



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

OPCIÓN: INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

T E S I S:

**DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DEL CONTENIDO DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Verbesina sphaerocephala*
A. GRAY (ASTERACEAE) CON LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
Y ANTIOXIDANTE**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN EN INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M.C. KATHIA YANELLY RODRÍGUEZ VALDOVINOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ ROBERTO MEDINA MEDRANO

MORELIA, MICHOACÁN

NOVIEMBRE 2024

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 y en la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y el Dr. José Roberto Medina Medrano



Dedicatoria

**A mis amados padres, quienes confiaron en mí y me apoyaron
con todo su cariño**

A mis queridos amigos que me echaron porras

“En esta vida no somos más que simples pasajeros”



Agradecimientos

A Dios por guiar mis pasos y permitirme haber logrado con éxito culminar esta etapa de mi vida.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, especialmente al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por brindarme la oportunidad de realizar este posgrado.

Al CONAHCYT por el otorgamiento de la beca para mis estudios de doctorado.

A mi director de tesis, Dr. Rafael Salgado Garciglia, por aceptarme como su estudiante de estancias y de doctorado, por todos los conocimientos y experiencias aprendidos para mi formación como doctora en ciencias, así como los gratos momentos, ayuda, consejos y enorme paciencia durante seis años.

A mi director de tesis, Dr. José Roberto Medina Medrano, por seguir trabajando conmigo desde la maestría y ahora en doctorado, por sus conocimientos y brindarme las facilidades para realizar este trabajo en su laboratorio de la UCEMICH.

A la Dra. Rosa Elva Norma Del Río Torres, por haber aceptado formar parte de mi comité, así como ser mi tutora durante mis estudios de posgrado y otorgarme sus valiosas aportaciones y consejos.

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina, por haber aceptado ser parte de mi comité, por haberme permitido realizar parte de mi trabajo en su laboratorio, por sus enseñanzas y aportes durante la realización de experimentos, sin olvidar las amenas pláticas.

Al Dr. Joel Edmundo López Meza, por haber aceptado ser parte de mi comité, por sus aportaciones y conocimientos, también por los momentos compartidos que, aunque fueron limitados, fueron muy gratos.

Al Dr. Juan Antonio (Toño) Guerrero y al Dr. Juan Luis Monribot, por su valioso apoyo durante los análisis de UPLC-MS, especialmente a Toño por las vivencias, aunque poquitas, pero agradables.

A mis padres, Antonio Rodríguez y Leticia Valdovinos, quienes me apoyaron y me brindaron toda la confianza durante esta travesía, por ayudarme a perseguir y lograr mis metas y sueños, especialmente cuando quería tirar la toalla y no podía más.

A mi familia, mi hermano Tony, mi cuñada Rocío, mi hermana Carolina, mi cuñado Omar, mis tíos Martha y Gonzalo, mi tía Bertha, mis abuelos María, José, Evelia y José María (†).

A mis sobrinitos Michelle, Coco y Yahir, por ser parte de mi motivación.

A la Dra. Alejandra Hernández García, responsable del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su apoyo y consejos durante mi formación de posgrado.

A mis compañeros de laboratorio: Sol, Erika, Atsiri, Nadia, Liz, por los momentos vividos, haciendo de manera amena el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeritos de doctorado Ray, Netly (Tocaya) y Tamara, por apoyarnos los unos a los otros durante estos cuatro años de doctorado y por la bonita amistad formada.

A los M.C. Yolanda Aguilar, Karina Hernández, Juan Christian Altamirano y Agustín Moreno por las vivencias y momentos que pasamos durante todo mi periodo de posgrado, especialmente a mis queridas Yola y Kari, por haberme brindado su amistad y apoyo tanto en lo experimental y personal.

A las M.C. Marina Murillo, Cinthia Landa y Ángeles Rangel, por haberme ayudado en la última parte experimental y por brindarme su amistad y bonitos momentos, adoptándome en su laboratorio haciéndome sentir como un miembro más de su equipo.

A Brandon, por las vivencias y charlas de mangas que tuvimos y seguiremos teniendo.

A Adrián, mi amigo de GDL, por las largas horas de chismes y debates sobre las múltiples historias leídas.

A mis queridas amigas Rubí Julieta Ortega, Estefanía Cázares, Samara Vidal que me han apoyado y dados sus ánimos, agradezco mucho tenerlas conmigo.

A mis amiguitos del box Blanca, Verito, Mitzu, Mariela, Sebastián, Javi, Cristy, Anita, Marko, Ily, por echarme porras cada vez que iba y venía a entrenar.

A mis queridas amigas del club, especialmente a Pauly, Sol, Zali (manaa) y Mía, que me han apoyado y dado ánimos en estos cuatro años (y más) desde Santiago de Chile, Estado de México y Perú.

A mi querida Lily, secretaria del PIDCB, por su enorme ayuda durante mis trámites como estudiante de doctorado.

Al M.C. Luis María Suárez, por los agradables momentos al trabajar en su laboratorio (estancia de maestría) y desde que llegué a la UMSNH.

A Douglitas, lomito Bull terrier de cuatro patas, que sin saberlo me dio muchos ánimos cada vez que pasaba por su casa a visitarlo.

¡Gracias eternas!

ÍNDICE GENERAL	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>ii</i>
RESUMEN.....	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Hongos patógenos de plantas agrícolas	4
2.1.1. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fries.....	4
2.1.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc.	6
2.1.3. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlech.	7
2.2. Antifúngicos	9
2.2.1. <i>Antifúngicos de origen sintético</i>	9
2.3. Actividad antioxidante de compuestos de origen vegetal	16
2.4. Relación entre compuestos bioactivos con la actividad antioxidante y antifúngica	17
2.5.1. <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS	27
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
7. MATERIAL BIOLÓGICO Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	29
7.1. Colecta de plantas de <i>V. sphaerocephala</i>	29
7.2. Aislamientos y cultivo de hongos.....	30
7.3. Obtención de los extractos y de las fracciones	31
8. RESULTADOS	33
8.1. Capítulo 1. Actividad antifúngica y tamizaje fitoquímico de inflorescencias, hojas, tallos y extractos de raíces de <i>Verbesina sphaerocephala</i> (Asteraceae) sobre tres hongos fitopatógenos.	33
8.1.1. <i>Resumen</i>	33
8.1.2. <i>Artículo 1. Antifungal activity and phytochemical screening of inflorescences, leaves, stems, and roots extracts of Verbesina sphaerocephala (Asteraceae) against three phytopathogenic fungi.</i>	34
8.2. Capítulo 2. Actividad antioxidante y antifúngica, y caracterización de compuestos fenólicos usando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución	

Acoplada y Espectrometría de Masas (UPLC-MS) del extracto acuoso de tallo y fracciones de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	52
8.2.1. Resumen.....	52
8.2.2. Artículo 2.....	53
8.2.3. Resultados complementarios. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC ₅₀) y total (IC ₁₀₀) del extracto acuoso de tallo de <i>V. sphaerocephala</i> sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> ...	67
8.3. Capítulo 3. Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas del extracto acuoso de tallo y fracciones de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	70
Volatile compounds analysis by gas chromatography-mass spectrometry of extract aqueous and fractions of <i>Verbesina sphaerocephala</i> stems.....	70
8.3.1. Resumen.....	70
8.3.2. Abstract.....	70
8.3.3. Introducción.....	71
8.3.4. Materiales y métodos.....	73
8.3.5. Resultados y discusión.....	75
8.3.6. Conclusiones.....	81
8.3.7. Referencias.....	82
8.4. Capítulo 4. Análisis del efecto prooxidante del extracto acuoso de tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i> y la fracción de acetato de etilo en esporas de <i>Botrytis cinerea</i>	86
8.4.1. Resumen.....	86
8.4.2. Abstract.....	86
8.4.3. Introducción.....	87
8.4.4. Materiales y métodos.....	89
8.4.5. Resultados y discusión.....	92
8.4.6. Conclusiones.....	99
8.4.7. Referencias.....	100
9. DISCUSIÓN GENERAL.....	104
9.1. Efecto antifúngico <i>in vitro</i> y perfil químico de diferentes extractos de <i>V. sphaerocephala</i> sobre tres hongos fitopatógenos.....	104
9.2. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales, actividad antioxidante y antifúngica, y caracterización de compuestos fenólicos usando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución y Espectrometría de Masas (UPLC-MS) del extracto acuoso de tallo y fracciones de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	105
9.3. Efecto del extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo sobre el estrés oxidante en esporas de <i>B. cinerea</i>	110

10. CONCLUSIONES	113
11. LITERATURA GENERAL CITADA	114
15. ANEXOS	133

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>F. oxysporum</i>	6
Cuadro 2. Actividad antifúngica de terpenos en hongos fitopatógenos	13
Cuadro 3. Actividad antifúngica de compuestos fenólicos en hongos fitopatógenos...	14
Cuadro 4. Compuestos terpénicos y fenólicos con actividad antifúngica y antioxidante.....	18
Cuadro 5. Clasificación taxonómica de <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray.....	23
Cuadro 6. Concentración inhibitoria media y total (IC ₅₀ e IC ₁₀₀) del extracto acuoso de tallos de <i>V. sphaerocephala</i>	67
Cuadro 7. Contenido de fenoles, flavonoides, terpenos totales y actividad antioxidante de diferentes extractos de tallos de <i>V. sphaerocephala</i>	68
Cuadro 8. Identificación y cuantificación de compuestos terpénicos en el extracto acuoso de tallo y sus fracciones de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	79
Cuadro 9. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), glutatión total y actividad de enzimas CAT y SOD en esporas de <i>Botrytis cinerea</i> tratadas con el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	93
Cuadro 10. Viabilidad celular (%) de esporas de <i>B. cinerea</i> tratadas con el extracto acuoso y la fracción de etilo de tallos de <i>Verbesina sphaerocephala</i>	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Botrytis cinerea</i> . (a) Hongo en medio PDA, (b) micelio, (c) esporas. Imágenes propias	5
Figura 2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . (a) Hongo en medio PDA, (b) Micelio, (c) Esporas. Imágenes propias	7
Figura 3. <i>Fusarium oxysporum</i> . (a) Hongo en medio PDA, (b) Micelio, (c) Esporas.....	8
Figura 4. Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos y terpénicos.....	13
Figura 5. Mecanismos de acción de compuestos terpénicos y fenólicos en una célula fúngica.....	19
Figura 6. <i>Distribución de Verbesina sphaerocephala</i>	22
Figura 7. <i>Verbesina sphaerocephala</i> : Planta arbustiva en época de floración (a); Inflorescencias (b); tallos (c); hoja (d); raíces (e)	23
Figura 8. Ejemplar de <i>Verbesina sphaerocephala</i> confirmado en el herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.....	29
Figura 9. Tejidos de <i>V. sphaerocephala</i> en fresco y procesados.....	30
Figura 10. Cepas fúngicas: <i>Botrytis cinerea</i> (a); <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (b); <i>Fusarium oxysporum</i> (c). Fotografías propias.....	31
Figura 11. Proceso de obtención de extractos y fracciones de <i>V. sphaerocephala</i> ...	32
Figura 12. Contenido de terpenos totales del extracto acuoso de tallo y sus tres fracciones de <i>V. sphaerocephala</i>	76
Figura 13. Cromatograma del extracto acuoso de tallo de <i>Verbesina sphaerocephala</i> , obtenido por CG-EM.....	78
Figura 14. Viabilidad y germinación de esporas de <i>B. cinerea</i> expuestas a diferentes tratamientos.....	99
Figura 15. Mecanismo de acción propuesto de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de <i>V. sphaerocephala</i> en esporas de <i>B. cinerea</i>	112

RESUMEN

Verbesina sphaerocephala es una de las especies de la familia Asteraceae más distribuida a lo largo del territorio mexicano, la cual ha sido poco estudiada; sin embargo, se ha reportado la presencia de algunos compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antibacteriana. En esta investigación se evaluó la actividad antifúngica, antioxidante y el perfil químico de compuestos fenólicos y terpénicos de extractos (acuoso, metanol, acetato de etilo y de cloroformo) de diferentes partes (tallos, hojas, inflorescencias y raíces) de *Verbesina sphaerocephala*, así como de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en pozos contra tres hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*). La actividad antioxidante se determinó con los métodos de DPPH, ABTS, FRP y TAC. La cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos se realizó por Ultra Cromatografía de Líquidos acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS), y las de los compuestos terpénicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Con el análisis fitoquímico se determinó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, saponinas y terpenos. En una primera etapa, se observó que el extracto acuoso de tallo exhibió la mayor actividad antifúngica (100%) en el crecimiento micelial de los tres hongos a 10 mg/mL, pero en *B. cinerea* el efecto fue mayor desde una concentración de 1 mg/mL. Este extracto fue seleccionado para las otras etapas de la investigación, obteniendo la IC₅₀ (0.10 mg/mL) contra *B. cinerea* y demostrando que la fracción de acetato de etilo fue la de mayor actividad antifúngica (IC₅₀: 14.8 mg/mL), comparada con las otras fracciones. Tanto el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo exhibieron el mayor contenido de ácidos fenólicos (21.40 y 21.26 mg equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto seco, mg EAG/g ES, respectivamente) y flavonoides (11.53 y 3.71 mg equivalentes de rutina, mg ER/g ES, respectivamente) y una alta actividad antioxidante con TAC (20.62 y 40.21 mg equivalentes a ácido ascórbico, mg/g ES, respectivamente), FRP (74.76 y 129.57 mg equivalentes de ácido gálico, mg EAG/g ES, respectivamente), DPPH (IC₅₀: 12.38 y 7.36 mg/mL, respectivamente), y ABTS (IC₅₀: 5.60 y 7.76 mg/mL, respectivamente). Se detectaron doce compuestos fenólicos en el extracto acuoso mediante el análisis UPLC-MS, de los cuales los principales fueron el ácido protocatecuico, el vainillínico y el hidroxibenzoico, mientras que en la fracción de acetato de etilo se identificó la presencia de 18 compuestos fenólicos, de los cuales la mayoría fueron vainillina, rutina y ácido hidroxibenzoico. Por GC-MS en el extracto acuoso fueron identificados 26 compuestos volátiles cuantificados en mg/g ES, 88.6 % corresponden a sesquiterpenos (elemol, 0.245 mg/g; nerolidol, 0.346 mg/g; isodieno, 0.531 mg/g; α -santalol, 0.212 mg/g; y α -bisabolol, 0.285 mg/g), y en la fracción de acetato de etilo, 15 compuestos fueron identificados con un 93.4% de sesquiterpenos, cuatro de ellos presentes en el extracto, pero en una mayor concentración en esta fracción (elemol, 0.356 mg/g; nerolidol, 0.407 mg/g; isodieno, 0.583 mg/g; y α -bisabolol, 0.525 mg/g). En las fracciones metanólica y hexánica se identificó un número menor de compuestos volátiles y en menor concentración que la de acetato de etilo y que el extracto acuoso. Con este análisis se sugiere que la mezcla de los sesquiterpenos elemol, nerolidol, isodieno, α -santalol y α -bisabolol, son los responsables de la actividad biológica y antioxidante, por estar presentes tanto en el extracto como en la fracción de acetato de etilo, y en un mayor contenido. En cuanto a la determinación del efecto prooxidante tanto del extracto acuoso como de la fracción de acetato de etilo, esta última mostró la actividad más alta con valores mayores a los del extracto acuoso en la producción de especies reactivas de oxígeno (3.27 UAF), así como el mayor efecto en la actividad de catalasa (0.17 U/mg proteína), los valores más bajos en glutatión total (0.0115 μ mol glut/mg proteína) y con una inhibición del 93.32% sobre la superóxido dismutasa. Así mismo, la fracción de acetato de etilo provocó un 100% de mortalidad de las esporas de *B. cinerea*. Con estos resultados, se concluye que la fracción de acetato de etilo genera estrés oxidante en esporas de *B. cinerea*, sugiriendo este sea el mecanismo de acción antifúngico de los compuestos presentes en esta fracción.

Palabras clave: Antifúngicos, Antioxidantes, Estrés oxidante, Fenólicos, Terpenos, *Verbesina*.

ABSTRACT

Verbesina sphaerocephala is one of the species of the Asteraceae family, most distributed throughout the Mexican territory, and has been little studied, reporting the presence of some bioactive compounds with antioxidant and antibacterial activity. In this research, the antifungal and antioxidant activity and the chemical profile of phenolic and terpene compounds of extracts (aqueous, methanol, ethyl acetate, and chloroform) of different parts (stems, leaves, inflorescences, and roots) of *Verbesina sphaerocephala*, as well as the fractions obtained by liquid-liquid partitioning, were evaluated. The antifungal activity was assessed by the well diffusion method against three phytopathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Fusarium oxysporum*). Antioxidant activity was determined using the DPPH, ABTS, FRP, and TAC methods. The quantification and identification of phenolic compounds was performed by ultra chromatography of liquids mass-coupled (UPLC-MS) and those of terpene compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-EM). The phytochemical analysis determined the presence of phenolic compounds, flavonoids, coumarins, quinones, saponins, and terpenes. In the first stage, it was observed that the aqueous stem extract exhibited the highest antifungal activity (100%) in the mycelial growth of the three fungi at 10 mg/mL, but in *B. cinerea*, the effect was greater from a concentration of 1 mg/mL. This extract was selected for the other stages of the research, obtaining the IC₅₀ (0.10 mg/mL) against *B. cinerea* and demonstrating that the ethyl acetate fraction was the one with the highest antifungal activity (IC₅₀: 14.8 mg/mL), compared to the other fractions. Both the aqueous extract and the ethyl acetate fraction exhibited the highest content of phenolic acids (21.40 and 21.26 mg gallic acid equivalents per gram of dry extract, mg EAG/g ES, respectively) and flavonoids (11.53 and 3.71 mg routine equivalents, mg ER/g ES, respectively) and high antioxidant activity with TAC (20.62 and 40.21 mg ascorbic acid equivalents, mg/g ES, respectively), FRP (74.76 and 129.57 mg gallic acid equivalents, mg EAG/g ES, respectively), DPPH (CI₅₀: 12.38 and 7.36 mg/mL, respectively), and ABTS (CI₅₀: 5.60 and 7.76 mg/mL, respectively). Twelve phenolic compounds were detected in the aqueous extract by UPLC-MS analysis, of which the main ones were protocatechuic acid, vanillin, and hydroxybenzoic acid, while in the ethyl acetate fraction, the presence of 18 phenolic compounds was identified, of which the majority were vanillin, rutin, and hydroxybenzoic acid. By GC-MS in the aqueous extract, 26 volatile compounds were identified quantified in mg/g ES, 88.6 % corresponding to sesquiterpenes (elemol, 0.245 mg/g; nerolidol, 0.346 mg/g; isodene, 0.531 mg/g; α -santalol, 0.212 mg/g; and α -bisabolol, 0.285 mg/g), and in the ethyl acetate fraction, 15 compounds were identified with 93.4% sesquiterpenes, four of them present in the extract, but in a higher concentration in this fraction (elemol, 0.356 mg/g; nerolidol, 0.407 mg/g; isodene, 0.583 mg/g; and α -bisabolol, 0.525 mg/g). In the methanolic and hexanic fractions, fewer volatile compounds were identified, and the concentrations were lower than in ethyl acetate and aqueous extract. This analysis suggests that the mixture of the sesquiterpenes elemol, nerolidol, isodene, α -santalol, and α -bisabolol are responsible for the antifungal and antioxidant activity, as they are present both in the extract and in the ethyl acetate fraction, and higher content. Regarding the determination of the pro-oxidant effect of both the aqueous extract and the ethyl acetate fraction, the latter showed the highest activity with values higher than those of the aqueous extract in the production of reactive oxygen species (3.27 UAF), as well as the greatest effect on catalase activity (0.17 U/mg protein), the lowest values in total glutathione (0.0115 μ mol glut/mg protein) and with a 93.32% inhibition of superoxide dismutase. Likewise, the ethyl acetate fraction caused a 100% mortality of *B. cinerea* spores. These results conclude that the ethyl acetate fraction generates oxidative stress in *B. cinerea* spores, suggesting this is the mechanism of antifungal action of the compounds present in this fraction.

Keywords: Antifungals, Antioxidants, Oxidative stress, Phenolics, Terpenes, *Verbesina*.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son de los organismos patógenos que mayormente atacan a las plantas y provocan enfermedades que ocasionan las pérdidas más graves en la producción agrícola. Se sabe que más de 19000 especies de hongos causan enfermedades en las plantas, aunque los más comunes pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Molinilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phomopsis* y *Rhizopus* (Jain *et al.*, 2019; Jayawardena *et al.*, 2019, 2020). Desde hace más de 50 años, en los campos agrícolas de todo el mundo se aplican fungicidas de origen sintético, con el fin de reducir estas pérdidas en la agricultura, ya que, por su uso desmedido y naturaleza de éstos, se acumulan y contaminan el suelo, el agua y por supuesto los alimentos, por lo que son considerados compuestos tóxicos dañinos para el ambiente y para el humano, contribuyendo también a la aparición de cepas fúngicas resistentes (Majeed *et al.*, 2017; Tashiro *et al.*, 2019).

Debido a esto, con el fin de contribuir a la disminución de la contaminación que este tipo de fungicidas causan, así como reducir 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, así como una baja contaminación al ambiente.

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios como parte de sus mecanismos de defensa al ataque de patógenos y de adaptación a ambientes adversos como altas o bajas temperaturas, sequía, salinidad, alta intensidad de luz, entre otros. Se clasifican en tres grandes grupos como los terpenos, los fenólicos, los alcaloides y otros compuestos nitrogenados. Tanto los de origen terpénico como fenólico son de los más abundantes, y debido a su amplia actividad biológica, como la antioxidante y la antimicrobiana, son considerados como metabolitos con un alto potencial para ser utilizados como inhibidores del crecimiento de bacterias y hongos patógenos, los que causan enfermedades tanto en plantas y en humanos (Ramírez-

Gómez *et al.*, 2019). Por estas características, son considerados como candidatos excelentes para ser empleados en la agricultura orgánica, importantes para el abastecimiento de la demanda creciente de alimentos inocuos, sobre todo para disminuir el uso de los fungicidas químicamente sintetizados.

Dentro de los polifenoles, tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides presentan actividad antifúngica, ya que algunos de ellos tienen la capacidad de inhibir la germinación de esporas fúngicas, mientras que otros causan deformación y lisis celular (Pusztahelyi *et al.*, 2015). Los flavonoides como la quercetina y los ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, han mostrado actividad antifúngica frente a algunos fitopatógenos como *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Wianowska *et al.*, 2016). La inhibición del crecimiento de hongos se ha relacionado con la actividad antioxidante, debido a que hay compuestos con esta última actividad, que muestran un efecto prooxidante en modelos de cultivos *in vitro* de hongos, generando un mayor estrés oxidante, lo que altera las proteínas de membrana, que conlleva a la deformación y pérdida de la funcionalidad membranal, provocando la disrupción de éstas, llevando a la muerte de los hongos tratados (Joaquín-Ramos *et al.*, 2020).

Así mismo, hay investigaciones que también demuestran que diversos metabolitos de tipo terpénico como los monoterpenos, diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos, tienen tanto actividad antifúngica como antioxidante. Este grupo de metabolitos son componentes principales de los aceites esenciales o de extractos de baja polaridad o intermedia de gran cantidad de plantas, como las de la familia Asteraceae, que contienen tanto terpenos como fenólicos y son responsables de la actividad antifúngica y antioxidante (Jamalian *et al.*, 2012; Singh y Sharma, 2015; Gavrilović *et al.*, 2016). En particular, los extractos hidroalcohólicos de *Tagetes patula* (Asteraceae) mostraron esta relación entre la actividad antifúngica y la antioxidante, debido al contenido tanto de fenólicos como de terpenos. Una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos, de terpenos y tanto de la actividad antifúngica como de la antioxidante, se

ha reportado en especies de la familia Zingiberaceae, en las que la curcumina es el principal componente fenólico (Yordi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Parham *et al.*, 2020).

Especies del género *Verbesina*, perteneciente también a la familia Asteraceae como *V. macrophylla*, *V. lanata*, *V. encelioides* y *V. persicifolia*, presentan también, tanto actividad antifúngica como antioxidante. Las especies de *Verbesina* representan el segundo género más grande de esta familia en México, con 164 especies nativas y 138 endémicas (Villaseñor, 2018), y varias de sus especies son utilizadas como parte de la medicina tradicional mexicana por sus propiedades como antioxidante, antifúngico, antibacteriana, antitumoral, entre otras (Dalla Via *et al.*, 2015; Al-Oqail *et al.*, 2016; García-Bores *et al.*, 2020).

Se ha reportado que diversos extractos de la especie *V. sphaerocephala* también presentan actividad biológica, aunque son pocos los estudios fitoquímicos realizados con esta planta. Recientemente, se reportó que contiene sesquiterpenos (ej. cadinenos) y flavonoides entre otros compuestos fenólicos (ej. rutina) que se relacionan con su actividad antimicrobiana y antioxidante (Arciniegas *et al.*, 2020; Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021). Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021) demostraron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de esta planta sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, aunque hasta ese momento, se desconocían sus propiedades antifúngicas, así como la identificación de sus principales compuestos de naturaleza terpénica y fenólica.

Es por ello, que el objetivo general de esta investigación fue determinar el contenido e identificar los principales compuestos fenólicos y terpénicos, así como evaluar la actividad antifúngica y actividad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente polaridad de diversas partes (capítulos florales, hojas, tallos y raíces) de *Verbesina sphaerocephala*, sobre los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hongos patógenos de plantas agrícolas

Los hongos son el grupo de agentes fitopatógenos de mayor importancia debido al amplio número de especies que causan daños y al extenso rango de enfermedades que provocan en el 70-80% de las plantas de valor agrícola, tanto en la etapa de pre- y poscosecha. Estos microorganismos han desarrollado diversas estrategias para atacar a los cultivos, desde colonizar tejidos vivos de las plantas, interactuando con los mismos y obteniendo nutrientes sin llegar a matar a las plantas (hongos biotróficos), ingresar a tejidos vegetales y matándolos para el mismo fin (hongos necrotróficos), aprovechar heridas en los tejidos vegetales para invadirlos y aprovechar sus nutrientes, ocasionando la posterior muerte de la planta (hongos hemibiotróficos), entre otros mecanismos de infección (Doehlemann *et al.*, 2016; Shuping y Eloff, 2017; Peng *et al.*, 2021).

Se estima que más de 19000 especies de hongos ocasionan pérdidas en la producción agrícola, que pueden sobrepasar los 200 billones de dólares anuales, superando incluso a las pérdidas provocadas por otro tipo de fitopatógenos, como las bacterias, insectos y nemátodos (Jain *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). A continuación, se describirán los hongos bajo estudio: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*.

2.1.1. *Botrytis cinerea* Pers.:Fries

De acuerdo con diversas investigaciones, *B. cinerea* es el hongo que ocupa el segundo lugar en el rango de fitopatógenos de importancia agrícola, al que se le atribuyen pérdidas agrícolas a nivel mundial de hasta el 45%. En medio papa-dextrosa-agar (PDA), *B. cinerea* presenta un micelio de apariencia algodonosa y aérea, de una tonalidad marrón a verde oscura. Su micelio se conforma de conidióforos (12 μm) que se ramifican para posteriormente integrar conidios (10-12 x 8-10 μm) a manera de racimos, de forma ovoide y unicelulares. Este hongo presenta estructuras de

resistencia, llamadas esclerocios, mismas que llegan a medir de 2 a 5 mm de longitud, de forma esférica y de tonalidad café (Romanazzi y Feliziani, 2014) (Figura 1).

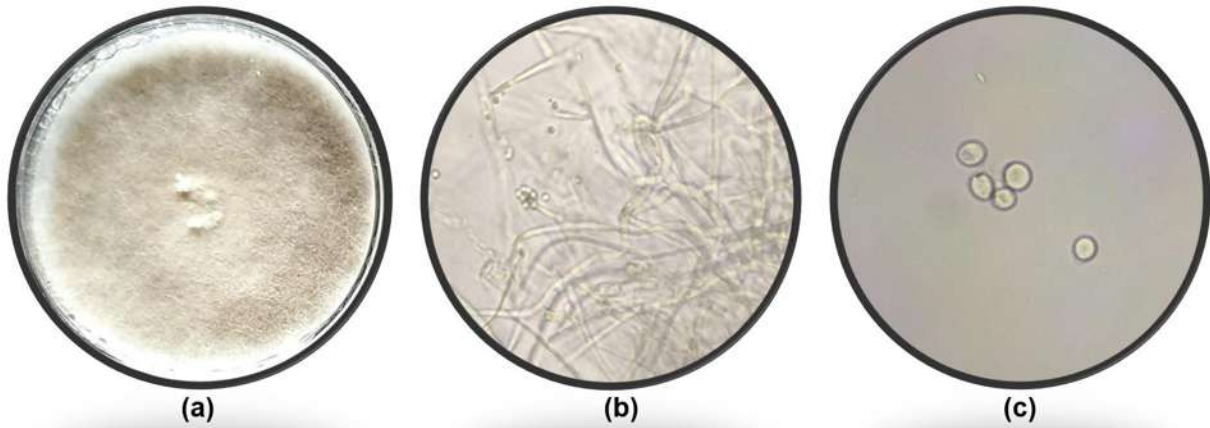


Figura 1. *Botrytis cinerea*. **(a)** Hongo en medio PDA, **(b)** micelio, y **(c)** esporas. (Fotografías propias).

La clasificación de este hongo que se da a continuación es de acuerdo con la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP/EPPO, 2021) (Cuadro 1). *B. cinerea* se hospeda en residuos de tejidos vegetales que permanecen en los nuevos cultivos. Al haber un aumento de la temperatura, se generan micelio y conidióforos y en estas estructuras inicia el desarrollo de esporas o conidios, los que ya maduros son liberados al ambiente y dispersados a través del agua o viento para llegar a cultivos sanos. Una vez logrado esto, las esporas comienzan a germinar y tienen la capacidad de generar el micelio en los diferentes tejidos vegetales como hojas, tallos, flores y frutos, tanto en forma externa como interna, ocasionando la pudrición y la muerte de estos (Romanazzi y Feliziani, 2014b; González-Domínguez *et al.*, 2015).

Este hongo es el principal agente causal de la enfermedad moho gris, que afecta a más de 500 especies agrícolas y ornamentales, principalmente a la uva, frutillas, cucurbitáceas, cítricos, solanáceas, entre otras. Los principales métodos para controlar a este hongo fitopatógeno se basan principalmente en el uso de fungicidas de origen sintético; en la selección y cultivo de variedades resistentes; en la

sanitización de plántulas y frutos; en la irradiación empleando rayos gamma; o con el control biológico, utilizando hongos y bacterias benéficas (Bika *et al.*, 2020; De Simone *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*.

Nombre científico	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Reino	Fungi	Fungi	Fungi
Clase	Leotiomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes
Orden	Helotiales	Glomerellales	Hypocreales
Familia	Sclerotiniaceae	Glomerellaceae	Nectriaceae
Género	<i>Botrytis</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>

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

El hongo *C. gloeosporioides* es uno de los que más afecta a los cultivos en la etapa de poscosecha, considerado uno de los hongos fitopatógenos más comunes. En medio PDA presenta colonias que forman micelios de apariencia esponjosa y algodonada con coloración salmón-blanquecinas, dependiendo del tipo de medio de cultivo y observándose segmentos marrones, lo cual indica esporulación. Su morfología consta de conidios de forma ovalada con medidas de 9 a 24 μm x 3 a 6 μm , dichos conidios se encuentran agrupados en estructuras llamadas acérvulos, los cuales presentan una forma irregular o en forma de discos y pueden llegar a medir de 80 a 250 μm (Figura 2) (Siddiqui y Ali, 2014; Rojo-Báez *et al.*, 2017). La clasificación de este hongo se presenta en el Cuadro 1.

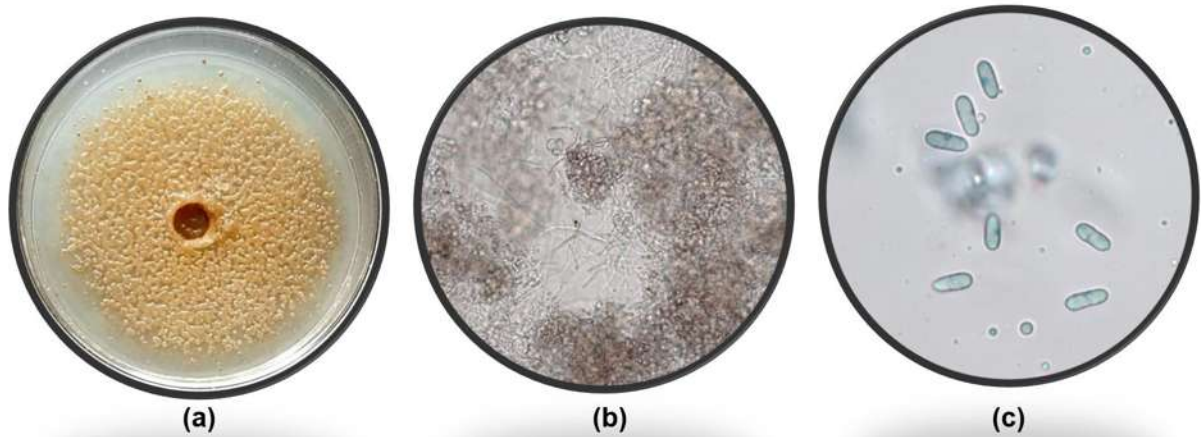


Figura 2. *Colletotrichum gloeosporioides*. **(a)** Hongo en medio PDA, **(b)** Micelio, y **(c)** Esporas (Fotografías propias).

Diversas investigaciones reportan que *C. gloeosporioides* comienza su ciclo cuando las esporas de este hongo llegan al fruto mediante la acción del viento u otro factor de dispersión. Una vez que llega al fruto, aprovecha las heridas o fisuras en este para poder ingresar y desarrollarse; comienza produciendo enzimas como poligalacturonasas y pectatoliasas, degradando los tejidos a su paso al mismo tiempo que va aprovechando los nutrientes de su hospedero, observándose en el fruto manchas con anillos concéntricos que van avanzando hasta que el fruto se pudre totalmente. La antracnosis es la principal enfermedad causada por este hongo, aunque también provoca tizones en hojas de plantas jóvenes. Este hongo afecta a cultivos que posean alto contenido de humedad, tales como el mango, papaya, tomate, frutillas, aguacate, tomate, cítricos, entre otros. Entre los métodos primordiales de control para este fitopatógeno se destaca el uso de fungicidas sintéticos, control biológico (*Trichoderma* spp.), rotación de cultivos, irradiaciones y uso de variedades de cultivos resistentes al hongo (Sharma y Kulshrestha, 2015; Kamle y Kumar, 2016; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2020).

2.1.3. *Fusarium oxysporum* Schlech.

De acuerdo con Lombard *et al.* (2019), *Fusarium oxysporum* es el hongo, dentro del género *Fusarium*, que presenta mayor impacto a nivel agrícola y económico. En medio

PDA las colonias de *F. oxysporum* se muestran como micelio aplanado, de textura ligeramente algodonoso, con tonalidades que pueden ir de color rosado hasta púrpura intenso, notándose cambios de color. Estos hongos presentan macroconidios, estructuras características en *F. oxysporum* debido a su forma de medialuna y mismos que presentan divisiones (3 a 5 septos), cuyas medidas pueden ser de 27-46 x 3-5 μm a 35-60 x 3-5 μm , dependiendo del número de septos que presenten estas estructuras. A su vez, también poseen microconidios, los que presentan una estructura elíptica o cilíndrica, llegando a medir 5-12 x 2.2-3.5 μm (Figura 3). A diferencia de los macroconidios, no cuentan con septos. De igual manera, también poseen estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, que se caracterizan por su forma rugosa o pueden ser también lisas, llegando a medir entre 5 y 15 μm (Retana *et al.*, 2018; Cardona-Piedrahíta y Castaño-Zapata, 2019). Por otro lado, la clasificación taxonómica de *F. oxysporum* de acuerdo con la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas se presenta en el Cuadro 1 (EPPO, 2021).

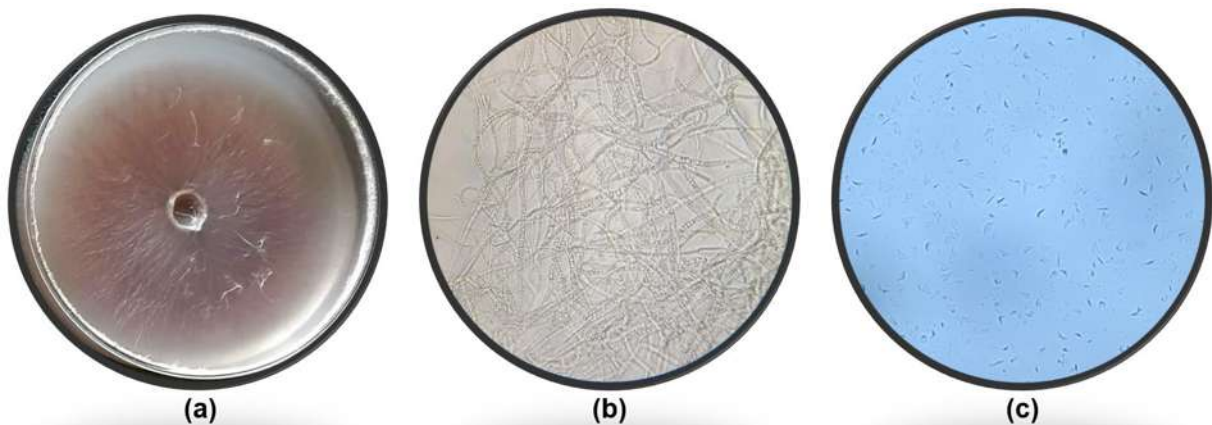


Figura 3. *Fusarium oxysporum*. **(a)** Hongo en medio PDA, **(b)** Micelio, y **(c)** Esporas (Fotografías propias).

El ciclo vital de *F. oxysporum* inicia cuando sus esporas se activan por acción de las raíces de las plantas, emitiendo mezclas de sustancias a manera de exudados. Posteriormente, el tubo germinativo de las esporas ingresa a la raíz de las plantas aprovechando fisuras u otro tipo de lesiones, atravesando la corteza hasta llegar al sistema vascular. Una vez allí, comienza a generar sus estructuras características, micro y macroconidios, los cuales van esparciéndose por la planta, provocando

colapso de la defensa por parte de las plantas (Deng *et al.*, 2015; Rana *et al.*, 2017; Worku y Sahela, 2018).

Dentro de las enfermedades que causa *F. oxysporum*, están la marchitez vascular, la podredumbre basal y de raíz, el mal de Panamá y la secadera en frutillas. Entre los principales cultivos que *F. oxysporum* provoca daños se encuentran el maíz, plátano, algodón, soya, melón, cebolla, tomate, papa, chile, violetas, gerberas, orquídeas, entre otros. El control químico con fungicidas químicos sintéticos, extractos de plantas, uso de microorganismos benéficos, cultivo de variedades resistentes y rotación de cultivos, constituyen las estrategias de control más utilizadas contra este hongo fitopatógeno (Lecomte *et al.*, 2016; Abhiram y Masih, 2018; Joshi, 2018; Edel-Hermann y Lecomte, 2019; López-Zapata y Castaño-Zapata, 2019).

2.2. Antifúngicos

Los compuestos antifúngicos son agentes de origen natural o sintético cuya función es detener el crecimiento y/o provocar la muerte de los hongos. En la actualidad, el empleo de antifúngicos sintéticos es uno de los métodos de control más efectivo para el tratamiento y control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, debido a su eficacia contra este tipo de microorganismos. Los antifúngicos actúan a través de diversos mecanismos de acción, como la desestabilización de membranas celulares, la destrucción de paredes celulares, la inhibición de enzimas importantes para sus procesos metabólicos, lo que impide que las esporas germinen, entre otros diversos mecanismos (Baibakova *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2019; López-Herrera y Melero-Vara, 2020).

2.2.1. Antifúngicos de origen sintético

Este tipo de productos de naturaleza química sintética pueden ser aplicados en los cultivos tanto en etapa de pre y poscosecha. Los antifúngicos sintéticos se clasifican de acuerdo con su aplicación en la planta, de contacto (se colocan en la planta por aspersión a manera de cubierta protectora) y sistémicos (se aplican mediante riego e

ingresan a la planta por absorción a través del sistema vascular) (Baibakova *et al.*, 2019; Hermann y Stenzel, 2019).

Los antifúngicos sintéticos más utilizados en la agricultura pertenecen a las sales de cobre y azufre, azoles, dicarboximidias y benzimidazoles. Las sales de cobre y azufre se consideran de los primeros compuestos usados a manera de antifúngicos, actuando los iones de cobre y/o azufre al enlazarse a proteínas de membranas fúngicas ocasionando su ruptura; los azoles se encargan de inhibir enzimas relacionadas a la biosíntesis del ergosterol, tal es el caso de la 14 α dimetilasa; el grupo de las triazinas. Las dicarboximidias son moléculas cuyo modo de acción contra los hongos se basa en la interferencia con la trasducción de señales, específicamente en las enzimas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) y en las enzimas histidina cinasas; los benzimidazoles intervienen a nivel de mitosis, impidiendo el ensamblaje de la β -tubulina de las fibras del huso (Fillinger y Walker, 2015; Dogan *et al.*, 2017; Baibakova *et al.*, 2019b).

Dentro de los fungicidas químico-sintéticos, como el Tecto60® (tiabendazol), este tiene una acción sistémica, tanto con actividad preventiva como curativa por contacto, que es absorbido por raíces y hojas, y principalmente su efecto contra hongos es impidiendo la mitosis celular al unirse a la tubulina. El Benomy150® (benzimidazol) es absorbido por la planta y traslocado en forma ascendente, protegiendo incluso a los brotes que se desarrollan después de la aplicación, debido a que es sistémico y con un extenso efecto residual, también actúa sobre la tubulina, evitando la mitosis, pero al ingresar a la célula del hongo se transforma en metilbenzimidazol-2-il que interfiere en la síntesis del ADN y en el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN al ARN, y también en butil isocianato, que actúa como fuerte inhibidor de la oxidación de la glucosa y del acetato, impidiendo la respiración celular (su vida media es hasta de 12 meses) (PortalTecnoAgrícola, 2022).

2.2.2. Antifúngicos de origen vegetal

Los extractos vegetales son el producto obtenido de plantas o partes de éstas (hojas, flores, raíces, tallos) empleando disolventes (agua, metanol, acetato de etilo, entre otros) mediante diferentes métodos de extracción (maceración, infusiones, fluidos supercríticos, destilación). Contienen una mezcla compleja de compuestos denominados metabolitos secundarios, los que presentan actividad biológica de interés, entre ellas la propiedad antifúngica, además de que tienen un periodo de vida corto en el ambiente, son amigables con especies como los polinizadores o microorganismos benéficos (hongos micorrícicos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, entre otros), por lo cual su uso se implementa para el control de hongos fitopatógenos (Santamaría *et al.*, 2015; Mesa *et al.*, 2019).

Los metabolitos secundarios son moléculas de naturaleza orgánica que son generados por las plantas, que aunque no tienen una función principal para el crecimiento y desarrollo vegetal, son esenciales durante la interacción de éstas con el ambiente, como en la atracción de polinizadores y otros organismos benéficos, así como en la defensa contra organismos herbívoros o microorganismos patógenos, además contra factores abióticos como altas y bajas temperaturas, radiación solar, disponibilidad de agua, entre otros (Hernández-Alvarado *et al.*, 2018; Sepúlveda-Vázquez *et al.*, 2018).

Diversas investigaciones reportan que los metabolitos secundarios de plantas poseen propiedades biológicas de interés como lo son la actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana y antifúngica (Hernández-Alvarado *et al.*, 2018; Sepúlveda-Vázquez *et al.*, 2018) (Cuadro 2). Dentro de los metabolitos secundarios se destacan tres principales grupos, los terpenos, los fenoles o polifenoles y los alcaloides.

Terpenos. De acuerdo con Boncan *et al.* (2020), los terpenos son metabolitos secundarios sintetizados a partir de una molécula de cinco átomos de carbono (isopreno). Su clasificación depende del número de carbonos que presenten en sus estructuras (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, entre otros). Se sintetizan por la ruta del ácido mevalónico y son los compuestos mayoritarios en los

aceites esenciales vegetales y participan en las interacciones de las plantas con otros organismos (herbívoros, polinizadores y otras especies vegetales) así como alelopáticos, entre otras.

Este grupo de metabolitos exhiben propiedades biológicas de interés, tales como la actividad antimicrobiana, quimioprotectora, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antifúngica, entre otras. Los terpenos presentan diversos mecanismos de acción contra hongos fitopatógenos, tal es el caso del timol y el carvacrol, los cuales actúan inhibiendo la biosíntesis de ergosterol en las membranas fúngicas. Por otro lado, el elemol causa daños en la pared celular de los hongos, almacenándose en orgánulos y destruyéndolos. En el caso del linalool, se sabe que su modo de acción es actuando a nivel mitocondrial, produciendo deformaciones en la matriz de las mitocondrias e incrementando los niveles de ERO. El nerolidol altera la morfología de hifas, inhibe la producción de esporas y altera la permeabilidad de membranas. También los terpenos provocan la muerte de células fúngicas por acumulación de especies reactivas de oxígeno (Chan *et al.*, 2016; Haque *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Ludwicsuk *et al.*, 2017; Redondo-Blanco *et al.*, 2020) (Figura 4) (Cuadro 2).

Almasoodi *et al.* (2020), evaluaron la actividad antifúngica de diferentes extractos de las plantas *Curcuma longa* y *Boswellia carteri* contra *Fusarium* sp., reportando una actividad inhibitoria que fue atribuida a los compuestos terpénicos. Por otro lado, Yusoff *et al.*, (2020) reportan que los terpenos escualeno, fitol, triacontano, heptacosano y neofitadieno, presentes en extractos de *Vernonia amigdalina*, poseen efecto antifúngico contra *B. cinerea*. De igual manera, Kwodaga *et al.* (2018), mencionan que el extracto acuoso de neem (*Azadirachta indica*) mostró inhibición contra *C. gloeosporioides*, relacionándolo con los compuestos de naturaleza terpénica presentes en dicho extracto. Asimismo, la fracción metanólica de extractos de hojas de *Alphonsea sclerocarpa* inhibe el crecimiento de *Aspergillus* sp., debido a su alto contenido de terpenos (Suman *et al.*, 2017) (Figura 4).

Cuadro 2. Actividad antifúngica de terpenos en hongos fitopatógenos.

Metabolito	Especie/Planta	Hongo blanco	Referencia
p-cimeno	Comino (<i>Carum copticum</i>)	<i>Aspergillus flavus</i>	Kazemi <i>et al.</i> , 2015
Timol y carvacrol	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	<i>Fusarium</i> sp.	(Boudine <i>et al.</i> , 2016)
Geraniol y citral	Gotehge (<i>Lippia rugosa</i>)	<i>Aspergillus flavus</i>	Tang <i>et al.</i> , 2018
Nerolidol	<i>Myrcia lundiana</i>	<i>Fusarium pallidoroseum</i>	(Sampaio <i>et al.</i> , 2020)
α-thujene	Pimienta (<i>Pimenta dioica</i>)	<i>Colletotrichum</i> sp.	Velázquez Silva <i>et al.</i> , 2021)
β-copaeno y γ-muuroleno	Crisantemo (<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	<i>Alternaria tenuissima</i>	(He <i>et al.</i> , 2023)



Figura 4. Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos y terpénicos.

Fenólicos. Los compuestos fenólicos son moléculas que se encuentran constituidas por un anillo aromático, o un grupo de benceno, que se caracterizan por la presencia de grupos hidroxilo. No obstante, pueden presentar otros sustituyentes que les confieren estructuras más complejas y otras características importantes para su actividad biológica (Lin *et al.*, 2016; Saranraj *et al.*, 2019).

De este grupo, se destacan los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinas, cumarinas, ligninas, xantonas, entre otros, de los cuales algunos presentan propiedades biológicas de gran interés como la actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antidiabética, antiviral, entre otras (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2019). Se ha demostrado que la capacidad antifúngica de los compuestos fenólicos provenientes de diferentes plantas se debe a que destruyen las membranas celulares por sus propiedades lipofílicas, interfieren en el metabolismo microbiano, inhiben la síntesis de metabolitos esenciales en los hongos, o bien, desestabilizan el ADN, entre otros posibles modos de acción, que retardan o inhiben el crecimiento de los hongos (Dambolena *et al.*, 2011) (Figura 4, Cuadro 3).

Cuadro 3. Actividad antifúngica de compuestos fenólicos en hongos fitopatógenos.

Metabolito	Especie/Planta	Hongo blanco	Referencia
Cumarina	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rashad <i>et al.</i> , 2018
Apigenina	<i>Agave americana</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sahnoun <i>et al.</i> , 2018
Ácido p-cumárico	<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2019
Punicalina (tanino)	<i>Punica granatum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Brighenti <i>et al.</i> , (2021)
Salvigenina	<i>Combretum erythrophyllum</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Seepe <i>et al.</i> , 2021

Santos *et al.* (2017), evaluaron el efecto antifúngico de los extractos etanólicos (70%) de hojas y raíces de la planta *Cuphea glutinosa* contra diferentes cepas de *Candida*, encontrando que dichos extractos poseen actividad antifúngica significativa contra *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. A su vez, le atribuyen la actividad biológica a la quercetina identificada mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS). De igual manera Rongai *et al.* (2015), analizaron la actividad antifúngica de extractos acuosos de granado (*Punica granatum* y salvia (*Salvia guaranitica*) contra *F. oxysporum*. Los autores reportan que dichos extractos inhiben a *F. oxysporum*, atribuyendo este efecto antifúngico a la alta presencia de compuestos de naturaleza flavonoide. Asimismo, Behiry *et al.* (2019), determinaron el efecto antifúngico de extractos metanólicos de *Musa paradisiaca* contra *Rhizoctonia solani*, mencionando que los flavonoides identificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en el extracto inhibieron al hongo en un 94.07%.

Alcaloides. Los alcaloides son compuestos que se sintetizan a partir de un aminoácido, su estructura es heterocíclica y tienen características básicas de acuerdo con su composición. Su clasificación varía dependiendo de su tipo de estructura (alcaloides, protoalcaloides y pseudoalcaloides). Los alcaloides se sintetizan mediante la ruta del ácido shikímico y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Estos compuestos actúan en las plantas como reservas de nitrógeno para diversos procesos metabólicos, defensa contra fitopatógenos y depredadores, e intervienen regulando el crecimiento vegetal, entre otras funciones (Shi *et al.*, 2014; Espada-Domínguez *et al.*, 2016; Bribi, 2018; Desgagné-Penix, 2021).

Algunos de los alcaloides exhiben mecanismos de acción contra diversos tipos de hongos. Tal es el caso de la piperina, la cual actúa contra el hongo *Aspergillus parasiticus*, inhibiendo su crecimiento, así como la biosíntesis de aflatoxinas y alterando los mecanismos antioxidantes endógenos (enzimas superóxido dismutasa, catalasa). Por otro lado, la colchicina se une a la enzima hidrofolato reductasa, la cual interviene en la síntesis de purinas y aminoácidos en *Aspergillus niger*. De igual

manera, la sanguinarina altera el potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en *Magnaporthe oryzae*, al igual que provoca el colapso de su membrana y la pared celular (Zhao *et al.*, 2019; Rebecca *et al.*, 2021; Buitimea-Cantúa *et al.*, 2022).

2.3. Actividad antioxidante de compuestos de origen vegetal

La actividad antioxidante se refiere a aquella propiedad que presentan diversos compuestos para inhibir o retardar el daño a las células ocasionado por la acción de radicales libres, ya sea donando electrones o protones completos a estos para estabilizarlos, activando enzimas antioxidantes, reduciendo o quelando iones que puedan desencadenar en la generación de estas moléculas en el organismo. Los compuestos fenólicos y los terpenos se caracterizan por presentar esta cualidad entre sus diversas propiedades biológicas (Figura 4).

Mohandas *et al.* (2018), evaluaron el contenido total y actividad antioxidante de terpenos presentes en extractos de *Thuidium tamariscellum*, reportando que dichos metabolitos presentan alta capacidad antioxidante en las pruebas de actividad bloqueadora de los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil y 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (DPPH[·] y ABTS^{·+}), poder reductor férrico (FRAP), actividad quelante de iones y capacidad bloqueadora de peróxido de hidrógeno. Asimismo, Takaidza *et al.* (2018), reportaron que los terpenos presentes en extractos de especies de *Tulbaghia* bloquean al radical DPPH[·] en dicho ensayo, actuando como principales donadores de electrones a diferencia de los otros metabolitos presentes en los extractos.

Jeszka-Skowron *et al.* (2014), mencionan que el flavonoide rutina, presente en la planta del té (*Camellia sinensis*), es el compuesto predominante en conjunto con otros ácidos fenólicos (identificado por HPLC), atribuyéndosele a éste el efecto antioxidante al ser donador de electrones en la prueba de DPPH[·]. De igual manera, Rusmana *et al.* (2017), investigaron el contenido de quercetina y rutina, así como la actividad

antioxidante de éstos en el extracto de *Phyllanthus niruri*, reportando que la quercetina es el metabolito responsable de la actividad antioxidante mediante diversos ensayos (ABTS^{•+}, DPPH[•] y FRAP) a comparación de la rutina. Por otro lado, Meziti *et al.* (2019), realizaron un estudio fitoquímico de extractos de *Quercus ilex* y *Pinus halepensis*, encontrando catequina y ácidos fenólicos, los que presentaron una alta actividad antioxidante en la prueba de reducción férrica y a los cuales también se les atribuye un efecto protector del ADN.

2.4. Relación entre compuestos bioactivos con la actividad antioxidante y antifúngica

Se sabe muy poco acerca de la posible relación de la actividad antioxidante con la actividad antifúngica como un posible mecanismo de acción, debido a que los compuestos antioxidantes en cantidades elevadas actúan ejerciendo el efecto contrario, un efecto prooxidante, lo que provoca la acumulación de radicales libres en las células y conduce a la muerte celular (Cuadro 4, Figura 5).

En las investigaciones realizadas por de Freitas *et al.* (2012), se ha demostrado una correlación entre la actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Leiothrix spiralis* con la actividad antifúngica sobre cuatro especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*). Cudalbeanu *et al.* (2020), también reportaron que la actividad antifúngica de extractos de *Nymphaea alba* observada sobre *C. glabrata*, incrementa cuando aumenta la actividad antioxidante, lo que se atribuye a la quercetina contenida en los extractos.

Por otro lado, Kalidindi *et al.* (2015), reportaron que los compuestos fenólicos encontrados en extractos metanólicos de *Annona squamosa* son los responsables de la actividad antioxidante y antifúngica contra *A. alternata*, *F. solani* y *A. niger*. Sin embargo, dichos autores no mencionan una posible relación de las actividades reportadas, pero indican que éstas son dependientes de la concentración de los compuestos. Por otro lado, Joaquín-Ramos *et al.* (2020), mencionan en su estudio que los compuestos fenólicos identificados en *Barkleyanthus salicifolius* están

relacionados con las actividades antifúngicas y antioxidantes contra *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, indicando una posible relación entre ambas actividades biológicas. Recientemente, Ahmed *et al.* (2022), reportaron que existe una correlación entre la actividad antioxidante y antifúngica de los triterpenos espinasterol y el 22,23-dihidroespinasterol, presentes en los extractos de hojas de *Cytrullus colocynthis* sobre *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*.

Cuadro 4. Compuestos terpénicos y fenólicos con actividad antifúngica y antioxidante.

Compuesto	Planta	Hongo	Actividad	Referencia
Polifenoles (flavonoides, taninos y antocianinas)	<i>Artemisia herba-alba</i>	<i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium graminearum</i>	Antioxidante (20.64 mg/L) (DPPH) y antifúngica	Khelifi <i>et al.</i> , 2013
Fenoles y flavonoides	<i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob. & Brettell	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antioxidante (285.07 mM Trolox) y antifúngica (92% inhibición)	Joaquín-Ramos <i>et al.</i> , 2020
Escualeno, fitol, triacontano, heptacosano y neofitadieno	<i>Vernonia amygdalina</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Efecto antifúngico (500 mg/mL)	Yusoff <i>et al.</i> , 2020
Tujona, carvacrol, p-cineole y camphor	<i>Asteriscus graveolens</i>	<i>F. oxysporum</i>	Antioxidante (34.81 µg/mL (DPPH), 89.37 µg/mL (FRAP), antifúngica (IC ₅₀ : 18.29 µg/mL)	Aljeldah, 2022

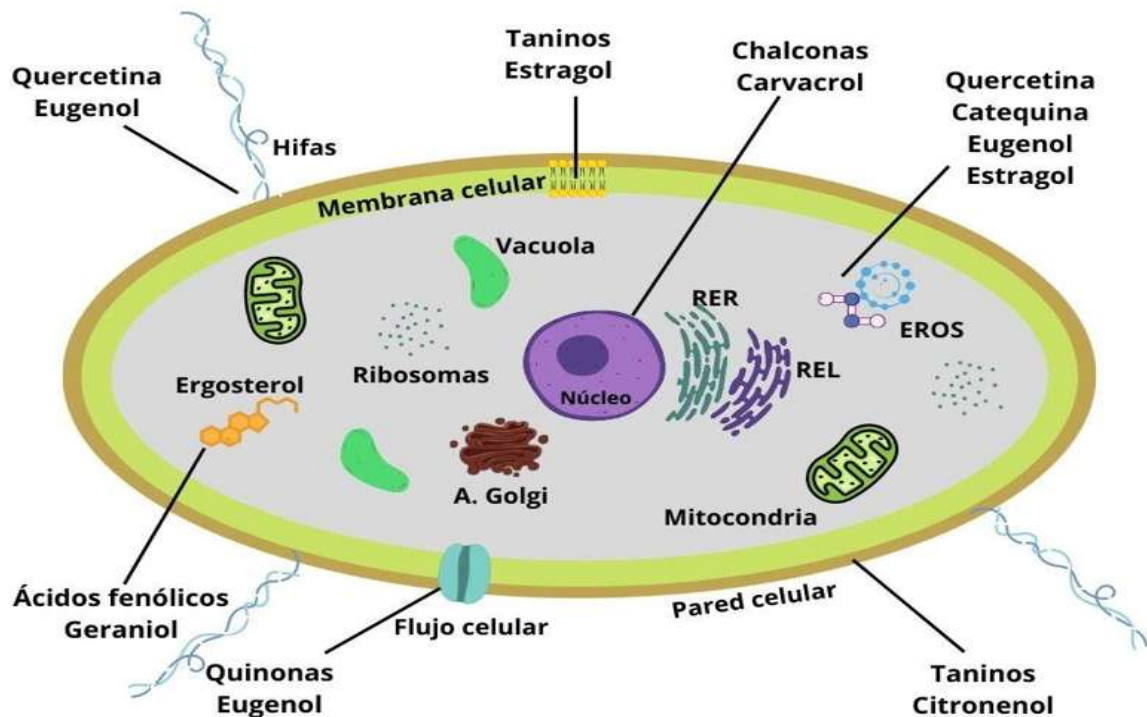


Figura 5. Sitios de acción de compuestos terpénicos y fenólicos en una célula fúngica. (Jin, 2019).

En investigaciones recientes se reportan sitios de acción y los mecanismos de acción antifúngicos específicos de metabolitos o grupos de estos, los cuales se mencionan a continuación (Figura 5):

Hifas. La quercetina actúa a nivel de membrana celular, impidiendo el crecimiento y desarrollo de las hifas. El eugenol provoca alteraciones morfológicas en las hifas, así como un incremento del contenido de potasio en el citoplasma que causa una coagulación de este y la degradación de vacuolas (Wang *et al.*, 2010; Khalifa *et al.*, 2024).

Pared celular. Los taninos, como el ácido tánico, provocan la disrupción de la integridad de la pared celular. Por otro lado, el citronelol afecta significativamente la pared celular, provocando lisis celular (De Oliveira *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2019).

Membrana celular. Los taninos se unen a proteínas de membrana, provocan su precipitación, así como quelar ciertos iones (como el hierro) y desencadenar una alteración en la membrana celular. El estragol provoca deterioro de la integridad en la membrana celular (Huang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019; Nourbakhsh *et al.*, 2021).

Ergosterol. Algunos ácidos fenólicos, como el ácido gálico y vanilínico, afectan la biosíntesis del ergosterol, reduciendo la enzima 14 α dimetilasa o inhibiendo la propia ruta. El geraniol interviene disminuyendo el contenido de ergosterol en las células fúngicas (De Oliveira *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2020).

Flujo celular. Las cumarinas, como la antraquinona, intervienen al inhibir bombas de eflujo que son dependientes de energía. El eugenol interviene afectando genes de bombas de eflujo dentro de la célula (Freiesleben y Jager, 2014; Sen *et al.*, 2023).

Núcleo. Las chalconas afectan a nivel de núcleo interrumpiendo e inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, activando la apoptosis. El carvacrol suprime la expresión de genes que se relacionan con la síntesis del ADN, y el procesamiento y modificaciones del ARN (Rao *et al.*, 2010; Al Aboody *et al.*, 2020).

ERO. Las catequinas estimulan la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) dentro de las células. En el caso de la quercetina, eleva los niveles de ERO y disminuye los niveles redox intracelulares, provocando que el sistema antioxidante de las mitocondrias se altere. De igual manera, el eugenol genera y eleva los niveles de ERO en las membranas fúngicas. El estragol afecta el contenido de ERO y altera la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Olea *et al.*, 2019; Al Aboody *et al.*, 2020; Nguyen y Bhattacharya, 2022; Liang *et al.*, 2023).

2.5. *Verbesina* Linneo (Asteraceae)

En México, la familia Asteraceae (=Compositae) es una de las más extensa que conforman la flora nacional, principalmente se caracteriza por presentar sus flores en diferentes cantidades conformando un capítulo o cabezuela, siendo ésta la inflorescencia. En el país existen 3,113 especies, de las cuales 1988 son endémicas,

siendo Michoacán el quinto estado con el mayor número de especies (837) (Villaseñor, 2018).

El género *Verbesina* fue descrito por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum* 2: 901–903 (1753) y es el segundo género más grande de esta familia en México, con 164 especies nativas y 138 endémicas, aunque recientemente se ha descrito que el género comprende 340 especies (Ahmed *et al.*, 2024). De acuerdo con Rzedowski y Carrillo (2011), las plantas de este género se identifican por ser herbáceas, arbustivas o a veces arborescentes; presentan tallos con frecuencia alados, signo característico de este género; sus hojas son opuestas o alternadas, enteras o lobadas; sus flores pueden ser liguladas o tubulares (fértiles o infértiles) dependiendo de la especie y dispuestas en cabezuelas; sus corolas son amarillas, anaranjadas o a veces blancas; las flores del disco son hermafroditas y tubulares. Los frutos (aquenios) se encuentran fuertemente comprimidos y por lo general alados en los márgenes. En el estado de Michoacán, las especies más abundantes son *V. encelioides*, *V. fastigiata*, *V. grayii*, *V. klattii*, *V. mexiae* y *V. sphaerocephala*, por mencionar algunas (Villaseñor, 2016, 2018).

Existen investigaciones en diversas especies del género *Verbesina* donde se ha evaluado su actividad antioxidante y antifúngica. Divya-Ramakrishnan *et al.* (2017), reportaron que la especie *V. encelioides* posee efecto antioxidante y antifúngico contra hongos como *R. solani*, *Aspergillus flavus* y *Sclerotium rolfsii*, así como una alta actividad antioxidante. Asimismo, García-Bores *et al.* (2020), mencionan que fracciones hexánicas de extractos metanólicos de la especie *V. crocata* posee actividad antioxidante significativa y promueve la cicatrización de heridas en un modelo murino.

Ramseyer *et al.* (2017) evaluaron la actividad antifúngica del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *V. lanata* contra el hongo fitopatógeno *Plasmopara viticola*, señalando que los compuestos sesquiterpenos 6β -cinamoiloxi- $4\beta,9\beta,15$ -trihidroxiudesmano y 6β -cinamoiloxi- $1\beta,15$ -dihidroxiudesm-4-en-3-ona presentes en este extracto, son los responsables de la actividad antifúngica. De igual manera, Ruíz-Jiménez (2015), realizó un estudio fitoquímico en extractos hexánicos, metanólicos y

de acetato de etilo de hojas e inflorescencias de *V. parviflora*, encontrando una mezcla de esterato de α y β -amirina, epóxido de β -cariofileno, eudesmenol, espatulenol, axillarina, quercetagetina 3-metil éter, entre otros. También se determinó en este estudio su capacidad antioxidante con el método de DPPH, reportando que la axillarina mostró la mayor actividad antioxidante (CE_{50} : 3.96 $\mu\text{g/mL}$).

2.5.1. *Verbesina sphaerocephala* A. Gray

Verbesina sphaerocephala A. Gray es una planta común en las zonas del Estado de Michoacán de Ocampo, abunda principalmente en terracerías o zonas no perturbadas por el humano. Es considerada nativa para México, ya que se distribuye en los Estados del centro, noreste y suroeste de México, como Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Morelos, Guerrero y Michoacán, entre otros (Figura 6). Se usa como planta medicinal por diversas comunidades de las regiones. También se le da usos como planta melífera en la apicultura para la producción de miel (Villaseñor y Ortiz, 2012).



Figura 6. Distribución de *Verbesina sphaerocephala* en México (WCVF, 2023).

Es una planta arbustiva que puede llegar a medir desde 0.6 hasta los 3 metros de altura. Presenta tallos pilosos, alados y erectos de tonalidades verdosas y amarillas; sus hojas pueden ser opuestas o alternadas, con forma lanceolada. Sus

inflorescencias constan de flores liguladas y corolas tubulares organizadas en cabezuelas en tonalidades amarillas; sus frutos (aquenios) son de forma obovada y aplanada. Su clasificación taxonómica se describe de acuerdo a WCVP (2023) (Cuadro 5), y fue publicada por primera vez en *Proc. Amer. Acad. Arts* (22: 428. 1887). Tiene un periodo de floración que va desde julio a diciembre (Rzedowski y Carrillo, 2011) (Figura 7).

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (WCVP, 2023).

Reino: Plantae
Filo: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Asterales Link
Familia: Asteraceae Giseke
Género: <i>Verbesina</i> L.
Especie: <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray



Figura 7. *Verbesina sphaerocephala*: Planta arbustiva en época de floración (a); Inflorescencias (b); tallos (c); hoja (d); raíces (e). Fotografías propias.

Existen pocas investigaciones en la especie *V. sphaerocephala* relacionadas a su uso, así como a su composición química. En diversos estudios de etnomedicina, esta planta es empleada 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*) de extractos etanólicos del follaje de *V. sphaerocephala*, reportando que están constituidos con flavonoides y otros fenoles y son considerados como los más activos (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2018).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se determinó el contenido fenólico total, la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos metanólicos de hojas y flores de *V. sphaerocephala*, reportando la presencia de flavonoides y taninos, los que presentaron alta actividad antioxidante. De igual manera, los extractos mostraron actividad antibacteriana significativa (90% y 95%) sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Verbesina sphaerocephala es una planta endémica del Estado de Michoacán y es empleada en la medicina tradicional, además es una planta melífera importante para los apicultores. Los resultados de las pocas investigaciones de esta especie demuestran que contiene compuestos bioactivos con alta actividad antioxidante, aunque se desconocen sus principales compuestos, así como su actividad inhibitoria sobre hongos fitopatógenos.

Resulta de interés el realizar investigaciones sobre diversos extractos de esta planta para contribuir al conocimiento de su actividad antifúngica, la identificación de los principales compuestos activos, su contenido y la determinación de la actividad antioxidante, así como el posible mecanismo de la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos.

4. HIPÓTESIS

El contenido de compuestos activos (fenólicos y terpénicos) de los extractos de *Verbesina sphaerocephala* presenta una relación directa con la actividad antifúngica y antioxidante.

5. OBJETIVOS

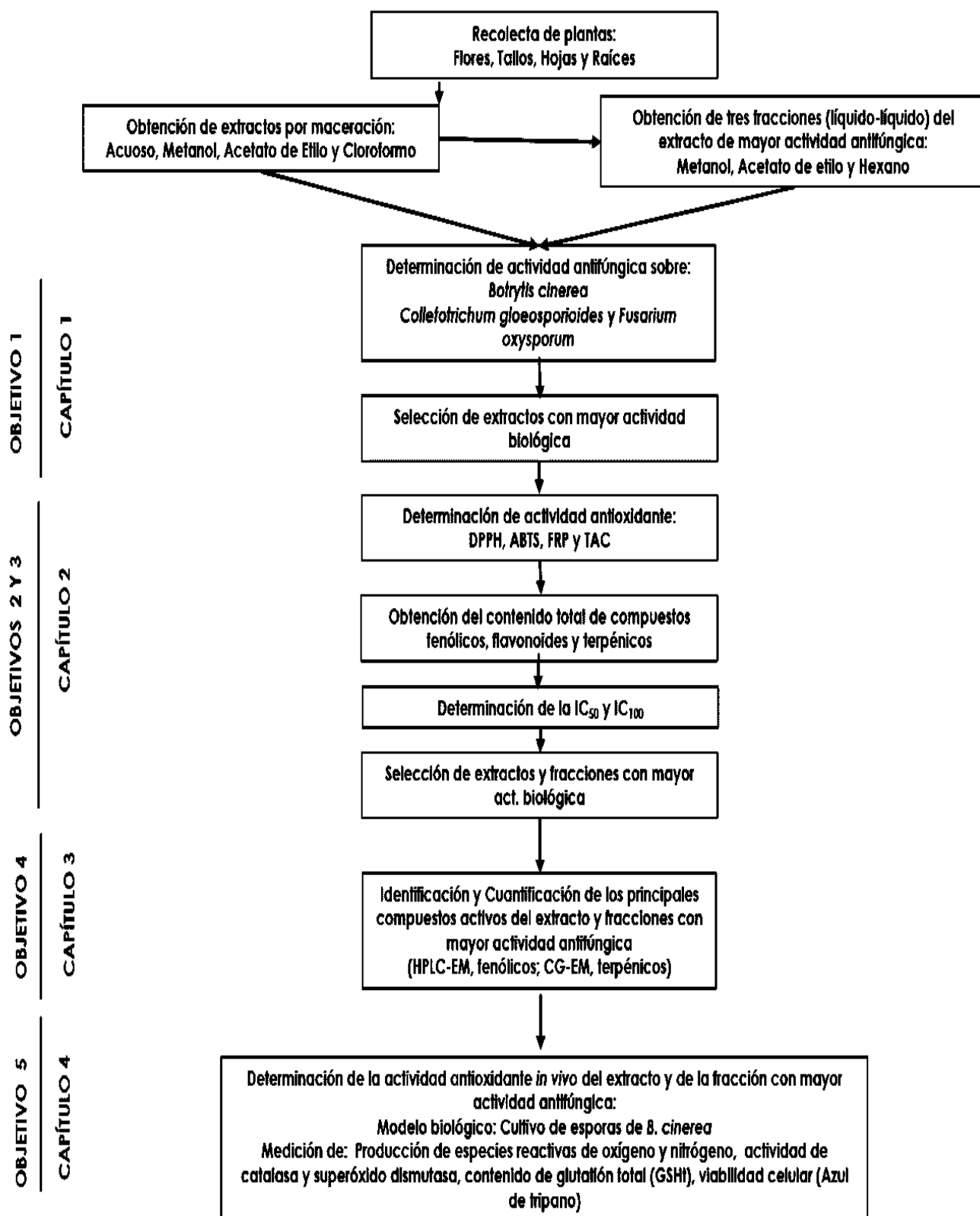
5.1. Objetivo general

Determinar la relación entre el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos, la actividad antifúngica y antioxidante de diferentes extractos de *V. sphaerocephala*.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antifúngica y antioxidante *in vitro* de diferentes extractos de *V. sphaerocephala* sobre tres hongos fitopatógenos.
2. Determinar el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos, de diferentes extractos de *V. sphaerocephala*.
3. Establecer la IC₅₀ y IC₁₀₀ del extracto y de la fracción con mayor actividad antifúngica sobre tres hongos fitopatógenos.
4. Identificar y cuantificar los principales compuestos activos (fenólicos y terpénicos) del extracto y de las fracciones con mayor actividad antifúngica.
5. Analizar la actividad antioxidante *in vivo* del extracto y de la fracción con mayor actividad antifúngica.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIAL BIOLÓGICO Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

7.1. Colecta de plantas de *V. sphaerocephala*

Se realizó la colecta de los tejidos de *V. sphaerocephala* (hojas, inflorescencias, tallos y raíces) en el cerro La Estrella del municipio de Pajacuarán, Michoacán (N: 20°05'54.8", O: 102°33'19.2") en el mes de octubre del año 2020. Se llevó un ejemplar al Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH para su identificación botánica (Figura 8), realizada por la Biol. Rosa Isabel Fuentes Chávez. Los tejidos se llevaron a sequedad a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) en ausencia de luz para posteriormente ser molidos y almacenados en oscuridad para la realización de los extractos (Figura 9).



Figura 8. Ejemplar de *Verbena sphaerocephala* confirmado en el herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (a), incorporado a la colección con el número de folio 31383 (b).

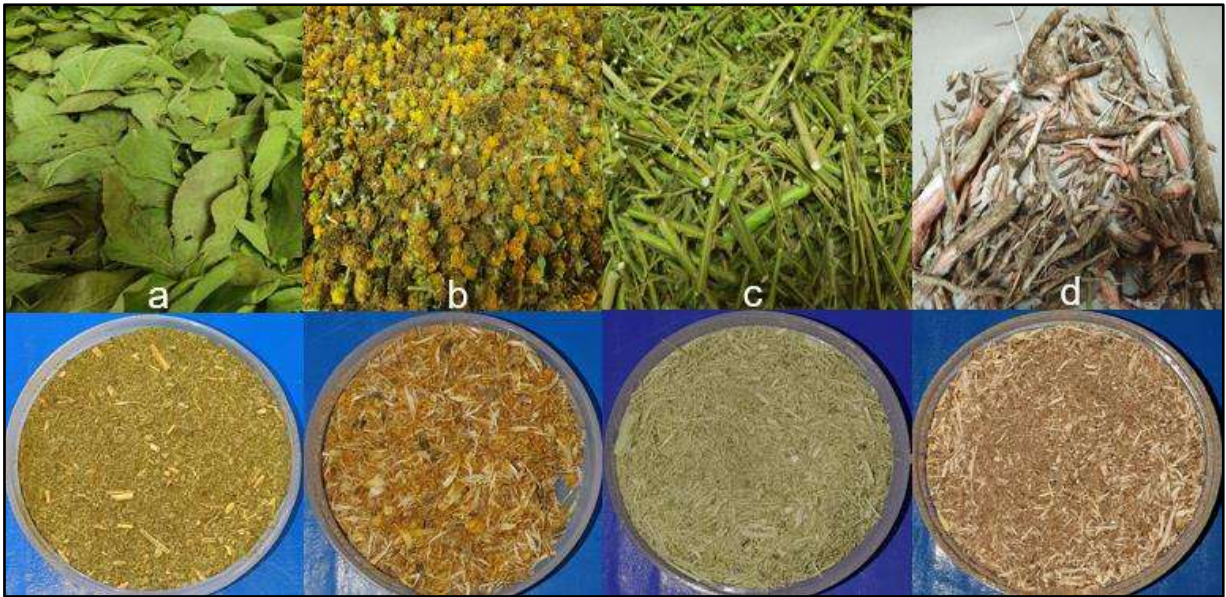


Figura 9. Tejidos de *V. sphaerocephala* en fresco y procesados. Hojas **(a)**; inflorescencias **(b)**; tallos **(c)** y raíces **(d)**. Fotografías propias.

7.2. Aislamientos y cultivo de hongos

Los ensayos antifúngicos se realizaron con aislados de los siguientes hongos: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, que pertenecen al cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, que se cultivan por resiembra de micelio en medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 25° C. *B. cinerea* y *F. oxysporum* fueron aislados de hojas y raíces de zarzamora, respectivamente; *C. gloeosporioides* de frutos de aguacate.

Los hongos aislados se identificaron mediante el análisis del crecimiento y las características macroscópicas de las colonias, como la coloración, la forma, la elevación, el aspecto, la superficie, el margen o el borde. Se observaron las características microscópicas de los hongos para analizar la forma de las esporas, las hifas y las estructuras reproductivas. Para determinar el género de cada aislado, se analizaron las características morfológicas con claves taxonómicas y literatura de identificación de hongos filamentosos (Watanabe, 2002). Cada hongo aislado se subcultivó, se mantuvo en medio PDA y se incubó a 25 °C (*B. cinerea*) y a 28 °C (*C.*

gloeosporioides y *F. oxysporum*) para obtener los inóculos para los ensayos (Figura 10).

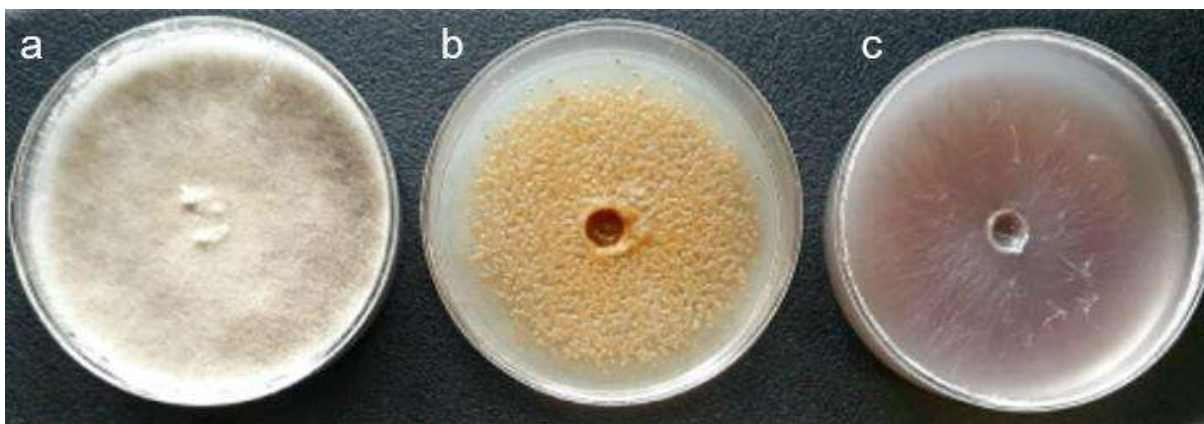


Figura 10. Cepas fúngicas: *Botrytis cinerea* (a); *Colletotrichum gloeosporioides* (b); *Fusarium oxysporum* (c). Fotografías propias.

7.3. Obtención de los extractos y de las fracciones

Cada extracto se obtuvo por maceración en frío en una proporción de 100 g de tejido seco molido (hojas, inflorescencias, tallos y raíces) por 500 mL de cada disolvente (agua a 90°C, metanol, acetato de etilo y cloroformo) al 100% (v/v), en ausencia de luz por cinco días, con una agitación vigorosa cada 24 h a una temperatura de 4°C (Harborne, 1998). Los extractos se llevaron a filtración a temperatura ambiente, utilizando un embudo Buchner y papel filtro Whatman No. 1. Se llevaron a sequedad por evaporación en un rotavapor al vacío y una temperatura de 50° C. Finalmente, los extractos fueron resuspendidos en sus respectivos disolventes a una concentración de 100 mg/mL. Los extractos se almacenaron en frascos ámbar a -4°C para su posterior uso, para asegurar su actividad (Figura 11).

Para la obtención de las fracciones con las actividades antifúngicas y antioxidantes se seleccionó el extracto con mayor efecto y se realizó el fraccionamiento líquido-líquido para la separación de compuestos, de acuerdo con el método modificado de Umar *et al.* (2015). Para ello, se añadieron tres disolventes de diferente polaridad por separado (hexano, acetato de etilo y metanol) (v:v) y se recuperaron las fracciones. Se llevaron

a sequedad en un rotavapor a 50°C y se resuspendieron a una concentración de 100 mg/mL en metanol. Las fracciones se almacenaron a -4°C (Figura 11).

Tanto el extracto acuoso y su fracción de acetato de etilo se obtuvieron en un solo lote y mantuvieron su actividad antifúngica durante toda la experimentación.



Figura 11. Proceso de obtención de extractos y fracciones de *V. sphaerocephala*.

8. RESULTADOS

8.1. Capítulo 1. Actividad antifúngica y tamizaje fitoquímico de inflorescencias, hojas, tallos y extractos de raíces de *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae) sobre tres hongos fitopatógenos.

Antifungal activity and phytochemical screening of inflorescences, leaves, stems, and roots extracts of *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae) against three phytopathogenic fungi.

8.1.1. Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo analizar la actividad antifúngica y realizar un tamizaje fitoquímico de extractos de *Verbesina sphaerocephala* obtenidos con agua, metanol, acetato de etilo y de cloroformo, a partir de las inflorescencias, hojas, tallos y raíces. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en pozos contra tres hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. El análisis fitoquímico se realizó para la determinación de compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, saponinas y terpenos. El extracto acuoso de tallo exhibió la mayor actividad antifúngica, lo que resultó en una reducción del 100% en el crecimiento micelial de los tres hongos a 10 mg/mL. Este estudio reveló que el extracto acuoso de tallo suprimió el crecimiento de *B. cinerea* a una concentración de 1 mg/mL y su actividad se relacionó con la presencia de compuestos fenólicos, cumarinas, quinonas, flavonoides y terpenos. Con esta investigación se demostró que el extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* contiene compuestos fitoquímicos con propiedades fungicidas.

Palabras clave: actividad antifúngica; tamizaje fitoquímico, hongos fitopatógenos; polifenoles; terpenos.

8.1.2. Artículo 1. Antifungal activity and phytochemical screening of inflorescences, leaves, stems, and roots extracts of *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae) against three phytopathogenic fungi.

Natural Product Research. Submission ID 244634977. Research Article

Rodríguez-Valdovinos Kathia Yanelly^a, Medina-Medrano José Roberto^b, Hernández-García Alejandra^a, Saavedra-Molina Alfredo^a, López-Meza Joel Edmundo^c, del Río-Torres Rosa Elva Norma^a and Salgado-Garciglia Rafael^{a*}

^a*Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, C.P. 58060, Morelia, Michoacán, México.*

^b*Licenciatura en Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, C.P. 59103, Sahuayo, Michoacán, México.*

^c*Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Veterinaria, C.P. 58893 Morelia, Michoacán, México.*

*corresponding author: rafael.salgado@umich.mx

Graphical abstract



Antifungal activity and phytochemical screening of inflorescences, leaves, stems, and roots extracts of *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae) against three phytopathogenic fungi

The present study aimed to analyse the antifungal activity and perform a phytochemical screening of aqueous, methanol, ethyl acetate, and chloroform extracts of the inflorescences, leaves, stems, and roots of *Verbesina sphaerocephala*. Antifungal activity was evaluated using the well diffusion method against three phytopathogenic fungi: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Fusarium oxysporum*. Phytochemical screening was performed for phenolic compounds, flavonoids, coumarins, quinones, saponins, and terpenes. Aqueous stem extract exhibited the highest antifungal activity, resulting in a 100% reduction in the mycelial growth of the three fungi at 10 mg/mL. This study revealed that aqueous stem extract suppressed the growth of *B. cinerea* at a concentration of 1 mg/mL and that this extract contains a high content (++) of phenolics, coumarins and quinones, with and flavonoids and terpenes slightly present (+). Our study showed that the aqueous stem extract of *V. sphaerocephala* contains phytochemical compounds with fungicidal properties.

Keywords: antifungal activity; phytochemical screening; phytopathogenic fungi; polyphenols; terpenes.

1. Introduction

Species of the genus *Verbesina* belonging to the Asteraceae family, such as *V. macrophylla*, *V. lanata*, *V. encelioides* and *V. persicifolia*, have antifungal activities (Divya-Ramakrishnan et al., 2017; Ramseyer et al., 2017; de Veras et al., 2021). *Verbesina* represents the second largest genus of the Asteraceae family in Mexico, with 164 native and 138 endemic species (Villaseñor, 2004), several of which are used in traditional Mexican medicine because of their antioxidant, antifungal, antibacterial, and antitumor properties (Jain et al., 2008; Sindhu et al., 2011).

Verbesina sphaerocephala A. Gray is a common plant in Michoacán, Mexico, and is abundant mainly on dirt roads or undisturbed areas. Various communities in these regions use it as a medicinal plant. *V. sphaerocephala* is also used as a melliferous plant in honey production (Villaseñor and Ortiz, 2012). Although there have been few phytochemical and

biological activity studies on this species, it has recently been reported that this plant contains sesquiterpenes (e.g., cadinene) and flavonoids, among other phenolic compounds (e.g., rutin) that are related to antifungal activity (Arciniegas et al., 2020; Rodríguez-Valdovinos et al., 2021). Rodríguez-Valdovinos et al. (2021) demonstrated the antibacterial activity of methanolic extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, their antifungal properties and the identification of their main terpene and phenolic compounds are unknown.

Terpenes and phenolic compounds are among the most abundantly produced by plants, and due to their broad biological activities, such as antifungal properties, they are considered metabolites with a high potential to inhibit the growth of phytopathogenic fungi that cause various diseases, such as grey mould caused by *Botrytis cinerea* in berries, anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado, and root or stem rot by *Fusarium oxysporum* in various plants. Owing to these characteristics, studying plants that produce these types of metabolites is important for searching alternatives for new antifungals to reduce the use of chemically synthesized fungicides (Mahlo et al., 2010).

Among polyphenols, phenolic acids and flavonoids exhibit antifungal activities; some can inhibit the germination of fungal spores, whereas others cause cell deformation and lysis (Pusztahelyi et al., 2015). Flavonoids (e.g., quercetin) and phenolic acids (e.g., ferulic acid) have shown antifungal activity against phytopathogens, including *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, and *B. cinerea* (Wianowska et al., 2016). Similarly, various terpene compounds, such as monoterpenes, diterpenes, triterpenes, and sesquiterpenes, exhibit antifungal activity. These metabolites are major components of essential oils from various plants, such as those of the Asteraceae family, containing both terpenes and phenolics compounds that are responsible for antifungal activity (Gavrilović et al., 2016).

This study aimed to evaluate the antifungal activity of extracts of different polarities from inflorescences, leaves, stems, and roots of *V. sphaerocephala* against the phytopathogenic fungi *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, and *F. oxysporum* and determine the presence of polyphenols and terpenes in the extract with the highest antifungal activity.

2. Results and discussion

Yields of the plant extracts

The yields of crude extracts from 100 g of dried plant material extracted from *V. sphaerocephala* are shown in Table 1. The results showed that the chloroformic inflorescence and aqueous stem extracts produced the highest amount of crude extract, with 5.54 g/100 g dry weight (dw) and 5.49 g/100 g dw, respectively. The lowest yields were obtained from the root and ethyl acetate extracts.

Various factors have been reported to affect the extract yield, particularly Plant materials, extraction time, temperature, and solvent polarity (Zhang et al., 2018; Truong et al., 2019). The current results indicated that a highly polar solvent (aqueous) and a nonpolar solvent (chloroform) resulted in a high extraction yield. Although the extract yields have been reported to be higher in polar solvents than in nonpolar solvents (Nawaz et al., 2020), a chloroform solvent (medium polarity) has produced high yields in *Achillea* species (*A. lingulata* and *A. abrotanoides*) (Kaczorová et al., 2021). Although this solvent has been used to isolate a wide range of compounds from plant materials and is commonly used for non-targeted isolation and analysis of natural products, owing to its toxicity, chloroform is not a suitable solvent for use in food and pharmaceutical preparations (Altemimi et al., 2017; Kaczorová et al., 2021). Furthermore, aqueous extracts of *V. sphaerocephala* stems have a relatively high yield, and their application has advantages such as low cost, non-toxicity, food safety, and recycling (Choi and Verpoorte, 2019; Awad et al., 2021).

Antifungal activity of the plant extracts

The antifungal activities of different parts of *V. sphaerocephala* crude extracts (aqueous, methanol, ethyl acetate, and chloroform) at a concentration of 10 mg/mL against the growth of *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum* were determined using the agar well diffusion method. All extracts used in this study exhibited varying degrees of antifungal activity against the three fungi (Table 1). However, the aqueous extract of *V. sphaerocephala* stems was the most effective among the extracts tested. In fact, this extract resulted in a 100% inhibition percentage against the three fungi assayed compared to the positive control, Benomyl 50 (10 mg/mL). The other extracts did not have the ability to inhibit fungal growth

above 33% and root extracts had the lowest antifungal activity (Table 1). The effects of the extracts were compared with those of the respective solvents (water, methanol, ethyl acetate, or chloroform) as negative controls, which did not show any antifungal activity.

A few studies have confirmed the antifungal activity of *Verbesina* species against phytopathogenic fungi. An ethyl acetate extract from the inflorescences of *V. lanata* showed significant inhibitory activity *in vitro* against grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*) (Ramseyer et al., 2017) and an acetone bark extract of *V. turbacensis* inhibited the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* (Powers et al., 2022). One of the most studied species is *V. encelioides* that presents antifungal activity, and stem and leaf powders in silver nanoparticles have shown activity against *Aspergillus niger* and *A. flavus* (Kushwaha and Malik, 2013), hydroalcoholic extracts of the aerial branches, roots, and flowers were effective against *Aspergillus fumigatus* (Albalawi et al., 2015), and a protein extract showed biological activity against *A. flavus* and *Fusarium oxysporum* (Divya-Ramakrishnan et al., 2017). The antifungal effect of the aqueous extract of *V. sphaerocephala* stems is consistent with that reported for the polar extracts of *V. encelioides* (Albalawi et al., 2015).

To determine the lower inhibitory concentrations of the aqueous stem extract of *V. sphaerocephala* against the three fungi, seven days after culture, the effects of three concentrations (1, 5, and 10 mg/mL) were observed, using water as a negative control and Benomyl 50 as a positive control (10 mg/mL) (Table 2). The mycelial growth of the three fungi was 100% inhibited at concentrations of 5 and 10 mg/mL; however, the concentration of 1 mg/mL was effective in a 100% only against *B. cinerea* and very low against *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*. The treatment with water did not show any inhibition, and with Benomyl 50, 100% inhibition was obtained in the three fungi (Table 2). These results demonstrate that the aqueous stem extract of *V. sphaerocephala* contains compounds with high antifungal activity against *B. cinerea* at the lowest concentration tested (1 mg/mL).

Aqueous extracts of different plants have been shown to inhibit phytopathogen fungi (Sayago et al., 2012; Ngegba et al., 2018), noting that antifungal activity is concentration dependent. Alotibi et al. (2020) studied the antifungal activity of the aqueous extracts of *Rumex vesicarius* stems, observing that at a concentration of 50 mg/mL, obtained about 50%

inhibition of *Helminthosporium rostratum* and *Fusarium oxysporum*; the aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves was effective against *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* and *Rhizopus oryzae* at values ranged from 31.25 to 62.5 mg/mL (Oniha et al., 2021); aqueous extracts from *Arum cyreniacum* tubers, leaves and flowers shown a low inhibition against *F. oxysporum* with only 5.8, 10.5 and 47% of inhibition with 200 mg/mL, respectively (Abdulrazziq et al., 2021); whereas against *F. solani*, the aqueous extract from *Annona squamosa* leaves exhibited intermediate effect with percentage inhibition of 33.33% at 1 mg/mL and 64.58% at 2 mg/mL (Kalidindi et al., 2015).

The aqueous extract of stems of *V. sphaerocephala* showed an antifungal activity of 100% on the three fungi assayed at concentration of 5 mg/mL. *B. cinerea* was the pathogenic strain with greater susceptibility to mycelial growth inhibition at 1 mg/mL, an inhibitory concentration considered optimal because the antifungal effect of this extract was 10 times more active than that of the commercial fungicide Benomyl 50 (10 mg/mL), which was used as the positive control.

Phytochemical screening

The present study revealed that aqueous stem extract form *V. sphaerocephala* shown the presence of phytochemical constituents, such as phenolics, flavonoids, coumarins, quinones, and terpenes. In this extract, the phenolic, coumarin, and quinone contents were higher than those of the flavonoids and terpenes, and saponins were not detected (Table 3). In particular, the hydroalcoholic extracts of *Tagetes patula* and *Juniperus communis* have antifungal activity because of their polyphenol and terpene (Politi et al., 2016; Fierascu et al., 2018).

These groups of compounds that constitute the aqueous extract of the stems of *V. sphaerocephala* can be attributed to the antifungal activity of the three fungi under study, mainly against *B. cinerea*, as they can act alone or in synergy, as demonstrated in other studies (Pusztahelyi et al., 2015; Salhi et al., 2017; Aboody and Mickymaray, 2020).

Polyphenols have different antifungal mechanisms because of their potential to damage membrane structural integrity in a non-specific manner, inhibit certain electron transport

enzymes, induce mitochondrial malfunction, and reduce cell wall construction, as well as the efflux-mediated pumping system (Aboody and Mickymaray, 2020). Coumarins act by inhibiting conidial germination and mycelial growth, causing cell content leakage due to the formation of pores in the wall, as well as stimulating apoptosis by altering the mitochondrial level through ROS accumulation, preventing lipid-oxidation, and damaging peroxisomes. In contrast, quinones act at the mitochondrial level, affecting efflux pumps, altering the membrane potential, intervening in nucleic acids, and disrupting protein synthesis and mRNA transfer (Sarmiento-Guerra et al., 2015; Shang et al., 2019; He et al., 2021). Finally, terpenes cause lesions in fungal membranes, reduce ergosterol synthesis, and inhibit ATPases that promote cell death (Zaker, 2016; Kuete, 2017). In order to investigate the antifungal compounds of the aqueous stem extract of *V. sphaerocephala*, the perspective of this work, is to realize Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry analysis.

3. Conclusions

Three phytopathogenic fungi (*B. cinerea*, *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*) were inhibited *in vitro* by an aqueous stem extract from *V. sphaerocephala* and they had a greater capacity to inhibit the radial growth of the mycelium of *B. cinerea* at a concentration of 1 mg/mL. The biological activity was attributed to the polyphenols and terpenes found in the phytochemical screening.

Acknowledgements

We thank the Coordinación de la Investigación Científica/Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC/UMSNH) (RSG/2020-2022) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (775428).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors (s) report no funding associated with the work featured in this article.

Orcid

K.Y. Rodríguez-Valdovinos <https://orcid.org/0000-0003-3518-3276>

J.R. Medina-Medrano <https://orcid.org/0000-0002-4903-4936>

A. Hernández-García <https://orcid.org/0000-0001-8353-0266>

A. Saavedra-Molina <https://orcid.org/0000-0002-0811-2950>

J.E. López-Meza <https://orcid.org/0000-0002-3269-9202>

R.E.N. del Río-Torres <https://orcid.org/0000-0001-8932-552X>

R. Salgado-Garciglia <https://orcid.org/0000-0001-5920-6562>

Experimental section

Chemicals

All the solvents used for the preparation of the extracts are analytical grade of Meyer® (Mexico). Potato Dextrose Agar (PDA) was used for the culture and bioassays with phytopathogenic fungi (Bioxon®, Mexico). The following reagents were used for phytochemical screening: acetic anhydride, hydrochloric acid, chloroform (JT Baker, Mexico), ammonium hydroxide, sulfuric acid (Meyer, Mexico), mercuric chloride (Fermont, Mexico), potassium iodide (Monterrey Chemical Products, Mexico), lead acetate (Sigma Aldrich, Germany), and sodium hydroxide (Jalmeck, Mexico). The standards gallic acid, naringenin, stigmasterol, linalool, and methoxycoumarin were purchased from Sigma Aldrich (Germany); digitonin, from Fluka (Switzerland); and coenzyme Q10, from Qunol (USA).

Plant material

The complete plants specimens of *V. sphaerocephala* were collected in Pajacuarán, Michoacán, México (20°05'54.8'' N Latitude and 102°33'19.2'' W Longitude) on October 2020. The plant samples were authenticated and deposited in the Biology Faculty Herbarium (EBUM) of Michoacan University of San Nicolás of Hidalgo (UMSNH) (Accession:31383). All plant parts

(inflorescences, leaves, stems, and roots) were separated and dried at room temperature. Subsequently, the samples were crushed and stored separately in the dark for extract preparation.

Fungal strains

The fungi *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides* were strains from the Plant Biotechnology Laboratory of the Chemical Biological Research Institute (UMSNH), isolated from diseased blackberries and avocados, respectively. The isolated fungi were identified by analysing the growth and macroscopic characteristics of the colonies such as coloration, shape, elevation, appearance, surface, margin or edge. The microscopic characteristics of the fungi were observed to analyse the shape of the spores, hyphae and reproductive structures. To determine the genus of the specimen collected, the morphological characteristics were analysed with taxonomic keys and identification literature of filamentous fungi (Watanabe, 2002). Each isolated fungi were subculture and maintained on PDA medium and incubated at 25 °C (*B. cinerea*) and 28 °C (*C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*) to obtain inocula for testing.

Crude extract preparation

All extracts were prepared by cold maceration (4 °C). The dry-milled materials (100 g dry weight each) were extracted with 500 mL of each solvent (water at 90 °C, methanol, ethyl acetate, and chloroform) and maintained for 5 days with constant stirring (150 rpm) in the dark. They were then filtered at room temperature using a funnel with Whatman paper No 1 (Whatman Ltd., England), and the solvents containing the extracted materials, concentrated until dryness in a rotary evaporator Buchi® under reduced pressure and 50 °C. The total solid test was used to determine the extract yield, which was expressed as milligrams of dry solids concentrated at 100 mg/mL. Finally, the total extract was stored in an amber flask at 4 °C until further use.

Antifungal activity assay

Antifungal activity was determined using the well diffusion method (Magaldi et al., 2004), using Petri dishes with PDA medium, in the center of the plate a 5 mm hole was made with the upper end of a sterile Pasteur pipette. Each well was filled with either 100 μ L of the extracts (10 mg/mL); Benomyl 50 (Benomyl 50% WP®, Taicang Pesticide Factory, China) (10 mg/mL), used as a positive control; each solvent (water, methanol, ethyl acetate and chloroform) used as a negative control, allowing its volatilization to stand on the bench for 30 min. Subsequently, 5 mm discs of mycelia from each fungus were inserted into the wells. All the plates were incubated for 7 days, at 25 °C for *B. cinerea*, and at 28 °C for *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*. The zone of inhibition was measured using a set of Vernier calipers and recorded in millimeters. The assay was repeated twice for confirmation. The percentage inhibition of mycelial growth was calculated using Equation 1.

$$Inhibition (\%) = \left(\frac{R_1 - R_2}{R_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

Where:

R1 = the average diameter (mm) of mycelial growth in control plate

R2 = the average diameter (mm) of mycelial growth in treatment plate

Three concentrations (1, 5, and 10 mg/mL) of the extract with the highest antifungal activity were assayed using the well-diffusion method, following the methodology described above.

Phytochemical screening

After the bioassay tests, the extract with the highest antifungal activity was selected for the qualitative determination of polyphenols (phenolics, flavonoids, coumarins, and quinones), saponins, and terpenes using established procedures (Ortega-Medrano et al. 2022) with modifications. For these tests, extracts were prepared at a concentration of 5 mg/mL. The criterion reported in the work of García-Granados et al., (2019) was used to evaluate the qualitative presence of the various compounds in the extracts of *V. sphaerocephala*: (++++) indicates abundant presence, (++) indicates notable presence, (+) indicates minimal presence and (-) indicates absence.

Tests for phenolics

Lead acetate test: 500 μL of 10% lead acetate solution was added into 500 μL extract in a glass test tube. The presence of phenolics was indicated by a white precipitate. Gallic acid was used as the standard.

Test for flavonoids

Ammonium hydroxide test: 400 μL of 5% ammonium hydroxide was added into 400 μL extract. The presence of flavonoids was indicated by yellow coloration using naringenin as the standard.

Test for coumarins

Sodium hydroxide test: 400 μL of 10% sodium hydroxide was added to 400 μL extract. The presence of flavonoids was indicated by yellow coloration, using methoxycoumarin as the standard.

Test for quinones

Sulfuric acid test: 400 μL of sulfuric acid was added into 400 μL extract. The presence of quinones was indicated by a soft red coloration using ubiquinone as the standard.

Test for saponins

Froth formation test: A total of 500 μL of plant extract was thoroughly mixed with 1.5 mL distilled water in a test tube, for a 5 min. The presence of saponins was confirmed by the formation of a stable and persistent froth.

Test for terpenes

Salkowski test: A total of 500 μL of plant extract was mixed with chloroform (1.5 mL) in a test tube, and 500 μL of sulfuric acid was added. The formation of the red phase denotes the presence of terpenes, using linalool as the standard.

Table 1. Extract yield and antifungal activity of *Verbesina sphaerocephala* crude extracts against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Fusarium oxysporum* using well diffusion method.

Crude extract [10 mg/mL]	Extract yield (g)	Inhibition (%)		
		<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>
Aqueous				
Inflorescences	2	1.11 ± 1.92 ^c	11.67 ± 2.89 ^d	25.56 ± 1.92 ^b
Leaves	1.39	0 ± 0 ^d	26.67 ± 2.89 ^b	5.56 ± 1.92 ^g
Stems	5.49	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
Roots	3.64	0 ± 0 ^d	6.67 ± 2.89 ^f	1.11 ± 1.92 ^h
Methanolic				
Inflorescences	3.59	0 ± 0 ^d	3.33 ± 2.85 ^f	28.89 ± 3.85 ^b
Leaves	3.26	0 ± 0 ^d	28.33 ± 2.89 ^b	30 ± 3.33 ^b
Stems	1.52	32.22 ± 1.92 ^b	0 ± 0 ^g	11.11 ± 1.92 ^e
Roots	0.74	0 ± 0 ^d	13.33 ± 2.89 ^d	12.22 ± 1.92 ^e
Ethyl acetate				
Inflorescences	3.81	0 ± 0 ^d	1.67 ± 2.89 ^g	20 ± 3.33 ^c
Leaves	2.17	4.94 ± 1.92 ^c	26.67 ± 2.89 ^b	31.11 ± 1.92 ^b
Stems	0.71	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^g	7.78 ± 1.92 ^f
Roots	0.41	0 ± 0 ^d	1.67 ± 2.89 ^g	0 ± 0 ⁱ
Chloroformic				
Inflorescences	5.54	1.11 ± 1.92 ^c	16.67 ± 2.89 ^c	7.78 ± 1.92 ^f
Leaves	4.21	0 ± 0 ^d	10 ± 5 ^e	20 ± 3.33 ^c
Stems	1.03	3.33 ± 3.33 ^c	1.67 ± 2.89 ^g	17.78 ± 1.92 ^d
Roots	0.43	2.22 ± 1.92 ^c	13.33 ± 2.89 ^d	2.22 ± 1.92 ^h
Benomyl 50	-	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a

Mean ± SD in a column superscripted with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Inhibition of mycelium growth of *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, and *F. oxysporum* with different concentrations of the aqueous stem extract from *V. sphaerocephala* (7 days of culture).

Treatment (mg/mL)	Inhibition (%)		
	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>
Stem aqueous extract			
Water	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c
1	100 ± 0 ^a	12.67 ± 1.45 ^b	10.42 ± 1.82 ^b
5	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
10	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
Benomyl 50			
10	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a

Mean ± SD in a column superscripted with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Phytochemical screening of aqueous extract from *Verbesina sphaerocephala* stems.

Chemical group	Test	Response
Phenolic	Lead acetate	++
Flavonoid	Ammonium hydroxide	+
Coumarin	Sodium hydroxide	++
Quinone	Sulfuric acid	++
Saponin	Froth	-
Terpene	Salkowski	+

- Absence, + slightly present, and ++ present.

References

- Abdulrazziq AA, Salih SM, Alnomasy SF, Aldosari ZM, Alotaibi BS. 2021. Inhibition of fungal plant pathogens by aqueous extracts of *Arum cyreniacum*. J Adv in Microbiol. 21 (7): 1-6. doi: 10.9734/JAMB/2021/v21i730363
- Al Aboody MS, Mickymaray S. 2020. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. Antibiotics. 9(2): 45. doi: 10.3390/antibiotics9020045
- Albalawi MAD, Bashir NAO, Tawfik A. 2015. Anticancer and antifolate activities of extracts of six Saudi Arabian wild plants used in folk medicine. J Life Sci. 9: 334-340. doi: 10.17265/1934-7391/2015.07.006
- Alotibi FO, Ashour EH, Al-Basher G. 2020. Evaluation of the antifungal activity of *Rumex vesicarius* L. and *Ziziphus spina-christi* (L) Desf. Aqueous extracts and assessment of the morphological changes induced to certain myco-phytopathogens. Saudi J Biol Sci. 27(10): 2818-2828. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.06.051
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. 2017. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants. 6(4): 42. doi: 10.3390/plants6040042
- Arciniegas A, Pérez-Castorena AL, Villaseñor JL, de Vivar AR. 2020. Cadinenes and other metabolites from *Verbesina sphaerocephala* A. Gray. Bio Sys Eco. (93): 104183. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104183>
- Awad AM, Kumar P, Ismail-Fitry MR, Jusoh S, Ab Aziz MF, Sazili AQ. 2021. Green extraction of bioactive compounds from plant biomass and their application in meat as natural antioxidant. Antioxidants. 10(9):1465. doi: 10.3390/antiox10091465
- Choi YH, Verpoorte R. 2019. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. Curr Opin Food Sci. 26: 87–93. doi: 10.1016/j.cofs.2019.04.003
- de Veras BO, Saturnino de Oliveira JR, de Menezes Lima VL, Ferraz Navarro DM, de Oliveira Farias de Aguiar JCR, de Medeiros Moura GM, Wellington da Silva J, Dias de Assis CR, Gorlach-Lira K, Castro de Assis PA, et al. 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. J Ethno. 265: 113248. doi: [10.1016/j.jep.2020.113248](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248)
- Divya-Ramakrishnan CK, Doss D, Vijayabharathi A. 2017. Biochemical and Antimicrobial Characterization of an Underexploited Medicinal Plant - *Verbesina encelioides*. Int J Curr Microbiol App Sci. 6(12): 3407-3416. doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.396
- Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu SM, Cimpeanu C, Georgescu MI, Fierascu RC, Ortan A, Sutan AN, Anuta V, Zanfirescu A. 2018. Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-

inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wild-growing *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) native to Romanian southern sub-Carpathian hills. BMC Comp Alt Med. 18(3): 1-14. doi: 10.1186/s12906-017-2066-8

García-Granados RU, Cruz-Sosa F, Alarcón-Aguilar FJ, Nieto-Trujillo A, Gallegos-Martínez ME. 2019. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* banks ex köning et sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. Polibotánica, (48): 151-168. doi: 10.18387/polibotanica.48.12

Gavrilović M, Sokovic M, Stanković M, Marin P, Stevanović Z, Janačković P. 2016. Antimicrobial and antioxidative activity of various leaf extracts of *Amphoricarpus* Vis.(Asteraceae) taxa. Arch Biol Sci. 68(4): 803-810. doi: 10.2298/ABS160112068G

He YH, Shan XF, Li HX, Li AP, Tang C, Zhang BQ, Zhang ZJ, Wang R, Ma Y, Du SS, et al. 2021. Antifungal activity and action mechanism study of coumarins from *Cnidium monnieri* fruit and structurally related compounds. Chem Bio. 18(12): e2100633. doi: [10.1002/cbdv.202100633](https://doi.org/10.1002/cbdv.202100633)

Jain SC, Singh R, Jain R. 2008. Antimicrobial and antioxidant potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. and Hook. Fil ex Gray. Res J Med Plant. 2(2): 61-65. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2008.61.65>

Kaczorová D, Karalija E, Dahija S, Bešta-Gajević R, Parić A, Čavar Zeljković S. 2021. Influence of extraction solvent on the phenolic profile and bioactivity of two *Achillea* species. Molecules. 26(6): 1601. doi: 10.3390/molecules26061601

Kalidindi N, Thimmaiah NV, Jagadeesh NV, Nandeeep R, Swetha S, Kalidindi B. 2015. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. J Food Drug Ana. 23(4): 795-802. doi: 10.1016/j.jfda.2015.04.012

Kuete V. 2017. *Thymus vulgaris*. In: Kuete V, editor. Medicinal spices and vegetables from Africa. United Kingdom (UK): Academic Press; p. 599-609. doi: [10.1016/B978-0-12-809286-6.00028-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00028-5)

Kushwaha HB, Malik CP. 2013. Biopotential of *Verbesina encelioides* (stem and leaf powders) in silver nanoparticle fabrication. Turk J Bio. 37(6):645-654. doi: 10.3906/biy-1212-7

Magaldi S, Mata-Essayag S, De Capriles CH, Pérez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. Int J Inf Dis. 8(1), 39-45. doi: 10.1016/j.ijid.2003.03.002

Mahlo SM, Mcgaw LJ, Eloff JN. 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. C Prot. 29(12): 1529-1533. doi: [10.1016/j.cropro.2010.08.015](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.08.015)

Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. 2020. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Braz J Pharma Sci. 56: e17129. doi: 10.1590/s2175-97902019000417129.

Ngegba PM, Kanneh SM, Bayon MS, Ndoko EJ, Musa PD. 2018. Fungicidal effect of three plants extracts in control of four phytopathogenic fungi of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit rot. *Int J Env Agri and Biotech.* 3(1): 112-117. doi: 112-117.10.22161/ijeab/3.1.14

Oniha M, Eni A, Akinnola O, Omonigbehin EA, Ahuekwe EF, Olorunshola JF. 2021. *In vitro* antifungal activity of extracts of *Moringa oleifera* on phytopathogenic fungi affecting *Carica papaya*. *Maced J Med Sci.* 9(A): 1081-1085. doi: 10.3889/oamjms.2021.6794

Ortega-Medrano RJ, Ceja-Torres LF, Vázquez-Sánchez M, Martínez-Ávila GCG, Medina-Medrano JR. 2023. Characterization of *Cosmos sulphureus* Cav. (Asteraceae): Phytochemical screening, antioxidant activity and chromatography analysis. *Plants.* 12(4): 896. doi: 10.3390/plants12040896

Politi FAS, Queiroz-Fernandes GM, Rodrigues ER, Freitas JA, Pietro RCLR. 2016. Antifungal, antiradical and cytotoxic activities of extractives obtained from *Tagetes patula* L. (Asteraceae), a potential acaricide plant species. *Micro Patho.* 95: 15-20. doi: [10.1016/j.micpath.2016.02.016](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.016)

Powers CN, Mayo JA, Moriarity DM, Vogler B, Setzer WN, McFeeters RL. 2022. Identification of anticryptococcal bornyl compounds from *Verbesina turbacensis* and their structure-activity relationships. *Plant Med.* 88(14): 1341-1347. doi: 10.1055/a-1792-3214

Pusztahelyi T, Holb IJ, Pócsi I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci.* 6: 573. doi:10.3389/fpls.2015.00573

Ramseyer J, Thuerig B, De Mieri M, Schärer HJ, Oberhänsli T, Gupta MP, Tamm L, Hamburger M, Potterat O. 2017. Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *J Nat Prod.* 80(12): 3296-3304. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00868

Rodríguez-Valdovinos KY, Salgado-Garciglia R, Vázquez-Sánchez M, Álvarez-Bernal D, Oregel-Zamudio E, Ceja-Torres LF, Medina-Medrano JR. 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. doi: 10.3390/plants10030475

Salhi N, Mohammed Saghir SA, Terzi V, Brahmi I, Ghedairi N, Bissati S. 2017. Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant Algerian medicinal plants. *Biomed Res Int.* 2017: 1-6. doi: 10.1155/2017/7526291

Sarmiento-Guerra FQ, Aquino de Araujo RS, Pereira de Souza J, de Oliveira Pereira F, Mendonça-Junior FJB, Barbosa-Filho JM, de Oliveira Lima E. 2015. Evaluation of antifungal activity and mode of action of new coumarin derivative, 7-hydroxy-6-nitro-2h-1-benzopyran-2-one, against *Aspergillus* spp. *Evidence-Based Comp Alt Med.* 2015: 1-8. doi: 10.1155/2015/925096

Sayago JE, Ordoñez RM, Negrillo L, Torres S, Isla MI. 2012. Antifungal activity of extracts of extremophile plants from the Argentine Puna to control citrus postharvest pathogens and green mold. *Post Bio Tech.* 67: 19-24. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.12.011

Shang XF, Zhao ZM, Li JC, Yang GZ, Liu YQ, Dai LX, Zhang ZJ, Yang ZG, Miao XL, Yang CJ, et al. 2019. Insecticidal and antifungal activities of *Rheum palmatum* L. anthraquinones and structurally related compounds. *Ind C Prod.* 137: 508-520. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.055

Sindhu RK, Vasudeva N, Sharma SK. 2011. Hypolipidemic potential of ethanolic extract of *Verbesina encelioides* Benth. Roots. *Act Pol Pharm.* 68(2): 301-304. https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2011/2/301.pdf

Truong DH, Nguyen DH, Anh Ta NT, Vo Bui Anh, Do TH, Nguyen HC. 2019. Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *J Food Qua.* 2019: 1-9. doi: [10.1155/2019/8178294](https://doi.org/10.1155/2019/8178294)

Villaseñor JL. 2004. The genera of vascular plants flora of Mexico. *Bot Sci.* 75: 105-135. doi: [10.17129/botsci.1694](https://doi.org/10.17129/botsci.1694)

Villaseñor JL, Ortiz E. 2012. La familia Asteraceae en la Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Act Bot Mex.* 100(100): 259-291. doi: 10.21829/abm100.2012.37.

Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 2nd ed., CRC Press, Florida, pp. 39-183. doi: [10.1201/9781420040821](https://doi.org/10.1201/9781420040821)

Wianowska D, Garbaczewska S, Cieniecka-Roslonkiewicz A, Dawidowicz AL, Jankowska A. 2016. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. *Micro Path.* 100: 263-267. doi: [10.1016/j.micpath.2016.10.009](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.009).

Zaker M. 2016. Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control-A review. *The Agriculturists.* 14(1): 134-141. doi: 10.3329/agric.v14i1.29111.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med.* 13(20):1-26. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x

8.2. Capítulo 2. Actividad antioxidante y antifúngica, y caracterización de compuestos fenólicos usando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución Acoplada y Espectrometría de Masas (UPLC-MS) del extracto acuoso de tallo y fracciones de *Verbesina sphaerocephala*










8.2.1. Resumen

El género *Verbesina* representa el segundo grupo más diverso de la familia Asteraceae en México, siendo *Verbesina sphaerocephala* una de las especies más distribuidas a lo largo del territorio mexicano. Esta especie ha sido poco estudiada, reportándose la presencia de algunos compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antibacteriana. En este estudio se determinó el contenido y composición fenólica y flavonoide, así como la actividad antioxidante y antifúngica de extractos acuosos de tallo de *V. sphaerocephala* y sus fracciones. Los resultados mostraron que la mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* fue mostrada por el extracto acuoso (IC₅₀: 0,10 mg/mL) y la fracción de acetato de etilo (IC₅₀: 14,8 mg/mL). Además, el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo mostraron los mayores contenidos fenólicos (21,40 y 21,26 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco, respectivamente) y flavonoides (11,53 y 3,71 mg de equivalentes de rutina, respectivamente) y una elevada actividad antioxidante determinada por la capacidad antioxidante total (20,62 y 40,21 mg de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto seco, respectivamente), poder reductor férrico (74,76 y 129,57 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco, respectivamente), DPPH (IC₅₀: 12,38 y 7,36 mg/mL, respectivamente) y ABTS (IC₅₀: 5,60 y 7,76 mg/mL, respectivamente). Se detectaron 12 compuestos fenólicos en el extracto acuoso mediante análisis UPLC-MS, de los cuales los principales fueron los ácidos protocatecuico, vanilínico e hidroxibenzoico, mientras que en la fracción de acetato de etilo se identificó la presencia de 18 compuestos fenólicos, de los cuales los principales fueron la vanillina, la rutina y el ácido hidroxibenzoico. Los resultados de esta investigación demuestran que el extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala* posee compuestos fenólicos con actividad antifúngica y antioxidante.

Palabras clave: Actividad antifúngica; actividad antioxidante, *Botrytis cinerea*; fenólicos; *Verbesina sphaerocephala*.

Article

Antioxidant and Antifungal Activities and Characterization of Phenolic Compounds Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UPLC-MS) of Aqueous Extracts and Fractions from *Verbesina sphaerocephala* Stems

Kathia Yanelly Rodríguez-Valdovinos ¹, Rafael Salgado-Garciglia ¹, Alejandra Hernández-García ¹, Alfredo Saavedra-Molina ¹, Rosa Elva Norma del Río-Torres ¹, Joel Edmundo López-Meza ², Juan Luis Monribot-Villanueva ³, José Antonio Guerrero-Analco ³ and José Roberto Medina-Medrano ^{4,*}

Citation: Rodríguez-Valdovinos, K.Y.; Salgado-Garciglia, R.; Hernández-García, A.; Saavedra-Molina, F.A.; del Río-Torres, R.E.N.; López-Meza, J.E.; Monribot-Villanueva, J.L.; Guerrero-Analco, J.A.; Medina-Medrano, J.R. Antioxidant and Antifungal Activities and Characterization of Phenolic Compounds Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UPLC-MS) of Aqueous Extracts and Fractions from *Verbesina sphaerocephala* Stems. *Plants* **2024**, *13*, 2791. <https://doi.org/10.3390/plants13192791>

Academic Editors Maria Iorizzi and Javier Hernández-Allica

Received: 19 August 2024

Revised: 2 October 2024

Accepted: 3 October 2024

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Michoacan, Mexico; 2019606d@umich.mx (K.Y.R.-V.); rafael.salgado@umich.mx (R.S.-G.); alejandra.hernandez@umich.mx (A.H.-G.); francisco.saavedra@umich.mx (F.A.S.-M.); norma.del.rio@umich.mx (R.E.N.d.R.-T.)
 - ² Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro 58880, Michoacan, Mexico; elmeza@umich.mx
 - ³ Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster BioMimic®, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa 91073, Veracruz, Mexico; juan.monribot@inecol.mx (J.L.M.-V.); joseantonio.guerrero@inecol.mx (J.A.G.-A.)
 - ⁴ Licenciatura en Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo 59103, Michoacan, Mexico
- * Correspondence: jrmedina@ucemich.edu.mx; Tel.: +52-(353)-532-0762 (ext. 1643) *Plants* **2024**, *13*, 2791. <https://doi.org/10.3390/plants13192791>

Abstract: The *Verbesina* genus represents the second most diverse group from the Asteraceae family in Mexico; *Verbesina sphaerocephala* is one of the most distributed species along the Mexican territory. This species has been poorly studied, reporting the presence of some bioactive compounds with antioxidant and antibacterial activity. In this study, phenolic and flavonoid contents and composition, antioxidant and antifungal activities of aqueous extracts of the stem of *V. sphaerocephala* and its fractions were determined. The results showed that the highest antifungal activity against *Botrytis cinerea* was shown by the aqueous extract (IC₅₀: 0.10 mg/mL) and the ethyl acetate fraction (IC₅₀: 14.8 mg/mL). In addition, the aqueous extract and the ethyl acetate fraction exhibited the highest phenolic (21.40 and 21.26 mg gallic acid equivalents per gram of dry extract, respectively) and flavonoid contents (11.53 and 3.71 mg rutin equivalents, respectively) and high antioxidant activity determined by the Total Antioxidant Capacity (20.62 and 40.21 mg ascorbic acid equivalents per gram of dry extract, respectively), Ferric Reducing Power (74.76 and 129.57 mg gallic acid equivalents per gram of dry extract, respectively), DPPH (IC₅₀: 12.38 and 7.36 mg/mL, respectively), and ABTS (IC₅₀: 5.60 and 7.76 mg/mL, respectively) methods. Twelve phenolic compounds were detected in the aqueous extract using UPLC-MS analysis, of which the major ones were protocatechuic, vanillic, and hydroxybenzoic acid, while in the ethyl acetate fraction, the presence of 18 phenolic compounds were identified, of which the majority were vanillin, rutin,

and hydroxybenzoic acid. The results of this research demonstrate that the aqueous extract of *V. sphaerocephala* stems has phenolic compounds with antifungal and antioxidant activity.

Keywords: antifungal activity; antioxidant activity; *Botrytis cinerea*; phenolics; *Verbesina sphaerocephala*

1. Introduction

Fungi are one of the phytopathogens that mostly attack plants and cause diseases, both in the pre- and post-harvest stages [1]. It is reported that there are more than 19,000 fungi that cause disease in plants in the world [2]. *Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus that causes serious economic and agronomic losses worldwide [3]. This fungus affects nearly 500 crops worldwide, the main ones being grapes, berries (strawberries, blackberries, blueberries, raspberries), Solanaceae (tomatoes, potatoes), and pumpkins, among others [4]. The fight against *B. cinerea* and other phytopathogenic fungi has driven research into new control strategies, with a growing focus on the use of natural compounds as sustainable alternatives to conventional chemical treatments.

Phenolic compounds, known for their antioxidant and antimicrobial properties, have a high potential to be used in the inhibition of the growth of phytopathogenic fungi. In addition, they are considered low toxicity since they have a short persistence in the environment. These plant metabolites are potentially considered to be integrated as one of the alternative methods for the control of phytopathogenic fungi [5–7].

Verbesina sphaerocephala is an endemic plant species of Mexico [8], belonging to the Asteraceae family, known for its medicinal properties and its wide distribution in tropical and subtropical regions. In recent years, this plant has attracted the attention of researchers due to its therapeutic potential, particularly with regard to its antioxidant, antibacterial, and antifungal properties and its phenolic composition. The antioxidant activity of *V. sphaerocephala* has been documented in several studies, which highlight its ability to neutralize free radicals and reduce oxidative stress. This property is attributed in part to its rich phenolic composition, which includes compounds such as flavonoids, phenols, and phenolic acids, known for their ability to protect cells against oxidative damage and premature aging [9–11]. In addition to its antioxidant activity, *V. sphaerocephala* has shown promising antibacterial properties. Recent research has shown its effectiveness against pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, suggesting its potential use in the treatment of bacterial infections [11]. Regarding its antifungal activity, the plant has been shown to be effective against various pathogenic fungi, including *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, and *Botrytis cinerea* species, which opens the possibility of its use in the treatment of fungal infections [12]. These findings underline the importance of *V. sphaerocephala* as a potential source of bioactive compounds that can be used in the development of new agents for the management of *B. cinerea*.

Therefore, the aim of the present study was to determine the phenolic and flavonoid contents, phenolic composition, and in vitro antioxidant and antifungal activities against *B. cinerea* of aqueous extracts and its fractions from *V. sphaerocephala* stem.

2. Results and Discussion

2.1. Total Phenolic and Flavonoid Content

In this research, the phenolic and total flavonoid content of the aqueous extract and its fractions from the stem tissue of *V. sphaerocephala* were evaluated. Table 1 shows these results. The range of phenolic content was from 21.40 to 13.54 milligrams equivalent of gallic acid per gram of dry extract (mg GAE/g DE), with the aqueous extract having the highest content (Table 1). In previous research on this plant, a

total phenolic content of 10.50 mg GAE per gram of dry tissue (DT) was reported in methanolic extracts of the leaf tissue [11], two times lower than what was obtained in this study.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents, free radical scavenging activity, total antioxidant capacity, ferric reducing power of aqueous extract, and fractions from the stem of *Verbesina sphaerocephala*.

Extract	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg RE/g DE)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS IC ₅₀ (mg/mL)	TAC (mg AAE/g DE)	FRP (mg GAE/g DE)
Aqueous stem extract	21.40 ± 0.36 ^a	11.53 ± 0.07 ^a	12.36 ± 0.07 ^c	5.60 ± 0.11 ^a	20.62 ± 0.09 ^c	74.76 ± 1.48 ^b
Ethyl acetate fraction	21.26 ± 0.38 ^a	3.71 ± 0.03 ^b	7.36 ± 0.01 ^a	7.76 ± 0.09 ^b	40.21 ± 0.41 ^a	129.57 ± 2.08 ^a
Methanolic fraction	13.54 ± 0.43 ^b	2.12 ± 0.07 ^c	8.48 ± 0.02 ^b	10.26 ± 0.04 ^c	31.46 ± 0.6 ^b	61.48 ± 1.04 ^c

Abbreviations: TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoid content; GAE, gallic acid equivalents; RE, rutin equivalents; DE, dry extract; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; IC₅₀, median inhibitory concentration; FRP, ferric reducing power. Values are expressed as mean ± standard deviation of three repetitions. Values with different letters indicate significant differences (Tukey, $p < 0.05$).

In the case of the aqueous extract fractions obtained by liquid–liquid phase separation, the ethyl acetate fraction was the one that showed the highest content (21.26 mg GAE/g DE), while the methanolic fraction obtained the lowest content (13.54 mg GAE/g DE), as can be seen in Table 1. There are no previous studies on the fractionation of extracts in this plant, so it is proposed to carry out more work in this area.

On the other hand, in the total flavonoid content of the extracts and fractions, a similar behavior to that of the phenolic content results was observed since the highest flavonoid content was presented in the aqueous extract with 11.53 milligrams of rutin equivalents per gram of dry extract (mg RE/g DE). The flavonoid content of the aqueous extract analyzed in this study was higher compared to that obtained in the hydro-methanolic extract of leaves of this plant previously reported [11], which was 9.85 mg equivalents of catechin per gram of dry tissue (mg CE/g DT), being 1.17 times higher than that obtained in the aqueous extract of stems reported here. Meanwhile, the ethyl acetate fraction of the aqueous extract showed the highest flavonoid content with 3.71 mg RE/g DE, while the methanolic fraction showed a content of 2.12 mg RE/g DE, which was the lowest flavonoid content.

2.2. Identification and Quantification of Total Phenolic Compounds by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (UPLC–MS)

According to the UPLC–MS analysis carried out on the aqueous stem extract from *V. sphaerocephala* and its fractions (ethyl acetate and methanol), the presence of 12 phenolic compounds was found in the aqueous extract, 18 compounds in the ethyl acetate fraction and 13 compounds in the methanolic fraction (Table 2). In the aqueous extract, 84.61% of these compounds correspond to the group of phenolic acids, while the remaining (15.38%) were flavonoids. The major compounds in this extract were protocatechuic acid (96.06 µg/g DE), vanillinic acid (66.86 µg/g DE), and hydroxybenzoic acid (65.59 µg/g DE).

On the other hand, in the case of the ethyl acetate fraction, the proportion of its phenolic compounds was the following: phenolic acids (63.15%), flavonoids (26.31%), coumarins (5.26%) and lignans (5.26%). Vanillin (289.27 µg/g DE), rutin (250.52 µg/g DE), and protocatechuic acid (250.54 µg/g DE) were the compounds with the greatest presence. The presence of phenolic compounds with high antioxidant activity, such as isoquercitrin (quercetin-3-*O*-glucoside) [13], astragaline (kaempferol 3-*O*-glucoside) [14], secoisolariciresinol [15] and kaempferol [16] were detected by chromatographic analysis only in the ethyl acetate fraction.

Similarly, in the methanolic fraction, 76.92% of the identified phenolics are phenolic acids, and 23.07% are flavonoids. In this fraction, the majority of compounds were chlorogenic acid (64.05 µg/g DE),

protocatechuic acid (16.14 $\mu\text{g/g DE}$), and rutin (10.28 $\mu\text{g/g DE}$). Rodríguez-Valdovinos et al. [11] previously detected the compound rutin in *V. sphaerocephala* leaf tissue (13.97 mg/g DT) using High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), suggesting that this compound is stored in greater quantities in the leaves and flowers of this plant. Nevertheless, in *Verbesina encelioides*, the presence of *p*-coumaric acid, vanillinic acid, gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, and chlorogenic acid has been reported [17], which makes them compounds in common between these two species of the genus.

Table 2. Phenolic compounds identified by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (UPLC–MS) in aqueous extract and fractions from the stem of *Verbesina sphaerocephala*.

R _t (min)	Compound	$\mu\text{g/g DE}$		
		Aqueous Extract	Ethyl Acetate Fraction	Methanolic Fraction
1.4	Gallic acid	ND	ND	4.98 \pm 0.04 ^a
2.5	Protocatechuic acid	93.06 \pm 2.56 ^b	250.54 \pm 1.04 ^a	16.14 \pm 0.45 ^c
3.76	Hydroxybenzoic acid	65.69 \pm 1.14 ^b	135.61 \pm 0.89 ^a	3.82 \pm 0.12 ^c
5.12	Vanillinic acid	66.86 \pm 0.13 ^b	246.94 \pm 3.46 ^a	5.99 \pm 0.26 ^c
5.34	Chlorogenic acid	22.51 \pm 0.34 ^c	114.66 \pm 3.16 ^a	64.05 \pm 1.17 ^b
5.38	Caffeic acid	ND	18.36 \pm 1.16 ^a	4.86 \pm 0.11 ^b
6.52	Vanillin	10.09 \pm 0.06 ^b	289.27 \pm 2.92 ^a	0.75 \pm 0.09 ^c
7.21	<i>p</i> -coumaric acid	21.13 \pm 0.45 ^b	139.72 \pm 2.71 ^a	3.51 \pm 0.10 ^c
8.4	Scopoletin	ND	3.03 \pm 0.34 ^a	ND
8.6	Ferulic acid	2.99 \pm 0.15 ^b	26.05 \pm 0.31 ^a	0.17 \pm 0.04 ^c
9.15	Salicylic acid	10.97 \pm 0.25 ^b	40.19 \pm 0.35 ^a	1.38 \pm 0.06 ^c
9.16	Sinapic acid	1.37 \pm 0.21 ^b	5.74 \pm 0.69 ^a	1.23 \pm 0.07 ^b
10.35	Rutin	20.56 \pm 0.73 ^b	250.52 \pm 8.21 ^a	10.28 \pm 0.18 ^b
10.57	Isoquercitrin (quercetin-3- <i>O</i> -glucoside)	ND	69.16 \pm 2.19 ^a	ND
11.91	Astragaline (kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside)	ND	41.61 \pm 1.51 ^a	ND
13.02	Secoisolariciresinol	ND	47.79 \pm 1.09 ^a	ND
14.08	Trans cinnamic acid	11.46 \pm 0.06 ^b	59.45 \pm 1.43 ^a	ND
15.18	Quercetin	ND	21.25 \pm 0.49 ^a	6.45 \pm 0.10 ^b
15.28	Luteolin	1.07 \pm 0.12 ^a	ND	ND
17.81	Kaempferol	ND	6.94 \pm 0.09 ^a	ND

Abbreviations: R_t, retention time; DE, dry extract; ND, not determined. Values are expressed as mean \pm standard deviation of three repetitions. Values with different letters indicate significant differences (Tukey, $p < 0.05$).

2.3. Antioxidant Activity

2.3.1. DPPH Antioxidant Assay

Table 1 shows the antioxidant activity presented by the aqueous extract and its fractions from the stem tissue of *V. sphaerocephala*. As can be seen in Table 1, the ethyl acetate fraction of the aqueous stem extract was the one that presented the highest scavenging activity of the DPPH radical since a concentration of 7.36 mg/mL of extract was required to inhibit the radical, followed by the methanolic fraction and the aqueous stem extract, with IC₅₀ values of 8.48 and 12.36 mg/mL, respectively. In previous studies, it has been reported that the methanolic extract of *V. sphaerocephala* leaves showed an IC₅₀ value of 5.83 mg/mL [11].

Based on correlation analysis, no clear relationship was observed between the total phenolic and flavonoid contents of the extracts and the scavenging activity of radical DPPH since the extract and fractions that showed the highest total phenolic and flavonoid contents did not obtain the highest DPPH radical scavenging effect.

2.3.2. ABTS Antioxidant Assay

Regarding the scavenging activity of the ABTS radical, the aqueous extract showed the strongest ABTS radical scavenging effect with an IC_{50} value of 5.60 mg/mL. Both the ethyl acetate fraction and the methanolic fraction showed lower scavenging activity of radical ABTS ($IC_{50} = 7.76$ and 10.26 mg/mL, respectively). These values, however, are lower than those previously reported for methanolic leaf extracts of *V. sphaerocephala* [11].

Based on Pearson's correlation coefficient, a clear relationship was observed between the ABTS scavenging activity and the phenolic and flavonoid contents ($R = -0.891$, $p \leq 0.01$ and $R = -0.918$, $p < 0.01$, respectively) of the *V. sphaerocephala* extracts and fractions, which indicates that by increasing the content of phenolics in the extracts and fractions, the scavenging activity increased.

2.3.3. Total Antioxidant Capacity

According to the results of the Total Antioxidant Capacity (TAC) in which the capacity of the extracts to reduce molybdenum (VI) to molybdenum (V) was evaluated, the antioxidant capacity ranged from 20.62 to 40.21 mg AAE/g DE. Similarly, as with the DPPH radical, the ethyl acetate fraction exhibited the highest antioxidant capacity, while the aqueous extract obtained the lowest antioxidant capacity (Table 1). These values are lower than those obtained in methanolic extracts of *V. sphaerocephala* leaves (51.05 ± 0.36 mg AAE/g DT) [11].

2.3.4. Ferric Reducing Power (FRP)

The ferric-reducing power analysis determines the ability of metabolites to reduce the ferric ion (Fe^{+3}) to ferrous (Fe^{+2}) due to the donation of an electron by measuring the antioxidant activity in equivalents of gallic acid per gram of dry extract. In this work, the ethyl acetate fraction exhibited the highest value of antioxidant activity to reduce ferric ions (129.57 mg GAE/g DE), while the methanolic fraction obtained the lowest value (61.48 mg GAE/g DE). To the best of our knowledge, no reports of this assay have been found for this plant species.

The antioxidant activity of the extract and the fractions showed significant differences (Table 1), as did their phenolic composition (Table 2). Something important to highlight is the increase in the antioxidant activity of the ethyl acetate fraction in all the tests evaluated (DPPH, ABTS, TAC, and FRP) compared to the results with the aqueous stem extract, as shown in Table 1. This event could be due to behavior that occurs in the fractions since the active compounds present in the fractions are less linked to other compounds compared to the extract, in which an antagonism phenomenon could exist, which is why its antioxidant effect could be compromised [18]. A more detailed analysis between the individual phenolic compounds and the DPPH radical scavenging activity showed that chlorogenic acid, which was identified in the aqueous extract and both fractions (Table 2), was one of the compounds that contributed most to the scavenging activity of DPPH radical ($R = -0.933$, $p < 0.01$). In the specific case of quercetin, which was identified only in the ethyl acetate and methanol fractions (Table 2), it could have been responsible for the DPPH radical scavenging activity observed, according to Pearson's correlation coefficient ($R = -0.861$, $p < 0.01$). The above could explain that both fractions showed higher scavenging activity than the aqueous extract, as can be seen in Table 1. Luteolin, a compound present in the aqueous extract and absent in the fractions (Table 2), may have contributed to the ABTS radical scavenging activity, according to the correlation analysis ($R = -0.839$, $p < 0.01$). Likewise, a positive correlation was observed between 17 of the compounds identified in this research with the ferric reducing power, with trans-cinnamic acid ($R = 0.999$, $p < 0.01$), salicylic acid ($R = 0.998$, $p < 0.01$), vanillinic acid ($R = 0.997$, $p < 0.01$), *p*-coumaric acid ($R = 0.996$, $p < 0.01$), ferulic acid ($R = 0.995$, $p < 0.01$), protocatechuic acid ($R = 0.989$, $p < 0.01$), rutin ($R = 0.987$, $p < 0.01$), vanillin ($R = 0.986$, $p < 0.01$), having the highest correlation values.

With these results in the four antioxidant tests evaluated, we can determine that the aqueous stem extract of *V. sphaerocephala* and its ethyl acetate fraction have a potential antioxidant effect, so it is necessary to carry out more research to explore new biological properties.

2.4. Antifungal Activity

Figure 1 shows the results of antifungal activity as the median inhibitory concentration (IC_{50}), which represents the concentration of aqueous extract or fraction needed to reduce by 50% (IC_{50}) the mycelial growth of *B. cinerea*. Interestingly, the methanolic fraction did not show inhibition against *B. cinerea*. The aqueous stem extract showed the highest antifungal activity compared to its ethyl acetate fraction, as their IC_{50} and lethal inhibitory concentration (IC_{100}) values were 0.10 ± 0.00 and 0.24 ± 0.00 mg/mL (10 and 24 μ g/mL), respectively (Figure 1A). In the case of the ethyl acetate fraction, its antifungal activity was low, showing IC_{50} and IC_{100} values of 14.51 ± 0.06 and 21.49 ± 0.09 mg/mL, respectively (Figure 1B). Interestingly, both the aqueous stem extract and its ethyl acetate fraction showed a fungicidal effect, as there was no mycelial growth after the five days of the assay evaluation.

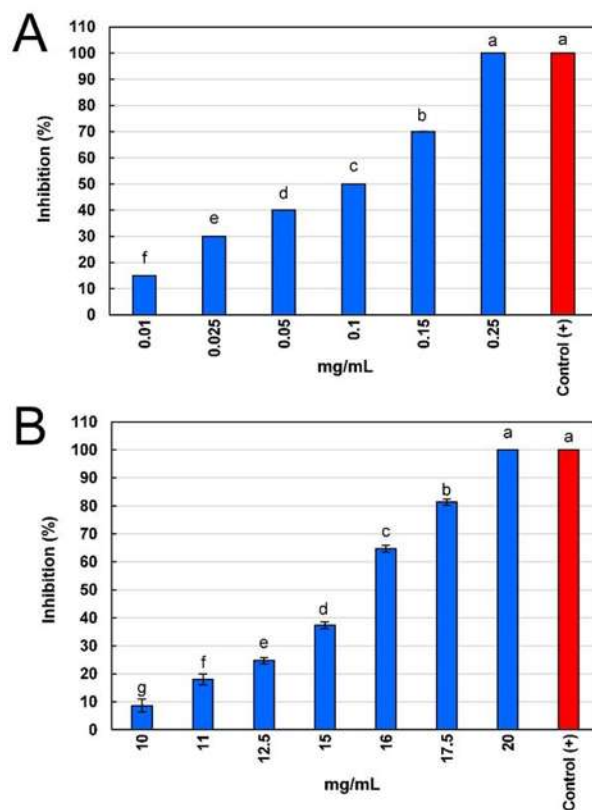


Figure 1. Antifungal activity of stem aqueous extract and ethyl acetate fraction from *Verbesina sphaerocephala* against *Botrytis cinerea*. (A) Percentage of inhibition of mycelial growth of aqueous stem extract at different concentrations; (B) Percentage of inhibition of mycelial growth of ethyl acetate fraction at different concentrations. Abbreviations: Control (+), Benomyl 10 mg/mL. Values are expressed as mean \pm standard deviation of three repetitions. Values with different letters indicate significant differences (Tukey, $p < 0.05$).

In a previous study by our working group, we reported the antifungal activity of hydrolates of leaves and stems from *V. sphaerocephala* against the fungi *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, and *B. cinerea* [12]. In that work, *B. cinerea* was determined to be more sensitive against stem hydrolate with IC_{50} and IC_{100} values of 1.3 and 2.7 mg/mL (130 and 270 μ g/mL), respectively. It should be noted that the hydrolates were not as effective as the aqueous extract reported here since up to 13 times more hydrosol was required to inhibit the growth of the fungi *B. cinerea* by 50%.

On the other hand, other species of the genus *Verbesina* have reported antifungal activity against other phytopathogenic fungi, such as the case of *Verbesina lanata*, whose ethyl acetate extract showed an IC_{50} value of 35 μ g/mL against the fungus *Plasmopara viticola* [19]. Similarly, other authors report the

antifungal activity of *V. encelioides* extracts against *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Rhizoctonia solani* [20].

As previously indicated, the phenolic composition of the stem extract and fractions of *V. sphaerocephala* varied significantly (Table 2). Different antifungal modes of action have been reported for some of the phenolic compounds identified in both the aqueous extract and its fractions (ethyl acetate and methanolic) of *V. sphaerocephala* stems. Protocatechuic acid acts by affecting membrane permeability as well as cell wall degradation in *B. cinerea* [21]. Likewise, vanillic acid decreases membrane permeability [22] as well as inhibits ergosterol synthesis [23]. Vanillin has different antifungal modes of action, such as increased membrane permeability, leakage of intracellular contents, and inhibition of cell wall enzymes such as polygalacturonase, pectin lyase, and endo-1,4- β -D-glucanase [24]. *p*-coumaric acid alters oxidative phosphorylation, causing uncoupling in mitochondria [25]. Scopoletin acts by inhibiting conidial germination, affecting the high osmolarity glycerol pathway, as well as altering the cell membrane and cell wall [26]. Ferulic acid promotes destabilization of the internal fungal cell structure as well as cell surface morphology, induces leakage of intracellular contents, and inhibition of spore germination [27]. Salicylic acid causes leakage of protein content from the cell interior, intracellular disorganization, and lipid damage [28]. Rutin intervenes by affecting the enzymes sterol 14- α demethylase, a key enzyme in the biosynthesis of various sterols, and nucleoside diphosphate kinase, essential in the phosphorylation process of nucleoside triphosphate and diphosphate (NTP and NDP, respectively) [29]. Trans-cinnamic acid promotes damage to plasma membrane integrity and also stimulates the increase in intracellular reactive oxygen species, and activities of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes [30]. Quercetin has demonstrated a synergistic effect in conjunction with other phenolics, altering the composition of the cell membrane through the induction of oxidative stress [31]. Kaempferol alters the synthesis of nucleic acids and proteins and decreases the function of mitochondria as well as causing disruption of the cell membrane [32].

There are many modes of action through which the phenolic compounds present in the aqueous extract of *V. sphaerocephala* and its fractions could be acting on the phytopathogen *B. cinerea*; however, the authors recommend carrying out a subsequent targeted study to determine their specific mechanisms of action.

It is possible that the antifungal activity observed in this research is due to a synergistic effect of the phenolic compounds present in both the aqueous extract and its ethyl acetate fraction from the stem of *V. sphaerocephala* since no clear relationship was observed between the antifungal activity and the phenolic and flavonoid contents or between the antifungal activity and the individual phenolic compounds identified by UPLC–MS analysis in the aqueous extract and its ethyl acetate fraction.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Reagents

Sodium carbonate (Na_2CO_3) (99%, J.T. Baker[®], Mexico), aluminum chloride (AlCl_3) (99%, Meyer[®], Mexico) potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (99.8%, J.T. Baker[®], Phillipsburg, NJ, USA), phosphate dibasic sodium (99.9%, Fermont[®], Mexico), ammonium molybdate (99%, Merck[®], Mexico), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) (99%, Roche[®], Germany), potassium ferrocyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), trichloroacetic acid ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$), ferric chloride (FeCl_3) were used. Folin–Ciocalteu reagent (99%) and standard gallic acid ($\geq 99\%$), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid ($\geq 99\%$), and rutin hydrate ($\geq 95\%$) (HPLC grade) were provided by Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA).

Potato dextrose agar (PDA) medium (provided by Bioxon[®], Mexico) and Benomyl[®] 50 WP (Taicang Pesticide Factory, China) were used. Water, acetonitrile, and formic acid (LC-MS grade) were purchased from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). The reference standards used in the UPLC analysis were as follows: shikimic acid, gallic acid, L-phenylalanine, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, (–)-epigallocatechin, (+)-catechin, vanillic acid, scopolin, chlorogenic acid, caffeic acid, malvin, kuromanin, procyanidin B2, vanillin, keracyanin, (–)-epicatechin, 4-coumaric acid, mangiferin, umbelliferone, (–)-gallocatechin gallate, scopoletin, ferulic acid, quercetin 3,4-di-O-

glucoside, 3-coumaric acid, salicylic acid, sinapic acid, epicatechin gallate, ellagic acid, myricitrin, pelargonidin, quercetin 3-D-galactoside, rutin, p-anisic acid, quercetin 3-glucoside, luteolin 7-O-glucoside, malvidin, 2,4-dimethoxy-6-methylbenzoic acid, penta-O-galloyl-B-D-glucose, kaemperol 3-O-glucoside, quercitrin, naringin, myricetin, hesperidin, trans-resveratrol, rosmarinic acid, secoisolariciresinol, phloridzin, trans-cinnamic acid, psoralen, quercetin, luteolin, angelicin, naringenin, apigenin, matairesinol, kaempferol, hesperetin, podophyllotoxin, methyl cinnamate, nordihydroguaiaretic acid, chrysin, kaempferide, emodin, chrysophanol.

3.2. Fungal Strain

The fungi *B. cinerea* was previously isolated and identified by Robles-Yerena et al., 2021 [33]. Briefly, *B. cinerea* was isolated from decaying strawberry fruits and was molecularly identified for confirmation of genus and species (accession number: MW698862). This strain belonged to the strain collection of the Molecular Biology Laboratory of the Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo and was donated by Dr. Pedro Damián Loeza-Lara.

3.3. Plant Material

V. sphaerocephala specimens were collected in October 2020 at Pajacuarán (20°05'54.8" N, 102°33'19.2" W) in the Mexican state of Michoacán. The specimens were authenticated by Biol. Rosa Isabel Fuentes Chávez. Voucher herbarium specimens were deposited at the herbarium of the Faculty of Biology of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, with herbarium number 31383.

3.4. Drying Process

V. sphaerocephala plants were dried at room temperature (20 °C) for 5 days in the absence of light. Stems were removed from the plants, and afterward, the tissues were ground in a blender to obtain a fine powder. Milled tissues were stored in dark conditions at room temperature until they were used.

3.5. Preparation of the Extracts

The extract was obtained by maceration in a proportion of 100 g of ground dry tissue (stem) per 500 mL of water at 90 °C, with vigorous shaking every 24 h, in the absence of light for five days [34]. The extract was filtered at room temperature using a Buchner funnel and Whatman No. 1 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, UK). Then, the extract was evaporated to dryness using a vacuum rotary evaporator (Büchi Waterbath B-480, Switzerland) at 50 °C with a rotational speed of 120 rpm for 25 h. Finally, dry extract was suspended in methanol to obtain a final concentration of 100 mg/mL. The extract was stored in amber bottles at 4 °C for later use.

3.6. Liquid-Liquid Phase Separation

A liquid-liquid phase separation was carried out on the extract to obtain the fractions [35]. The phases were separated using a separatory funnel, placing 150 mL of extract and 150 mL of solvent (ethyl acetate or methanol). The funnel was shaken well, and phase separation was allowed to occur. The upper organic layer was collected in a beaker. The procedure was repeated two more times. Subsequently, fractions were dried in a rotary evaporator (Büchi Waterbath B-480, Switzerland) at 50 °C with a rotational speed of 120 rpm for 8 min and suspended in methanol at a concentration of 100 mg/mL. The fractions were stored at -4 °C.

3.7. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Content

3.7.1. Total Phenolic Content

Total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method, according to Singleton et al. [36], with modifications. Next, 50 µL of each extract and fraction solution was taken, and 500 µL of deionized water was added and mixed. Subsequently, 25 µL of 1 N Folin–Ciocalteu reagent was added

and shaken for 5 min. Finally, 75 μL of a 20% (*w/v*) Na_2CO_3 solution was added and left to rest in the absence of light for 2 h at room temperature. The absorbances of the samples were read in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 760 nm. To determine the phenolic compounds in the aqueous extract and fractions of *V. sphaerocephala*, 200 μL of the sample was taken and evaluated using a gallic acid standard curve ($A_{760} = 0.0017 [\text{gallic acid}] - 0.0246$, $r = 0.9908$), obtained using 10 known concentrations (30–300 $\mu\text{g/mL}$) of the compound. The total phenolic content was expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g DE).

3.7.2. Total Flavonoid Content

To determine the total flavonoid content, the technique described by Lamaison and Carnat [37] was used. To achieve this, 250 μL of aqueous extracts and fractions were added with 250 mL of 5% aluminum chloride (*w/v*) solution. The absorbance value was evaluated after 10 min at a wavelength of 430 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The total flavonoid content was determined using a rutin curve ($A_{430} = 0.005 [\text{rutin}] - 0.0062$, $r = 0.9983$) obtained using ten concentrations of rutin (0.01–0.1 mg/mL). Total flavonoids were expressed in milligrams of rutin equivalents per gram of dry extract (mg RE/g DE).

3.8. Identification and Quantification of Total Phenolic Compounds by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry

The identification and quantification of phenolic compounds was carried out by the method previously reported [38,39]. The extracts were prepared with the solvent methanol with 0.1% formic acid (*v/v*) at 50 mg/mL, then filtered with 0.2 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes and finally placed in 2 mL UPLC vials. All samples were analyzed on a 1290 Infinity Agilent ultra-high resolution liquid chromatograph coupled to a 6460 Agilent triple quadrupole-mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chromatography was performed on an Agilent Eclipse Plus C18 column (1.8 μm , 2.1 \times 50 mm) with a column temperature of 40 $^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of (A) water (MS grade) and (B) acetonitrile (MS grade), both with 0.1% formic acid (*v/v*). The gradient conditions of the mobile phases were 0–30 min a linear gradient 1–50% B, 30–35 min a linear gradient 50–99% B, 35–39 min an isocratic step at 99% B, 39–40 min linear gradient 99–1% B, 40–45 min an isocratic step at 1% B. The flow rate was 0.3 mL/min, and 2 μL of extract was injected. The mass spectrometric analysis was performed with an electrospray ionization source in negative and positive mode with a capillary and nozzle voltages of 3500 and 500 V, respectively. The gas and sheath gas temperatures were 300 and 250 $^\circ\text{C}$, respectively. The gas and sheath gas flows were 5 and 11 L/min, respectively, and the nebulizer pressure was 45 Psi. Data were acquired and processed with the MassHunter workstation software, version B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For identification and quantification, 67 authentic standards were purchased or in-house purified, including two phenolic precursors (shikimic acid and phenylalanine) and 65 phenolic compounds belonging to several subcategories (Supplementary Table S1). The identification of each compound was performed by a dynamic multiple-reaction monitoring method (see detailed information in Supplementary Table S1). The compound quantification was carried out by constructing calibration curves with 12 concentration points from 0.25 to 19 μM , obtaining determination coefficient values higher than 0.96 (Supplementary Table S1). The concentration of each phenolic compound was expressed as micrograms per gram of dry extract ($\mu\text{g/g DE}$).

3.9. Analysis of Antioxidant Activity

3.9.1. DPPH Antioxidant Assay

The DPPH technique was used to determine the antioxidant activity [40]. A DPPH solution was prepared (98 $\mu\text{g/mL}$ in methanol). Then, 900 μL of DPPH reagent was taken to mix with 100 μL of extracts and fractions (5–50 mg/mL), and they were incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was read at 523 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Methanol was used as a blank. The scavenging effect of DPPH was measured using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

where A_{control} is the absorbance of the control (DPPH solution), and A_{sample} is the absorbance of the sample (DPPH plus 100 μL of extract). The median inhibitory concentration (IC_{50}) was determined using linear regression. The scavenging activity was expressed as the IC_{50} that represents the *V. sphaerocephala* aqueous extract or fractions concentration (mg/mL) needed to reduce by 50% the initial DPPH absorbance.

3.9.2. ABTS Antioxidant Assay

The ABTS technique was performed using the procedure described by [41]. The ABTS radical was obtained through the oxidation reaction using 1 mL of the ABTS reagent at a concentration of 7 mmol/L and 17.6 μL of potassium persulfate solution (140 mmol/L). The solution was placed in the absence of light for a period of 12 h at room temperature. The ABTS solution was diluted with water to have an absorbance value of 0.700 ± 0.01 at a wavelength of 734 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Once the radical was formed, a mixture was made by taking 250 μL of the extracts with 250 μL of ABTS solution. The absorbance value was measured at 734 nm after 6 min. The test was performed with 10 concentrations of extract and fractions (1–50 mg/mL). The blank was prepared under the conditions described above, replacing the aqueous extract with methanol and a fraction with ethyl acetate or methanol as applicable. The percentage of scavenging effect was measured using the following formula:

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = [A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

where A_{blank} represents the absorbance of the blank (ABTS solution plus methanol), A_{sample} means the absorbance of the test sample (ABTS solution plus extract), and A_{control} is the absorbance of the control (ABTS solution). The median inhibitory concentration (IC_{50}) was determined using linear regression by making a graph with the percentage of inhibition against the concentration of the extract. The scavenging activity was expressed as the IC_{50} that represents the aqueous extract or fractions concentration (mg/mL) needed to reduce by 50% the initial ABTS absorbance.

3.9.3. Total Antioxidant Capacity

The total antioxidant capacity was carried out according to the reported by [42]. The working solution was prepared with 0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate. Then, 50 μL of each *V. sphaerocephala* extract and fraction was combined with 500 μL of a working solution. Subsequently, samples were incubated in a dry bath/block heater from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) at a temperature of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min. The samples were then placed at room temperature, and the absorbance was measured at 695 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A standard curve of ascorbic acid was generated ($A_{695} = 0.0014 [\text{ascorbic acid}] + 0.0368$, $r = 0.9981$, with ten concentrations of ascorbic acid (0.04–0.4 mg/mL). The total values of antioxidant capacity were expressed in milligrams of equivalents of ascorbic acid per gram of dry extract (mg AAE/g DE).

3.9.4. Ferric Reducing Potential

To determine the ferric-reducing power of *V. sphaerocephala* extracts and fractions, the methodology proposed by [43] was used with some modifications. To achieve this, 100 μL of extracts and fractions of *V. sphaerocephala* were mixed with 100 μL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 100 μL of 1% potassium ferrocyanide (*w/v*). The mixture was incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min in a digital dry bath/block heater (Thermo Scientific brand, Massachusetts, USA). Then, 100 μL of 10% trichloroacetic acid (*w/v*) and 200 μL of deionized water were added. Finally, 40 μL of 0.1% ferric chloride (*w/v*) was placed, and the

absorbance at 700 nm was recorded in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The ferric reducing power was calculated from the following calibration curve $A_{700} = 0.00006 [\text{gallic acid}] + 0.00008$, $r = 0.9962$, constructed with six concentrations of gallic acid (0.45–2.7 mg/mL). The results were expressed in mg equivalents of gallic acid per gram of dry extract (mg GAE/g ES).

3.10. Antifungal Assay

Antifungal activity was determined with the well diffusion method [44], using Petri dishes with 3.9% PDA medium (*w/v*) in which 2.5 mm perforations were made. In each well, 100 μL of the extract at six different concentrations (0.01–0.25 mg/mL) or 100 μL of the fraction at eight different concentrations (5–20 mg/mL) were poured. Subsequently, a fragment of *B. cinerea* mycelium was inoculated into each well and incubated for 5 days at 25 ± 2 °C. The commercial fungicide Benomyl® (10 mg/mL) was used as a positive control and methanol as a negative control. The percentage of inhibition (%) was calculated with the formula outlined by Rutiaga [45]:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{\text{Growth}_{\text{control}} - \text{Growth}_{\text{sample}}}{\text{Growth}_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

where $\text{Growth}_{\text{control}}$ represents the average diameter of fungal growth of the control (fungi), $\text{Growth}_{\text{sample}}$ means the average diameter of fungal growth of the test sample (fungi plus extract or fraction). The median inhibitory concentration (IC_{50}) and the lethal inhibitory concentration (IC_{100}) were determined using linear regression by making a graph with the percentage of fungi inhibition against the concentration of the extract or fraction. Antifungal activity was expressed as the IC_{50} that represents the aqueous extract or fractions concentration (mg/mL) needed to reduce by 50% the fungal growth, and as the lethal inhibitory concentration (IC_{100}), which represents the concentration of aqueous extract or fractions (mg/mL) needed to completely inhibit fungal growth.

3.11. Statistical Analysis

Results were reported as mean \pm standard deviation of three independent replicates. An analysis of variance (ANOVA) was used to assess statistical significance. Differences between values with a $p < 0.05$ were considered statistically significant. Tukey's test was performed for the comparison of means for the corresponding results. Relationships between all determinations were tested using Pearson's correlation. These analyses were performed with the SPSS software version 29.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

4. Conclusions

In the present study, the phenolic composition, antioxidant and antifungal activities of the aqueous stem extract, and its fractions (ethyl acetate and methanol) of *V. sphaerocephala* were analyzed. In this study, new phenolic compounds were identified for this species, contributing to its knowledge of phytochemical composition. Our results indicate that the antioxidant activity shown by the aqueous extract and its fractions could be attributed to the phenolic compounds present in them. Also, the antifungal activity exhibited by the aqueous extract of *V. sphaerocephala* stem and its ethyl acetate fraction was highly dependent on the phenolic composition. The results of this research support the idea that the aqueous extract of *V. sphaerocephala* stems possess great potential for *B. cinerea* management. The modes of action are yet to be elucidated. Therefore, future investigations into the specific mechanisms of action of the phenolics detected in the extracts of the fungus *B. cinerea* are recommended.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1. Representative chromatograms of standards, aqueous extract, ethyl acetate and methanolic fractions from stem of *Verbesina sphaerocephala* compounds identified by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (UPLC–MS); Table S1. Conditions for identification and quantification of phenolic compounds by UPLC-MS.

Author Contributions: Conceptualization, R.S.-G.; methodology, K.Y.R.-V.; software, J.R.M.-M. and K.Y.R.-V.; validation, A.H.-G.; formal analysis, J.L.M.-V. and J.A.G.-A.; investigation, F.A.S.-M.; resources, R.S.-G.; data

curation, J.E.L.-M. and R.E.N.d.R.-T.; writing—original draft preparation, K.Y.R.-V.; writing—review and editing, J.R.M.-M.; visualization, R.E.N.d.R.-T.; supervision, F.A.S.-M. and J.E.L.-M.; project administration, A.H.-G. and R.S.-G.; funding acquisition, R.S.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Acknowledgments: K.Y.R.-V. gives thanks to the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) for a scholarship awarded (no. 775428). R.S.G. is grateful to CIC-UMSNH. J.R.M.-M. gratefully acknowledges Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sharma, I. *Phytopathogenic Fungi and Their Biocontrol Applications*; INC, 2020; ISBN 9780128213940.
2. Jain, A.; Sarsaiya, S.; Wu, Q.; Lu, Y.; Shi, J. A Review of Plant Leaf Fungal Diseases and Its Environment Speciation. *Bioengineered* **2019**, *10*, 409–424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>.
3. Roca-Couso, R.; Flores-Félix, J.D.; Rivas, R. Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis Cinerea*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 45. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>.
4. Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; Van Kan, J.A.L. *Botrytis Cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>.
5. Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Wrona, O.; Górecki, R.; Buszewski, B. Medicago Sativa as a Source of Secondary Metabolites for Agriculture and Pharmaceutical Industry. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 520–539. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.006>.
6. Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.H.; Bahadar, K. Role of Secondary Metabolites in Plant Defense against Pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>.
7. Xue, H.; Jiang, Y.; Zhao, H.; Köllner, T.G.; Chen, S.; Chen, F.; Chen, F. Characterization of Composition and Antifungal Properties of Leaf Secondary Metabolites from Thirteen Cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Molecules* **2019**, *24*, 4202. <https://doi.org/10.3390/molecules24234202>.
8. Rzedowski, J.; Calderón de Rzedowski, G. Compositae: Tribu Heliantheae II. *Flora Bajío Reg. Adyac.* **2011**, *172*, 1–409.
9. Vázquez-Sánchez, M.; Medina-Medrano, J.R.; Cortez-Madrigal, H.; Angoa-Pérez, M.V.; Muñoz-Ruiz, C.V.; Villar-Luna, E. Nematicidal Activity of Wild Plant Extracts against Second-Stage Juveniles of *Nacobbus Aberrans*. *Nematropica* **2018**, *48*, 136–144.
10. Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A.L.; Villaseñor, J.L.; Romo de Vivar, A. Cadinenes and Other Metabolites from *Verbesina Sphaerocephala* A. Gray. *Biochem. Syst. Ecol.* **2020**, *93*, 104183. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104183>.
11. Rodríguez-Valdovinos, K.Y.; Salgado-Garciglia, R.; Vázquez-Sánchez, M.; Álvarez-Bernal, D.; Oregel-Zamudio, E.; Ceja-Torres, L.F.; Medina-Medrano, J.R. Quantitative Analysis of Rutin by HPTLC and in Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic-Rich Extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants* **2021**, *10*, 475. <https://doi.org/10.3390/plants10030475>.
12. Aguilar-Mejía, Y. *Efecto Antioxidante y Antifúngico de los Compuestos Volátiles del Hidrolato de Tallos y Hojas de Verbesina Sphaerocephala (Asteraceae)*; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo: Morelia, Mexico, 2023.
13. Gonçalves, A.C.; Falcão, A.; Alves, G.; Silva, L.R.; Flores-Félix, J.D. Antioxidant Activity of the Main Phenolics Found in Red Fruits: An in Vitro and in Silico Study. *Food Chem.* **2024**, *452*, 139459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139459>.
14. Razola-Díaz, M. del C.; Aznar-Ramos, M.J.; Benítez, G.; Gómez-Caravaca, A.M.; Verardo, V. Exploring the Potential of Phenolic and Antioxidant Compounds in New Rosaceae Fruits. *J. Sci. Food Agric.* **2024**, *104*, 3705–3718. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13255>.
15. Vek, V.; Keržič, E.; Poljanšek, I.; Eklund, P.; Humar, M.; Oven, P. Wood Extractives of Silver Fir and Their Antioxidant and Antifungal Properties. *Molecules* **2021**, *26*, 6412. <https://doi.org/10.3390/molecules26216412>.
16. Lal, M.; Sutradhar, D. Extraction of Kaempferol Derivatives from *Zygophyllum paulayanum* and Its Diverse Biological Activities. *Nat. Prod. Res.* **2024**, *0*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2375310>.

17. Mehal, K.K.; Kaur, A.; Singh, H.P.; Batish, D.R. Investigating the Phytotoxic Potential of *Verbesina Encelioides*: Effect on Growth and Performance of Co-Occurring Weed Species. *Protoplasma* **2023**, *260*, 77–87. <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01761-2>.
18. Cardona Galeano, C.W.; Robledo Restrepo, C.S.M.; Rojano, C.B.A.; Alzate Guarín, C.F.; Muñoz Herrera, D.L.; Saez Vega, C.J. Actividad Leishmanicida y Antioxidante de Extractos de *Piper Daniel-Gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2013**, *18*, 268–277.
19. Ramseyer, J.; Thuerig, B.; De Mieri, M.; Schärer, H.J.; Oberhänsli, T.; Gupta, M.P.; Tamm, L.; Hamburger, M.; Potterat, O. Eudesmane Sesquiterpenes from *Verbesina Lanata* with Inhibitory Activity against Grapevine Downy Mildew. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 3296–3304. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00868>.
20. Divya Ramakrishnan, C.K.; Doss, D.; Vijayabharathi, A. Biochemical and Antimicrobial Characterization of an Underexploited Medicinal Plant-*Verbesina Encelioides*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 3407–3416. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.396>.
21. Nguyen, X.H.; Naing, K.W.; Lee, Y.S.; Moon, J.H.; Lee, J.H.; Kim, K.Y. Isolation and Characteristics of Protocatechuic Acid from *Paenibacillus elgii* HOA73 against *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. *J. Basic Microbiol.* **2015**, *55*, 625–634. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400041>.
22. Alnuaimi, A.D.; O'Brien-Simpson, N.M.; Reynolds, E.C.; McCullough, M.J. Clinical Isolates and Laboratory Reference *Candida* Species and Strains Have Varying Abilities to Form Biofilms. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 689–699. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12068>.
23. Raut, J.S.; Rajput, S.B.; Shinde, R.B.; Surwase, B.S.; Karuppaiyil, S.M. Vanillin Inhibits Growth, Morphogenesis and Biofilm Formation by *Candida albicans*. *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* **2013**, *3*, 130–138. <https://doi.org/10.1080/22311866.2013.817749>.
24. Yang, J.; Chen, Y.Z.; Yu-Xuan, W.; Tao, L.; Zhang, Y. Di; Wang, S.R.; Zhang, G.C.; Zhang, J. Inhibitory Effects and Mechanisms of Vanillin on Gray Mold and Black Rot of Cherry Tomatoes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, *175*, 104859. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104859>.
25. Morales, J., Mendoza, L. and Cotoras, M. Alteration of Oxidative Phosphorylation as a Possible Mechanism of the Antifungal Action of P-Coumaric Acid against *Botrytis Cinerea*. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 969–976. <https://doi.org/10.1111/jam.13540>.
26. Yuan, X.; Yang, F.; Wang, Y.; Li, S.; Zhang, D.; Liang, W.; Yang, Q. Scopoletin Negatively Regulates the HOG Pathway and Exerts Antifungal Activity against *Botrytis cinerea* by Interfering with Infection Structures, Cell Wall, and Cell Membrane Formation. *Phytopathol. Res.* **2024**, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s42483-023-00219-4>.
27. Yan, H.; Meng, X.; Lin, X.; Duan, N.; Wang, Z.; Wu, S. Antifungal Activity and Inhibitory Mechanisms of Ferulic Acid against the Growth of *Fusarium graminearum*. *Food Biosci.* **2023**, *52*, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102414>.
28. da Rocha Neto, A.C.; Maraschin, M.; Di Piero, R.M. Antifungal Activity of Salicylic Acid against *Penicillium expansum* and Its Possible Mechanisms of Action. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018>.
29. Khanzada, B.; Akhtar, N.; Okla, M.K.; Alamri, S.A.; Al-Hashimi, A.; Baig, M.W.; Rubnawaz, S.; Abdelgawad, H.; Hirad, A.H.; Haq, I.U.; et al. Profiling of Antifungal Activities and in Silico Studies of Natural Polyphenols from Some Plants. *Molecules* **2021**, *26*, 7164. <https://doi.org/10.3390/molecules26237164>.
30. Zhang, Z.; Qin, G.; Li, B.; Tian, S. Effect of Cinnamic Acid for Controlling Gray Mold on Table Grape and Its Possible Mechanisms of Action. *Curr. Microbiol.* **2015**, *71*, 396–402. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0863-1>.
31. Aghababaei, F.; Hadidi, M. Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1–31. <https://doi.org/10.3390/ph16071020>.
32. Abody, S.M.; Mickymaray, S. Antibiotics Anti-Fungal E Ffi Cacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–42.
33. Robles-Yerena, L.; Rodríguez-Mendoza, J.; Santoyo, G.; Ochoa-Alvarado, X.I.; Medina-Estrada, R.I.; Jiménez-Mejía, R.; Loeza-Lara, P.D. Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from Strawberry and Papaya Fruits and Their Susceptibility to Fatty Acids. *Can. J. Plant Pathol.* **2022**, *44*, 828–835. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2084457>.
34. Abah, S.E.; Egwari, L.O. Methods of Extraction and Antimicrobial Susceptibility Testing of Plant Extracts. *Afr. J. Jownal Basic Appl. Sci.* **2011**, *3*, 205–209.
35. Danmusa, U.M.; Nasir, I.A.; Abdullahi, M.I.; Ahmad, A.A.; Abdulkadir, I.S. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activities of Methanolic Stem Extracts of *Ochna Schweinfurthiana* F. Hoffm. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* **2015**, *3*, 171–182. https://doi.org/10.56499/jppres15.093_3.6.171.

36. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
37. Lamaison, J.L.; Carnart, A. Teneurs En Principaux Flavonoides Des Fleurs et Des Feuilles de *Crataegus Monogyna* Jacq. et de *Crataegus Laevigata* (Poiret) Dc. En Fonction de La Periode de Vegetation. *Plantes Med. Phyther.* **1991**, *25*, 12–16.
38. Juárez-Trujillo, N.; Monribot-Villanueva, J.L.; Jiménez-Fernández, V.M.; Suárez-Montaño, R.; Aguilar-Colorado, Á.S.; Guerrero-Analco, J.A.; Jiménez, M. Phytochemical Characterization of Izote (*Yucca elephantipes*) Flowers. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2018**, *91*, 202–210. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.027>.
39. Monribot-Villanueva, J.L.; Elizalde-Contreras, J.M.; Aluja, M.; Segura-Cabrera, A.; Birke, A.; Guerrero-Analco, J.A.; Ruiz-May, E. Endorsing and Extending the Repertory of Nutraceutical and Antioxidant Sources in Mangoes during Postharvest Shelf Life. *Food Chem.* **2019**, *285*, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.136>.
40. Barriada-Bernal, L.G.; Almaraz-Abarca, N.; Delgado-Alvarado, E.A.; Gallardo-Velázquez, T.; Ávila-Reyes, J.A.; Torres-Morán, M.I.; González-Elizondo, M.D.S.; Herrera-Arrieta, Y. Flavonoid Composition and Antioxidant Capacity of the Edible Flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CYTA-J. Food* **2014**, *12*, 105–114. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.801037>.
41. Lee, K.J.; Oh, Y.C.; Cho, W.K.; Ma, J.Y. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *1*, 165457. <https://doi.org/10.1155/2015/165457>.
42. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
43. Mokrani, A.; Krisa, S.; Cluzet, S.; Da Costa, G.; Tamsamani, H.; Renouf, E.; Mérillon, J.M.; Madani, K.; Mesnil, M.; Monvoisin, A.; et al. Phenolic Contents and Bioactive Potential of Peach Fruit Extracts. *Food Chem.* **2016**, *202*, 212–220. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.12.026>.
44. Magaldi, S.; Mata-Essayag, S.; Hartung De Capriles, C.; Perez, C.; Colella, M.T.; Olaizola, C.; Ontiveros, Y. Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing. *Int. J. Infect. Dis.* **2004**, *8*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>.
45. Rutiaga-Quiñones, J.G. *Chemische und Biologische Untersuchungen zum Verhalten Dauerhafter Holzarten und Ihrer Extrakte Gegenüber Holzabbauenden Pilzen*; München, Germany, 2001.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

8.2.3. Resultados complementarios. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y total (IC₁₀₀) del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*

En el cuadro 6 se muestran los resultados de las IC₅₀ e IC₁₀₀ del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* determinadas sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. El extracto acuoso inhibió el crecimiento de dichos hongos con concentraciones menores a 5 mg/mL, siendo *C. gloeosporioides* más susceptible (IC₅₀: 1.53 mg/mL; IC₁₀₀: 2.36 mg/mL). Estos valores fueron mayores a los obtenidos sobre *B. cinerea*, indicativo de la mayor susceptibilidad de este hongo al extracto acuoso de los tallos de *V. sphaerocephala* (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2024).

Cuadro 6. Concentración inhibitoria media y total (IC₅₀ e IC₁₀₀) del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala*.

Hongo	Extracto	
	IC ₅₀ mg/mL	IC ₁₀₀ mg/mL
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1.53	2.36
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.37	4.81

8.2.4. Resultados complementarios. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, terpenos totales y actividad antioxidante de diferentes extractos de tallos de *V. sphaerocephala*

En el cuadro 7 se reportan los resultados del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales, de terpenos totales y la actividad antioxidante de diferentes extractos de tallos (metanólico, clorofórmico y de acetato de etilo) de *V. sphaerocephala*. El extracto metanólico mostró los valores más altos de contenido de ácidos fenólicos totales (16.50 mg EAG/g ES) y de terpenos totales (32.73 mg EL/g

ES), así como la mayor actividad antioxidante por las cuatro técnicas evaluadas (TAC; DPPH, ABTS y FRP). Por otro lado, el extracto de acetato de etilo mostró el mayor contenido de flavonoides (8.44 mg ER/g ES).

El contenido de ácidos fenólicos totales fue más alto tanto en el extracto acuoso como en la fracción de acetato de etilo de los tallos de *V. sphaerocephala* (21.40 y 21.26 mg de EAG/g ES, respectivamente), así como en el contenido de flavonoides totales (11.53 y 3.71 mg de ER/g ES, respectivamente). El contenido de terpenos totales fue mayor en el extracto metanólico (32.73 mg EL/g ES), aunque sin diferencias significativas con el obtenido en el extracto acuoso de tallo (29.8 mg EL/g ES) (Capítulo 8.4).

Cuadro 7. Contenido de fenoles, flavonoides, terpenos totales y actividad antioxidante de diferentes extractos de tallos de *V. sphaerocephala*.

Extracto	Fenólicos (mg EAG/g ES)	Flavonoides (mg ER/g ES)	Terpenos (mg EL/ g ES)	TAC (mg EAA/g ES)	DPPH ⁺ IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS ⁺ IC ₅₀ (mg/mL)	FRP (mg EAG/g ES)
Metanol	16.50±0.18 ^b	6.65±0.07 ^c	32.73±0.07 ^a	34.64±0.09 ^a	20.98±0.02 ^b	13.10±0.01 ^b	69.82±1.54 ^b
Clorofórmico	1.01±0.03 ^c	2.12±0.02 ^d	15.41±0.03 ^d	5.15±0.03 ^d	45.21±0.02 ^d	33.79±0.11 ^c	23.55±0.57 ^d
Ac. de etilo	15.60±0.12 ^d	8.44±0.03 ^b	29.07±0.02 ^c	12.20±0.03 ^c	29.91±0.03 ^c	37.21±0.20 ^d	28.61±0.77 ^c

Abreviaturas: EAG, equivalentes de ácido gálico; EAA, equivalentes de ácido ascórbico; ES: Extracto seco; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; ABTS, ácido 2,2-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]; FRP: Potencial reductor férrico; TAC: Actividad antioxidante total IC₅₀, concentración inhibitoria media. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres repeticiones. ANOVA, post hoc Tukey ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante obtenida con los métodos TAC (34.64 mg EAA/g ES) y FRP (69.82 mg EAG/g ES), indica una mayor actividad del extracto metanólico, el cual también presentó las IC₅₀ más bajas con los métodos DPPH (20.98 mg/mL) y ABTS (13.1 mg/mL). El extracto acuoso de tallo mostró una actividad TAC menor que el extracto metanólico (20.62 mg EAA/g ES) pero mayor que los extractos

clorofórmico y de acetato de etilo, mientras que la fracción de acetato de etilo del extracto de tallo presentó una actividad más alta. Con el método FRP, el extracto acuoso y la fracción, presentaron una actividad antioxidante mayor que los demás extractos con valores de 74.76 y 129.57 mg EAG/g ES, respectivamente. La actividad antioxidante determinada con los métodos DPPH y ABTS, demostraron que el extracto acuoso mostró la mayor actividad con valores más bajos de la IC_{50} (IC_{50} : 12.38 mg/mL) y ABTS (IC_{50} : 5.60 mg/mL, respectivamente). Es importante destacar que con la fracción de acetato de etilo de este extracto, las IC_{50} fueron aún menores (DPPH, IC_{50} : 7.36 mg/mL; ABTS, IC_{50} : 7.76 mg/mL) (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2024).

8.3. Capítulo 3. Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas del extracto acuoso de tallo y fracciones de *Verbesina sphaerocephala*

Volatile compounds analysis by gas chromatography-mass spectrometry of extract aqueous and fractions of *Verbesina sphaerocephala* stems

8.3.1. Resumen

El extracto crudo acuoso de tallo de *Verbesina sphaerocephala* y la fracción de acetato de etilo obtenida presentaron la mayor actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* y una alta actividad antioxidante por TAC, DPPH y ABTS (Capítulo 2). En esta investigación se identificaron y cuantificaron los principales compuestos volátiles de este extracto y de tres fracciones obtenidas por extracción líquido-líquido con el siguiente orden de disolventes, hexano, acetato de etilo y metanol. El análisis se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), identificando en el extracto acuoso 26 compuestos volátiles cuantificados en mg/g de extracto seco (ES), que corresponden al 88.6% de sesquiterpenos como el elemol (0.245 mg/g ES), nerolidol (0.346 mg/g ES), isodieno (0.531 mg/g ES), α -santalol (0.212 mg/g ES) y α -bisabolol (0.285 mg/g ES). En la fracción de acetato de etilo, la de mayor actividad biológica, se identificaron 15 compuestos, de los cuales el 93.4% corresponden también a sesquiterpenos, cuatro de ellos presentes en el extracto, pero en una mayor concentración en esta fracción (elemol, 0.356 mg/g ES; nerolidol, 0.407 mg/g ES; isodieno, 0.583 mg/g ES; y α -bisabolol, 0.525 mg/g ES). En la fracción metanólica fueron identificados solamente 7 compuestos volátiles, de los cuales el 28.6% son fenilpropanoides (ej., p-vinilguaicol, 0.028 mg/g ES; metileugenol, 0.041 mg/g ES) y el 71.4% son sesquiterpenos (ej., elemol, 0.061 mg/g ES; cariofileno, 0.112 mg/g ES; y α -bisabolol, 0.058 mg/g ES), estos últimos en concentraciones más bajas que el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo. En la fracción hexánica se identificaron 13 compuestos, todos de naturaleza sesquiterpénica, presentando solo al isodieno (0.121 mg/g ES) presente en el extracto, al α -santalol (0.164 mg/g ES) y a la ambrosina (0.109 mg/g ES), como mayoritarios. Con este análisis se sugiere que la mezcla de los sesquiterpenos elemol, nerolidol, isodieno, α -santalol y α -bisabolol, son los responsables de la actividad biológica y antioxidante, por estar presentes tanto en el extracto como en la fracción de acetato de etilo, y en un mayor contenido.

Palabras clave: CG-EM, compuestos volátiles, terpenos, fenilpropanoides, sesquiterpenos.

8.3.2. Abstract

The aqueous stem extract and the ethyl acetate fraction of *Verbesina sphaerocephala* have shown the highest antifungal activity on *Botrytis cinerea* and high antioxidant activity by TAC, DPPH, and ABTS (Chapter 2), so in this research, the main volatile compounds of this crude extract and three fractions were identified and quantified. The

fractions were obtained by liquid-liquid extraction using the following solvents: hexane, ethyl acetate, and methanol. The analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), identifying in the aqueous extract 26 volatile compounds quantified in mg/g of dry extract (DE), which correspond to 88.6 % of sesquiterpenes such as elemol (0.245 mg/g DE), nerolidol (0.346 mg/g DE), isolede (0.531 mg/g DE), α -santalol (0.212 mg/g DE) y α -bisabolol (0.285 mg/g DE). In the ethyl acetate fraction, the fraction with the highest biological activity, 15 compounds were identified, of which 93.4% correspond to sesquiterpenes, four of them present in the extract, but in a higher concentration in this fraction (elemol, 0.356 mg/g DE; nerolidol, 0.407 mg/g DE; isolede, 0.583 mg/g DE; y α -bisabolol, 0.525 mg/g DE). In the methanolic fraction, only 7 volatile compounds were identified, of which 28.6% are phenylpropanoids (e.g., p-vinylguaicol, 0.028 mg/g DE; metyleugenol, 0.041 mg/g DE) and 71.4% are sesquiterpenes (e.g., elemol, 0.061 mg/g DE; caryophyllene, 0.112 mg/g DE; and, α -bisabolol, 0.058 mg/g DE), the latter compounds were at lower concentrations than the aqueous extract and the ethyl acetate fraction. In the hexane fraction, 13 compounds were identified, all of them of a sesquiterpene nature, presenting only isolede (0.121 mg/g DS) present in the extract, α -santalol (0.164 mg/g DE) and ambrosin (0.109 mg/g DES) as the major compounds. This analysis suggests that the mixture of the sesquiterpenes elemol, nerolidol, isolede, α -santalol, and α -bisabolol are responsible for biological and antioxidant activity, as they are present in both the extract and the ethyl acetate fraction, and in higher content.

Keywords: GC-MS, volatile compounds, terpenes, phenylpropanoids, sesquiterpenes.

8.3.3. Introducción

Las plantas sintetizan una amplia gama de compuestos con un gran potencial biotecnológico. Los terpenos son uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza, derivados por una o más unidades de isopreno, clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno que conforman su estructura (hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos) (Perveen, 2018; Mabou y Youssa, 2021). Estos compuestos se sintetizan en las plantas mediante dos diferentes rutas metabólicas: la ruta del metil eritrol-4-fosfato (MEP) ubicada en los plástidos que se enfoca en la síntesis de monoterpenos, diterpenos y derivados, y la ruta del ácido mevalónico (MVA), la cual se encuentra en el citoplasma y produce sesquiterpenos, entre otros (Li *et al.*, 2023).

Más de 80,000 terpenos o derivados de estos (terpenoides) han sido identificados en plantas, considerados como el grupo más extenso de metabolitos especializados y estudiados en el ámbito de la química, ya que exhiben una amplia gama de propiedades de interés ecológico y biotecnológico, como la antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antialérgica y antimicrobiana (bactericida y fungicida), las cuales dependen del tipo de terpeno. Son indispensables para la defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros, así como para la atracción de organismos benéficos como polinizadores y otros que puedan otorgarles un beneficio simbiótico (micorriza). Por otro lado, los terpenos han sido empleados en diversas industrias para la fabricación de productos cosméticos, fragancias, saborizantes alimentarios, medicamentos, insecticidas, combustibles, materias primas, entre otros (Ninkuu *et al.*, 2021; Kanwal *et al.*, 2022; Masyta *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

Los aceites esenciales de plantas están mayormente constituidos por compuestos volátiles de tipo terpénico y fenólicos (fenilpropanos), sobre todo en especies de las familias Apiaceae (Umbelliferae), Myrtaceae, Asteraceae (Compositae), Lamiaceae (Labiatae), Zingiberaceae, Cupressaceae, Lauraceae, Pinaceae, Piperaceae y Rutaceae (Vigan, 2010; Gladikostić *et al.*, 2023). El perfil químico, el contenido y la actividad biológica de estos varía debido a varios factores, como al número y tipo de moléculas, estereoquímica de los constituyentes y al método empleado de extracción; así mismo, las condiciones ambientales como el clima, el tiempo de cosecha, el tejido u órgano vegetal, la intensidad de la luz, edad o fenología de la planta, composición del suelo, son determinantes en la cantidad, calidad y composición de los compuestos extraídos (Fornari *et al.*, 2012).

Una gran cantidad de especies de la familia Asteraceae se han estudiado debido a la variedad y cantidad de compuestos bioactivos que sintetizan, entre los que destacan los terpenos y los fenólicos, de los que se ha demostrado diversas actividades biológicas (Sülsen *et al.*, 2017). Diversas especies de los géneros como *Pittocaulon* (Marín Loaiza *et al.*, 2008), *Tagetes* (Barajas-Pérez *et al.*, 2011) y *Senecio* (Arancibia

et al., 2013; Galvez *et al.*, 2018) poseen actividad antifúngica debido al contenido de compuestos volátiles. En cuanto a las especies del género *Verbesina*, también perteneciente a la familia Asteraceae, son pocas las que han sido estudiadas por sus propiedades antifúngicas, como *Verbesina encelioides* con actividad antifúngica sobre *Sclerotium rolfisii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani* (Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017), *V. lanata* con inhibición sobre *Plasmopara viticola* (Ramseyer *et al.*, 2017), *V. turbacensis* que inhibe a *Cryptococcus neoformans* (Powers *et al.*, 2022) y *V. macrophylla* contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Deiró *et al.*, 2023). Recientemente en nuestro grupo de trabajo, la especie *V. sphaerocephala* ha sido estudiada y se ha demostrado que extractos de la parte aérea presentan actividad antioxidante y antimicrobiana (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021), pero principalmente el extracto acuoso de tallos mostró actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* y *Colletotrichum gloeosporioides*, debido a la presencia de compuestos fenólicos y terpenos (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2024).

En cuanto a la composición terpénica de *Verbesina sphaerocephala*, existen pocos estudios: Salmon *et al.* (1985) aislaron el sesquiterpeno amorfano verocephol del tejido de hojas, mientras que Arciniegas *et al.* (2020) reportaron la presencia de cadinenos y lactonas sesquiterpénicas en partes aéreas de esta planta.

El objetivo de esta etapa de la presente investigación fue determinar el contenido de terpenos totales, e identificar y cuantificar el perfil de compuestos volátiles tanto del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* como de tres fracciones obtenidas de este.

8.3.4. Materiales y métodos

La recolección de los tejidos de tallos de *V. sphaerocephala* y el método de extracción se describen en el capítulo 7 (material biológico y métodos de extracción).

Determinación del contenido de terpenos totales

La determinación de terpenos totales en el extracto acuoso y sus fracciones se llevó a cabo siguiendo la metodología de Ghorai *et al.*, (2012). Se tomaron 100 µL de muestra y se les añadió 1 mL de cloroformo, dejando en reposo en hielo durante 15 min. Posteriormente a cada tubo se les añadió 100 µL de ácido sulfúrico concentrado y se dejaron en incubación en una cama de hielo en oscuridad durante 90 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se recuperó la fase rojiza de los tubos en tubos nuevos y se les añadió 450 µL de metanol y se mezcló. La absorbancia se midió a 538 nm en un espectrofotómetro de UV-visible. El contenido de terpenos totales se cuantificó empleando una curva de calibración del estándar linalool obtenida a partir de siete concentraciones (1-30 mg/mL) ($[A_{538} = 0.041 [\text{Linalool}] - 0.0408, r = 0.966]$). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de linalool por gramo de extracto seco (mg EL/g ES).

Identificación y cuantificación de compuestos volátiles por CG-EM

Para la cuantificación e identificación de compuestos volátiles del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* y sus fracciones, se realizó el análisis por CG-EM siguiendo la metodología descrita por Torres-Martínez *et al.* (2014), realizada en el Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM, campus Morelia. Se inyectó 1 µL del extracto y fracciones, disuelto en metanol, en un cromatógrafo 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 × 0.25 mm de diámetro interno × 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.

El porcentaje de los componentes de los compuestos volátiles 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-alcános 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 (2017).

La concentración de cada compuesto se cuantificó con el método de estándar interno usando una solución de tetradecano de concentración conocida (0.125 mg/mL). Esta concentración fue referida al peso seco de tejido presente en cada una de las muestras.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{ÁREA pico} \times 0.125 \text{ mg tetradecano}}{\text{ÁREA tetradecano}}$$

Las concentraciones relativas se reportaron en el porcentaje del contenido (%) de la muestra.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$), una prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) empleando el software estadístico SPSS IBM versión 26.

8.3.5. Resultados y discusión

Contenido de terpenos totales en el extracto acuoso de tallo y sus fracciones

En esta etapa de la investigación se realizó la determinación del contenido total de terpenos en el extracto acuoso de tallo y las fracciones de *V. sphaerocephala*. Los resultados se muestran en la figura 12. La fracción hexánica no pudo ser analizada debido a que presentó un bajo rendimiento.

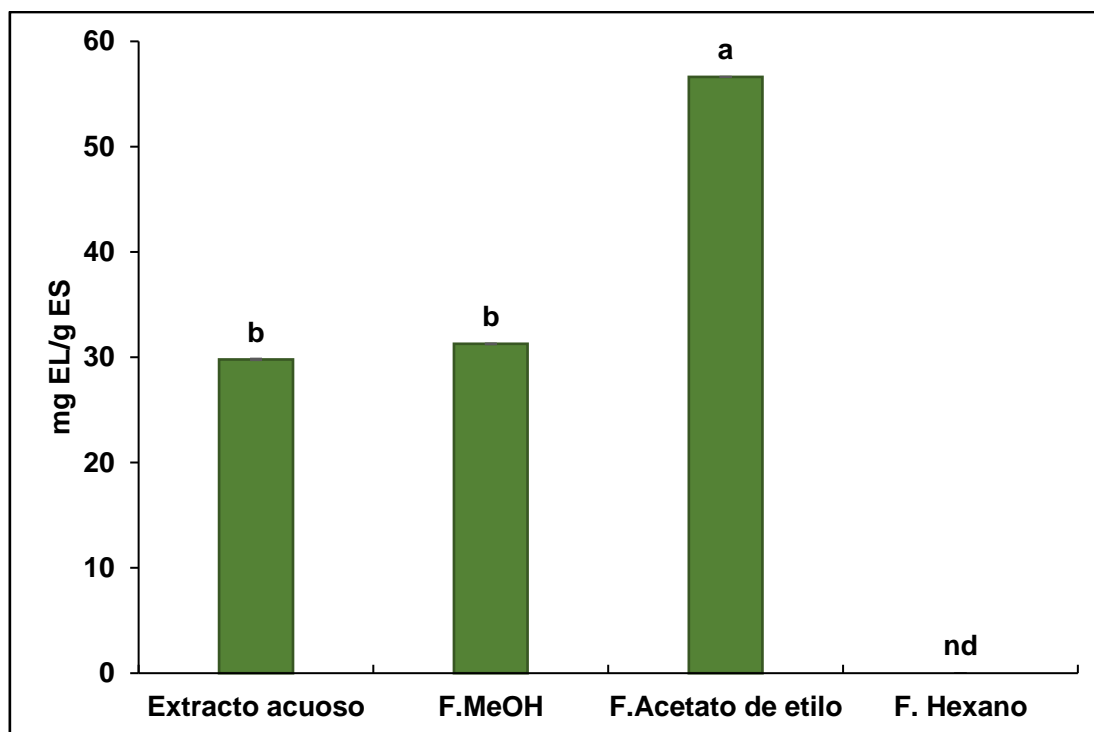


Figura 12. Contenido de terpenos totales del extracto acuoso de tallo y tres fracciones de *V. sphaerocephala*. Letras diferentes significan diferencia significativa. ANOVA, post hoc Tukey ($p \leq 0.05$, $n=3$).

El rango de concentración de terpenos fue 29.8 a 56.63 mg EL/g ES, obteniendo el mayor contenido en la fracción de acetato de etilo, con valores similares tanto el extracto acuoso (29.8 mg EL/g ES) como en la fracción metanólica (31.27 mg EL/g ES), sin diferencias significativa entre estos dos. En investigaciones recientes con *V. sphaerocephala*, Aguilar-Mejía (2023) reportó que en el hidrolato de tallos se obtuvo 1.13 ± 1.24 mg EL/g ES, 26.37 veces inferior al contenido del extracto acuoso de tallos. Asimismo, se reporta que la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallos de *V. sphaerocephala* contiene 7.8 mg EL/g ES, 7.26 veces menor a lo cuantificado en la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de tallo.

Uno de los factores que influye en la extracción de los compuestos de naturaleza terpénica es la temperatura del disolvente. Truong *et al.* (2021) reportaron un contenido de terpenos más alto al emplear el disolvente de extracción (hexano:acetona) a una temperatura de 66°C (815.52 mg EL/g) en comparación del mismo disolvente a una temperatura de 6°C (453.70 mg EL/g), sugiriendo que la temperatura alta favorece la extracción de compuestos terpénicos de los diferentes tejidos vegetales.

Debido a que los terpenos solo contienen carbono e hidrógeno en su estructura, pueden recuperarse con la extracción con disolventes menos polares, mientras que los terpenoides, que tienen grupos funcionales polares (hidroxilo, carboxilo e incluso amino) o incluso pueden ser glicosilados (saponinas), se extraen con solventes de polaridad intermedia a alta; por ejemplo, el cloroformo, metanol y agua (Aziz *et al.*, 2018).

Otras variables que intervienen son el tiempo de colecta de la planta, tipo de suelo en la cual ésta se encuentre, factores bióticos y abióticos, disolvente a emplear, método y tiempo de extracción, por mencionar algunos (González-Hernández *et al.*, 2021). Con el método de maceración, usando agua a 90 °C, se obtienen compuestos polares, mayormente fenólicos, con una mezcla de menos polares como algunos tipos de terpenos, como lo reporta Patel *et al.* (2021).

En esta investigación, este tipo de extracción mayormente extrajo compuestos fenólicos (Capítulo 8.3), pero se identificó la presencia de terpenos, siendo los sesquiterpenos los que más abundan.

Identificación de compuestos terpénicos en el extracto acuoso de *V. sphaerocephala* y sus fracciones

De acuerdo con el análisis de CG-EM (Cuadro 8), en el extracto acuoso se identificaron un total de 26 compuestos, de los cuales el 88.46% corresponde al grupo de los

sesquiterpenos mientras que el 7.69% a los fenilpropanoides y el 3.84% restante son monoterpenos. Los compuestos mayoritarios en el extracto acuoso son el isoleudeno (0.531 mg/g ES), nerolidol (0.346 mg/g ES), α -bisabolol (0.285 mg/g ES) y el elemol (0.245 mg/g ES). En la figura 13 se muestra un cromatograma del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala*, como ejemplo de lo obtenido por el análisis de CG-EM.

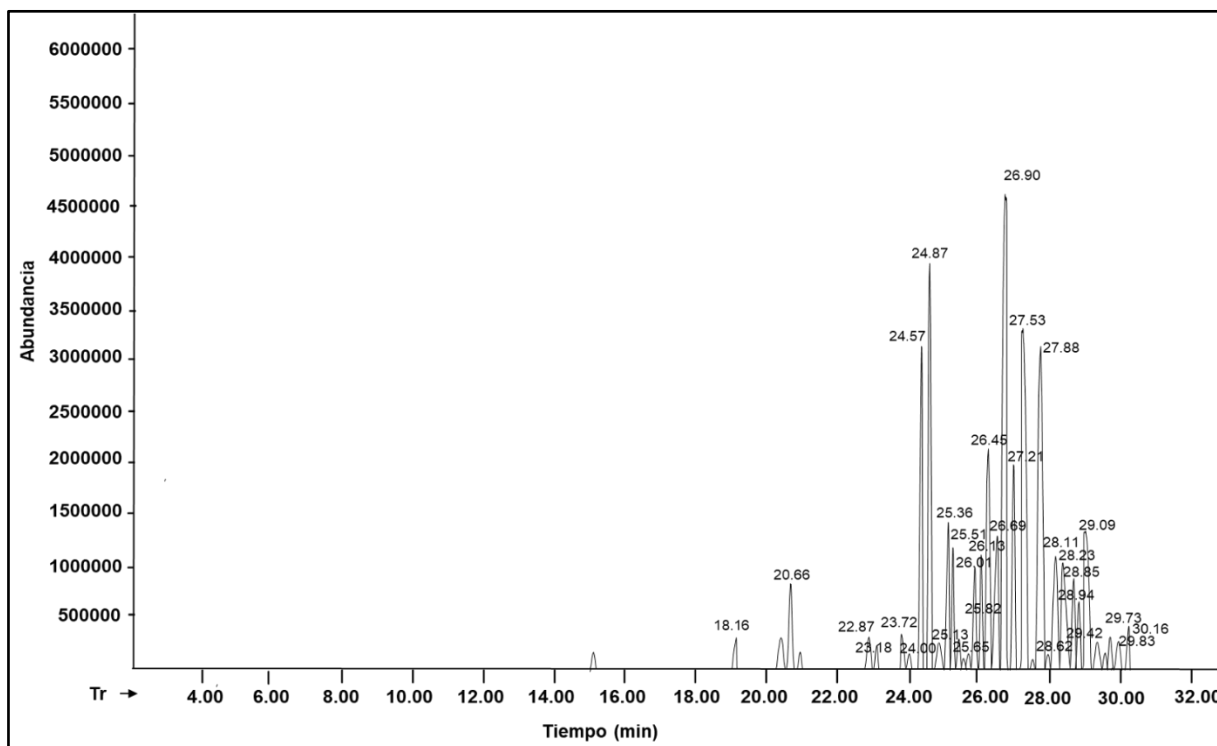


Figura 13. Cromatograma del extracto acuoso de tallo de *Verbena sphaerocephala*, obtenido por CG-EM.

Cuadro 8. Identificación y cuantificación de compuestos terpénicos en el extracto acuoso de tallo de *Verbesina sphaerocephala* y sus fracciones.

Tiempo de Retención (min)	Compuesto	Extracto		Fracciones					
		%	mg/g ES	Metanólica		Acetato de etilo		Hexánica	
				%	mg/g ES	%	mg/g ES	%	mg/g ES
18.16	p-Vinilguaiacol	1.13	0.029	1.09	0.028	-	-	-	-
20.66	Metileugenol	1.17	0.030	1.56	0.041	1.12	0.029	-	-
22.87	Isopiperitona	1.08	0.028	-	-	-	-	-	-
23.18	Cadineno	1.02	0.026	-	-	-	-	-	-
23.72	Timol	1.38	0.035	-	-	-	-	-	-
24.00	Copaeno	1.00	0.026	-	-	-	-	-	-
24.57	Elemol	9.44	0.245	2.34	0.061	13.72	0.356	-	-
24.87	Nerolidol	13.34	0.346	-	-	15.68	0.407	-	-
25.13	Cariofileno óxido	1.33	0.034	-	-	1.48	0.038	1.26	0.032
25.29	Muuroleno	1.13	0.029	-	-	-	-	-	-
25.36	Cariofileno	1.78	0.046	4.34	0.112	3.68	0.095	-	-
25.51	Cedrendiol	1.13	0.029	2.28	0.059	2.46	0.063	-	-
26.01	Cubenol	1.98	0.051	3.22	0.083	2.67	0.069	-	-
26.13	Thujopseno	1.38	0.035	-	-	1.12	0.029	-	-
26.45	β -Guaieno	1.47	0.038	-	-	4.45	0.115	2.56	0.066
26.69	Cadinol	1.11	0.028	-	-	3.24	0.084	1.12	0.029
26.90	Isoledeno	20.45	0.531	-	-	22.45	0.583	4.68	0.121
27.21	Ledol	3.22	0.083	-	-	4.34	0.112	2.56	0.066
27.53	α -Santalol	8.18	0.212	-	-	-	-	6.34	0.164
27.88	α-Bisabolol	10.97	0.285	2.24	0.05824	20.22	0.52572	3.22	0.083
28.11	Drimenol	1.04	0.027	-	-	-	-	2.22	0.057
28.62	Espatuleno	1.12	0.029	-	-	1.21	0.03146	1.18	0.030
28.85	Ambrosina	1.06	0.027	-	-	-	-	4.22	0.109
28.94	Isoaromadendreno epóxido	1.43	0.037	-	-	-	-	1.18	0.030
29.09	β -Cedrenol	1.77	0.046	-	-	1.28	0.03328	1.12	0.029
30.16	Santonina	1.08	0.028	-	-	-	-	1.11	0.028

En las fracciones se observó una variación en cuanto a la presencia y contenido de compuestos terpénicos, observándose una separación de acuerdo con la polaridad de los disolventes de fraccionamiento. En la fracción de metanol se identificaron 7 compuestos, siendo el 71.43% sesquiterpenos y el resto (28.57%) fenilpropanoides. En esta fracción los compuestos mayoritarios fueron el cariofileno (0.112 mg/g ES), cubenol (0.083 mg/g ES), elemol (0.061 mg/g ES) y el cedrendiol (0.059 mg/g ES). En la fracción de acetato de etilo se detectaron 15 compuestos de los cuales el 93.33% pertenece al grupo de los sesquiterpenos y el 6.67% restante corresponde a los fenilpropanoides. Al igual que en el extracto acuoso, los compuestos mayoritarios son el isoledeno (0.583 mg/g ES), α -bisabolol (0.525 mg/g ES), nerolidol (0.407 mg/g ES) y elemol (0.356 mg/g ES). Finalmente, en la fracción de hexano, se encontraron 13 compuestos, siendo todos del grupo de los sesquiterpenos. Los compuestos mayoritarios en esta fracción son el α -santalol (0.164 mg/g ES), isoledeno (0.121 mg/g ES), ambrosina (0.109 mg/g ES) y el α -bisabolol (0.083 mg/g ES).

Aguilar-Mejía (2023) realizó la identificación de compuestos terpénicos empleando CG-EM, reportando en el hidrolato de tallos de *V. sphaerocephala* ambrosina, metileugenol, cariofileno, β -cedrenol, cedrendiol y santonina, mismos que se encuentran presentes en el extracto acuoso de tallos. En este mismo estudio, en la fracción de acetato de etilo del hidrolato de tallos se identificó la presencia de isoledeno, nerolidol y α -bisabolol, compuestos que también se reportaron en la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso, variando el contenido.

Por otro lado, Arciniegas *et al.* (2020) identificaron cadinenos y lactonas sesquiterpénicas en partes aéreas de *V. sphaerocephala*; sin embargo, no es posible saber con certeza en qué tejido se encuentran dichos compuestos debido a la naturaleza del extracto del estudio. Por lo que se resalta que los compuestos identificados en este estudio se encuentran en los tejidos de tallos de esta planta.

Un aspecto importante para destacar en esta investigación es la concentración de compuestos terpénicos en la fracción de acetato de etilo en comparación con el

extracto acuoso, la cual fue mayor en sus compuestos mayoritarios. Ismail y Chua (2020) mencionan que el usar el método de bipartición líquido-líquido es empleado para recuperar compuestos terpénicos de un extracto crudo, utilizando diferentes disolventes con polaridad variable dependiendo del tipo de terpenos a obtener. Asimismo, González-Hernández *et al.* (2024) destacan que este método (bipartición líquido-líquido) es excelente para concentrar y enriquecer compuestos terpénicos, principalmente a aquellos que tengan en sus estructuras grupos funcionales carboxilo o amino con cualidades ácido-base.

Con los resultados presentados en esta investigación (Capítulos 8.1. y 8.2), el extracto acuoso de tallo y la fracción de acetato de etilo, mostraron una alta actividad antioxidante y antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, sugiriendo que los compuestos terpénicos volátiles pueden ser los responsables de dichas actividades en sinergia con otros compuestos presentes en los tratamientos, como los compuestos fenólicos (Capítulo 8.2).

8.3.6. Conclusiones

Se determinó el contenido de terpenos totales, así como la identificación y cuantificación de compuestos volátiles en el extracto acuoso de tallo y las fracciones (metanol, acetato de etilo y hexano) de *V. sphaerocephala*. Se identificaron nuevos compuestos terpénicos en el tejido de tallo, perteneciendo en su mayoría al grupo de los sesquiterpenos, sugiriendo que este grupo de terpenos es predominante en la especie *V. sphaerocephala*.

Con el enriquecimiento de compuestos volátiles en la fracción de acetato de etilo, se sugiere que los mayoritarios como elemol, nerolidol, isoleodeno, α -santalol y α -bisabolol, son los responsables tanto de la actividad antifúngica como de la actividad antioxidante, reportada en los capítulos 8.1 y 8.2.

8.3.7. Referencias

- Aguilar-Mejía, Y. (2023). Efecto antioxidante y antifúngico de los compuestos volátiles del hidrolato de tallos y hojas de *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae). [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/16636#:~:text=AA%2FmL\),Verbesina%20sphaerocephala%20A.,hidrolatos%20de%20hojas%20y%20tallos.](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/16636#:~:text=AA%2FmL),Verbesina%20sphaerocephala%20A.,hidrolatos%20de%20hojas%20y%20tallos.)
- Arancibia, L., Naspi, C., Pucci, G., y María, A. (2013). Biological activity of a furanoterpenoid isolated from *Senecio filaginoides* var. *filaginoides*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(1), 18-23.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L., y de Vivar, A. R. (2020). Cadinenes and other metabolites from *Verbesina sphaerocephala* A. Gray. *Biochemical Systematics and Ecology*, 93, 104183. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104183
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., ... y Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100-1110. DOI: 10.2174/1389200219666180723144850
- Barajas Pérez, Juan Saúl, Montes-Belmont, Roberto, Castrejón Ayala, Federico, Flores-Moctezuma, Hilda Elizabeth, y Serrato Cruz, Miguel Ángel. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista mexicana de micología*, 34, 85-91. DOI: 10.33885/sf.2011.3.1092
- Cadena-Rodríguez, Y. J., Vázquez-Sánchez, M., Cruz-Cárdenas, G., y Villaseñor, J. L. (2019). Use of ecological niche models of plant species to optimize placement of apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 63(2), 243-265. DOI: 10.2478/JAS-2019-0017
- Deiró, E., Vale, V., Boness, H., y Marques, E. (2023). Biological and phytochemical study of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake (Asteraceae): Estudo biológico e fitoquímico das folhas de *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake (Asteraceae). *Concilium*, 23(23), 712-735. DOI: 10.53660/CLM-2666-23U61
- Divya-Ramakrishnan, C.K.; Doss, D.; Vijayabharathi, A. Biochemical and Antimicrobial Characterization of an Underexploited Medicinal Plant-*Verbesina encelioides*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2017, 6, 3407–3416. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.612.396.

- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., y Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.051
- Galvez, C. E., Jimenez, C. M., Gomez, A. de los A., Lizarraga, E. F., y Sampietro, D. A. (2018). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Senecio nutans*, *Senecio viridis*, *Tagetes terniflora* and *Aloysia gratissima* against toxigenic *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Natural Product Research*, 34(10), 1442–1445. DOI: 10.1080/14786419.2018.1511555
- Ghorai, N., Chakraborty, S., Guichait, S., Saha, S. K., y Biswas, S. (2012). Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*. DOI: 10.1038/protex.2012.055
- Gladikostić, N., Ikonić, B., Teslić, N., Zeković, Z., Božović, D., Putnik, P., ... y Pavlić, B. (2023). Essential oils from Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae and Lamiaceae families grown in Serbia: Comparative chemical profiling with *in vitro* antioxidant activity. *Plants*, 12(4), 745. DOI: 10.3390/plants12040745
- González-Hernández, R. A., Valdez-Cruz, N. A., y Trujillo-Roldán, M. A. (2024). Factors that influence the extraction methods of terpenes from natural sources. *Chemical Papers*, 78(5), 2783-2810. DOI: 10.1007/s11696-024-03339-z
- Ismail, N. I. M., y Chua, L. S. (2020, December). Solvent partition for terpenoid rich fraction from crude extract of *Eurycoma longifolia*. In *Third International Conference on Separation Technology 2020 (ICoST 2020)* (pp. 62-67). Atlantis Press. DOI: 10.2991/aer.k.201229.009
- Kanwal, A., Bilal, M., Rasool, N., Zubair, M., Shah, S. A. A., y Zakaria, Z. A. (2022). Total synthesis of terpenes and their biological significance: a critical review. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1392. DOI: 10.3390/ph15111392
- Li, C., Zha, W., Li, W., Wang, J., y You, A. (2023). Advances in the biosynthesis of terpenoids and their ecological functions in plant resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11561. DOI:10.3390/ijms241411561
- Mabou, F. D., y Yossa, I. B. N. (2021). TERPENES: Structural classification and biological activities. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 16, 25-40. DOI: 10.9790/3008-1603012540
- Marín-Loaiza, J. C., Ávila, J. G., Canales, M., Hernandez, T., y Céspedes, C. L. (2008). Antifungal and antibacterial activities of endemic *Pittocaulon* spp. from Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46(1–2), 66–71. DOI:10.1080/13880200701734505

- Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., ... y Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry*: X, 13, 100217. DOI:10.1016/j.fochx.2022.100217
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., y Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710. DOI:10.3390/ijms22115710
- Patel, M., Dave, K., y Patel, P. (2021). A review on different extraction method of plants: Innovation from ancient to modern technology. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 10(12), 511-527. DOI: 10.31032/IJBPAS/2021/10.12.1044
- Perveen, S. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.79683
- Powers, C. N., Mayo, J. A., Moriarity, D. M., Vogler, B., Setzer, W. N., y McFeeters, R. L. (2022). Identification of Anticryptococcal bornyl compounds from *Verbesina turbacensis* and their structure-activity relationships. *Planta Medica*, 88(14), 1341-1347. DOI: 10.1055/a-1792-3214
- Ramseyer, J., Thuerig, B., De Mieri, M., Scharer, H. J., Oberhansli, T., Gupta, M. P., ... y Potterat, O. (2017). Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *Journal of natural products*, 80(12), 3296-3304. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00868
- 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. DOI: 10.3390/plants10030475
- Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Salgado-Garciglia, R., Hernández-García, A., Saavedra-Molina, A., del Río-Torres, R. E. N., López-Meza, J. E., ... y Medina-Medrano, J. R. (2024). Antioxidant and Antifungal Activities and Characterization of Phenolic Compounds Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UPLC-MS) of Aqueous Extracts and Fractions from *Verbesina sphaerocephala* Stems. *Plants*, 13(19), 2791. DOI: 10.3390/plants13192791
- Salmon, M., Soriano-Garcia, M., Toscano, R. A., Cardenas, J., Miranda, R., Vargas, F., y Angeles, E. (1985). Verocephol, a unique amorphane sesquiterpene. gamma.-lactol. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(21), 4171-4172. DOI: 10.1021/jo00221a044

- Sülsen, V. P., Lizarraga, E. F., Mamadalieva, N. Z., y Lago, J. H. G. (2017). Potential of terpenoids and flavonoids from Asteraceae as anti-inflammatory, antitumor, and antiparasitic agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6196198. DOI: 10.1155/2017/6196198.
- Torres-Martínez, R., Bello-González, M. Á., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., ... 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. DOI: 10.29298/rmcf.v5i21.362.
- 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. DOI: 10.1002/fsn3.2149
- 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. DOI: 10.37360/blacpma.19.18.2.11
- Velasco-Ramírez, A. P., Virgen-Calleros, G., Hernández-Herrera, R. M., Velasco-Ramírez, A., Corona-Cervantes, M. P., Munguía-Lizalde, D. M., y Hernández-Pérez, A. R. (2021). *Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(2), 339-353. DOI: 10.18781/r.mex.fit.2103-2
- Vigan, M. (2010). Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology*, 20(6), 685-692. DOI: 10.1684/ejd.2010.1066.

8.4. Capítulo 4. Análisis del efecto prooxidante del extracto acuoso de tallo de *Verbesina sphaerocephala* y la fracción de acetato de etilo en esporas de *Botrytis cinerea*

8.4.1. Resumen

El extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* y su fracción de acetato de etilo presentan una alta concentración de compuestos fenólicos y terpénicos, así como una alta actividad antioxidante y antifúngica, específicamente sobre *B. cinerea*. No obstante, se desconoce el mecanismo de acción del efecto antifúngico tanto del extracto como la fracción. Con el análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno, se observó que la fracción de acetato de etilo mostró los valores más altos (3.27 ± 0.03 UAF) en comparación con el extracto acuoso (0.34 ± 0.03 UAF). En el caso de la actividad de la enzima catalasa, tanto el extracto acuoso como la fracción de acetato de etilo disminuyeron la actividad de la enzima fúngica en el modelo de esporas, siendo la fracción de acetato de etilo la que mostró el efecto más marcado (0.17 U/mg proteína). En glutatión total, la fracción de acetato de etilo obtuvo los valores más bajos (0.0115 μmol glut/mg proteína), mientras que el extracto acuoso obtuvo valores de 0.0366 μmol glut/mg proteína. En la prueba SOD, la fracción de acetato de etilo inhibió la actividad de la enzima en un 93.32%, por otro lado, el extracto acuoso mostró porcentajes de inhibición de 46.39%. Finalmente, en la prueba viabilidad celular, la fracción de acetato de etilo afectó significativamente la viabilidad de las esporas de *B. cinerea*, obteniendo un 100% de mortalidad en comparación del extracto acuoso, el cual obtuvo valores de mortalidad de 24% en el modelo de esporas. Con estos resultados, se concluye que la fracción de acetato de etilo genera estrés oxidante en esporas de *B. cinerea*, sugiriendo este es el mecanismo de acción antifúngico de los compuestos presentes en esta fracción.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, Especies reactivas de oxígeno, extracto vegetal, fracciones, *Verbesina sphaerocephala*.

8.4.2. Abstract

The aqueous stem extract of *V. sphaerocephala* and its ethyl acetate fraction show a high concentration of phenolic and terpenic compounds, as well as high antioxidant and antifungal activity, specifically on *B. cinerea*. However, the mechanism of action of the antifungal effect of both the extract and the fraction is unknown. With the analysis of reactive oxygen species production, it was observed that the ethyl acetate fraction showed the highest values (3.27 ± 0.03 UAF) compared to the aqueous extract (0.34 ± 0.03 UAF). In the case of catalase enzyme activity, both the aqueous extract and the ethyl acetate fraction decreased fungal enzyme activity in the spore model, with the ethyl acetate fraction showing the most marked effect (0.17 U/mg protein). In total glutathione, the ethyl acetate fraction obtained the lowest values (0.0115 μmol glut/mg protein), while the aqueous extract obtained values of 0.0366 μmol glut/mg protein. In the SOD test, the ethyl acetate fraction inhibited the enzyme activity by 93.32%; on the other hand, the aqueous extract showed inhibition percentages of 46.39%. Finally, in the cell viability test, the ethyl acetate fraction significantly affected the viability of *B.*

cinerea spores, obtaining 100% mortality compared to the aqueous extract, which obtained mortality values of 24% in the spore model. With these results, it is concluded that the ethyl acetate fraction generates oxidative stress in *B. cinerea* spores, suggesting this is the mechanism of antifungal action of the compounds present in this fraction.

Keywords: *Botrytis cinerea*, reactive oxygen species, plant extract, fractions, *Verbesina sphaerocephala*.

8.4.3. Introducción

Las enfermedades causadas por hongos son una de las afecciones que más afectan a la agricultura a nivel mundial. De acuerdo con Nazarov *et al.* (2020) los hongos fitopatógenos son los organismos más agresivos que perjudican a los cultivos en todas sus etapas de producción, siendo más de 20,000 especies identificadas en investigaciones recientes, las que son causantes de diversas enfermedades (Ray *et al.*, 2017). Una de las enfermedades más devastadoras en la producción agrícola es la podredumbre gris o “moho gris”, ocasionada por el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea*, la cual se presenta en más de 1,400 especies vegetales cada año, presentándose los daños en partes aéreas de las plantas (tallos, hojas, inflorescencias y frutos) tanto en etapa de pre- y poscosecha, como ocurre en los cultivos de frutillas (fresas, zarzamora, frambuesa, arándanos), tomate, tabaco, pepino, manzana, lechuga, entre otros (Wang *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2023).

Esta enfermedad es de gran importancia económica a nivel mundial debido a la versatilidad del hongo para adaptarse al ambiente, a los factores de ataque y supresión de defensas por parte de las plantas, así como a la resistencia adquirida a una gran diversidad de fungicidas químico-sintéticos usados para su control (Sun *et al.*, 2021; Hajji-Hedfi *et al.*, 2023). Debido a lo anterior, surge la necesidad de buscar alternativas que sean más amigables con el medio ambiente, que no presenten toxicidad a los humanos u otras especies benéficas, de bajo costo y con múltiples mecanismos de acción.

Los metabolitos secundarios de plantas son una de las alternativas para el control de este tipo de hongo, por sus propiedades antifúngicas reportadas en diversas investigaciones, destacando principalmente los compuestos fenólicos y los terpénicos, que también son excelentes compuestos antioxidantes. Sus mecanismos de acción son diversos en la célula fúngica. Uno de estos mecanismos es mediante la generación de estrés oxidante, debido a que dichos compuestos en altas concentraciones ejercen un efecto prooxidante, afectando el sistema antioxidante endógeno de los hongos fitopatógenos, por la inhibición de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, entre otros mecanismos que involucran la actividad antioxidante de las células fúngicas, lo que lleva a un desequilibrio al aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ERO), provocando daños a nivel de ADN, proteínas, peroxidación de lípidos, entre otros, desencadenando la muerte celular (OuYang *et al.*, 2018; Valenzuela-Cota *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020).

En la literatura se han reportado el efecto prooxidante de compuestos terpénicos y fenólicos de diferentes extractos/fracciones en hongos. Khan *et al.* (2011) reportaron el efecto prooxidante de tres fenilpropanoides (metileugenol, eugenol y estragol) en *Candida albicans*. Asimismo, se ha demostrado que el citral promueve un efecto prooxidante en *Penicillium digitatum*, al igual que diversos compuestos volátiles de *Jacquinia macrocarpa* en *Fusarium verticillium* (OuYang *et al.*, 2018; Valenzuela-Cota *et al.*, 2019). En el caso de los compuestos fenólicos, los ácidos gálico, vanilínico, protocatecuico y siríngico, así como la quercetina y el kaemferol identificados en fracciones de *Vitis vinífera*, han sido señalados como los responsables de la actividad prooxidante en *Botrytis cinerea*, al provocar acumulación excesiva de ERO en hifas (Cotoras *et al.*, 2014).

Anteriormente, se ha mencionado que extractos de especies del género *Verbesina* han mostrado tanto actividad antioxidante como antifúngica (Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017; Ramseyer *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2019; de Veras *et al.*, 2021) En esta investigación, en capítulos anteriores, se ha reportado que tanto el extracto acuoso del tejido de tallos como la fracción de acetato de etilo de *V. sphaerocephala*, poseen

actividad antioxidante significativa mediante diversos métodos (DPPH, ABTS, TAC y FRP), así como actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, teniendo un mayor efecto antifúngico en este último al inhibir su crecimiento micelial con valores de IC₅₀ de 0.10 mg/mL y 14.3 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por el cual, el extracto y la fracción inhiben el crecimiento de *B. cinerea*, y surge el interés de determinar si puede deberse a un efecto prooxidante. Por esto, el objetivo de esta parte de la investigación, fue analizar el efecto prooxidante del extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* y la fracción de acetato de etilo en un modelo de esporas de *B. cinerea*, determinando el resultado del estrés oxidante generado sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, la actividad de catalasa y superóxido dismutasa, así como el contenido de glutatión total y la viabilidad celular.

8.4.4. Materiales y métodos

La recolecta de los tejidos de tallos de *V. sphaerocephala*, el método de extracción u obtención de la fracción de acetato de etilo, se describen en el capítulo 7 (material biológico y métodos de extracción).

Preparación de esporas de *B. cinerea*

Las esporas de *B. cinerea* se colectaron de micelio de este hongo en cajas Petri en medio PDA con agua estéril en tubos Falcon de 15 mL. Se hizo el conteo en la cámara de Neubauer para ajustar la concentración de las esporas para los ensayos requeridos. Las esporas fueron expuestas al extracto acuoso de tallo y a la fracción de acetato de etilo en las concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀, 0.10 mg/mL y 14.8 mg/mL, respectivamente). Como controles positivos se utilizaron menadiona y peróxido de hidrógeno (5 mM), y como control negativo se usaron esporas sin ningún tratamiento, mantenidas en agua estéril a 25 ±2 °C. Se usó el metanol como blanco. Se incubaron las esporas durante 6 h a los tratamientos y posteriormente fueron usadas para las pruebas de estrés oxidante.

Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para la determinación de las especies reactivas de oxígeno se realizó la metodología de Ortiz-Ávila *et al.* (2013) con modificaciones. En tubos de ensayo se añadieron 500 μL de solución de esporas a una concentración de 1×10^3 esporas/mL expuestas a los tratamientos. Las esporas se resuspendieron en buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, 3 mM MgCl_2 y KH_2PO_4 3 mM, pH 7.4) y se incubaron a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente a cada tubo se le añadió 5 μL de la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína H_2DCFDA 5 μM durante 15 min en un baño de hielo bajo agitación constante. Posteriormente, se realizó la lectura de la absorbancia a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/520 nm en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RFRF-5301PC. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la CAT se evaluó empleando la metodología de Jeulin *et al.* (1989) con modificaciones, evaluando la concentración de oxígeno disuelto, empleando un oxímetro con electrodo tipo Clark, después de la adición de H_2O_2 como lo describió Jeulin *et al.* (1989), con ligeras modificaciones. En tubos de ensayo se añadieron 500 μL de la solución de esporas a una concentración de 4.6×10^5 esporas/mL. Los tratamientos se resuspendieron en buffer de fosfatos (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 0.1 M) con EDTA 5 mM (pH 7.6) y se incubaron durante 6 h. Posteriormente, se llevaron a una cámara de un oxímetro con electrodo tipo Clark y se agregaron 20 μL de H_2O_2 5 mM recién preparado, registrándose la conversión de H_2O_2 en oxígeno durante 150 segundos. Los resultados se expresaron como la cantidad de enzima catalasa necesaria para catalizar la neutralización de 1 μMol de H_2O_2 por minuto (U) por mg de proteína.

Determinación del contenido de glutatión total (GSht)

El contenido de glutatión total se determinó mediante la metodología propuesta por Griffith (1980) con modificaciones. En tubos de ensayo se añadieron 100 μ L de solución de esporas a una concentración de 9.3×10^6 esporas/mL. A cada tubo se le agregó 1 mL de solución PBS con tritón-X100 al 5%. Las muestras fueron sometidas en baño ultrasónico a 60° C durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente. Se llevaron a ciclos de congelación y descongelación durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 8000 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante de cada muestra para transferir a tubos nuevos. En celdas de 1 mL, por separado, se colocaron 700 μ L de buffer de fosfatos (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 0.1 M) con EDTA 5 mM (pH 7.6) atemperado y se añadieron 100 μ L de cada muestra (sobrenadante). Posteriormente se agregaron 120 μ L de una mezcla de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) [DTNB] y enzima glutatión reductasa (GR) (v/v), incubando los tubos durante 30 segundos. Finalmente se añadieron 60 μ L de solución de Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) y se mezclaron. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS a 412 nm durante 5 minutos. Los resultados se expresan como μ Mol de glutatión por miligramo de proteína.

Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa se determinó mediante un *kit* de análisis comercial (Sigma-Aldrich, USA). Para la liberación de enzimas, se realizó el mismo procedimiento que en el ensayo de contenido de glutatión. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV-visible a 450 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la enzima SOD (%).

Determinación de la viabilidad celular y germinación de esporas

La viabilidad celular y la germinación de las esporas de *B. cinerea* se determinó mediante el método de exclusión con azul de tripano, siguiendo la metodología

propuesta por Strober (2001) y Lima de Sousa *et al.* (2013). En tubos Eppendorf estériles, se agregaron 500 μL de caldo nutritivo estéril. Posteriormente se agregaron esporas de *B. cinerea* en una concentración de 1×10^3 esporas/mL y se añadieron 100 μL de cada tratamiento (IC_{50} del extracto acuoso de tallo y de la fracción de acetato de etilo, 0.10 mg/mL y 14.8 mg/mL, respectivamente), al control positivo (Benomyl50[®], 10 mg/mL) y al control negativo (metanol).

Las esporas se incubaron durante 72 h y se tomaron 10 μL de cada tratamiento para colocarlos en un portaobjetos, para determinar la viabilidad celular. Se añadieron 10 μL de colorante azul de tripano (0.1%) y se contaron 50 esporas por cada tratamiento. Se tomaron imágenes de las esporas en un microscopio Nikon[®] Eclipse E200. Los resultados se expresaron como porcentaje de mortalidad de las esporas (%).

Análisis estadístico

Los valores obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$), una prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey y Dunnett ($p \leq 0.05$) empleando el software estadístico SPSS IBM versión 26.

8.4.5. Resultados y discusión

Utilizando el modelo de esporas de *B. cinerea*, se realizó la determinación de especies reactivas de oxígeno, así como el contenido de glutatión total, la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa, así como la viabilidad de estas.

Efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno

En el cuadro 9 se muestran los resultados del efecto tanto del extracto acuoso como de la fracción de acetato de etilo de tallos de *V. sphaerocephala*, sobre la producción de ERO en esporas de *B. cinerea*. Con la fracción de acetato de etilo se obtuvo un incremento de la producción de ERO, obteniendo valores de 3.27 UAF/mg de proteína,

siendo iguales a los obtenidos en el tratamiento con menadiona, de acuerdo con la prueba de Dunnett (Cuadro 9). No obstante, con la adición del extracto acuoso de tallos, se obtuvieron valores menores de ERO (0.31 UAF/mg de proteína), similares a los observados con metanol (blanco) y en las esporas no tratadas (control negativo), aunque menor que con H₂O₂, aunque esto se explica por la concentración elevada utilizada de este (Ransy *et al.*, 2020). El uso de H₂O₂ es un procedimiento para causar estrés oxidante en modelos celulares. La reacción de Fenton entre H₂O₂ y iones Fe²⁺ genera el radical OH altamente reactivo y se cree que es el principal mecanismo para causar dicho daño oxidativo (Ward *et al.*, 1987), por lo que es utilizado en el modelo de esporas de *B. cinerea* para determinar su efecto prooxidante. Los valores de ERO en las esporas sin tratamiento (0.21 UAF/mg de proteína) no mostraron diferencia significativa a lo observado al adicionar metanol (0.23 UAF/mg de proteína), pero la producción de ERO inducida por la fracción de acetato de etilo fue de 15.6 veces más que lo obtenido en este control y 12.1 veces más que el extracto (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), glutatión total y actividad de enzimas CAT y SOD en esporas de *Botrytis cinerea* tratadas con el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo de *Verbesina sphaerocephala*.

Muestra	ERO UAF	CAT U/mg prot	GLUTATIÓN TOTAL (GSH) μ Mol/mg prot	SOD (% inhibición)
Extracto acuoso	0.31 \pm 0.03	6.21 \pm 0.78*	0.04 \pm 0.002	46.39 \pm 0.61*
Fracción de acetato de etilo	3.27 \pm 0.03*	4.25 \pm 0.29*	0.01 \pm 0.001*	93.32 \pm 0.52*
Menadiona	3.75 \pm 0.41*	4.51 \pm 0.15*	0.12 \pm 0.002*	25.64 \pm 0.68*
H₂O₂	22.41 \pm 0.19*	5.70 \pm 0.59*	0.012 \pm 0.001*	63.19 \pm 0.26*
Metanol	0.23 \pm 0.03	16.24 \pm 1.93	0.04 \pm 0.002	0 \pm 0
Esporas NT	0.21 \pm 0.03	16.68 \pm 0.03	0.04 \pm 0.001	0 \pm 0

Los valores representan la media \pm D.E. (desviación estándar), n=6. (*) indica diferencias estadísticas significativas comparado con el grupo control (Esporas sin tratamientos) de acuerdo con la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). UAF: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia. U: Cantidad de enzima para catalizar la neutralización de 1 μ Mol de H₂O₂ x min. NT: Esporas No Tratadas

En otros trabajos se reporta que tanto los extractos o fracciones obtenidas de estos presentan actividad antifúngica al inducir el incremento de ERO. Cotoras *et al.* (2014) evaluaron el efecto prooxidante de fracciones de acetato de etilo y cloroformo, provenientes de extractos de *Vitis vinífera*, y observaron que dichas fracciones indujeron la producción excesiva de ERO intracelulares en *B. cinerea*, debido al alto contenido de compuestos fenólicos presentes en las fracciones.

Por otro lado, Valenzuela-Cota *et al.* (2019) estudiaron la producción de ERO en un modelo con esporas de *Fusarium verticillioides* expuestas a una fracción butanólica del extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa*, demostrando que, a concentraciones elevadas de la fracción, se incrementa el contenido de ERO en las esporas de *F. verticillioides*, atribuyéndole el efecto a los compuestos volátiles presentes en la fracción butanólica y que se relacionó con su efecto antifúngico.

Efecto sobre la actividad de la enzima catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima antioxidante que pertenece al grupo de enzimas oxirreductasas, llevando a cabo la reacción con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O), ayudando a mantener un equilibrio de las especies reactivas de oxígeno generadas por el metabolismo celular (Valdez-Solana *et al.* 2021). En el caso de la actividad de la enzima catalasa en esporas de *B. cinerea*, se observó que esta actividad fue inhibida por el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo. Al igual que en el ensayo anterior (determinación de ERO), con la fracción de acetato de etilo de obtuvo el mayor efecto, al disminuir la actividad de la enzima (4.25 U/mg de proteína) en comparación con el control de esporas sin tratamiento (16.68 U/mg de proteína) y observándose resultados similares de disminución de la enzima en los tratamientos con menadiona (4.51 U/mg de proteína), con H_2O_2 (5.70 U/mg de proteína) y con el extracto acuoso (6.21 U/mg de proteína) (Cuadro 9).

Valenzuela-Cota *et al.* (2019) reportaron que la fracción butanólica de *J. macrocarpa* disminuyó la actividad de esta enzima (8 U/mg de proteína) en esporas del hongo *Fusarium verticillioides*, indicando que los compuestos volátiles presentes en esta fracción fueron los responsables del efecto. Asimismo, de acuerdo con García *et al.* (2021), el extracto acuoso de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) inhibió la actividad de la enzima catalasa en *Plasmopara viticola* después de 6 h de exposición al extracto, efecto similar a lo observado en este estudio con el extracto acuoso de tallo y su fracción de acetato de etilo. De igual manera, el extracto de acetato de etilo de *Artemisia argyi* mostró efecto en la enzima catalasa del hongo *Verticillium dahliae*, al incrementar las unidades de esta en respuesta al aumento de radicales libres por la exposición al extracto (Wang *et al.*, 2021).

Efecto sobre el contenido de glutatión total (GSH)

El glutatión es un tripéptido antioxidante que se constituye de los aminoácidos cisteína, ácido glutámico y glicina. Tiene múltiples funciones dentro de la célula, entre las cuales se destaca la disminución de ERO (Bonola-Gallardo *et al.*, 2014). En el cuadro 9 se muestran los resultados para la determinación del contenido de glutatión total en *B. cinerea*. Se observan valores de contenido bajos, debido a la baja actividad metabólica en el modelo experimental empleado (esporas). Siguiendo la tendencia que se observó en las dos pruebas anteriores, la fracción de acetato de etilo mostró un efecto notable en el contenido de glutatión total al disminuir su contenido en las esporas de *B. cinerea* (0.012 μmol de glut/mg de proteína), igual que lo producido por menadiona (0.012 μmol de glut/mg de proteína). No obstante, el extracto acuoso no afectó el contenido de glutatión total (0.04 μmol de glut/mg de proteína) al mostrar contenidos similares a los de los controles negativos, esporas no tratadas y tratadas con metanol (0.04 y 0.04 μmol de glut/mg de proteína, respectivamente). El mecanismo de acción de este compuesto es generar estrés oxidante dentro de las células, activando poros de transición y aumentando las ERO mediante un mecanismo de ciclo redox, derivando en apoptosis (Criddle *et al.* 2006; Loor *et al.* 2010). Se sugiere que el contenido de

glutación se incrementó en respuesta al aumento de ERO con el tratamiento de menadiona.

En otros estudios se ha demostrado que diversos compuestos poseen efecto en el contenido de glutación. Bertóti *et al.* (2016) evaluaron el efecto de los compuestos volátiles del aceite esencial de hojas y raíces de *Armoracea rusticana* en un modelo de *Candida albicans*, indicando que los niveles de glutación total disminuyen a medida que se aumenta la concentración del aceite esencial. Por otro lado, terpenos como el citral disminuyen el contenido de glutación total en el hongo *Penicillium digitatum*, acentuándose el efecto a medida que aumenta el tiempo de exposición al compuesto (OuYang *et al.*, 2018).

Efecto sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que pertenece a la familia de las metaloenzimas, con actividad antioxidante significativa, ya que participa en la regulación de ERO intracelulares, producidas por los procesos metabólicos en la célula. Esta enzima cataliza la reacción para dismutar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (Wang *et al.* 2017).

En este estudio se evaluó la actividad de SOD en esporas de *B. cinerea* expuestas a diferentes tratamientos (Cuadro 9). Observándose la misma tendencia que en las pruebas anteriores, la fracción de acetato de etilo demostró tener el mayor efecto en esta enzima, al inhibir su actividad en un 93.32%. No obstante, el extracto acuoso de tallo obtuvo valores de inhibición de 46.39% 2.01 veces menor a lo observado con la fracción. Con los controles de menadiona y H_2O_2 , se inhibió la actividad de SOD en un 25.64% y 63.19%, respectivamente, valores menores a lo observado con la fracción de acetato de etilo.

En otros trabajos se ha evaluado el efecto tanto de extractos como de fracciones en la actividad de SOD. Valenzuela-Cota *et al.* (2019) reportaron que la fracción butanólica

de *J. macrocarpa* inhibe la actividad de SOD en concentraciones inferiores a 1 mg/mL, atribuyéndosele este efecto a la mezcla variada de compuestos volátiles en la fracción. Por otro lado, el compuesto 7-(5-hidroxi-3,7-dimetilocta-2,6-dieniloxi)-cromen-2-ona (5'-hidroxi-aurapteno) aislado de *Lotus lalambensis* modula la actividad de SOD en *Aspergillus flavus*, por regulación del estrés oxidante (Ali *et al.*, 2021). De igual manera, Yang *et al.* (2020) investigaron la actividad antifúngica de cembratrien-dioles (diterpenos) de *Nicotiana tabacum* en el hongo *B. cinerea*, reportando que estos compuestos poseen una alta actividad antifúngica, lo que se relacionó directamente con la inhibición de la actividad de SOD en este hongo, provocando un efecto de estrés oxidante.

Efecto sobre la viabilidad y la germinación celular

El principio de la tinción de azul de tripano se basa en que las células que son viables presentan membranas celulares que están íntegras, limitando la penetración de ciertas sustancias, como el azul de tripano entre otras. No obstante, si hay daño en la membrana celular, el colorante ingresa al interior de la célula, obteniendo células teñidas de azul (Strober, 2015). En el cuadro 10 se presentan los resultados del efecto del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala* y de la fracción de acetilo, con este ensayo de viabilidad en las esporas de *B. cinerea*, así como a sus respectivos controles.

El tratamiento con la fracción de acetato de etilo fue el más efectivo al mostrar valores de mortalidad del 100% de las esporas de *B. cinerea*. Asimismo, se inhibió la germinación de las esporas cuando estas fueron cultivadas en medio PDA (Figura 14). En el tratamiento con el extracto acuoso, se obtuvo una viabilidad mayor (24% de mortalidad) en las esporas, visualizándose en el microscopio esporas sin tinción y presentando tubos germinativos, coincidiendo con lo observado al cultivarse en medio PDA, en las cuales hubo crecimiento de micelio.

Con estos resultados, se sugiere que en esporas de *B. cinerea*, la fracción de acetato de etilo posee actividad fungicida y el extracto acuoso de tallo presenta un efecto fungistático (Figura 14). Estos resultados coinciden con los obtenidos con la fracción de acetato de etilo al determinar su efecto sobre la inducción de ERO en el modelo *in vivo* de esporas de *B. cinerea*, en los que el extracto presentó una menor inducción en la producción de ERO y un efecto menor sobre la actividad de SOD y en el contenido de glutatión (Cuadro 10).

Cuadro 10. Viabilidad celular (%) de esporas de *B. cinerea* tratadas con el extracto acuoso y la fracción de etilo de tallos de *Verbesina sphaerocephala*.

Muestra	Mortalidad (%)
Extracto	24 ± 2 ^b
Fracción	100 ^a
Benomy150 [®]	100 ^a
Metanol	0 ^c
Esporas	0 ^c

Los valores representan la media ± D.E. (desviación estándar) del porcentaje de mortalidad, n=3. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas comparado con el grupo control (esporas sin tratamientos). ANOVA, post hoc Tukey ($p < 0.05$).

Una de las posibles causas de la pérdida de viabilidad de las esporas de *B. cinerea* expuestas a la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *V. sphaerocephala* es por daños a la membrana y pared celulares fúngicas, ya que dicha fracción es rica en compuestos fenólicos y terpénicos. Ambos tipos de compuestos han sido identificados tanto en el extracto acuoso como en la fracción (Capítulos 2 y 3), de los que se reportan algunos compuestos fenólicos que afectan la integridad de la membrana celular lo que lleva a la pérdida del contenido intracelular (Li y Zhu, 2021).

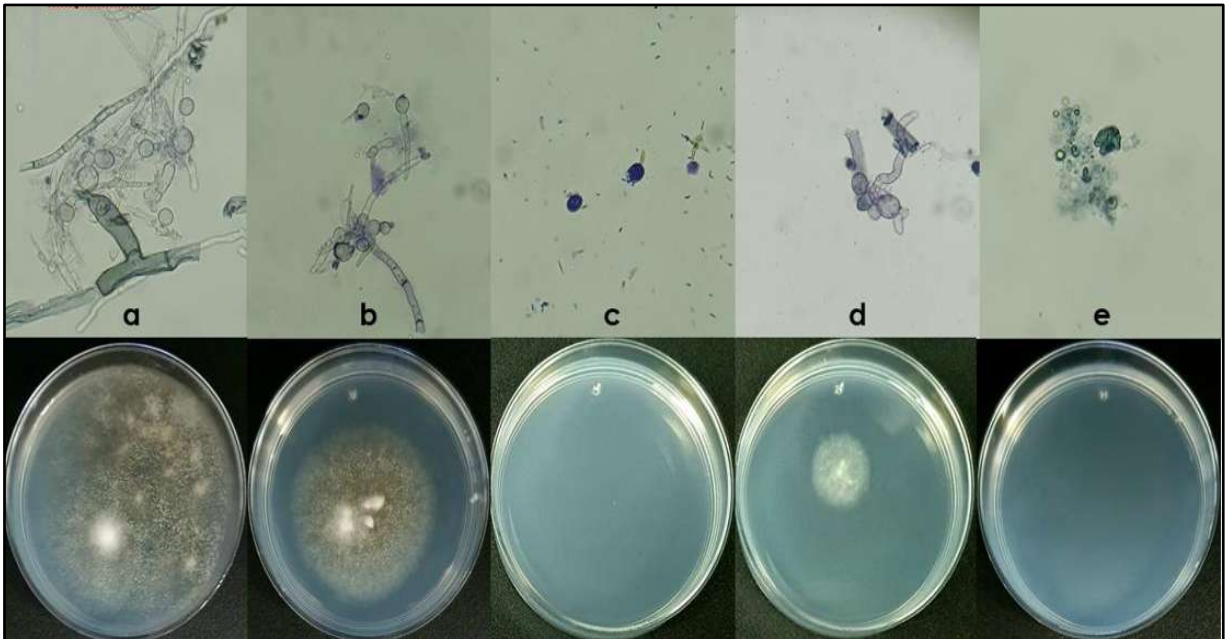


Figura 14. Viabilidad y germinación de esporas de *B. cinerea* expuestas a diferentes tratamientos. **(a)** Esporas no tratadas; **(b)** Esporas tratadas con metanol; **(c)** Esporas tratadas con Benomyl50®; **(d)** Esporas tratadas con el extracto acuoso de tallo; y **(e)** Esporas tratadas con la fracción de acetato de etilo.

En el caso de los terpenos, también se han reportado que ocasionan una serie de daños que van desde la distorsión y malformaciones en hifas, destrucción de la pared celular, así como desestabilización de orgánulos en citoplasma (Kim *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2016). Otros inducen apoptosis por modulación de especies reactivas de oxígeno (Asif *et al.* 2016) o afectan la biosíntesis de ergosterol (Fonseca Bezerra *et al.* 2020; Eddin *et al.* 2022).

8.4.6. Conclusiones

Tanto el extracto acuoso como la fracción de acetato de etilo de tallos de *V. sphaerocephala* generan estrés oxidante en esporas de *B. cinerea*. Con la fracción de acetato de etilo se obtuvo el mayor efecto, inhibiendo la actividad de catalasa y superóxido dismutasa, así como disminuyendo el contenido de glutatión total, lo que

se relacionó con la producción de especies reactivas de oxígeno. Debido a que con la fracción de acetato de etilo se obtuvo un 100% de mortalidad, se sugiere que esta actividad antifúngica es resultado de un efecto prooxidante, debido al sinergismo entre los compuestos fenólicos y terpénicos, identificados en esta fracción y en un mayor contenido que el extracto acuoso.

8.4.7. Referencias

- Asif, M., Shafaei, A., Jafari, S. F., Mohamed, S. K., Ezzat, M. O., Majid, A. S. A., ... y Majid, A. M. S. A. (2016). Isoledene from *Mesua ferrea* oleo-gum resin induces apoptosis in HCT 116 cells through ROS-mediated modulation of multiple proteins in the apoptotic pathways: a mechanistic study. *Toxicology Letters*, 257, 84-96. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.05.027
- Bertóti, R., Vasas, G., Gonda, S., Nguyen, N. M., Szőke, É., Jakab, Á., ... y Emri, T. (2016). Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *Journal of basic microbiology*, 56(10), 1071-1079. DOI: 10.1002/jobm.201600082
- Bonola, I. F., Irigoyen, M. E., Vera, L. I., Campero, A., y Hamdan, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias clínicas*, 15(1), 2-8. DOI: 10.1016/j.cc.2015.06.002
- Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., y Mendoza, L. (2014). In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules*, 19(12), 21154-21167. DOI: 10.3390/molecules191221154
- Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., ... y Petersen, O. H. (2006). Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40485-40492. DOI: [10.1074/jbc.M607704200](https://doi.org/10.1074/jbc.M607704200)
- de Veras, B. O., de Oliveira, J. R. S., de Menezes Lima, V. L., Navarro, D. M. D. A. F., de Oliveira Farias, J. C. R., de Medeiros Moura, G. M., ... y de Souza Lopes, A. C. (2021). The essential oil of the leaves of *Verbesina macrophylla* (Cass.) SF Blake has antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activities and is toxicologically safe. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113248. DOI: [10.1016/j.jep.2020.113248](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113248)

- Eddin, L. B., Jha, N. K., Goyal, S. N., Agrawal, Y. O., Subramanya, S. B., Bastaki, S. M., y Ojha, S. (2022). Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of α -bisabolol. *Nutrients*, 14(7), 1370. DOI: 10.3390/nu14071370
- Fayzi, L., Askarne, L., Boufous, E. H., Cherifi, O., y Cherifi, K. (2022). Antioxidant and antifungal activity of some Moroccan seaweeds against three postharvest fungal pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, 21(2), 328-338. DOI: 10.3923/ajps.2022.328.338
- Folami, S. O., Nurudeen, O. Q., Falana, B. M., Ajiboye, O. A., y Bamaiyi, J. A. (2020). Involvement of Oxidative Stress in Bactericidal Activity of Vanillic Acid Against *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical and Experimental Medicine*, 1(1), 67-72. DOI: 10.47838/acem.26011977.11162020.asmeda.11.0
- Fonseca Bezerra, C., de Alencar Júnior, J. G., de Lima Honorato, R., Dos Santos, A. T. L., Pereira da Silva, J. C., Silva, T. G. D., ... y da Silva, T. G. (2020). Antifungal properties of nerolidol-containing liposomes in association with fluconazole. *Membranes*, 10(9), 194. DOI: 10.3390/membranes10090194
- García, C., Fedrigo, K., Gabriel, A., Botelho, R. V., Rodrigues, J. D., y Ono, E. O. (2021). Control of mildew in vines with cinnamon extract and catalase activity in organic production. *Research, Society and Development*, 10(10), e214101018885-e214101018885. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18885
- Hajji-Hedfi, L., Rhouma, A., Hajlaoui, H., Hajlaoui, F., y Rebouh, N. Y. (2023). Understanding the influence of applying two culture filtrates to control gray mold disease (*Botrytis cinerea*) in tomato. *Agronomy*, 13(7), 1774. DOI: 10.3390/agronomy13071774
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., ... y Mir, S. S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 85, 436-443. DOI: 10.1134/S0026261716040093
- Ho, T. T., Murthy, H. N., y Park, S. Y. (2020). Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 716. DOI: 10.3390/ijms21030716
- Khanzada, B., Akhtar, N., Okla, M. K., Alamri, S. A., Al-Hashimi, A., Baig, M. W., ... y Mirza, B. (2021). Profiling of antifungal activities and in silico studies of natural polyphenols from some plants. *Molecules*, 26(23), 7164. DOI: 10.3390/molecules26237164
- Kim SeonHong, K. S., Lee SuYeon, L. S., Hong ChangYoung, H. C., Cho SeongMin, C. S., Park MiJin, P. M., y Choi InGyu, C. I. (2016). Antifungal effect of elemol

- and eudesmol from *Cryptomeria japonica* essential oil against *Trichophyton rubrum*. *Academia Journal of Agricultural Research*, 4(8), 511-7. DOI: 10.15413/ajar.2016.0182
- Li, Q., Zhu, X., Zhao, Y., y Xie, Y. (2022). The antifungal activity of o-vanillin against *Aspergillus flavus* via disrupting ergosterol biosynthesis and promoting oxidative stress, and an RNA-seq analysis thereof. *Lwt*, 164, 113635. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113635
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Hoek, T. L. V., y Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1925-1936. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021
- Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M., y Karakozova, M. V. (2020). Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta naturae*, 12(3), 46. DOI: 10.32607/actanaturae.11026
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Moon, J. H., Lee, J. H., y Kim, K. Y. (2014). Isolation and characteristics of protocatechuic acid from *Paenibacillus elgii* HOA73 against *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Basic Microbiology*, 55(5), 625-634. DOI: 10.1002/jobm.201400041
- OuYang, Q., Tao, N., y Zhang, M. (2018). A damaged oxidative phosphorylation mechanism is involved in the antifungal activity of citral against *Penicillium digitatum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 239. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00239
- Ray, M., Ray, A., Dash, S., Mishra, A., Achary, K. G., Nayak, S., y Singh, S. (2017). Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 708-723. DOI: [10.1016/j.bios.2016.09.032](https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.032)
- Divya-Ramakrishnan, C. D., Doss, D., y Vijayabharathi, A. (2017). Biochemical and antimicrobial characterization of an underexploited medicinal plant-*Verbesina encelioides*. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6(12), 3407-3416. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.612.396
- Ramseyer, J., Thuerig, B., De Mieri, M., Scharer, H. J., Oberhansli, T., Gupta, M. P., ... y Potterat, O. (2017). Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *Journal of natural products*, 80(12), 3296-3304. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00868
- Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111:A3.B.1-A3.B.3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111

- Sun, C., Zhu, C., Tang, Y., Ren, D., Cai, Y., Zhou, G., ... y Zhu, P. (2021). Inhibition of *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes by calcium propionate. *Food Quality and Safety*, 5, fyab016. DOI: 10.1093/fqsafe/fyab016
- Valenzuela-Cota, D. F., Buitimea-Cantúa, G. V., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Martínez-Higuera, A. A., y Rosas-Burgos, E. C. (2019). Inhibition of the antioxidant activity of catalase and superoxide dismutase from *Fusarium verticillioides* exposed to a *Jacquinia macrocarpa* antifungal fraction. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(8), 647-654. DOI: [10.1080/03601234.2019.1622978](https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1622978)
- Verma, V., Chaudhary, M., y Srivastava, N. (2019). Antioxidative properties of isolated saponins of *Verbena encelioides* (Cav.) Benth. & Hook. fil ex Gray and SEM studies of synthesized green nanoparticles for acne management. *Plant Science Today*, 6(sp1), 575-582. DOI: 10.14719/pst.2019.6.sp1.675
- Wang, Y., Li, J., Chen, Q., Zhou, J., Xu, J., Zhao, T., ... y Liu, D. (2022). The role of antifungal activity of ethyl acetate extract from *Artemisia argyi* on *Verticillium dahliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1343-1356. DOI: 10.1111/jam.15298
- Wang, H. C., Li, L. C., Cai, B., Cai, L. T., Chen, X. J., Yu, Z. H., y Zhang, C. Q. (2018). Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Frontiers in Microbiology*, 9, 470. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00470
- Ward, J. F., Evans, J. W., Limoli, C. L., y Calabro-Jones, P. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, 105.
- Yang, J., Chen, Y. Z., Yu-Xuan, W., Tao, L., Zhang, Y. D., Wang, S. R., ... y Zhang, J. (2021). Inhibitory effects and mechanisms of vanillin on gray mold and black rot of cherry tomatoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 175, 104859. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104859
- Yang, Q., Wang, J., Zhang, P., Xie, S., Yuan, X., Hou, X., ... y Du, Y. (2020). In vitro and in vivo antifungal activity and preliminary mechanism of cembratrien-diols against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 154, 112745. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112745
- Yousaff, M., Shoaib, A., Fatima, Q., Bukhari, S., Ali, N., y Fatima, U. (2023). In vitro antifungal potential of vanillic acid against *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Bioresource Management*, 10(2), 1.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9.1. Efecto antifúngico *in vitro* y perfil químico de diferentes extractos de *V. sphaerocephala* sobre tres hongos fitopatógenos

Con la evaluación de la actividad antifúngica y el perfil químico de los extractos de diferentes polaridades de inflorescencias, hojas, tallos y raíces de *V. sphaerocephala* frente a los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, se determinó que el extracto acuoso de tallo inhibió el crecimiento de *B. cinerea* (1 mg/mL), lo cual se relacionó con los compuestos presentes en el extracto como fenólicos, cumarinas, quinonas, flavonoides y terpenos. Este extracto fue de los que tuvieron un mayor rendimiento (Capítulo 1), y aunque son varios los factores que afectan este resultado, como la parte vegetal, el tipo y tiempo de extracción, la temperatura y la polaridad del disolvente (Zhang *et al.*, 2018; Truong *et al.*, 2019), la alta polaridad el extracto acuoso se ha reportado con una mayor eficiencia para la obtención de extractos con un mayor rendimiento (Nawaz *et al.*, 2020). Una ventaja del uso de extractos acuosos, como el extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala*, además del alto rendimiento, es su obtención a bajo costo, la no toxicidad y su seguridad alimentaria (Choi y Verpoorte, 2019; Awad *et al.*, 2021).

En esta investigación se comprobó el efecto antifúngico de los diferentes extractos de *V. sphaerocephala* sobre los tres hongos bajo estudio, lo cual no había sido reportado, que concuerda con lo descrito para *V. encelioides*, una especie de las más estudiadas de *Verbesina*, con actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *A. flavus* (Kushwaha y Malik, 2013), *A. fumigatus* (Albalawi *et al.*, 2015) y *Fusarium oxysporum* (Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017). El efecto antifúngico del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala* es similar a lo reportado con los extractos polares de *V. encelioides* (Albalawi *et al.*, 2015), aunque con la aplicación de una concentración menor (1 mg/mL) a lo reportado para otras plantas como *Rumex vesicarius* (tallos), con un 50% de inhibición de *Helminthosporium rostratum* y *Fusarium oxysporum* a una concentración de 50 mg/mL; *Moringa oleifera* (hojas) contra *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y *Rhizopus oryzae* (31.25 a 62.5 mg/mL) (Oniha *et al.*, 2021); y de hojas de

Annona squamosa con una inhibición del 33.33% con 1 mg/mL y del 64.58% con 2 mg/mL (Kalidindi *et al.*, 2015). Esta concentración (1 mg/mL) inhibió el 100% del crecimiento micelial de *B. cinerea* y es considerada óptima, ya que la concentración fue 10 veces menor que lo requerida con el fungicida comercial (Benomyl®50, 10 mg/mL), que fue utilizado como control positivo.

En este extracto acuoso se determinó la presencia de compuestos fenólicos, cumarinas, quinonas, flavonoides y terpenos. Los ácidos fenólicos, flavonoides, polifenoles y terpenos han mostrado diversos mecanismos antifúngicos, que generalmente dañan la integridad estructural de las membranas celulares, inhibiendo ciertas enzimas del transporte de electrones, induciendo también daño mitocondrial, reduciendo la síntesis de la pared celular y modificando los sistemas de bombas de eflujo (Zaker, 2016; Kuete, 2017; Al Aboody y Mickymaray, 2020). Por lo anterior, se sugiere que sean los responsables de la actividad antifúngica, lo cual deberá demostrarse en estudios posteriores. Además, se deberá analizar si estos actúan solos o en sinergia, lo que ha sido demostrado en diversos estudios (Pusztahelyi *et al.*, 2015; Salhi *et al.*, 2017; Aboody y Mickymaray, 2020). Asimismo, estos grupos de compuestos pueden inhibir la germinación y el crecimiento micelial, o provocar apoptosis por un incremento y acumulación de ERO (Sarmiento-Guerra *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021). Sin embargo, se requieren otras aproximaciones experimentales para ver si esta es su mecanismo antifúngico.

9.2. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales, actividad antioxidante y antifúngica, y caracterización de compuestos fenólicos usando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución y Espectrometría de Masas (UPLC-MS) del extracto acuoso de tallo y fracciones de *Verbesina sphaerocephala*

Compuestos fenólicos y flavonoides totales

Con la determinación del contenido de fenoles totales (ácidos fenólicos y flavonoides) del extracto acuoso y de las fracciones de tallos de *V. sphaerocephala*, se observó que no hubo variación en cuanto al contenido de ácidos fenólicos tanto en el extracto

acuoso como en su fracción de acetato de etilo, con un valor menor en la fracción metanólica; sin embargo, el extracto acuoso presentó el mayor contenido de flavonoides. En una investigación previa (Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021) se reportaron un alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides (10.5 mg EAG/g ES y 9.85 mg EC/g ES, respectivamente) en un extracto metanólico de hojas de esta especie. No obstante, el contenido total tanto de fenólicos totales fue mayor en el extracto acuoso y en la fracción de acetato de etilo, y el de flavonoides solo en el extracto acuoso. Un contenido similar de ácidos fenólicos totales (21.01 mg EAG/g ES) y uno mayor de flavonoides (68.11 mg EQ/ ES) fue reportado para un extracto metanólico de partes aéreas de *V. enceliodes*, una proporción observada para los extractos acuosos de los tallos de *V. sphaerocephala*, con un mayor contenido de flavonoides totales que ácidos fenólicos (Singh y Dahiya, 2017). En ambas investigaciones (Singh y Dahiya, 2017; Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021) se relacionó la presencia de los compuestos fenólicos con la actividad antimicrobiana, reportando un efecto bactericida con los extractos de *V. enceliodes* y de *V. sphaerocephala*. No hay reportes sobre el contenido de este tipo de compuestos en especies del género *Verbesina*.

Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC–EM

Con el análisis por UPLC–EM del extracto acuoso y las fracciones (acetato de etilo y metanol) de tallos de *V. sphaerocephala*, se identificaron 12 compuestos fenólicos en el extracto acuoso, 18 en la fracción de acetato de etilo y 13 en la fracción metanólica. Los compuestos mayoritarios en el extracto fueron el ácido protocatecuico (96.06 µg/g ES), el ácido vanilínico (66.86 µg/g ES) y el ácido hidrogenado (65.59 µg/g ES); en la fracción metanólica, la vanillina (289.27 µg/g ES), la rutina (250.52 µg/g ES) y el ácido protocatecuico (250.54 µg/g ES) fueron los de mayor presencia; y, en la fracción metanólica, el ácido clorogénico (64.05 µg/g ES), el ácido protocatecuico (16.14 µg/g ES) y la rutina (10.28 µg/g ES), fueron los de mayor concentración. En esta especie, Rodríguez-Valdovinos *et al.* (2021), reportaron la presencia del flavonoide rutina principalmente en hojas y flores. En otras especies de *Verbesina*, como *V. enceliodes*,

se identificaron ácidos fenólicos como el ácido *p*-coumárico, ácido vanillínico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido clorogénico (Mehal *et al.*, 2023), lo que indica que son compuestos comunes entre estas dos especies del mismo género.

Con el fraccionamiento del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala*, principalmente en la fracción de acetato de etilo, la mayoría del contenido de los compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso, fueron más altos, hasta 2.7 veces como en el ácido protocatecuico, 3.7 veces más en ácido vainillínico, 28.7 veces más en vainillina y 12.2 veces más en rutina, por lo que este método favoreció una concentración mayor de estos. Así mismo, debido a esta propiedad, se identificaron compuestos que no fueron detectados en el extracto acuoso como el ácido cafeico, escopoletina, isoquercitrina (quercetina-3-O-glucósido), astragalina (kaempferol 3-O-glucósido), secoisolariciresinol, quercetina y kaempferol. Por lo tanto, en la fracción de acetato de etilo, los compuestos mayoritarios están en una mayor concentración y se pudieron identificar otros, no detectados en el extracto acuoso. Pérez-Larrán *et al.* (2019) mencionan que este efecto se debe a que el acetato de etilo solubiliza flavonoides y otros compuestos fenólicos, concentrándolos en comparación con el extracto crudo del cual se obtuvo dicha fracción, destacando que este suceso se da en extractos acuosos o metanólicos de los cuales se obtienen fracciones con acetato de etilo. Los autores sugieren que se implementen más investigación en este campo para explicar este fenómeno de concentración.

Actividad antioxidante y antifúngica

Con la determinación de la actividad antioxidante, la fracción de acetato de etilo mostró la mayor actividad, en relación a otros extractos y al extracto acuoso de tallo, con las concentraciones más bajas para inhibir el radical DPPH, con una alta inhibición con el método TAC y con el análisis por FRP; aunque el extracto acuoso de tallo mostró una mayor capacidad atrapadora del radical ABTS, la fracción de acetato de etilo presentó solamente 1.4 veces menos. Esta mayor actividad observada en la fracción puede deberse a que los compuestos activos presentes están menos ligados a otros

compuestos en comparación con el extracto, en el que podría existir un fenómeno de antagonismo, por lo que su efecto antioxidante podría verse comprometido (Cardona-Galeano et al., 2013). Se sugiere que el ácido clorogénico, identificado tanto en el extracto acuoso como en la fracción, sea uno de los compuestos fenólicos que más contribuya a la actividad mostrada por DPPH. Así mismo, la quercetina, que se identificó solo en las fracciones de acetato de etilo y metanol, puede ser la responsable de esta actividad determinada por DPPH. Estos resultados pueden explicar por qué ambas fracciones mostraron una mayor actividad captadora de radicales en comparación con el extracto acuoso. Por otro lado, la luteolina, un compuesto presente en el extracto acuoso y ausente en las fracciones, puede haber contribuido a la actividad de eliminación de radicales ABTS. Asimismo, se observó una correlación positiva entre 17 de los compuestos identificados en esta investigación con poder reductor férrico, siendo el ácido trans-cinámico, el ácido salicílico, el ácido vainillínico, el ácido p-cumárico, el ácido ferúlico, el ácido protocatecuico, la rutina y la vainillina los que presentaron los valores más altos de correlación. Con estos resultados, se determinó que, con las cuatro pruebas antioxidantes evaluadas, el extracto acuoso de tallo de *V. sphaerocephala* y su fracción de acetato de etilo, tienen un potencial efecto antioxidante, por lo que es necesario realizar más investigaciones para explorar nuevas propiedades biológicas.

El extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala* mostró el mayor efecto antifúngico sobre *B. cinerea* con valores de IC₅₀ e IC₁₀₀ de 100 y 240 µg/mL, respectivamente, que al compararse con el efecto sobre este hongo con hidrolatos de tallos, éstos fueron menos efectivos, resultados mostrados en otra investigación por nuestro grupo de trabajo, destacando que el extracto acuoso fue 13 veces más efectivo que el hidrolato para inhibir el crecimiento del hongo *B. cinerea* en un 50%.

El efecto antifúngico de otras especies de *Verbesina* se ha reportado contra otros hongos fitopatógenos, como el caso de *V. lanata*, cuyo extracto de acetato de etilo mostró un valor de IC₅₀ de 35 µg/mL contra el hongo *Plasmopara viticola* (Ramseyer et al., 2017). De manera similar, otros autores reportan la actividad antifúngica de los

extractos de *V. encelioides* contra *Sclerotium rolfisii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani* (Divya-Ramakrishnan *et al.*, 2017).

Aunque existió variación en el contenido y la composición de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de tallo y las fracciones de *V. sphaerocephala*, algunos de los compuestos identificados (ej. Vainillina, rutina, ácido vanilínico, entre otros) están presentes tanto en el extracto como en la fracción de acetato de etilo, lo que sugiere que están relacionados con su actividad antioxidante y antifúngica observada en esta investigación. Esto coincide con reportes previos, en las que sugieren a estos compuestos presentes tanto en el extracto acuoso como en su fracción de acetato de etilo como responsables de esta actividad biológica y de las posibles vías de acción. El ácido protocatecuico actúa afectando la permeabilidad de la membrana o la degradación de la pared celular en *B. cinerea* (Nguyen *et al.*, 2015); el ácido vanilínico disminuye la permeabilidad de la membrana (Alnuaimi *et al.*, 2013) e inhibe la síntesis de ergosterol (Raut *et al.*, 2013). La vainillina tiene diferentes modos de acción, principalmente incrementa la permeabilidad de membrana, induce la fuga de contenido intracelular e inhibe la actividad de las enzimas poligalacturonasa, pectin liasa y la endo-1,4- β -D-glucanasa, que están en pared celular (Yang *et al.*, 2021). El ácido *p*-coumárico altera la fosforilación oxidativa, provocando el desacoplamiento de las mitocondrias (Morales *et al.*, 2017). Otros compuestos fenólicos como la escopoletina y el ácido ferúlico, inhiben la germinación de conidias (Yan *et al.*, 2023; Yuan *et al.*, 2024). La disrupción de membranas es causada por el ácido salicílico (da Rocha Neto *et al.*, 2015) y el kaemferol, la quercetina, la rutina y el ácido trans-cinámico promueven el daño de membranas por inducir un incremento intracelular de especies reactivas de oxígeno (Zhang *et al.*, 2015; Abody *et al.*, 2020; Aghababaei *et al.*, 2023).

Se sugiere que la actividad antifúngica observada en esta investigación se debe a un al sinergismo de los compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso y en la fracción etanólico de tallos de *V. sphaerocephala*, ya que no se observó una relación clara entre la actividad antifúngica y el contenido de los compuestos fenólicos identificados por el análisis UPLC-MS, tanto en el extracto acuoso como en la fracción

de acetato de etilo. Debido a esto se sugiere realizar pruebas con compuestos aislados y purificados, solos o en mezcla, para determinar el efecto antifúngico al o los compuestos en cuestión.

9.3 Efecto del extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo sobre el estrés oxidante en esporas de *B. cinerea*

En los capítulos 2 y 3 se reporta que, aunque tanto el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo de tallos de *V. sphaerocephala* presentan tanto compuestos fenólicos como terpénicos, es en la fracción donde se obtuvo un mayor contenido de este tipo de compuestos. Principalmente se identificó al ácido protocatecuico, a la vainillina y al isoledeno, los cuales han sido reportados que presentan actividad antifúngica por medio de un mecanismo de acción implicado con la generación de ERO (Asif *et al.*, 2016; Li y Zhu, 2021; Yang *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2024).

En el caso de los fenólicos, la vainillina afecta la integridad de la membrana celular, aumentando la permeabilidad de esta y, por ello, facilitando el ingreso de sustancias exógenas, así como la pérdida de contenido intracelular. En la pared, este fenólico inhibe enzimas involucradas en su síntesis como la poligalacturonasa, la pectina liasa y la endo-1,4- β -D-glucanasa (Li y Zhu, 2021). Otros, generan alteraciones tanto en la pared como en la membrana celular, además de inducir estrés oxidante por peroxidación de lípidos de membranas (Nguyen *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2024), provoca malformaciones en la morfología fúngica e inducen a un estrés oxidante celular (Folami *et al.*, 2020; Yousaf *et al.*, 2023).

En otras investigaciones se reporta también la existencia de mecanismos que involucran el aumento en el estrés oxidante como parte de la actividad antifúngica, indicando que el ácido protocatecuico afecta los lípidos de la membrana celular por estrés oxidante y provoca la desestabilización de esta, conllevando a la muerte celular en *B. cinerea*. La vainillina induce a la acumulación de ERO intracelular al estimular la peroxidación de lípidos en *Aspergillus flavus*, y, el isoledeno también actúa provocando el incremento de ERO, generando estrés oxidativo. No obstante, no hay reportes sobre su mecanismo de acción antifúngico por lo que se sugiere que, en este estudio, el

isoledeno presentó efecto antifúngico en *B. cinerea* mediante la generación de estrés oxidativo (Nguyen *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2024).

De los compuestos fenólicos y terpénicos identificados tanto en el extracto acuoso como en su fracción de acetato de etilo de tallos de *V. sphaerocephala*, algunos presentan efecto significativo en la enzima catalasa, como la vainillina que disminuyó la actividad de esta enzima, de manera dosis dependiente, en el hongo *A. flavus*. De igual manera, el ácido vanilínico mostró efecto en dicha enzima, reduciendo su actividad en el hongo *Sclerotium rolfsii* (Li *et al.*, 2022; Yousaff *et al.*, 2023).

Asimismo, el ácido protocatecuico genera alteraciones tanto en la pared alteraciones tanto en la pared como en la membrana celular, además de inducir estrés oxidante por peroxidación de lípidos de membranas (Nguyen *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2024) Por otro lado, el ácido vanilínico provoca malformaciones en la morfología fúngica, específicamente en micelio y esclerocios, al igual que altera enzimas como catalasa, fenilalanina amonio liasa, peroxidasa, entre otras, induciendo a un estrés oxidante celular (Folami *et al.*, 2020; Yousaf *et al.*, 2023). La rutina, flavonoide también identificado en el extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala*, interviene afectando a las enzimas esterol 14- α desmetilasa, una enzima clave en la biosíntesis de diversos esteroides, y nucleósido difosfato cinasa, esencial en el proceso de fosforilación del nucleósido trifosfato y difosfato (NTP y NDP), respectivamente (Khanzada *et al.*, 2021).

En el caso de los terpenos, el elemol, también constituyente del extracto, ocasiona una serie de daños que van desde la distorsión y malformaciones en hifas, destrucción de la pared celular, así como desestabilización de orgánulos en citoplasma, ya que el elemol se almacena en vacuolas y se fija en pared celular, principalmente (Kim *et al.*, 2016). De manera similar, el nerolidol, otro de los componentes volátiles de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala*, altera la morfología en hifas, también inhibe la producción de esporas y altera la permeabilidad de membranas (Chan *et al.*, 2016).

El isoledeno induce a apoptosis por modulación de especies reactivas de oxígeno, no obstante, esto sucede en células HCT 116 por lo que se sugiere que una respuesta similar esté ocurriendo en este modelo de esporas (Asif *et al.*, 2016). Finalmente, el α -bisabolol provoca apoptosis por alteraciones en las membranas mitocondrial y celular, al afectar la biosíntesis de ergosterol, al igual que altera la actividad de la enzima catalasa provocando estrés oxidativo (Fonseca Bezerra *et al.*, 2020; Eddin *et al.*, 2022).

Debido a los resultados observados con la fracción de acetato de etilo en las diferentes pruebas de esta investigación (producción de ERO y regula el contenido de glutatión, así como la actividad de CAT y SOD), esta fracción presentó el mayor efecto oxidante en el modelo de esporas de *B. cinerea*. Por lo que, se sugiere que el posible mecanismo de acción de la fracción de acetato de etilo es por generación de estrés oxidante al afectar el sistema antioxidante endógeno de las esporas, provocando un incremento de las ERO, derivando en la peroxidación de lípidos de membranas y provocando el colapso de las esporas, llevando a la muerte del hongo (Figura 15).

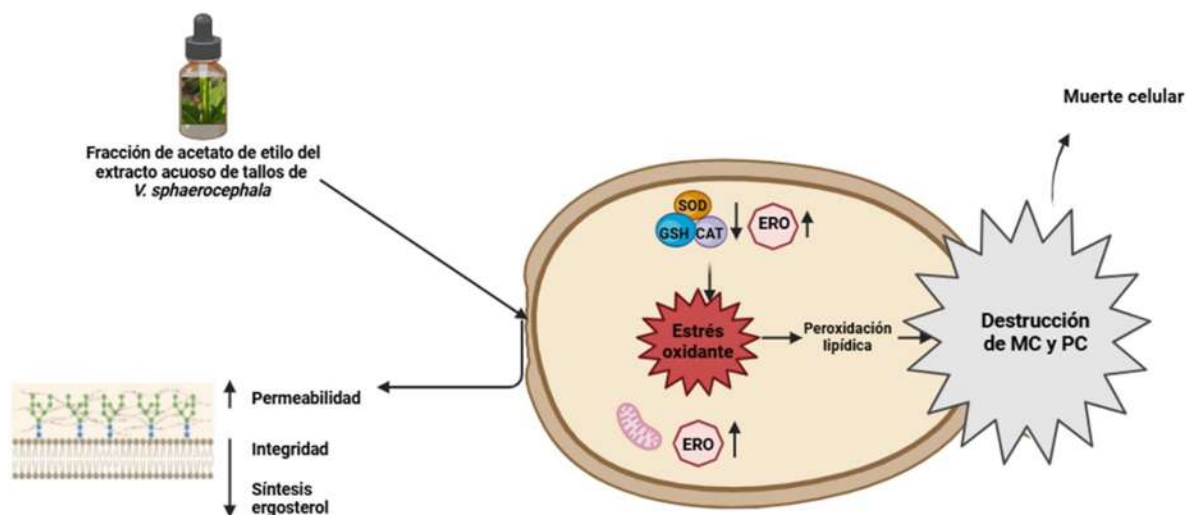


Figura 15. Mecanismo de acción propuesto de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de tallos de *V. sphaerocephala* en esporas de *B. cinerea*. ERO: Especies Reactivas de Oxígeno. SOD: Superóxido Dismutasa; CAT: Catalasa; GSH: Glutatión total. MC: Membrana celular; PC: Pared celular. Imagen propia.

10. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de tallo posee la mayor actividad antioxidante y antifúngica sobre los tres hongos evaluados (*B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*), siendo *B. cinerea* el hongo más susceptible de acuerdo con sus valores de IC₅₀ e IC₁₀₀. La actividad biológica observada con este extracto se relacionó directamente con el mayor contenido de fenoles y terpenos totales.

Con el fraccionamiento del extracto, se determinó que la fracción de acetato etilo fue la que mostró también una relación directa de ambas actividades biológicas con el contenido de compuestos terpénicos y fenólicos. Los compuestos isoledeno, α -bisabolol, vainillina y rutina identificados en la fracción de acetato de etilo se sugiere sean los responsables tanto de la actividad antifúngica como antioxidante.

Con los estudios preliminares de estrés oxidante *in vivo*, se sugiere que los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo provocan estrés oxidativo en esporas de *B. cinerea*. Con el análisis del perfil químico de ambos tipos de compuestos (fenólicos y terpénicos) tanto del extracto acuoso de tallo como de su fracción de acetato de etilo, no es posible definir hasta ahora, cuáles son los responsables de la actividad biológica ya que se identificaron sesquiterpenos, ácidos fenólicos y flavonoides como mayoritarios, que en sinergia pudieran ser los responsables de dicha respuesta.

11. LITERATURA GENERAL CITADA

- Abhiram, P., y Masih, H. (2018). In vitro Antagonism of *Trichoderma viride* against *Fusarium oxysporum* strains. *J Pharmacogn Phytochem*, 7(2), 2816-2819. <https://www.phytojournal.com/archives/2018/vol7issue2/PartAN/7-2-407-792.pdf>.
- Adams, R. (2017). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed.* Texensis Publishing. DOI: doi.org/10.1016/j.jasms.2005.07.008
- Aghababaei, F., y Hadidi, M. (2023). Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals*, 16(7), 1020. DOI: 10.3390/ph16071020.
- Aguilar-Mejía, Y. (2023). Efecto antioxidante y antifúngico de los compuestos volátiles del hidrolato de tallos y hojas de *Verbesina sphaerocephala* (Asteraceae).[Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH.[http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/16636#:~:text=AA%2FmL\),.Verbesina%20sphaerocephala%20A.,hidrolatos%20de%20hojas%20y%20tallos](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/16636#:~:text=AA%2FmL),.Verbesina%20sphaerocephala%20A.,hidrolatos%20de%20hojas%20y%20tallos).
- Ahmed, M., Sajid, A. R., Javeed, A., Aslam, M., Ahsan, T., Hussain, D., ... y Ji, M. (2022). Antioxidant, antifungal, and aphicidal activity of the triterpenoids spinasterol and 22, 23-dihydrospinasterol from leaves of *Citrullus colocynthis* L. *Scientific reports*, 12(1), 1-9. DOI: 10.1038/s41598-022-08999-z
- Ahmed, N., ur Rehman. y Ahmed, S. (2024). Phytochemical diversity, ethnomedicinal and therapeutic potential of the Genus *Verbesina*: A concise review. *Phytonutrients*. 23, 104-119. DOI: 10.62368/pn.v3i.34.
- Aljeldah, M. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Potencies of Chemically-Profiled Essential Oil from *Asteriscus graveolens* against Clinically-Important Pathogenic Microbial Strains. *Molecules*, 27(11), 3539. DOI: 10.3390/molecules27113539
- Al Aboody MS, Mickymaray S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*. 9(2), 45. DOI: 10.3390/antibiotics9020045
- Albalawi MAD, Bashir NAO, Tawfik A. (2015). Anticancer and antifolate activities of extracts of six Saudi Arabian wild plants used in folk medicine. *J Life Sci*. 9: 334-340. DOI: 10.17265/1934-7391/2015.07.006
- AL-Masoodi, H., Hussein, H. J., y Al-Rubaye, A. F. (2020). Antifungal activity of the two medicinal plants (*Curcuma longa* L. and *Boswellia carteri* Birdwood) against *Fusarium* species isolated from maize seeds. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3), 408-414. DOI: 10.31838/ijpr/2020.12.03.063

- Al-Oqail, M. M., Siddiqui, M. A., Al-Sheddi, E. S., Saquib, Q., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., y Farshori, N. N. (2016). *Verbesina encelioides*: cytotoxicity, cell cycle arrest, and oxidative DNA damage in human liver cancer (HepG2) cell line. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 1-10. DOI: 10.1186/s12906-016-1106-0
- Alnuaimi, A. D., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., y McCullough, M. J. (2013). Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS yeast research*, 13(7), 689-699. DOI: 10.1111/1567-1364.12068
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Villaseñor, J. L., y de Vivar, A. R. (2020). Cadinenes and other metabolites from *Verbesina sphaerocephala* A. Gray. *Biochemical Systematics and Ecology*, 93, 104183. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104183
- Asif, M., Shafaei, A., Jafari, S. F., Mohamed, S. K., Ezzat, M. O., Majid, A. S. A., ... y Majid, A. M. S. A. (2016). Isoledene from *Mesua ferrea* oleo-gum resin induces apoptosis in HCT 116 cells through ROS-mediated modulation of multiple proteins in the apoptotic pathways: a mechanistic study. *Toxicology Letters*, 257, 84-96. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.05.027
- Awad AM, Kumar P, Ismail-Fitry MR, Jusoh S, Ab Aziz MF, Sazili AQ. (2021). Green extraction of bioactive compounds from plant biomass and their application in meat as natural antioxidant. *Antioxidants*. 10(9),1465. DOI: 10.3390/antiox10091465
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., y Zheltobriukhov, V. F. (2019). Modern fungicides: Mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annual Research & Review in Biology*, 1-16. DOI: 10.9734/arrb/2019/v32i330083
- Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., ... y 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. DOI: 10.1080/19476337.2013.801037
- Behiry, S. I., Okla, M. K., Alamri, S. A., El-Hefny, M., Salem, M. Z., Alaraidh, I. A., ... y Salem, A. Z. (2019). Antifungal and antibacterial activities of *Musa paradisiaca* L. peel extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid contents. *Processes*, 7(4), 215. DOI: 10.3390/pr7040215
- Bertóti, R., Vasas, G., Gonda, S., Nguyen, N. M., Szőke, É., Jakab, Á., ... y Emri, T. (2016). Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *Journal of basic microbiology*, 56(10), 1071-1079. DOI: 10.1002/jobm.201600082

- Bika, R., Baysal-Gurel, F., y Jennings, C. (2021). *Botrytis cinerea* management in ornamental production: a continuous battle. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(3), 345-365. DOI: 10.1080/07060661.2020.1807409
- Boncan, D. A. T., Tsang, S. S., Li, C., Lee, I. H., Lam, H. M., Chan, T. F., y Hui, J. H. (2020). Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7382. DOI: 10.3390/ijms21197382
- Bonola, I. F., Irigoyen, M. E., Vera, L. I., Campero, A., y Hamdan, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias clínicas*, 15(1), 2-8. DOI: 10.1016/j.cc.2015.06.002
- Boudine, L., Louaste, B., Eloutassi, N., Chami, N., Chami, F., y Remmal, A. (2016). Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 17(4), 1120.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian Journal of Botany*, 1(1), 1-6. DOI: 10.63019/ajb.v1i2.467
- Buitimea-Cantúa, G. V., Leija Gutiérrez, H. M., Buitimea-Cantúa, N. E., del Refugio Rocha-Pizaña, M., García-Triana, A., Hernández-Morales, A., ... y Molina-Torres, J. (2022). The aflatoxin inhibitors capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits modulate the antioxidant system in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57(5), 358-368. DOI: 10.1080/03601234.2022.2060029
- Cadena-Rodríguez, Y. J., Vázquez-Sánchez, M., Cruz-Cárdenas, G., y Villaseñor, J. L. (2019). Use of ecological niche models of plant species to optimize placement of apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 63(2), 243-265. DOI: 10.2478/JAS-2019-0017
- Calderón de Rzedowski, G., y Carrillo-Reyes, P. (2011). Composite Tribe Heliantheae II (genera Lagascea-Zinnia). *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*, (172).
- Cardona Galeano, W., Robledo Restrepo, S. M., Rojano, B. A., Alzate Guarín, F., Muñoz Herrera, D. L., y Saez Vega, J. (2013). Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel.(Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 268-277.
- Cardona-Piedrahíta, L. F., y Castaño-Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227-233. DOI: 10.18257/raccefyn.854

- Chan, W. K., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., y Goh, B. H. (2016). Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, 21(5), 529. DOI: 10.3390/molecules21050529
- Choi YH y Verpoorte R. (2019). Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Curr Opin Food Sci.* 26: 87–93. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.04.003
- Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., y Mendoza, L. (2014). In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules*, 19(12), 21154-21167. DOI: 10.3390/molecules191221154
- Criddle, D. N., Gillies, S., Baumgartner-Wilson, H. K., Jaffar, M., Chinje, E. C., Passmore, S., ... y Petersen, O. H. (2006). Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40485-40492. DOI: 10.1074/jbc.M607704200
- Dalla Via, L., Mejia, M., García-Argáez, A. N., Braga, A., Toninello, A., y Martínez-Vázquez, M. (2015). Anti-inflammatory and antiproliferative evaluation of 4 β -cinnamoyloxy, 1 β , 3 α -dihydroxyeudesm-7, 8-ene from *Verbesina persicifolia* and derivatives. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 23(17), 5816-5828. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.002
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., López, A. G., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., Mwangi, J. W., ... 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*. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 11(2), 410-414. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.08.005
- da Rocha Neto, A. C., Maraschin, M., y Di Piero, R. M. (2015). Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *International journal of food microbiology*, 215, 64-70. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.018)
- De Simone, N., Pace, B., Grieco, F., Chimienti, M., Tyibilika, V., Santoro, V., ... y Russo, P. (2020). *Botrytis cinerea* and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. *Foods*, 9(9), 1138. DOI: 10.3390/foods9091138
- Deng, G. M., Yang, Q. S., He, W. D., Li, C. Y., Yang, J., Zuo, C. W., ... y Yi, G. J. (2015). Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling Fusarium wilt of banana. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(17), 7189-7207. DOI: 10.1007/s00253-015-6768-x

- Desgagné-Penix, I. (2021). Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochemistry Reviews*, 20(2), 409-431. DOI: 10.1007/s11101-020-09678-5
- Divya-Ramakrishnan CK, Doss D, Vijayabharathi A. (2017). Biochemical and Antimicrobial Characterization of an Underexploited Medicinal Plant - *Verbesina encelioides*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 6(12): 3407-3416. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.612.396
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., y Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*, 5(1), 5-1. DOI: 10.1128/9781555819583.ch34
- Doğan, İ. S., Saraç, S., Sari, S., Kart, D., Gökhan, Ş. E., Vural, İ., y Dalkara, S. (2017). New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. *European journal of medicinal chemistry*, 130, 124-138. DOI:10.1016/j.ejmech.2017.02.035
- DSD, S. J., Rao, G. V., Prasad, M. S., Babu, M. K., Narayana, S. S., y Satya, A. K. (2017). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activity of medicinal plant *Alphonsea sclerocarpa* Thaw. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6, 1280-1286.
- Edel-Hermann, V., y Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109(4), 512-530. DOI: 10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW
- Eddin, L. B., Jha, N. K., Goyal, S. N., Agrawal, Y. O., Subramanya, S. B., Bastaki, S. M., y Ojha, S. (2022). Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of α -bisabolol. *Nutrients*, 14(7), 1370. DOI: 10.3390/nu14071370
- EPPO. (n.d.-a). *Colletotrichum gloeosporioides* (COLLGL)[Overview]] EPPO Global Database.
- EPPO. (n.d.-b). *Fusarium oxysporum* (FUSAOX)[Overview]] EPPO Global Database.
- Espada-Domínguez, L., Ferrer-Serrano, A., Batista-King, Y., Bandera-Nápoles, A., y Almeida-Acosta, Y. (2016). Separación y clasificación de los alcaloides presentes en las hojas y flores de la especie *Spilanthes urens* Jacq. *Revista Cubana de Química*, 28(1), 409-430.
- Fayzi, L., Askarne, L., Boufous, E. H., Cherifi, O., y Cherifi, K. (2022). Antioxidant and antifungal activity of some Moroccan seaweeds against three postharvest fungal pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, 21(2), 328-338. DOI: 10.3923/ajps.2022.328.338
- Ferreira, F. V., Herrmann-Andrade, A. M., Calabrese, C. D., Bello, F., Vázquez, D., y Musumeci, M. A. (2020). Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum*

gloeosporioides and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L.(Osbeck)). *Journal of applied microbiology*, 129(3), 712-727. DOI: 10.1111/jam.14657

Fillinger, S., y Walker, A. S. (2016). Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases. In *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 189-216). Springer, Cham.

Folami, S. O., Nurudeen, O. Q., Falana, B. M., Ajiboye, O. A., y Bamaiyi, J. A. (2020). Involvement of Oxidative Stress in Bactericidal Activity of Vanillic Acid Against *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical and Experimental Medicine*, 1(1), 67-72. DOI: 10.47838/acem.26011977.11162020.asmeda.11.0

Fonseca Bezerra, C., de Alencar Júnior, J. G., de Lima Honorato, R., Dos Santos, A. T. L., Pereira da Silva, J. C., Silva, T. G. D., ... y da Silva, T. G. (2020). Antifungal properties of nerolidol-containing liposomes in association with fluconazole. *Membranes*, 10(9), 194. DOI: 10.3390/membranes10090194

García, C., Fedrigo, K., Gabriel, A., Botelho, R. V., Rodrigues, J. D., y Ono, E. O. (2021). Control of mildew in vines with cinnamon extract and catalase activity in organic production. *Research, Society and Development*, 10(10), e214101018885-e214101018885. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18885

García-Bores, A. M., Álvarez-Santos, N., López-Villafranco, M. E., Jácquez-Ríos, M. P., Aguilar-Rodríguez, S., Grego-Valencia, D., ... y del Carmen Benítez-Flores, J. (2020). *Verbena crocata*: A pharmacognostic study for the treatment of wound healing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3113-3124. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.08.038

Gavrilović, M., Soković, M., Stanković, M., Marin, P. D., Dajić-Stevanović, Z., y Janacković, P. (2016). Antimicrobial and antioxidative activity of various leaf extracts of *Amphoricarpos* Vis.(Asteraceae) taxa. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 803-810. DOI: 10.2298/ABS160112068G

Ghorai, N., Chakraborty, S., Gucchait, S., Saha, S. K., y Biswas, S. (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*. DOI: 10.1038/protex.2012.055

González-Domínguez, E., Caffi, T., Ciliberti, N., y Rossi, V. (2015). A mechanistic model of *Botrytis cinerea* on grapevines that includes weather, vine growth stage, and the main infection pathways. *PloS one*, 10(10), e0140444. DOI: 10.1371/journal.pone.0140444

González-Hernández, R. A., Valdez-Cruz, N. A., y Trujillo-Roldán, M. A. (2024). Factors that influence the extraction methods of terpenes from natural sources. *Chemical Papers*, 78(5), 2783-2810. DOI:10.1007/s11696-024-03339-z

- Hajji-Hedfi, L., Rhouma, A., Hajlaoui, H., Hajlaoui, F., y Rebouh, N. Y. (2023). Understanding the influence of applying two culture filtrates to control gray mold disease (*Botrytis cinerea*) in tomato. *Agronomy*, 13(7), 1774. DOI: 10.3390/agronomy13071774
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., ... y Mir, S. S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 85, 436-443. DOI: 10.1134/S0026261716040093
- He, X., Jiang, Y., Chen, S. (2023). Terpenoids and Their Possible Role in Defense Against a Fungal Pathogen *Alternaria tenuissima* in *Chrysanthemum morifolium* Cultivars. *J Plant Growth Regul.* 42, 1144–115. DOI:10.1007/s00344-022-10619-z
- He YH, Shan XF, Li HX, Li AP, Tang C, Zhang BQ, Zhang ZJ, Wang R, Ma Y, Du SS, et al. (2021). Antifungal activity and action mechanism study of coumarins from *Cnidium monnieri* fruit and structurally related compounds. *Chem Bio.* 18(12): e2100633. DOI: [10.1002/cbdv.202100633](https://doi.org/10.1002/cbdv.202100633)
- Hermann, D., y Stenzel, K. (2019). FRAC mode-of-action classification and resistance risk of fungicides. *Modern crop protection compounds*, 2, 589-608. DOI: 10.1002/9783527699261.ch14
- Hernández-Alvarado, J., Zaragoza-Bastida, A., López-Rodríguez, G., Peláez-Acero, A., Olmedo-Juárez, A., y Rivero-Perez, N. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1), 14-27. DOI: 10.21929/abavet2018.81.1
- Ho, T. T., Murthy, H. N., y Park, S. Y. (2020). Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 716. DOI: 10.3390/ijms21030716
- Ismail, N. I. M., y Chua, L. S. (2020, December). Solvent partition for terpenoid rich fraction from crude extract of *Eurycoma longifolia*. In *Third International Conference on Separation Technology 2020 (ICoST 2020)* (pp. 62-67). Atlantis Press.
- Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., y Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409-424. DOI: 10.1080/21655979.2019.1649520
- Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Chen, Y. J., Papp, V., Palla, B., Papp, D., ... y Wang, Y. (2020). One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for

- important phytopathogenic genera: 76–100 (2020). *Fungal Diversity*, 103(1), 87-218. DOI: 10.1007/s13225-020-00460-8
- Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Jeewon, R., Ghobad-Nejhad, M., Wanasinghe, D. N., Liu, N., ... y Kang, J. C. (2019). One stop shop II: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 26–50 (2019). *Fungal Diversity*, 94(1), 41-129. DOI: 10.1007/s13225-019-00418-5
- Jeszka-Skowron, M., y Zgoła-Grześkowiak, A. (2014). Analysis of antioxidant activity, chlorogenic acid, and rutin content of *Camellia sinensis* infusions using response surface methodology optimization. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2033-2041. DOI: 10.1007/s12161-014-9847-1
- Jin, Y. S. (2019). Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(19), 126589. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.07.048
- Joaquín-Ramos, A. D. J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., y Gutiérrez-Tlahque, J. (2020). Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* ENT# 91; KunthENT# 93; H. Rob y Brettell). *Chilean journal of agricultural research*, 80(3), 352-360. DOI: 10.4067/S0718-58392020000300352
- Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. *J. Med. Plants Stud*, 6(3), 112-115. DOI: 10.22271/plants.2018.v6.i3b.07
- Juarez-Trujillo, N., Monribot-Villanueva, J. L., Jiménez-Fernández, V. M., Suárez-Montaño, R., Aguilar-Colorado, Á. S., Guerrero-Analco, J. A., y Jiménez, M. (2018). Phytochemical characterization of Izote (*Yucca elephantipes*) flowers. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 202-210. DOI: 10.5073/JABFQ.2018.091.027
- Kalidindi, N., Thimmaiah, N. V., Jagadeesh, N. V., Nandeep, R., Swetha, S., y Kalidindi, B. (2015). Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), 795-802. DOI: [10.1016/j.jfda.2015.04.012](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.012)
- Kamle, M., y Kumar, P. (2016). *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of anthracnose disease in mango (*Mangifera indica* L.). In *Current trends in plant disease diagnostics and management practices* (pp. 207-219). Springer, Cham.
- Kanwal, A., Bilal, M., Rasool, N., Zubair, M., Shah, S. A. A., y Zakaria, Z. A. (2022). Total synthesis of terpenes and their biological significance: a critical review. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1392. DOI: 10.3390/ph15111392

- Kazemi, M. (2014). Effect of *Carum copticum* essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus* strains. *Natural Product Research*, 29(11), 1065–1068. DOI: 10.1080/14786419.2014.971796
- Khanzada, B., Akhtar, N., Okla, M. K., Alamri, S. A., Al-Hashimi, A., Baig, M. W., ... y Mirza, B. (2021). Profiling of antifungal activities and in silico studies of natural polyphenols from some plants. *Molecules*, 26(23), 7164. DOI: 10.3390/molecules26237164
- Khlifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., y Bouajila, J. (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and chemical toxicology*, 55, 202-208. DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.004
- Kim, S., Lee, S., Hong, C., Cho, S., Park, M., y Choi, I. (2016). Antifungal effect of elemol and eudesmol from *Cryptomeria japonica* essential oil against *Trichophyton rubrum*. *Academia Journal of Agricultural Research*, 4(8), 511-517. DOI: 10.15413/ajar.2016.0182
- Kwodaga, J. K., Sowley, E. N. K., y Badii, B. K. (2019). Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) the causative agent of yam anthracnose disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(1-2), 218-233. DOI: 10.1080/03235408.2019.1604303
- Kuete V. (2017). *Thymus vulgaris*. In: Kuete V, editor. Medicinal spices and vegetables from Africa. United Kingdom (UK): Academic Press; p. 599-609. DOI: [10.1016/B978-0-12-809286-6.00028-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00028-5)
- Kushwaha HB y Malik CP. (2013). Biopotential of *Verbesina encelioides* (stem and leaf powders) in silver nanoparticle fabrication. *Turk J Bio.* 37(6):645-654. DOI: 10.3906/biy-1212-7
- Lamaison, J. L., y Carnart, A. (1991). Teneurs en principaux falvonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 25(1), 12-16.
- Lee, K. J., Oh, Y. C., Cho, W. K., y Ma, J. Y. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1, 1–13. DOI:10.1155/2015/165457.
- Li, C., Zha, W., Li, W., Wang, J., y You, A. (2023). Advances in the biosynthesis of terpenoids and their ecological functions in plant resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11561. DOI: 10.3390/ijms241411561
- Li, M., Pare, P. W., Zhang, J., Kang, T., Zhang, Z., Yang, D., ... y Xing, H. (2018). Antioxidant Capacity Connection with Phenolic and Flavonoid Content in

- Chinese Medicinal Herbs. *Records of Natural Products*, 12(3), 239-250. DOI: 10.25135/rnp.24.17.08.138
- Li, Q., y Zhu, X. (2021). Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall. *Grain y oil science and technology*, 4(2), 54-61. DOI: [10.1016/j.gaost.2021.03.002](https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.03.002)
- Li, Q., Zhu, X., Zhao, Y., y Xie, Y. (2022). The antifungal activity of o-vanillin against *Aspergillus flavus* via disrupting ergosterol biosynthesis and promoting oxidative stress, and an RNA-seq analysis thereof. *Lwt*, 164, 113635. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113635
- Li, Y., Aioub, A. A., Lv, B., Hu, Z., y Wu, W. (2019). Antifungal activity of pregnane glycosides isolated from *Periploca sepium* root barks against various phytopathogenic fungi. *Industrial crops and products*, 132, 150-155. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.009
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... y Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374. DOI: 10.3390/molecules21101374
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., y Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1), 1-47. DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01
- Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Hoek, T. L. V., y Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1925-1936. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021
- López-Zapata, S. P., y Castaño-Zapata, J. (2019). Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (EF SM.) WC Snyder y HN Hansen]: una revisión. *Revista UDCA Actualidad & divulgación científica*, 22(2), 1-13. DOI: 10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., y Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- Mabou, F. D., y Yossa, I. B. N. (2021). TERPENES: Structural classification and biological activities. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 16, 25-40. DOI: 10.9790/3008-1603012540
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Pérez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., y Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility

- testing. *International journal of infectious diseases*, 8(1), 39-45. DOI: 10.1016/j.ijid.2003.03.002
- Majeed, A., Muhammad, Z., Ullah, Z., Ullah, R., y Ahmad, H. (2017). Late blight of potato (*Phytophthora infestans*) I: Fungicides application and associated challenges. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(3), 261-266. DOI: 10.24925/turjaf.v5i3.261-266.1038
- Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., ... y Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry: X*, 13, 100217. DOI: 10.1016/j.fochx.2022.100217
- Mehal, K. K., Kaur, A., Singh, H. P., y Batish, D. R. (2023). Investigating the phytotoxic potential of *Verbesina encelioides*: Effect on growth and performance of co-occurring weed species. *Protoplasma*, 260(1), 77-87. DOI: 10.1007/s00709-022-01761-2
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., y 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.
- Meziti, H., Bouriche, H., Kada, S., Demirtas, I., Kizil, M., Senator, A., y Garrido, G. (2019). Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. *J. Pharm. Pharmacogn. Res*, 7, 260-272.
- Mohandas, G. G., y Kumaraswamy, M. (2018). Antioxidant activities of terpenoids from *Thuidium tamariscellum* (C. Muell.) Bosch. and Sande-Lac. a Moss. *Pharmacognosy Journal*, 10(4), 645-649. DOI: 10.5530/pj.2018.4.106
- Mokrani, A., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Tamsamani, H., Renouf, E., ... y Richard, T. (2016). Phenolic contents and bioactive potential of peach fruit extracts. *Food Chemistry*, 202, 212-220. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.12.026
- Monribot-Villanueva, J. L., Elizalde-Contreras, J. M., Aluja, M., Segura-Cabrera, A., Birke, A., Guerrero-Analco, J. A., y Ruiz-May, E. (2019). Endorsing and extending the repertory of nutraceutical and antioxidant sources in mangoes during postharvest shelf life. *Food Chemistry*, 285, 119-129. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.136
- Morales, J., Mendoza, L., y Cotoras, M. (2017). Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the antifungal action of p-coumaric acid against *Botrytis cinerea*. *Journal of applied microbiology*, 123(4), 969-976. DOI: 10.1111/jam.13540

- Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Braz J Pharma Sci.* 56: e17129. DOI: 10.1590/s2175-97902019000417129.
- Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M., y Karakozova, M. V. (2020). Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta naturae*, 12(3), 46. DOI: 10.32607/actanaturae.11026
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Moon, J. H., Lee, J. H., y Kim, K. Y. (2014). Isolation and characteristics of protocatechuic acid from *Paenibacillus elgii* HOA73 against *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Basic Microbiology*, 55(5), 625-634. DOI: 10.1002/jobm.201400041
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., y Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710. DOI: 10.3390/ijms22115710
- Oniha M, Eni A, Akinnola O, Omonigbehin EA, Ahuekwe EF, Olorunshola JF. (2021). *In vitro* antifungal activity of extracts of *Moringa oleifera* on phytopathogenic fungi affecting *Carica papaya*. *Maced J Med Sci.* 9(A): 1081-1085. DOI: 10.3889/oamjms.2021.6794
- OuYang, Q., Tao, N., y Zhang, M. (2018). A damaged oxidative phosphorylation mechanism is involved in the antifungal activity of citral against *Penicillium digitatum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 239. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00239
- Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Nur, H., Ismail, A. F., Sharif, S., ... y Berto, F. (2020). Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants*, 9(12), 1309. DOI: 10.3390/antiox9121309
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., ... y Xu, B. L. (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology*, 1209. DOI: 10.3389/fmicb.2021.670135
- Pérez-Larrán, P., Torres, M. D., Flórez-Fernández, N., Balboa, E. M., Moure, A., y Domínguez, H. (2019). Green technologies for cascade extraction of *Sargassum muticum* bioactives. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2481-2495. DOI: 10.1007/s10811-018-1725-6
- Perveen, S. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.79683
- PortalTecnoAgrícola. (2022). VADEMECUM on-line de Carlos De Liñán, EditorialTecnoagrícola. <https://www.portaltecnogrícola.com/>

- 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. DOI: 10.1006/abio.1999.4019
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., y Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573. DOI: 10.3389/fpls.2015.00573
- Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R. R., Hanako-Rosas, G., Bautista-Baños, S., Acevedo-Hernández, G., Tiznado-Hernández, M. E., y Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro tests. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 755-763. DOI: 10.1007/s10068-018-0305-5
- Ramseyer, J., Thuerig, B., De Mieri, M., Scharer, H. J., Oberhansli, T., Gupta, M. P., ... y Potterat, O. (2017). Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *Journal of natural products*, 80(12), 3296-3304. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00868
- Rana, A., Sahgal, M., y Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction. In *Developments in fungal biology and applied mycology* (pp. 159-199). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-4768-8_10
- Raut, J. S., Rajput, S. B., Shinde, R. B., Surwase, B. S., y Karuppayil, S. M. (2013). Vanillin inhibits growth, morphogenesis and biofilm formation by *Candida albicans*. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3(2), 130-138. DOI: 10.1080/22311866.2013.817749
- Ray, M., Ray, A., Dash, S., Mishra, A., Achary, K. G., Nayak, S., y Singh, S. (2017). Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 708-723. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.032
- Rebecca, F. S., Nivedha, R. P., y Sharmila, R. (2021). Molecular docking analysis of bioactive compounds from *Mollugo cerviana* (L.) SER with DHFR for antifungal activity. *Bioinformatics*, 17(11), 944. DOI: 10.6026/97320630017944
- Redondo-Blanco, S., Fernandez, J., Lopez-Ibanez, S., Miguelez, E. M., Villar, C. J., y Lombo, F. (2020). Plant phytochemicals in food preservation: Antifungal bioactivity: A review. *Journal of Food Protection*, 83(1), 163-171. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-19-163
- Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., y Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 42(1), 115-126. DOI: 10.15517/rac.v42i1.32199

Retrieved September 30, 2021, from <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAOX>

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. DOI: [10.3390/plants10030475](https://doi.org/10.3390/plants10030475)

Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Salgado-Garciglia, R., Hernández-García, A., Saavedra-Molina, A., del Río-Torres, R. E. N., López-Meza, J. E., ... y Medina-Medrano, J. R. (2024). Antioxidant and Antifungal Activities and Characterization of Phenolic Compounds Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UPLC-MS) of Aqueous Extracts and Fractions from *Verbesina sphaerocephala* Stems. *Plants*, 13(19), 2791. DOI: [10.3390/plants13192791](https://doi.org/10.3390/plants13192791)

Rojo-Báez, I., García-Estrada, R. S., León-F, J., Sañudo-Barajas, A., y Allende-Molar, R. (2017). Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 549-570. DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1703-9](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-9)

Romanazzi, G., y Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (gray mold). In *Postharvest decay* (pp. 131-146). Academic Press. DOI: [10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1)

Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., y Milano, F. (2015). Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Sciences*, 10(1), 409-416. DOI: [10.1515/biol-2015-0040](https://doi.org/10.1515/biol-2015-0040)

Ruiz Jiménez, J. G. (2015). Estudio químico y actividad antioxidante de *Verbesina parviflora*. [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB_UMICH/2275/1/IQB-M-2015-0870.pdf

Rusmana, D., Wahyudianingsih, R., Elisabeth, M., Balqis, B., Maesaroh, M., y Widowati, W. (2017). Antioxidant activity of *Phyllanthus niruri* extract, rutin and quercetin. *The Indonesian Biomedical Journal*, 9(2), 84-90. DOI: [10.18585/inabj.v9i2.281](https://doi.org/10.18585/inabj.v9i2.281)

Rutiaga-Quiñones, J. G. (2001). Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverl. Gräffelfing, Germany.

Sahnoun, M., Saibi, W., Brini, F., y Bejar, S. (2018). Apigenin isolated from *A. americana* encodes human and *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase inhibitions: credible approach for antifungal and antidiabetic therapies. *Journal of food science and technology*, 55(4), 1489-1498. DOI: [10.1007/s13197-018-3065-6](https://doi.org/10.1007/s13197-018-3065-6)

- Salhi N, Mohammed Saghir SA, Terzi V, Brahmi I, Ghedairi N, Bissati S. (2017). Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant Algerian medicinal plants. *Biomed Res Int.* 2017: 1-6. DOI: 10.1155/2017/7526291
- Salmon, M., Soriano-Garcia, M., Toscano, R. A., Cardenas, J., Miranda, R., Vargas, F., y Angeles, E. (1985). Verocephol, a unique amorphane sesquiterpene. gamma.-lactol. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(21), 4171-4172. DOI: 10.1021/jo00221a044
- Santamaría, C., Martín-González, A., y Astorga, F. (2015). Extractos vegetales: aplicación para la reducción del estrés. *Revista nutriNews*, (2), 75-80.
- Santos, M. C., Farias, L. S., Merlugo, L., de Oliveira, T. V., Barbosa, F. S., Fuentefria, A. M., ... y Mendez, A. S. (2018). UPLC-MS for identification of quercetin derivatives in *Cuphea glutinosa* Cham. y Schltdl (Lythraceae) and evaluation of antifungal potential. *Current Pharmaceutical Analysis*, 14(6), 586-594. DOI: 10.2174/1573412913666170918150924
- Saranraj, P., Behera, S. S., y Ray, R. C. (2019). Traditional foods from tropical root and tuber crops: Innovations and challenges. In *Innovations in traditional foods* (pp. 159-191). Woodhead Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-12-814887-7.00007-1
- Sarmento-Guerra FQ, Aquino de Araujo RS, Pereira de Souza J, de Oliveira Pereira F, Mendonça-Junior FJB, Barbosa-Filho JM, de Oliveira Lima E. (2015). Evaluation of antifungal activity and mode of action of new coumarin derivative, 7-hydroxy-6-nitro-2h-1-benzopyran-2-one, against *Aspergillus* spp. *Evidence-Based Comp Alt Med.* 2015: 1-8. DOI: 10.1155/2015/925096
- Seepe, H. A., Ramakadi, T. G., Lebepe, C. M., Amoo, S. O., y Nxumalo, W. (2021). Antifungal activity of isolated compounds from the leaves of *Combretum erythrophyllum* (Burch.) Sond. and *Withania Somnifera* (L.) Dunal against *Fusarium* pathogens. *Molecules*, 26(16), 4732. DOI: 10.3390/molecules26164732
- Sepúlveda-Vázquez, J., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., Martínez-Puc, J. F., y Chan-Pérez, J. I. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79-95. DOI: 10.36610/j.jsaas.2018.050200079
- Shang XF, Zhao ZM, Li JC, Yang GZ, Liu YQ, Dai LX, Zhang ZJ, Yang ZG, Miao XL, Yang CJ, et al. (2019). Insecticidal and antifungal activities of *Rheum palmatum* L. anthraquinones and structurally related compounds. *Ind C Prod.* 137: 508-520. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.05.055

- Sharma, M., y Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233-1246. DOI: 10.13005/bbra/1776
- Shi, Q. I. U., Hui, S. U. N., Zhang, A. H., Hong-Ying, X. U., Guang-Li, Y. A. N., Ying, H. A. N., y Xi-Jun, W. A. N. G. (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 401-406. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60063-7
- Shuping, D. S. S., y Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(4), 120-127. DOI: 10.21010/ajtcam.v14i4.14
- Siddiqui, Y., y Ali, A. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In *Postharvest Decay* (pp. 337-371). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9
- Singh L. y Dahiya P. 2017. Evaluation of antimicrobial, phytochemicals, total phenolic and flavonoid contents of *Verbesina encelioides*- a lesser known herb of family Asteraceae. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 6(5), 27-30
- Singh, B., y Sharma, R. A. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5(2), 129-151. DOI: 10.1007/s13205-014-0220-2
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111:A3.B.1-A3.B.3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111
- Sun, C., Zhu, C., Tang, Y., Ren, D., Cai, Y., Zhou, G., ... y Zhu, P. (2021). Inhibition of *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes by calcium propionate. *Food Quality and Safety*, 5, fyab016. DOI: 10.1093/fqsafe/fyab016
- Takaidza, S., Mtunzi, F., y Pillay, M. (2018). Analysis of the phytochemical contents and antioxidant activities of crude extracts from *Tulbaghia* species. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38(2), 272-279. DOI: 10.1016/j.jtcm.2018.04.005
- Tang, X., Shao, Y. L., Tang, Y. J., y Zhou, W. W. (2018). Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). *Molecules*, 23(9), 2108. DOI: 10.3390/molecules23092108

- Tashiro, N., Ide, Y., Noguchi, M., Watanabe, H., y Nita, M. (2019). Emergence of Benzimidazole-and Strobilurin-Quinone Outside Inhibitor-Resistant Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, the Causal Fungus of Japanese Pear Anthracnose, and Alternative Fungicides to Resistant Strains. In *Plant Diseases-Current Threats and Management Trends*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.90018
- Torres-Martínez, R., Bello-González, M. Á., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., ... 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. DOI: 10.29298/rmcf.v5i21.362.
- 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 y nutrition*, 9(3), 1720-1735. DOI: 10.1002/fsn3.2149
- Tsimogiannis, D., y Oreopoulou, V. (2019). Classification of phenolic compounds in plants. In *Polyphenols in plants* (pp. 263-284). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8
- Valenzuela-Cota, D. F., Buitimea-Cantúa, G. V., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Martínez-Higuera, A. A., y Rosas-Burgos, E. C. (2019). Inhibition of the antioxidant activity of catalase and superoxide dismutase from *Fusarium verticillioides* exposed to a *Jacquinia macrocarpa* antifungal fraction. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(8), 647-654. DOI: 10.1080/03601234.2019.1622978
- Vázquez-Sánchez, M., Medina-Medrano, J. R., Cortez-Madrugal, 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. DOI: 10.37360/blacpma.19.18.2.11
- Velasco-Ramírez, A. P., Virgen-Calleros, G., Hernández-Herrera, R. M., Velasco-Ramírez, A., Corona-Cervantes, M. P., Munguía-Lizalde, D. M., y Hernández-Pérez, A. R. (2021). *Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(2), 339-353. DOI: 10.18781/r.mex.fit.2103-2

- Velázquez Silva, A., Robles Yerena, L. y López Necha. L. L. (2021). Chemical profile and antifungal activity of plant extracts on *Colletotrichum* spp. isolated from fruits of *Pimenta dioica* (L.) Merr. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 179, 104949. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104949
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3), 559-902. DOI: 10.1016/j.rmb.2016.06.017
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358. DOI: 10.17129/botsci.1872
- Wang, H. C., Li, L. C., Cai, B., Cai, L. T., Chen, X. J., Yu, Z. H., y Zhang, C. Q. (2018). Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Frontiers in Microbiology*, 9, 470. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00470
- Wang, Y., Li, J., Chen, Q., Zhou, J., Xu, J., Zhao, T., ... y Liu, D. (2022). The role of antifungal activity of ethyl acetate extract from *Artemisia argyi* on *Verticillium dahliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1343-1356. DOI: 10.1111/jam.15298
- WCVP. (2023). The World Checklist of Vascular Plants <https://www.kew.org/>. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <https://doi.org/10.34885/jdh2-dr22>, Recuperado el 15 de julio de 2024.
- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A. L., y Jankowska, A. (2016). Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. *Microbial Pathogenesis*, 100, 263-267. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.10.009
- Worku, M., y Sahe, S. (2018). Review on disease management practice of tomato wilt caused *Fusarium oxysporum* in case of Ethiopia. *J Plant Pathol Microbiol*, 9(11), 2-4. DOI: 10.4172/2157-7471.1000460
- Yan, H., Meng, X., Lin, X., Duan, N., Wang, Z., y Wu, S. (2023). Antifungal activity and inhibitory mechanisms of ferulic acid against the growth of *Fusarium graminearum*. *Food Bioscience*, 52, 102414. DOI:10.1016/j.fbio.2023.102414
- Yang, J., Chen, Y. Z., Yu-Xuan, W., Tao, L., Zhang, Y. D., Wang, S. R., ... y Zhang, J. (2021). Inhibitory effects and mechanisms of vanillin on gray mold and black rot of cherry tomatoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 175, 104859. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104859
- Yang, Q., Wang, J., Zhang, P., Xie, S., Yuan, X., Hou, X., ... y Du, Y. (2020). *In vitro* and *in vivo* antifungal activity and preliminary mechanism of cembratrien-diols against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 154, 112745. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112745

- Yordi, E. G. , Pérez, E. M. , Matos, M. J. , y Villares, E. U. (2012). Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In J. Bouayed, y T. Bohn (Eds.), Nutrition, Well-Being and Health. IntechOpen. DOI: 10.5772/29471
- Yousaff, M., Shoaib, A., Fatima, Q., Bukhari, S., Ali, N., y Fatima, U. (2023). In Vitro Antifungal Potential of Vanillic Acid against *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Bioresource Management*, 10(2), 1.
- Yuan, S., Li, W., Li, Q., Wang, L., Cao, J., y Jiang, W. (2019). Defense responses, induced by p-coumaric acid and methyl p-coumarate, of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit against black spot rot caused by *Alternaria alternata*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(10), 2801-2810. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00087
- Yusoff, S. F., Haron, F. F., Tengku Muda Mohamed, M., Asib, N., Sakimin, S. Z., Abu Kassim, F., y Ismail, S. I. (2020). Antifungal activity and phytochemical screening of *Vernonia amygdalina* extract against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease on tomato fruits. *Biology*, 9(9), 286. DOI: 10.3390/biology9090286
- Zaker M. (2016). Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control-A review. *The Agriculturists*. 14(1): 134-141. DOI: 10.3329/agric.v14i1.29111.
- Zhang, Z., Qin, G., Li, B., y Tian, S. (2015). Effect of cinnamic acid for controlling gray mold on table grape and its possible mechanisms of action. *Current Microbiology*, 71, 396-402. DOI: 10.1007/s00284-015-0863-1
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 13(20):1–26. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x
- Zhao, Z. M., Shang, X. F., Lawoe, R. K., Liu, Y. Q., Zhou, R., Sun, Y., ... y Yang, C. J. (2019). Anti-phytopathogenic activity and the possible mechanisms of action of isoquinoline alkaloid sanguinarine. *Pesticide biochemistry and physiology*, 159, 51-58. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.05.015

15. ANEXOS

Kathia Yanelly Rodríguez Valdovinos

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Verbesina sphaerocephala* A. G

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:404756664

Fecha de entrega

12 nov 2024, 2:27 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

12 nov 2024, 2:32 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Verbesina*pdf

Tamaño de archivo

5.8 MB

152 Páginas

48,199 Palabras

269,087 Caracteres

53% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Grupos de coincidencias

- 104 Sin cita o referencia 42%**
Coincidencias sin una citación ni comillas en el texto
- 1 Faltan citas 0%**
Coincidencias que siguen siendo muy similar al material fuente
- 176 Falta referencia 12%**
Las coincidencias tienen comillas, pero no una citación correcta en el texto
- 0 Con comillas y referencia 0%**
Coincidencias de citación en el texto, pero sin comillas

Fuentes principales

- 46%** Fuentes de Internet
- 45%** Publicaciones
- 0%** Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas Op. Investigaciones Químico Biológicas	
Título del trabajo	Determinación de la relación del contenido de compuestos bioactivos de <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray (Asteraceae) con la actividad antifúngica y antioxidante	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	M.C. Kathia Yanelly Rodríguez Valdovinos	2019606d@umich.mx
Director	Dr. Rafael Salgado Garciglia	rafael.salgado@umich.mx
Codirector	Dr. José Roberto Medina Medrano	jmedina@ucemich.edu.mx
Coordinador del programa	Dr. Omar Chassin Noria	omar.chassin@umich.mx

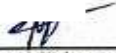
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	M.C. Kathia Yanelly Rodríguez Valdovinos 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán. 12 de noviembre del 2024