método de ABTS^{•+} y un óptimo valor reductor con el método de FRAP (26.9 mg AG/mL) (Figura 20). Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Essien *et al.* (2020) que reportaron que el fraccionamiento tuvo un efecto en la actividad antioxidante, revelaron que la fracción de acetato de etilo de hojas de *Emilia sonchifolia* (Asteraceae) mostró la inhibición más alta del radical DPPH[•] (64 %) y en el ensayo FRAP de igual manera la fracción de acetato de etilo mostró mayor poder reductor, en comparación con otros disolventes y el extracto crudo.

Estos resultados sugieren que los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo, sobre todo del hidrolato de hoja, son los responsables tanto de la actividad

antioxidante como de la actividad antifúngica. Los compuestos de polaridad intermedia de algunos fenólicos y flavonoides se han reportado como los de mayor actividad antifúngica y se ha relacionado como un posible mecanismo de acción, el efecto prooxidante (Kim *et al.*, 2019; Sotler *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

8.3. Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

El hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala* mostró el mayor contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales, en comparación al hidrolato de tallo. Estas diferencias en el contenido de compuestos de las diferentes partes de una planta, se atribuyen a que estos metabolitos secundarios desempeñan diversas funciones para protegerse de factores externos, por lo que los cambios en las condiciones como la temperatura, exposición a la radiación UV, humedad, sequía y salinidad, además de las interacciones biológicas, tienen un impacto en su producción y acumulación (Isah, 2019; Thakur, 2019).

Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) reportaron que las hojas de *V. sphaerocephala* también poseen un alto contenido de fenoles y flavonoides en hojas. De igual manera Amari *et al.* (2014) demostraron que las hojas de *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae) contienen una mayor cantidad de flavonoides en las hojas (3.15 mg EQ/g) en comparación con los tallos (2.61 mg EQ/g). Lo mismo se ha reportado para diferentes extractos de diferentes partes de las plantas, como lo descrito por Tandon y Gupta (2020) que obtuvieron un mayor contenido total de terpenos en las hojas de *Sphaeranthus indicus* (Asteraceae).

Con el análisis de estos compuestos totales en la tres fracciones de ambos hidrolatos, se observó un mayor contenido de compuestos fenólicos totales en la fracción de acetato de etilo, tanto del hidrolato de hoja como de tallo, con un valor de 2.1 veces más en el hidrolato de hoja (Figura 21). Sin embargo, en la fracción de acetato de etilo de tallo, el contenido de flavonoides fue mayor, aunque con valores similares al

mostrado por la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja (Figura 21). Respecto al contenido de terpenos totales, fueron las fracciones hexánica y de acetato de etilo del hidrolato de hoja, donde se obtuvo el contenido más alto, así como el de la fracción hexánica del hidrolato de tallo (Figura 21).

Se ha demostrado que el fraccionamiento ejerce un efecto en el contenido total de compuestos, llegando a tener una mayor concentración de compuestos en comparación con los extractos crudos como se observó en el presente trabajo. Esto puede compararse con el estudio realizado por Truong *et al.* (2021) quienes probaron los efectos del fraccionamiento en el contenido total de terpenos de *Serevenia buxifolia* (Rutaceae) y encontraron que la fracción de hexano-acetato de etilo tuvo un mayor contenido de terpenos totales (731.48 µg/mL) en comparación con otras combinaciones de disolventes y el extracto crudo (184.26 µg/mL), que es un efecto similar a lo ocurrido con la fracción de acetato de etilo de *Verbesina sphaerocephala*.

Asimismo, Essien *et al.* (2020) reportaron que el fraccionamiento aumentó el contenido de fenoles totales de *Emilia sonchifolia* (Asteraceae), en la fracción de acetato de etilo hubo un mayor contenido de fenoles (5.80 mg/g), seguido por el extracto crudo (2.5 mg/g), efecto similar ocurrió con el contenido de flavonoides, en la fracción de acetato de etilo el contenido de flavonoides fue más alto (10.5 mg/g), seguido del extracto crudo (4.4 mg/g).

Los resultados del análisis del contenido de fenoles, flavonoides y de terpenos totales, demuestran que fue la fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos la que observó los valores más altos de fenoles totales y de flavonoides, y solamente en la fracción hexánica se observó el mayor contenido de terpenos totales. Estos resultados concuerdan con la actividad antioxidante observada por el hidrolato de hoja, ya que la fracción de acetato de etilo mostró los más altos porcentajes de actividad, sugiriendo que el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) son los de mayor responsabilidad en la propiedad antioxidante de este hidrolato. En relación a la actividad antifúngica, aunque la del hidrolato de hoja fue menor a la del hidrolato de

tallo, estos resultados pueden explicar también, que las fracciones con un mayor contenido de compuestos fenólicos tuvieron la mayor actividad antifúngica, como puede observarse en la figura 17 y cuadro 7, en la que la fracción de acetato de etilo mostró la mayor efectividad.

8.4. Identificación y contenido de compuestos volátiles de los hidrolatos y fracciones de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*

Con el análisis de CG-EM tanto de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala*, así como de la fracciones metanólica, de acetato de etilo y hexánica, se identificaron compuestos volátiles mayormente de tipo sesquiterpénico como el Nerolidol, Isoledeno, Santonina, Humuleno, Ambrosina y Damsina (Cuadro 4, Figura 15).

En el hidrolato de hoja, los volátiles mayoritarios son nerolidol (12.89 %), isoledeno (15.18 %), santonina (10.58 %), humuleno (10.09 %) y ambrosina (20.66 %). En el hidrolato de tallo, los compuestos mayoritarios son santonina (8.78 %), humuleno (9.02 %), ledeno (10.24 %), damsina (10.82 %) y ambrosina (20.22 %). Con el análisis de las fracciones de ambos hidrolatos, se determinaron el metileugenol, el canfeno, el timol, el nerolidol, el isoledeno, β -bisabolol, el espatulenol y el ledeno; el nerolidol, el cariofileno, el isoledeno, el α -santalol, el β -bisabolol, el espatulenol, la santonina, el humuleno, el ledeno, la ambrosina y la damsina, son los compuestos de mayor contenido en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, aunque se observaron también en el hidrolato de tallo (Cuadro 8).

Los compuestos volátiles identificados con el análisis de CG-EM de los hidrolatos de hoja y tallo de *V. sphaerocephala* coinciden con lo reportado por Arciniegas *et al.* (2020), quienes identificaron sesquiterpén lactonas como la ambrosina y la damsina, no existen investigaciones que reporten otro tipo de compuestos volátiles en la especie bajo estudio. Otros de los compuestos como el humuleno, la santonina, el ledeno, el isoledeno y el nerolidol, fueron identificados como los mayoritarios y pertenecen al

grupo de los sesquiterpenoides, los que son reportados con cierta actividad tanto antifúngica como antioxidante (Dambolena *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2016).

Hay muy pocas investigaciones de hidrolatos obtenidos de plantas de la familia Asteraceae, sin embargo se han encontrado resultados similares con algunos compuestos presentes en algunas especies pertenecientes a esta familia, como es el caso de *Ambrosia maritima* de la cual se aislaron dos sesquiterpen-lactonas (damsina y ambrosina), compuestos responsables de la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en un 100 %, ya que causaron un daño estructural en las esporas, evitando su germinación y se reportaron valores de IC₅₀ de 0.33 y 0.41 mg/mL, respectivamente (Abdelgaleil *et al.*, 2011).

Los compuestos timol, linalool y 1,8-cineol, extraídos de *Artemisa herba-alba* son los responsables de la actividad antifúngica sobre *B. cinerea*, inhibiendo la germinación de esporas (Boukhenoufa *et al.*, 2021), lo que sugiere que en el hidrolato de *V. sphaerocephala* pueden estar presentes compuestos de naturaleza terpénica con capacidad antifúngica. Además de que de acuerdo con el valor de IC₅₀ de 1.3 mg/mL para el hidrolato de tallo este se considera que es un buen antifúngico (Mesa *et al.*, 2019).

Otros de los compuestos volátiles se distribuyeron en las distintas fracciones, pero siempre el mayor contenido de los mayoritarios fue más alto en la fracción de acetato de etilo tanto del hidrolato de hoja, como se mencionó arriba, como en el de tallo, en el que puede observarse un mayor porcentaje de algunos compuestos también antes mencionados (Cuadro 8). Estos resultados demuestran que el mayor contenido de compuestos sesquiterpenos, antes ya identificados en los hidrolatos, fueron separados o concentrados en la fracción de acetato de etilo, aunque con un mayor contenido en el de hoja.

Debido a que la mayor actividad antioxidante fue mostrada por la fracción de acetato de etilo del hidrolato de hoja de *V. sphaerocephala*, se sugiere que este tipo de

compuestos son los responsables de dicha actividad y también de la actividad antifúngica.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

Tanto el hidrolato de hoja como el de tallo de *V. sphaerocephala* mostraron un efecto inhibitorio del 100 %, sobre *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* a una concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, con el hidrolato de tallo se obtuvieron los valores más bajos de IC₅₀ e IC₁₀₀ sobre *B. cinerea*, considerándolo como el más efectivo. De ambos hidrolatos, la fracción de acetato de etilo de mostró la mayor actividad antifúngica sobre *B. cinerea*.

El hidrolato de hoja obtuvo una mayor actividad antioxidante en las técnicas DPPH•, ABTS^{•+}, FRAP y TAC, aunque el hidrolato de tallo mostró una óptima actividad antioxidante con el método de ABTS^{•+}. De ambos hidrolatos, la fracción de acetato de etilo fue la que mostró la mayor actividad antioxidante.

El mayor contenido de compuestos totales (fenoles, flavonoides y terpenos) fue presentado por el hidrolato de hoja en comparación con el hidrolato de tallo, y en la fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos se obtuvieron los valores más altos de fenoles totales y de flavonoides, y solamente en la fracción hexánica se observó el mayor contenido de terpenos totales. Estos resultados apoyados con el análisis de correlación sugieren que los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos se relacionan con la alta actividad antioxidante observada, la cual pudiera estar implicada en la actividad antifúngica.

Con el análisis del perfil químico por CG-EM, se sugiere que los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo de ambos hidrolatos, son los responsables tanto de la actividad antioxidante como antifúngica.

10. LITERATURA CITADA GENERAL

- Abad, M. J., y Bermejo, P. (2007). *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7), 76-96
- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Quinta Ed., Academic Press, Nueva York, 803 p.
- Arnao, M.B., Cano, A. y Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Ajay Kumar, G. (2014). Colletotrichum gloeosporioides: biology, pathogenicity and management in India. *J. Plant Physiol. Pathol*, 2(2), 2-11.
- Al-Snafi, A. E. (2016). The pharmacological activities of *Cuminum cyminum*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(6), 46-65.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Basavegowda, N. (2021). Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications. *Biomolecules*, 11(9), 1267.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., y Barrera-Necha, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (soft rot). In Postharvest decay (pp. 1-44). Academic Press.
- Bello-González, M.A., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M.B. y Salgado-Garciglia, R. (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, 39, 175-215.
- Brown, D. W., & Proctor, R. H. (2013). *Fusarium*. Caister Academic Press.
- Bussaman, P., Namsena, P., Rattanasena, P., y Chandrapatya, A. (2012). Effect of Crude Leaf Extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. *Psyche*, 2012.
- Calixto, M. J. y Urbina, A. A. (2019). Inhibición del crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp., con aceite esencial de menta y ruda. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*, 2.
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Cázar-Chávez D. (2017). Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi). Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Centeno-Briceño S. y Carrera-Jaspe Y. (2013). Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. *SABER*, 25(2), 185-191.
- Céspedes C.L., Avila J.G., Martínez A., Serrato B., Calderón-Mugica J.C. y Salgado-Garciglia R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J. Agric. Food Chem.*, 54(10), 3521–3527.
- Chouhan, S., Sharma, K., y Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Cordero, A. P., Romero, D. V., y Anaya, L. C. (2018). Actividad del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) contra *Colletotrichum gloeosporioides* de ñame (*Dioscorea alata*). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 99-108.
- Cotes, A. M., Zapata, Y., Beltrán-Acosta, C., Kobayashi, S., Uribe, L., y Elad, Y. (2018). Control biológico de patógenos foliares. Corporación colombiana de investigación agropecuaria AGROSAVIA.

- Dambolena, J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Kibwage I.O., Mwalukumbi J.M. y Kariuki S.T. (2010).** Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Inn. Food. Sci. Emerging. Technol.*, 11, 410-414.
- de Veras, B.O, Saturnino de Oliveira J.R., de Menezes Lima V.L., do Amaral Ferraz Navarro D.M., Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar J.C., de Medeiros Moura G.M., da Silva J.W., Dias de Assis C.R., Gorlach-Lira K., Castro de Assis P.A., de Souza Barbosa J.I., Cabral Sales de Melo M.R., Melo de Oliveira M.B., da Silva M.V., de Souza Lopes A.C. (2021).** The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) S.F.Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*, 265,113248.
- Divya-Ramakrishnan C.K., Doss D. y Vijayabharathi A. (2017).** Biochemical and antimicrobial characterization of an underexploited medicinal plant - *Verbesina encelioides*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3407-3416.
- Drenth, A., y Guest, D. (2013).** *Phytophthora*: la destructora de plantas. *Revista Palmas*, 34, 49-56.
- Essien, G. E., Thomas, P. S., & Udoette, I. M. (2020).** *In vitro* antioxidant analysis and quantitative determination of phenolic and flavonoid contents of *Emilia sonchifolia* (L) DC (Asteraceae) leaf extract and fractions. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 044-052.
- FHIA. (2007).** Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. 4:2-5.
- Fravel, D., Olivain, C., y Alabouvette, C. (2003).** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502
- Fulgencio-Negrete R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Funk, V. A., Sussana, A., Stuess, T. F., & Bayer, R. J. (2009).** Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Viena: International Association for Plant Taxonomy.
- García, C. (2004).** Introducción a la microbiología. Segunda edición. Editorial EUNED. Costa Rica. pp. 103 – 107
- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., y Viña, J. (2013).** Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista española de geriatría y gerontología*, 48(2), 79-88.
- Gonzalez-Burgos, E., y Gómez-Serranillos, M. P. (2012).** Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current medicinal chemistry*, 19(31), 5319-5341.
- González-López, Á. M., Quiñones-Aguilar, E. E., y Rincón-Enríquez, G. (2016).** Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. 33-49.
- Gormez, A., Bozari, S., Yanmis, D., Gulluce, M., Sahin, F., y Agar, G. (2015).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of two species of Lamiaceae against phytopathogenic bacteria. *Polish journal of microbiology*, 64(2), 121-127
- Guédez, Clemencia, Cañizalez, Luis, Avendaño, Laura, Scorza, José, Castillo, Carmen, Olivar, Rafael, Méndez, Yolanda, & Sánchez, Libert. (2014).** Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos poscosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2), 81-87

- Hammer, K. 1., Carson, C. F., y Riley, T. V. (2003).** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of applied microbiology*, 95(4), 853-860.
- Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019).** A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409-424.
- Javed B., Farooq F., Ibrahim M., Abbas H.A.B., Jawwad H., Zehra S.S., Ahmad H.M., Sarwer A., Malik K. y Nawaz K. (2023).** Antibacterial and antifungal activity of methanolic extracts of *Salix alba* L. against various disease causing pathogens. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e243332.
- Karamać, M., Kosińska, A. y Pegg, B.R. (2005).** Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 165-170.
- Kaur, S., Singh, H. P., Batish, D. R., y Kohli, R. K. (2011).** Chemical characterization, antioxidant and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus tereticornis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4788-4793.
- Kendrick, B. (2000).** The Fifth Kingdom, CD-ROM. Sidney-by-the-Sea British Columbia, Canada, V8L 1M8.
- Kim, J.-E.; Lee, J.-E.; Huh, M.-J.; Lee, S.-C.; Seo, S.-M.; Kwon, J.H.; Park, I.-K. (2019).** Fumigant antifungal activity via reactive oxygen species of *Thymus vulgaris* and *Satureja hortensis* essential oils and constituents against *Raffaelea quercus-mongolicae* and *Rhizoctonia solani*. *Biomolecules*, 9, 561.
- Kong, A. S. Y., Maran, S., Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Yang, S. K., Cheng, W. H., ... & Lai, K. S. (2022).** Anti-and Pro-Oxidant Properties of Essential Oils against Antimicrobial Resistance. *Antioxidants*, 11(9), 1819.
- Kuete, V. (2017).** *Thymus vulgaris*. Medicinal spices and vegetables from Africa, 599-609.
- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. (2004).** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*, 85:633-40
- Kumar, V., Mathela, C. S., Tewari, A. K., y Bisht, K. S. (2014).** In vitro inhibition activity of essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi. *Pesticide biochemistry and physiology*, 114, 67-71.
- Kwon, J. H., Ahn, G. H., y Park, C. S. (2004).** Fruit soft rot of sweet persimmon caused by *Mucor piriformis* in Korea. *Mycobiology*, 32(2), 98-101.
- Lee, J.E., Seo, S.M., Huh, M.J., Lee, S.C., Park, I.K. (2020).** Reactive oxygen species mediated-antifungal activity of cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils and their constituents against two phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 168, 104644.
- Li, B., Chen, Y., Zhang, Z., Qin, G., Chen, T., y Tian, S. (2020).** Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3416-3438.
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., y Gazim, Z. C. (2016).** Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18, 191-200.
- Luciano-Rosario, D., Keller, N. P., y Jurick, W. M. (2020).** *Penicillium expansum*: Biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21(11), 1391-1404.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., y Kolodziejczyk, P. P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732-1738.
- Magaldi, S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M.T. y Olaizola C. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases.*, 8(1), 39-45.

- Mahlo S. M., McGaw L. J. y Eloff J. N. (2010).** Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens, *Crop Protection*, 29, 1529-1533.
- Maldonado S. O., Jiménez V. E. N., Guapillo V. M. R. B., Ceballos R. G. M. y Méndez B.E. (2010).** Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med. UV*, 10(2):32-39
- Márquez, R., De la Rosa C. y Mercado A. (2007).** Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Point. *Sci. Tecn. XIII(3)*,155-159.
- Martinez, J. A. (2012).** Natural fungicides obtained from plants. IntechOpen.
- Martínez Padrón, Hadassa Yuef, Hernández Delgado, Sanjuana, Reyes Méndez, César Augusto, & Vázquez Carrillo, Gricelda. (2013).** El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.
- Martini, C., y Mari, M. (2014).** *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia Rot, Brown Rot). Postharvest Decay, 233–265.
- Mesa, A. M., Marin, P. A., Ocampo, O., Calle, J., y Monsalve Fonnegra, Z. I. (2019).** Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Ediciones INTA
- Montes-Belmont, R. (2009).** Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82.
- Mora, F.D., Rojasa Y.L., González V., Velasco J., Díaz T., Ríos N., Rojas-Fermin L.B., Carmona J., Silva B. y Nieto M. (2015).** Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Verbesina negrensis* from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communications*, 10(7),1309-1310.
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., y Capanoglu, E. (2020).** Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.
- Niño, J., Narváez D.M., Mosquera O.M. y Correa Y.M. (2006).** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight *Asteraceae* and two *Rubiaceae* plants from Colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 566-570.
- Omar M.S. y Kordali Ş. (2019).** Review of Essential Oils as Antifungal Agents for Plant Fungal Diseases. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (2), 294-301.
- OMS. (2018).** Inocuidad de alimentos, Aflatoxinas. Organización mundial de la salud, 5. WHO/NHM/FOS/RAM/18.1.
- Ortiz Escarza, J. M., & Medina López, M. E. (2020).** Estrés oxidativo ¿ un asesino silencioso?. *Educación química*, 31(1), 1-11.
- Özcan, M. M., y Chalchat, J. C. (2008).** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International journal of food sciences and nutrition*, 59(7-8), 691-698
- Padilla, F. C, Rincón, A. M, y Bou-Rached, L. (2008).** Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3), 303-308.
- Pavón, M. A., Gonzalez, I., Martín, R., y García, T. (2015).** Importancia del género *Alternaria* como patógeno de cultivos vegetales (I). *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (265), 46-50.
- Pedroso, A. T. R., Arrebato, M. A. R., Baños, S. B., Triana, A. C., y González, D. R. (2012).** Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.

- Plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., y Velez-Haro, J. M. (2014).** *Aspergillus* spp.(Black mold). In *Postharvest decay* (pp. 267-286). Academic Press.
- Prescott, M., Harley H.P. y Klein G.A. (2009).** Microbiología, 7ma edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana. 1220 pp.
- Prieto, P., Pineda, M. y Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Ramón-Valderrama, J. A. y Galeano-García, P. L. (2020).** Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas de plantas del género *Solanum*. *Información tecnológica*, 31(5), 33-42
- Ramseyer, J., Thuerig B., De Mieri M., Schärer H-J., Oberhänsli T., Gupta M.P. Tamm L., Hamburger M. y Potterat O. (2017).** Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *J. Nat. Prod.*, 80(12),3296-3304.
- Rodríguez-Valdovinos, K. (2019).** Determinación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (Asteraceae) (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Jiquilpan, México.
- Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Salgado-Garciglia, R., Vázquez-Sánchez, M., Álvarez-Bernal, D., Oregel-Zamudio, E., Ceja-Torres, L. F., y Medina-Medrano, J. R. (2021).** Quantitative Analysis of Rutin by HPTLC and In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic-Rich Extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants*, 10(3), 475.
- Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Medina-Medrano, J. R., Hernandez-García, A., Saavedra-Molina, F.A., Del Río-Torres, R.E.N., López-Mesa, J.E., García-Rodríguez, Y.M., Espinosa-García, F.J. y Salgado-Garciglia, R. (2022).** Actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* y perfil de compuestos volátiles del extracto acuoso de tallo de *Verbesina sphaerocephala*. REDBIO, Mérida, Yucatán, México.
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014).** *Botrytis cinerea* (gray mold). In *Postharvest decay* (pp. 131-146). Academic Press.
- Rutiaga, Q.J.G. (2001).** Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. *Buchverlag Gräffelfing*. München. p. 49.
- Rzedowski, G.C. y Rzedowski J. (2001).** Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), pp. 925-927.
- Saad, I., Díaz, E., Chávez, I., Reyes-Chilpa, R., Rubluo, A., y Jiménez-Estrada, M. (2000).** Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*, 55(1), 51-57.
- Salinas Sandoval, M. (2016).** Actividad antifúngica de extractos vegetales en hongos patógenos de cultivos comerciales.
- Satish C.J., Singh R. y Renuka J. (2008).** Antimicrobial and antioxidant potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. and Hook. Fil ex Gray. *Research Journal of Medicinal Plants*, 2:61-65.
- Singh R., Sharma R.R., Goyal R.K. (2007)** Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae* 111:344-351.

- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. (2014).** A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
- Solís-Silva, A., Reyes-Munguía, A., Madariaga-Navarrete, G., Medina-Pérez, R. G., Campos-Montiel, A. J., y Cenobio-Galindo, J. (2018).** Evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante de una nanoemulsión W/O de *Opuntia oligacantha* y aceite esencial de *Citrus X sinensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 3, 182-187.
- Sotler, R., Poljšak, B., Dahmane, R., Jukić, T., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Trebše, P., Starc, A. (2019).** Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clin. Croat.*, 58, 726–736
- Soto, A., Rodríguez, G, Fernández, Y. L., Pedraza, M. E., López, L., Díaz, M., y Fernández, S. P. (2017).** Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(8), 1867-1880.
- Torres-Martínez, R., Bello-González, M. Á., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M.M., Lara-Chávez, B.N., y Salgado-Garciglia, R. (2014).** Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21),122-134.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., y Garciglia, R. S. (2017).** Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 4), S875.
- Truong, D. H., Ta, N. T. A., Pham, T. V., Huynh, T. D., Do, Q. T. G., Dinh, N. C. G., y Bui, A. V. (2021).** Effects of solvent—solvent fractionation on the total terpenoid content and in vitro anti-inflammatory activity of *Serevenia buxifolia* bark extract. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1720-1735.
- Valdés-Pérez, O., Borrego-Alonso, S., Vivar-González, I., Anaya-Villalpanda, M., y Molina-Veloso, A. (2016).** Actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor en el control del biodeterioro fúngico de documentos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2), 78-85.
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J. J., y Sánchez-Escalante, A. (2014).** Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotechnia*, 16(1), 32-37.
- Vázquez-Sánchez, M., Medina-Medrano, J.R., Cortéz-Madrigal, H., Angoa-Pérez, M.V., Muñoz-Ruíz, C.V. y Villar-Luna, E. (2018).** Nematicidal activity of wild plant extracts against second-stage juveniles of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, 48(2), 136-144.
- Velasco-Ramírez, A.P., Velasco-Ramírez, S.F. y Velasco-Ramírez, A. (2019).** Uso en medicina tradicional de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (Asteraceae) en la comunidad de San Martín de las Flores, Jalisco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(2),144-154.
- Velázquez-del Valle, M., Bautista-Baños, S, Hernández-Lauzardo, A., Guerra-Sánchez, M., y Amora-Lazcano, E. (2008).** Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., y Martínez-Escudero, E. (2015).** Situación actual en el control de *Fusarium*

- spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
- Villaseñor, J. L. (2018).** Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en Mexico. *Botanical Sciences*, 96(2), 332–358.
- Wojcik-Stopczynska B. y Jakowienko P. (2012).** The estimation of antifungal activity of essential oil and hydrosol obtained from wrinkled-leaf mint (*Mentha crispa* L.), *Herba Polonica*, 8, 5-15.
- Xi, K.-Y.; Xiong, S.-J.; Li, G.; Guo, C.-Q.; Zhou, J.; Ma, J.-W.; Yin, J.-L.; Liu, Y.-Q.; Zhu, Y.-X (2022).** Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*. *Horticulturae*, 8, 983.
- Yun, D. G., y Lee, D. G. (2017).** Silymarin exerts antifungal effects via membrane-targeted mode of action by increasing permeability and inducing oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859(3), 467-474.
- Zaker, M. (2016).** Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control- A review. *The Agriculturists*, 14(1), 134-141.