



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

"Francisco García Salinas"

Unidad Académica de Ciencias Químicas

Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

Análisis fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante y antifúngica de *Asphodellus fistulosus* L.

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

Q.F.B. Pedro Israel Silva Martínez

Director

Dr. Gerardo Martínez Guajardo

Co-directora

Dra. Mónica Imelda Martínez Acuña

Asistente

Dr. Guillermo Quiñones Reyes

Agosto 2021.



Q.F.B. PEDRO ISRAEL SILVA MARTINEZ

PRESENTE

La Dirección de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, le notifica que el Comité de Revisión de su Documento de Tesis de Maestría, integrado por los Docentes- Investigadores: Dr. en C. Gerardo Martínez Guajardo, Dra. en C. Mónica Imelda Martínez Acuña, Dra. en C. María de los Ángeles Hernández Ruiz, Dr. en C. Hiram Hernández López, Dr. en C. Juan Armando Flores de la Torre. Han concluido la revisión del mismo y han dado su aprobación para su respectiva presentación.

Por lo anterior, se le autoriza la impresión definitiva de su Tesis de Maestría, a fin de dar trámite a la sustentación de su Examen de Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología Química.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zac. a 16 de Noviembre del
2021.

Dra. en C. María Argelia López Luna.
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químicas,
UAZ.

c. c. p. Archivo Institucional.

Unidad Académica
Ciencias Químicas



DIRECCIÓN
2021 - 2025



CIRCULAR

Una vez revisado el DOCUMENTO DE TESIS titulado: "Análisis fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante y antifúngica de *Asphodellus fistulosus* L", del Q.F.B. Pedro Israel Silva Martínez con número de Matrícula 33140567. Se solicita a los Miembros del Jurado de Exámen que se citan al calce, tengan a bien aprobar la impresión del documento para continuar los trámites necesarios ante la Rectoría de la Universidad Autónoma de Zacatecas y programar la realización del Examen de Grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zacatecas., a 16 de noviembre de
2021.

Dra. en C. Ismailia Leilani Escalante
García

Responsable de la Maestría en Ciencia
y Tecnología Química

REVISÓ Y APROBÓ

Dr. en C Gerardo Martínez Guajardo

Dra. en C. María de los Ángeles
Hernández Ruíz

Dr. en C. Hiram Hernández López

Dra. en C. Mónica Imelda Martínez
Acuña

Dr. en C. Juan Armando Flores de la
Torre

Unidad Académica
Ciencias Químicas



DIRECCIÓN
2021 - 2025

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi cariño para mi madre Beneranda y padre Eduardo, quienes siempre me han apoyado, por haberme forjado como la persona que soy e inculcarme los ideales que me han ayudado a llegar hasta aquí.

A mi hermano, que ha sido un ejemplo para mí y que me ha enseñado mucho, pues es una persona muy inteligente y dedicada.

A mi tío Saúl y su familia, quienes me apoyaron totalmente para poder iniciar con esta travesía por la Maestría en Ciencia y Tecnología Química.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Ambiental de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas a cargo de la Dra. en C. Mónica Imelda Martínez Acuña, una parte del trabajo se realizó con la colaboración del al Laboratorio de Biología de la Conservación de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, agradezco en especial a la Dra. en C. Lucía Delgadillo Ruiz y a su equipo de trabajo, al Laboratorio de Microbiología de la Licenciatura en Biotecnología de la Universidad Interserrana del Estado de Puebla Ahuacatlán coordinado ella que también se realizó en trabajo en conjunto gracias al trabajo experimentado de M. en C. Francisco Javier Camacho Martínez, también este trabajo fue posible gracias al Dr. en C. José de Jesús Balleza Cadengo y su equipo de colaboradores pertenecientes a la Unidad Académica de Agronomía, así como agradezco la colaboración del CIIAS-CIACYT, en especial a la Dra. en C. Lorena Díaz de León Martínez y al Dr. en C. Rogelio Flores pertenecientes a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A cada uno de mis asesores, a la Dra. en C. Mónica Imelda Martínez Acuña, por su paciencia y liderazgo en el trabajo, al Dr. en C. Gerardo Martínez Guajardo, por guiarme y por sus enseñanzas, y al Dr. en C. Guillermo Quiñones Reyes por su aporte de conocimiento a la investigación.

A los apoyos financieros que permitieron que esta investigación se realizara de una mejor manera otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría con registro No. 1011218 y al proyecto “Estudiar para el futuro de nuestros pueblos / Kaqalhtawaqaw xpalakata aqatunu kintachiwinkan / Tlamaxtilis eka ne walalis tu altepeme” No. 1212 apoyado por la Convocatoria de CONACYT Fomentar y fortalecer las vocaciones científicas 2020.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
I. Introducción.....	3
1.1. Planteamiento del problema	4
1.2. Antecedentes	6
1.3. Familia Xanthorrhoeaceae	8
1.4. <i>Asphodellus fistulosus</i> L.	9
1.5. Herborización.....	10
1.6. Compuestos activos de las especies vegetales.....	10
1.7. Metabolismo secundario de las plantas	11
1.7.1. Alcaloides	11
1.7.2. Glucósidos cardiotónicos.....	12
1.7.3. Triterpenoides y/o esteroides	12
1.7.4. Taninos.....	12
1.7.5. Flavonoides	13
1.7.6. Quinonas	14
1.7.7. Cumarinas	14
1.8. Fundamento de técnicas de extracción	15
1.8.1. Elección de solventes	15
1.8.2. Tratamientos previos a la extracción de principios activos	16
1.8.2.1. Secado	16
1.8.2.2. Molienda	17
1.8.2.3. Tamizado.....	17
1.9. Maceración	17
1.10. Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE).....	18
1.10.1. Ventajas de la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE).....	18
1.10.2. Desventajas de la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)	19
1.10.3. Equipo requerido para la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)	19
1.11. Identificación preliminar de metabolitos secundarios.....	19

1.11.1. Identificación de alcaloides	19
1.11.2. Identificación de Glucósidos cardiotónicos	20
1.11.3. Identificación de Triterpenoides y/o esteroides.....	20
1.11.4. Identificación de Taninos	20
1.11.5. Identificación de Flavonoides	20
1.11.6. Identificación de Quinonas	21
1.11.7. Identificación de Cumarinas	21
1.12. Actividad Antioxidante.....	21
1.12.1. Antioxidantes	21
1.12.2. Características de los antioxidantes	21
1.13. Fenoles totales.....	22
1.14. Flavonoides totales	23
1.15. Taninos condensados.....	23
1.16. Determinación de capacidad antioxidante total mediante la metodología de DDPH.....	24
1.17. Cromatografía de gases Acoplada a Masas (GC/MS)	24
1.18. Hongos de estudio	25
1.18.1. <i>Thricoderma harzianum</i>	25
1.18.2. <i>Fusarium spp.</i>	26
1.18.3. <i>Aspergillus spp.</i>	27
1.18.3.1. Micotoxinas.....	28
1.18.3.2. Aflatoxinas	28
1.19. Determinación de la actividad antifúngica.....	29
1.19.1. Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer)	30
1.20. Justificación	30
1.21. Hipótesis	32
1.22. Objetivos.....	32
1.22.1. Objetivo General	32
1.22.2. Objetivos específicos	32
II. Material y Métodos.....	32
2.1. Material vegetal.....	32
2.2. Secado de la <i>Asphodellus fistulosus</i>	33
2.3. Obtención de los extractos de plantas	34

2.4. Pruebas cualitativas de perfil químico.....	34
2.4.1. Prueba con KMnO_4 para detectar insaturaciones	34
2.4.2. Prueba de Salkowski para detectar esteroides y triterpenos	34
2.4.3. Prueba para detectar cumarinas.....	35
2.4.4. Prueba con FeCl_3 para detectar oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) 35	
2.4.5. Prueba para detectar floritaninos.....	35
2.4.6. Prueba para detectar lactonas.....	35
2.4.7. Prueba de Shinoda para detectar flavonoides.....	35
2.4.8. Prueba con amoníaco para detectar flavonoides.....	35
2.4.9. Prueba de Ácido sulfúrico para flavonoles, flavonas, chalconas, y quinonas.....	36
2.4.10. Prueba de agitación para saponinas	36
2.4.11. Prueba para saponinas con Bicarbonato de Sodio.....	36
2.4.12. Prueba de Salkowski para saponinas.....	36
2.4.13. Prueba de Baljet para Sesquiterpelactonas.....	36
2.4.14. Prueba de aromaticidad.....	36
2.4.15. Prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos	37
2.4.16. Prueba para detectar antocianinas	37
2.4.17. Prueba para detectar alcaloides	37
2.4.18. Prueba para detectar terpenoides	37
2.4.19. Prueba para detectar esteroides.....	37
2.5. Mediciones de pH	37
2.6. Determinación de capacidad antioxidante	38
2.7. Capacidad antioxidante por método FRAP.....	38
2.7.1. Preparación de reactivos para el ensayo de FRAP	38
2.7.2. Preparación de la curva de calibración para FRAP	38
2.7.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para FRAP ..	38
2.8. Capacidad antioxidante por método DPPH	39
2.8.1. Preparación del reactivo DPPH	39
2.8.2. Preparación de la curva de calibración para DPPH.....	39
2.8.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para DPPH ..	39
2.9. Fenoles totales.....	40
2.9.1. Preparación de reactivos	40

2.9.2. Preparación de la curva de calibración para fenoles totales.....	40
2.9.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para fenoles totales.....	40
2.10. Flavonoides totales.....	40
2.10.1. Preparación de reactivos.....	40
2.10.2. Preparación de la curva de calibración para flavonoides totales.....	40
2.10.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para flavonoides Totales.....	40
2.11. Taninos condensados.....	41
2.11.1. Preparación de reactivos.....	41
2.11.2. Preparación de la curva de calibración para taninos condensados....	41
2.11.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para taninos condensados.....	41
2.12. Evaluación de los extractos de la planta <i>Asphodellus fistulosus</i> como antifúngico.....	41
2.12.1. Colección de hongos y aislamiento.....	42
2.12.2. Diseño experimental.....	42
2.12.3. Cultivo de los hongos.....	43
2.12.3.1. Preparación del Agar PDA.....	43
2.13. Condiciones de la GC/MS.....	43
III. Resultados.....	44
3.1. Ubicación, identificación y obtención de la planta <i>Asphodellus fistulosus</i> ..	44
3.2. Obtención del extracto.....	45
3.3. Pruebas fitoquímicas.....	45
3.4. Mediciones de pH.....	48
3.5. Capacidad antioxidante.....	48
3.5.1. Capacidad antioxidante DPPH.....	48
3.5.2. Capacidad antioxidante FRAP.....	50
3.5.3. Fenoles totales.....	51
3.5.4. Flavonoides totales.....	53
3.5.5. Taninos condensados.....	55
3.6. Evaluación antifúngica de los extractos de <i>Asphodellus fistulosus</i>	56
3.7. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas (GC/MS).....	61
IV. Discusión.....	67

V. Conclusión.....	72
VI. Perspectivas.....	74
VII. Referencias.....	75
Anexos	ix

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de las pruebas fitoquímicas de los extractos de la <i>Asphodellus fistulosus</i>	45
Tabla 2. Resultados de DPPH de los extractos de la <i>Asphodellus fistulosus</i>	49
Tabla 3. Resultados de los extractos en poder reductor (%).	51
Tabla 4. Resultados de fenoles totales de los extractos de <i>A. fistulosus</i>	52
Tabla 5. Resultados de flavonoides totales de los extractos de <i>A. fistulosus</i>	54
Tabla 6. Resultados de taninos condensados de los extractos de <i>A. fistulosus</i>	55
Tabla 7. Resultados de la interacción de los hongos con los extractos de <i>A. fistulosus</i> y testigos.....	58
Tabla 8. Compuestos más abundantes en el extracto de fruto.	64
Tabla 9. Compuestos más abundantes en el extracto de tallo.....	65
Tabla 10. Compuestos más abundantes en el extracto de raíz.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Asphodellus fistulosus</i> L.	10
Figura 2. Curva de calibración para DPPH.....	49
Figura 3. Curva de calibración para FRAP.	51
Figura 4. Curva de calibración para fenoles totales.	52
Figura 5. Curva de calibración para flavonoides totales.	54
Figura 6. Curva de calibración para taninos condensados	55
Figura 7. A) Crecimiento normal <i>Aspergillus spp.</i> a las 72 horas. B) Crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> con los testigos y los extractos de <i>A. fistulosus</i> a las 72 horas. C) Crecimiento normal <i>Fusarium spp.</i> a las 72 horas. D) Crecimiento de <i>Fusarium spp.</i> con los testigos y los extractos de <i>A. fistulosus</i> a las 72 horas. E) Crecimiento normal <i>Thricoderma harzianum</i> a las 72 horas. F) Crecimiento de <i>Thricoderma harzianum</i> con los testigos y los extractos de <i>A. fistulosus</i> a las 72 horas.....	58
Figura 8. Espectro de GC/MS del extracto de fruto.	58
Figura 9. Espectro de GC/MS del extracto de tallo.	65
Figura 10. Espectro de GC/MS del extracto de raíz.....	65

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
μl	Microlitros.
A%	Porcentaje de área.
A.	<i>Asphodellus</i> .
Abs	Absorbancia.
Ác	Ácido.
AlCl₃	Cloruro de Aluminio.
Bi(NO₃)₃	Nitrato de bismuto.
C	Carbono.
cm	Centímetros.
CAT	Catequina.
DDT	Dicloro difenil tricloroetano.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
Dr.	Doctor.
Eq	Equivalente.
Fe⁺²	Ion Ferroso.
Fe⁺³	Ion Férrico.
FeCl₃	Cloruro de Hierro (III).
FRAP	Capacidad de Reducción Férrica del Plasma.
g	Gramos.
GAE	Ácido gálico.
GC/MS	Cromatografía de Gases Acoplada a Masas.
H₂SO₄	Ácido sulfúrico.
HCl	Ácido clorhídrico.
HgCl₂	Bicloruro de mercurio.
H-NMR	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
IR	Infrarrojo.
km	Kilómetros.
KMnO₄	Permanganato de Potasio.
m	Metros.
mg	Miligramos.
min	Minutos.

ml	Mililitros.
mm	Milímetros.
mM	Milimolar.
Mo⁺⁵	Molibdato.
msnm	Metros Sobre Nivel del Mar.
N₂	Nitrógeno líquido.
Na₂CO₃	Carbonato de sodio.
NaNO₂	Nitrito de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	Nanómetros.
O₂	Oxígeno.
PDA	Agar Dextrosa Papa.
PF	Peso en fresco.
pH	Potencial de hidrógeno.
Pk#	Número de pico.
PSI	Libra por Pulgada Cuadrada.
RT	Tiempos de Retención.
<i>spp</i>	Especie.
T	Temperatura.
TAEC	Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox.
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina.
UAE	Extracción Asistida por Ultrasonido.
UV-Vis	Ultravioleta-Visible.
Vol.	Volumen.
W⁺⁶	Wolframato.
WHO	Organización Mundial de la Salud.
Zn	Zinc.
μA	Micro amperes.
μm	Micrómetros.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es realizar la caracterización de los principales componentes fitoquímicos de la *Asphodellus fistulosus L.* y realizar la evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante, mediante la obtención de extractos de la planta de intereses, los cuales se obtuvieron mediante un sistema de disolventes compuesto por metanol: agua: ácido fórmico con ayuda de una maceración y una sonicación. Se realizaron un total de 22 pruebas para conocer el contenido fitoquímico de los extractos, siendo los flavonoides y sesquiterpelactonas algunos de los compuestos encontrados.

Los extractos presentan un DPPH en fruto de $11.85 \pm 0.132\%$, en raíz de $9.38 \pm 0.097\%$ y en tallo: $11.10 \pm 0.105\%$. El poder reductor según FRAP demostró que los extractos de *A. fistulosus* presentan una actividad en tallo 156.78 ± 0.0063 mg Eq Trolox/ g PF, en de fruto de 138.6 ± 0.0078 mg Eq Trolox/ g PF y en de raíz 125.1 mg Eq Trolox/ g PF. El ensayo de fenoles totales demostró que el extracto de fruto tiene una concentración de 3.994 mg Eq GAE / 100 g PF, el extracto tallo de 3.563 mg Eq GAE / 100 g PF y el de raíz una concentración 2.908 mg Eq GAE / 100 g PF. Para flavonoides totales el extracto de fruto reportó una concentración de 2.049 mg Eq GAE / 100 g PF, el de tallo una concentración de 1.634 mg Eq GAE / 100 g PF y el de raíz concentración de 1.5 mg Eq GAE / 100 g PF. El contenido de taninos condensados arrojó que el extracto de fruto tiene una concentración de 3.128 mg Eq GAE / 100 g PF, el extracto de tallo una concentración de 2.453 mg Eq GAE / 100 g PF y el de raíz una concentración de 2.201 mg Eq GAE / 100 g PF.

Se identificaron compuestos insaturados, algunos alcoholes y derivados fenólicos como el 1,2-Benzenediol, 3,5-bis (1,1-dimet hylethyl)- y el 2-Phenyl-4-chloromethyl-5-methyl-1 ,2,3-triazole con ayuda de la GC/MS.

No se demostró una actividad antifúngica en contra de los hongos *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* y *Thricoderma harzianum*, por el contrario, los extractos tienen un aparente efecto bioestimulante en el desarrollo de las cepas fúngicas.

ABSTRACT

The purpose of this research is to characterize the main phytochemical components of *Asphodellus fistulosus* L. and to evaluate the antifungal and antioxidant activity, by obtaining extracts of the plant of interest, which were obtained through a system of solvents composed of methanol: water: formic acid with the help of maceration and sonication. A total of 22 tests were carried out to know the phytochemical content of the extracts, with flavonoids and sesquiterpelactones being some of the compounds found.

The extracts present a DPPH in fruit of $11.85 \pm 0.132\%$, in root of $9.38 \pm 0.097\%$ and in stem: $11.10 \pm 0.105\%$. The reducing power according to FRAP showed that the extracts of *A. fistulosus* present an activity in stem 156.78 ± 0.0063 mg Eq Trolox / g DW, in fruit of 138.6 ± 0.0078 mg Eq Trolox / g DW and in root 125.1 mg Eq Trolox / g DW. The total phenol test showed that the fruit extract has a concentration of $3,994$ mg Eq GAE / 100 g DW, the stem extract $3,563$ mg Eq GAE / 100 g DW and the root extract a concentration $2,908$ mg Eq GAE / 100 g DW. For total flavonoids, the fruit extract reported a concentration of $2,049$ mg Eq GAE / 100 g DW, that of the stem a concentration of $1,634$ mg Eq GAE / 100 g PF and the root concentration of 1.5 mg Eq GAE / 100 g DW. The content of condensed tannins showed that the fruit extract has a concentration of $3,128$ mg Eq GAE / 100 g FW, the stem extracts a concentration of $2,453$ mg Eq GAE / 100 g FW and the root extract a concentration of $2,201$ mg Eq GAE / 100 g FW.

Unsaturated compounds, some alcohols and phenolic derivatives were identified. Some of those compounds were 1,2-Benzenediol, 3,5-bis (1,1-dimethyl-ethyl)- and 2-Phenyl-4-chloromethyl-5-methyl-1,2,3-triazole, identified by GC/MS.

It was not possible to demonstrate an antifungal activity against the fungi *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* and *Thricoderma harzianum*, on the contrary, the extracts have an apparent biostimulant effect on the development of fungal strains.

I. Introducción

La riqueza de plantas en México, es ampliamente reconocida como entre las más grandes del mundo. Se estima que en México hay 23,314 especies de plantas vasculares (aproximadamente 49.8%). Esto marca la importancia en material vegetal con el que se cuenta en el país y lo cual es un campo de oportunidad para el desarrollo de la investigación sobre estas especies vegetales en nuestro país ya que países como China y la India, de riqueza vegetal parecida a la mexicana, cuenta con un desarrollo en la investigación fitoquímica muy importante.¹

Sólo el 10% del total de plantas existentes en el mundo se ha evaluado con respecto a su potencial actividad biológica, lo cual, da una ventana de oportunidades importantes para el desarrollo de diferentes moléculas.²

Los metabolitos secundarios han sido la fuente más exitosa para el desarrollo de fármacos, que también se podrían utilizar con distintos fines. Se pueden descubrir nuevos compuestos que cumplan los requisitos específicos, por ejemplo; un bajo peso, ya que este aumenta la propiedad de la molécula para ser difundida fisiológicamente en las células, permitiendo llegar de mejor modo a su sitio diana. El estudio de los metabolitos secundarios ha sido casi exclusivo para la búsqueda de nuevos tratamientos en contra de enfermedades y no se han estudiado a profundidad la utilidad de estos fitocompuestos en otras áreas.³

Los fitocompuestos de las plantas son responsables de su olor (terpenos), pigmentación (quinonas y taninos) y sabor (terpenos). Algunos de los extractos de plantas son una mezcla de varios compuestos, como terpenoides y fenoles, a los que se les atribuyen propiedades antisépticas, antifúngicas, antioxidantes y antitumorales.⁴

El estudio de estos metabolitos se inicia realizando un proceso de extracción mediante diferentes técnicas dependiendo de las propiedades físicas o químicas de los analitos a extraer, como pueden ser la maceración o por medio de un sistema más complejo, como la sonicación.⁵

La importancia de desarrollar nuevas alternativas para el control de plagas, específicamente por hongos como los *Aspergillus spp.* que son perjudiciales para los cultivos, ya que los metabolitos secretados por este tipo de fitopatógenos, conocidos como: Aflatoxinas, son las responsables de la pérdida de los cultivos contaminados, dado al gran riesgo que representan para la salud de los individuos que puedan ingerir alimentos contaminados, así como el potencial riesgo ambiental que representa por su alta biodisponibilidad y prevalencia en el ambiente, siendo los cultivos más perjudicados el frijol, jitomate, trigo y maíz. Causando impacto en la productividad y reduciendo el valor comercial del producto.⁶

Tanto las aflatoxinas, como los de los fungicidas de origen sintético son de gran relevancia, ya que pueden causar contaminación de suelos y aguas, pudiendo entrar en la red trófica impactando en la salud del medio ambiente, esto incluye a los seres humanos, teniendo efectos adversos como: alergias, disrupción endocrina, alteraciones a nivel del sistema nervioso central, mutagénesis o carcinogénesis.^{6,7,8}

Los fitopatógenos responsables de la destrucción a gran escala de varios tipos de cultivos en todo el mundo, provocando grandes pérdidas alimentarias y económicas. Siendo los hongos la causa principal de la pérdida de arroz, frijoles, soya, maíz, papa y trigo a nivel mundial.⁹

La meta de este trabajo es la caracterización de los principales componentes fitoquímicos de la *Asphodellus fistulosus L.* y realizar la evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante, mediante la obtención de extractos de la planta de intereses.

1.1. Planteamiento del problema

La necesidad de aumentar la producción agrícola, así como la preservación de los productos agrícolas por un lapso mayor de tiempo, y disminuir la pérdida de estos productos por afectaciones de fitopatógenos, ha originado el desarrollo de nuevas tecnologías que buscan satisfacer estas necesidades, siendo una de ellas la creación de plaguicidas de origen sintético, con los cuales se buscaba la eliminación de especies no deseadas en los campos agrícolas.

Esto ha generado una pujante industrialización en la producción de estos agentes químicos, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció su fabricación y consumo a escala mundial. Se originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas.

Los hongos *Aspergillus spp.* se consideran uno de los principales fitopatógenos, atacan a cultivos de gran valor comercial, como; trigo, frijol, maíz y cebada. Debido a la producción de aflatoxinas, resultado de su metabolismo, estos compuestos se consideran toxinas ya que se ha asociado la exposición a estos compuestos a diversos efectos en salud como reacciones alérgicas, alteraciones del sistema nervioso central, y son considerados como mutagénicos y carcinogénicos.^{6,10,11}

Con base en la información obtenida, viendo la necesidad de alternativas de menor impacto ecológico, así como la necesidad de producción de fungicidas de origen natural, es viable la propuesta de una alternativa de control fitopatogénico de origen natural.

Al investigar acerca de plantas de las cuales se tuviera conocimiento de algún tipo de propiedad antifúngico, se denota que en su mayoría son plantas de importancia comercial, como pueden ser el tomillo, clavo, ajo o la “flor de muerto” debido a esto la utilización de alguna de estas especies se vería mermado por el conflicto de interés que esto puede representar para algunas personas, por lo cual, se buscó una planta de un género que no tuviera estas complicaciones. Se estudiaron varias opciones, hasta llegar con la familia de plantas “*Asphodellus*”. De este tipo de familias se tiene bien identificadas algunas de sus propiedades biológicas en contra de patógenos entonces al darnos cuenta de la existencia de este tipo de plantas en el estado de Zacatecas y verificar, además, de la existencia de la *Asphodellus fistulosus* y su nulo estudio acerca de sus propiedades antifúngicas y antioxidantes, nos dio la perspectiva de poder estudiar esta planta.

De la planta *Asphodellus fistulosus*, solo se tiene registro de una composición química conformada principalmente de flavonoides y antraquinonas, pero, no se tiene registro alguno sobre sus propiedades antioxidantes y fungicidas.¹²

Estudios de otras plantas del género *Asphodellus*, como la *Albus* y la *Calendula*, demuestran que estas plantas tienen propiedades como agentes bactericidas y fungicidas. Esto abre una ventana de posibilidades para la obtención del extracto con dicho fin debido a que las plantas de los mismos géneros, presentan composiciones químicas parecidas.^{13,14}

1.2. Antecedentes

Los fungicidas utilizados para el control de hongos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) son los carbamatos, nitrocompuestos aromáticos y extractos vegetales. Se tiene conocimiento que estas sustancias químicas son causantes de diversos daños al medio ambiente y a la salud de los organismos, en humanos pueden causar desde una leve reacción alérgica, daños mutagénicos, carcinogénicos y la muerte, según la concentración, tipo y tiempo de exposición y en el caso ambiental, pues la deposición en compartimientos ambientales.¹⁸

Se tiene conocimiento que el extracto de aceite esencial de orégano cuenta con propiedades fungicida, por su correcta composición de metabolitos, al igual que su concentración, posee características de capacidad de erradicar especies indeseables para cultivos.¹⁹

México cuenta con más de 23,000 especies de plantas nativas y el 49.8% son endémicas, 24 de ellas se han reportado con propiedades plaguicidas.²⁰

La *A. fistulosus* es una planta que se sabe que es tóxica para los humanos y para los animales, no sé sabe cuál es la sustancia causante de dicha toxicidad. Existen pocos estudios que hablen sobre la caracterización química de esta planta, el único que se logró recabar es el que lleva por título “Chemistry of *Asphodelus fistulosus*” en donde sólo se tomaron en cuenta las partes aéreas de la planta

lograron detectar 6 diferentes tipos de antraquinonas y dos tipos de flavonoides y utilizaron las partes aéreas de la planta.¹²

La etapa en la que se realizó la obtención de las plantas de estudio se deseaba que fuera en la época de floración, debido a que en esta etapa la planta concentra los componentes químicos en las partes aéreas, ya que necesita de la mayor parte de sus nutrientes para la producción de flores y semillas, por lo cual, estas flores y semillas serán ricas en compuestos metabólicos secundarios. Además, de que en esta etapa la planta presenta una coloración menos verdosa de lo habitual, esto debido a la poca presencia de clorofilas, ya que esta se ve degradada en esa etapa de la planta. Esto es benéfico a la hora de la realización de los ensayos fitoquímicos, ya que las clorofilas, en muchas ocasiones, solo provoca ruido en los resultados y no aportan nada en las propiedades antifúngicas y antioxidantes de interés.^{21,22}

La capacidad antioxidante de un extracto radica en la disminución que este pueda ejercer sobre los procesos oxidativos ocasionados por la presencia de especies oxidantes, las cuales provocan daños en las células donde estas interactúen, por lo cual, que un extracto presente una actividad antioxidante importante es muypreciado, pues esto puede funcionar como un sistema de defensa adicional al estrés oxidativo causados por los agentes fitopatogénicos que atacan al organismo de interés. Los compuestos a los cuales se les atribuyen más características antioxidantes son aquellos de naturaleza fenólica, de los cuales, la familia *Asphodellus* es muy rica, siendo esto uno de los factores por los cuales se eligió la planta de trabajo, aunque específicamente sobre esta planta, no se tienen registros sobre sus propiedades antioxidantes. Solo hay registros de propiedades favorables a la biorremediación de suelos por la retención de metales.^{23,24}

El estado de Zacatecas, localizado hacia la parte central de México ingresar las coordenadas y las colindancias, algo muy básico sobre su geología, el 73% de la entidad presenta clima seco y semiseco, el 17%, presenta clima templado subhúmedo y se localiza hacia el oeste del estado; el 6 % es muy seco se presenta hacia la región norte y noreste, el 4% restante presenta clima cálido subhúmedo y

se encuentra hacia el sur y suroeste de la entidad por favor reescribe la descripción de los climas utilizando la nomenclatura de Köppen-Geiger y agregando algo sobre las precipitaciones anuales, esto es importante porque describes el nicho ecológico de las plantas. su territorio converge de manera no claramente definida las provincias florísticas Altiplanicie, Costa Pacífica, Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental. Zacatecas tiene una flora vascular que se estima en 136 familias, 708 géneros y 2251 especies.²⁵

Las familias botánicas más comunes en Zacatecas son Asteraceae (15%) Fabaceae y Lamiaceae (6.1%), además de estas, las principales familias de plantas con referencias medicinales en el estado son: Asteraceae, Lauraceae, Fabaceae, Xanthorrhoeaceae, Amaranthaceae, Cactaceae, Apiaceae, Nyctaginaceae y Zygophyllaceae.^{26,27}

El sitio de estudio se encuentra en el municipio de Zacatecas, el cual tiene como coordenadas geográficas extremas: Al norte 22°50", al sur 22°37" de latitud norte; al este 102°32" y al oeste 102°51" de longitud oeste. Su altura media es de 2496 msnm. Colinda al Norte con los municipios de Calera, Morelos y Vetagrande; al este con los municipios de Vetagrande y Guadalupe; al sur con los municipios de Guadalupe, Genaro Codina y Villanueva; al Oeste con el municipio de Jerez. La superficie total del municipio es de 442 km², representando el 0.59 % del total del estado. Tiene un clima preponderantemente del tipo Semiseco Templado. El municipio, situado a 2 485 msnm, en el periodo de 1961-2000 la temperatura media anual promedio fue de 15.4°C (14.1°C del año más frío y 16.7 ° C del más caluroso).²⁸

1.3. Familia Xanthorrhoeaceae

Las xantoroéáceas (Xanthorrhoeaceae) son una familia de plantas angiospermas monocotiledóneas pertenecientes al orden de las asparagales. La familia presenta una amplia distribución geográfica, aunque dispersa, a través de los trópicos y regiones templadas del globo. Muchas de las especies se cultivan como ornamentales. Algunas de ellas se cultivan comercialmente como flor cortada. Dos especies del género Aloe se cultivan por las propiedades medicinales y

cosméticas del jugo de sus hojas. A esta familia pertenecen plantas de gran importancia medicinal como el Aloe Vera (*Aloe barbadensis Miller*), debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y uso cosmético en general.²⁹

Esta también tiene la subdivisión de familias, las cuales son: *Asphodeloideae*, *Hemerocallidoideae* y *Xanthorrhoeoideae*.³⁰

1.4. *Asphodellus fistulosus L.*

Es una planta amacollada que a primera vista puede parecer un pasto. Es de origen Mediterráneo, y actualmente se está extendiendo en muchas partes de la República, sobre todo en el Centro, principalmente a lo largo de las carreteras y en regiones semisecas. También se llega a observar en vegetación de matorral natural, y, por lo tanto, es de relevancia como invasiva (arvense). Introducida del Viejo Mundo y distribución secundaria en E.U.A y México.³¹

Es una especie de planta del género *Asphodelus* y de la familia *Xanthorrhoeaceae*. Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flor); Clase: Liliopsida (monocotiledóneas); Subclase: Liliidae; Orden: Liliales. Hábito y forma de vida: Hierba perenne de rizomas cortos, amacollada, como pasto o cebolla. Tamaño: Hasta de 65 cm de altura. Tallo: Subcilíndrico, de 8 a 25 cm de largo. Hojas: Lineares, hasta de 25 cm de longitud por 2 a 3 mm de diámetro, fistulosas (hueca en medio con los extremos cerrados, como popote), acuminadas, con rayas angostas longitudinales y algo áspera al tacto, verde-azulosas o ligeramente azul-grisáceas, vainas de 2 a 4.5 cm de largo, membranoso-escariosas. Inflorescencia: De 15 a 50 cm de longitud, con flores a lo largo de un eje, que a veces es ramificada (panícula), pedicelos de 4 a 8 mm de largo, bráctea floral de 2 a 3 mm de largo, acuminada o cuspidada, membranosa y seca. Florece y fructifica en diferentes épocas del año y es una planta perenne.^{32,33}

En la figura 1 se representa una planta de *Asphodellus fistulosus* L, en su habitat rural antes de realizar la cosecha de ésta.³³



Figura 1. Planta de *Asphodellus fistulosus* L.³³

1.5. Herborización

Esta acción consiste realizar un recorrido por el área de interés y tomar de este muestras o especímenes enteros de plantas o hierbas completas, las cuales procederán a ser secados para que sean más duraderos o bien, para ser procesados con otro fin.³⁴

1.6. Compuestos activos de las especies vegetales

El principio activo de una planta es una molécula, producto de su metabolismo. Tiene alguna actividad farmacológica o biológica, y es apta para su utilización terapéutica o bien, para otro fin práctico, como bioplaguicida, dependiendo de las propiedades químicas de dicha molécula. En la planta, el principio activo está acompañado de otras moléculas que modelan su actividad. El principio activo aislado, tiene una acción mucho más potente, pero presenta una serie de riesgos y efectos que disminuye su acción. El efecto de la planta no se puede explicar solo por uno de sus principios activos, su actividad completa se debe a los fitocomplejos, constituidos por los principios activos más otras moléculas aparentemente inactivas y otras sustancias coadyuvantes.³⁵

Los principios activos, que ejercen efecto fungicida son fenólicos, flavonoides, taninos, quinonas y alcaloides.³⁶

1.7. Metabolismo secundario de las plantas

La transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora. Estos compuestos son sustancias ecológicamente eficaces, frente a compuestos primarios que serían sustancias fisiológicamente eficaces.³⁷

El ordenamiento estrictamente químico, basado en los principales grupos funcionales, es la forma más secuenciada de organización. Para un mismo grupo funcional, además de la clasificación por las cadenas carbonadas presentes, la separación de los metabolitos secundarios también se realiza teniendo en cuenta la prioridad de organización de cada tipo de compuesto, la posición del grupo funcional, su configuración y la naturaleza de los residuos terminales.³⁸

1.7.1. Alcaloides

Gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mezcalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.³⁹

A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos.³⁹

1.7.2. Glucósidos cardiotónicos

Son glucósidos heterósidos con actividad sobre músculo cardíaco, compuestos de una genina esteroídica y azúcares. La genina, a su vez, tiene una lactona que puede ser pentagonal o hexagonal. Cuando la lactona es hexagonal los glucósidos se conocen como bufadienólidos, mientras que cuando es pentagonal se les llama cardenólidos. Presentan además propiedades detergentes. El más conocido es la digitoxina (representada en la figura) o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.⁴⁰

1.7.3. Triterpenoides y/o esteroides

Son un gran grupo de productos naturales derivados de precursores C₃₀. De los cuales se muestra que existen más de 100 esqueletos distintos. En esta clase de productos naturales se incluyen triterpenos, esteroides, limonoides, quasinoídes triterpenoidales y saponinas esteroideas. La mayoría de los esqueletos triterpénicos son tetraciclos y pentaciclos.⁴¹

Las hormonas esteroides vegetales, conocidas como brasinoesteroides, controlan el desarrollo de las plantas porque ocasionan el crecimiento celular. Proviene de una molécula de cadena lineal de C₃₀ de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C₂₂ y C₂₃.⁴¹

Los limonoides también son triterpenos, las sustancias amargas de los cítricos que actúan como antiherbívoros. Un limonoide de los más poderosos repelentes de insectos es la azadiractina que se usa en la industria alimentaria y en agronomía para el control de plagas.⁴¹

1.7.4. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al

colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables.⁴¹

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente.⁴²

Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran los taninos en la piel. Sin embargo, los taninos del vino tinto tienen efecto beneficioso en la salud humana al bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que provoca vasoconstricción.⁴¹

1.7.5. Flavonoides

Son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos.⁴³

Tienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.⁴³

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7.

Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides.⁴⁴

1.7.6. Quinonas

Las quinonas son una clase de compuestos orgánicos que se derivan formalmente de compuestos aromáticos (como benceno o naftaleno) mediante la conversión de un número par de grupos $-CH =$ en grupos $-C (= O) -$ con cualquier reordenamiento necesario de enlaces dobles, dando como resultado una estructura de diona cíclica totalmente conjugada. Este tipo de compuestos incluye algunos compuestos heterocíclicos. El miembro arquetípico de la clase es 1,4-benzoquinona o ciclohexadienodiona, a menudo llamada simplemente "quinona" (de ahí el nombre de la clase). Otros ejemplos importantes son 1,2-benzoquinona (orto-quinona), 1,4-naftoquinona y 9,10-antraquinona. Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico.⁴⁵

Las antraquinonas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas, equinodermos e insectos. Las familias vegetales más ricas en compuestos antracénicos son las rubiáceas, las ramnáceas y las poligonáceas; y en una menor proporción las liliáceas, Xanthorrhoeaceae (antes clasificadas en liliáceas) leguminosas, bignoniáceas, melastomatáceas, droseráceas, vismiáceas.⁴⁶

Estas sustancias pueden encontrarse en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, madera y frutos. Se les encuentra principalmente en forma de glicósidos (por ejemplo, las senidinas y la barbaloina), y en menor proporción en forma libre o agliconas (por ejemplo, alizarina y crisofanol).⁴⁷

1.7.7. Cumarinas

Las cumarinas constituyen una clase de metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pudiendo también ser encontrados en hongos y bacterias. Poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y antimicrobianas.⁴⁸

Las cumarinas son derivadas del ácido cinámico por ciclización de la cadena lateral del ácido o-cumárico. Todas las cumarinas son sustituidas por un grupo

hidroxila en la posición 7, con excepción de la 1,2-benzopirona. La hidroxi cumarina, también conocida como umbeliferona es la precursora de las cumarinas 6,7-dihidroxiadas y la 6,7,8-tri-hidroxiadas. Estos grupos hidroxilas pueden ser metilados o glicosilados. Cuando ellas son preniladas en varias posiciones del esqueleto cumarínico, como en el caso de la prenilación en C-6 o C-8, originando las pirano o furanocumarinas lineales y angulares respectivamente. Las cumarinas se encuentran distribuidas predominantemente en angiospermas, siendo las estructuras más simples y más encontradas. Las familias más citadas en la literatura por el contenido de cumarinas son: Asteraceae, Rutaceae, Thymeleaceae, Apiaceae, Oleaceae, Moraceae y Fabaceae.^{48,49}

1.8. Fundamento de técnicas de extracción

La extracción es el primer paso para separar el producto natural deseado del material que utiliza como fuente de estudio. La extracción con solvente es el método más utilizado, ya que la separación se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial.⁵

Las técnicas generales de extracción de principios activos de las plantas incluyen maceración, infusión, percolación, digestión, decocción, extracción continua (Soxhlet), extracción acuosa-alcohólica de fermentación, extracción a contracorriente, extracción asistida por microondas, extracción por ultrasonido (sonicación), extracción de fluido supercrítico y técnicas de destilación (destilación de agua, destilación de vapor, extracción fitónica (con solventes hidrofluorocarbonados). Estas técnicas van a depender de diversos factores para asegurarse de que la calidad del extracto buscado sea la mejor.⁵

1.8.1. Elección de solventes

La determinación exitosa de compuestos biológicamente activos del material vegetal depende en gran medida del tipo de solvente utilizado en el procedimiento de extracción.⁵

La elección del solvente está influenciada por lo que se pretende extraer. De la polaridad o la constante dieléctrica. Dado que el producto final contendrá trazas de residuos del solvente, no debe ser tóxico y no debe interferir con futuros bioensayos. El principio básico es moler el material vegetal (seco o húmedo) más fino, que aumenta el área de superficie para la extracción, lo que también aumenta la tasa de extracción. La relación de solvente 10: 1 (v / w) a peso seco ha sido utilizado como ideal.⁵⁰

Los disolventes más utilizados para la extracción de componentes activos son: agua, etanol, metanol, cloroformo, éter y acetona o combinación de éstos.⁵¹

Se basa en la ley de que “Lo similar disuelve lo similar” por lo cual, se utilizan solventes polares para moléculas polares. Los solventes que más han sido utilizados son el alcohol metílico y el etílico, por la gran cantidad de componentes que se pueden extraer con éstos, el bajo costo y el menor riesgo posible a la salud por el manejo de estos reactivos.⁵

1.8.2. Tratamientos previos a la extracción de principios activos

Antes de empezar el proceso de extracción, se recomiendan realizar una serie de acciones que ayudarán a un mejor rendimiento de la extracción, basándose en las necesidades de cada espécimen. Las recomendaciones son:

1.8.2.1. Secado

El secado de una planta no es más que el proceso de extraer la humedad que contiene, para evitar que se pudra, enferme o pierda las sustancias activas, además de permitir su almacenamiento por un tiempo determinado antes de su utilización.⁵

El calor natural es el sistema de secado más adecuado, y el que da siempre los mejores resultados. Obviamente, industrialmente con este sistema se obtiene un rendimiento inferior, ya que se está limitado a la época veraniega. En este caso se recurre a secaderos donde la ventilación, temperatura y humedad pueden ser regulados y mantenidos a un régimen constante.⁵²

El material vegetal puede ser secado también por métodos químicos, por ejemplo, con la adición de Nitrógeno líquido (N₂), ya que, gracias a su punto de ebullición tan bajo, al contactar al material vegetal, hace que el agua en la planta se evapore de manera prácticamente inmediata. Esto hace que sea un método rápido, pero poco accesible, debido a su costo y el material adicional necesario para realizarse.⁵²

1.8.2.2. Molienda

Este proceso consiste en la separación del material completo a secciones mucho más pequeñas, con la finalidad de aumentar el área de contacto del disolvente utilizado con respecto a la planta molida. Esto mejora el rendimiento del disolvente y genera un mayor recobro de obtención de los principios activos buscados. Este proceso se puede realizar de varias maneras, pero el uso de molinos especializados es el más útil y recomendable dado a los resultados y tamaño de partícula necesaria ya que estos tamaños son muy pequeños (nanómetros) y de igual forma, facilita el siguiente paso.⁵³

1.8.2.3. Tamizado

Es un proceso mecánico en el cual, al hacer pasar el resultado de la molienda a través de diversos filtros de diferentes tamaños, hace que el producto final sea prácticamente un polvo, de tamaño de partícula muy pequeño, en estos casos por una malla No. 30-40 (<0.5mm). Todo esto a conveniencia de que el disolvente penetre lo más posible a la planta procesada y esto aumente la cantidad de moléculas buscadas en dicho material vegetal.⁴⁸

1.9. Maceración

En este proceso, la planta en crudo o en polvo grueso se coloca en un recipiente tapado con el solvente y se deja reposar a temperatura ambiente durante un período de al menos 3 días, con agitación frecuente, hasta que la materia soluble se ha disuelto. La mezcla luego se cuela, el orujo (el material sólido húmedo) se presiona y los líquidos combinados se clarifican por filtración o decantación. No dejar a la luz del sol. De existir la presencia de una capa de aire en la parte superior entre la boca del recipiente y la tapa de este, remover el oxígeno que puede existir

en el recipiente con algún gas inerte (Helio, Nitrógeno, etc.) con ayuda de un evaporador.⁵¹

La principal desventaja es que el proceso puede tomar desde unas horas hasta varias semanas. La maceración también puede consumir grandes volúmenes de solvente y puede conducir a la posible pérdida de metabolitos y/o material vegetal. Además, algunos compuestos pueden no extraerse de manera eficiente si son poco solubles a temperatura ambiente. Aunque, como la extracción se realiza a temperatura ambiente, es menos probable que la maceración conduzca a la degradación de los metabolitos termolábiles. La técnica de extracción se usa en frío, lo cual facilita que un solvente específico pueda permanecer sobre una muestra por un tiempo prolongado, teniendo como ventaja el uso de equipos sencillos sin gasto de energía y la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades del material vegetal.⁵¹

1.10. Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)

Esta técnica se basa en la utilización de ondas ultrasónicas, las cuales van de 20 kHz hasta 2000 kHz. El efecto mecánico que se da como resultado de la interacción del medio líquido y las ondas ultrasónicas es una cavitación acústica, esta aumenta el contacto entre la superficie del material vegetal y el sistema de disolventes, además de incrementar la permeabilidad de las paredes celulares (Anexo 1).⁵⁴

Las propiedades tanto químicas como físicas del material vegetal sometido a ultrasonido se ven modificadas, ya que rompe la pared celular, ocasionando la liberación de los compuestos químicos de interés y mejorando la entrada del sistema disolvente en las células vegetales.⁵⁵

Se considera que el procedimiento es sencillo y el equipo tecnológico necesario es relativamente bajo, por lo que se puede utilizar a diferentes escalas de extracción química.⁵⁶

1.10.1. Ventajas de la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)

- Disminución en los tiempos de extracción.

- Menor consumo de disolventes.
- No se utiliza una fuente de calor.
- No se degradan compuestos químicos de interés debido a la termosensibilidad.
- Ahorro de insumos.⁵⁵

1.10.2. Desventajas de la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)

- A más de 20 kHz puede ocasionar un efecto de formación de radicales libres en algunos compuestos fitoquímicamente sensibles.
- El equipo utilizado puede no ser accesible para todos debido a su costo.⁵⁵

1.10.3. Equipo requerido para la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)

La composición más común de un equipo de UAE consiste en A) Un generador de ultrasonido, B) Un transductor y C) Un sonotrodo. Así como componentes adicionales, tales como: D) Soporte y E) Base para colocar el recipiente. Dicha estructura tradicional se puede observar en el Anexo 1.⁵⁶

1.11. Identificación preliminar de metabolitos secundarios

La mayoría de las plantas tienen componentes químicos específicos definidos para a la que se atribuye su actividad biológica. La caracterización cualitativa y cuantitativa del principio activo se realiza haciendo reaccionar los diferentes resultados obtenidos de, por ejemplo, una cromatografía en capa fina del extracto obtenido o bien, directamente al extracto, dependiendo del caso, que será manifestado con la presencia de un cambio de tonalidad, el cual indicará si el ensayo es positivo o negativo, dando así la presencia o ausencia de los grupos funcionales o especies buscadas.⁵¹

1.11.1. Identificación de alcaloides

Reactivo de Mayer

Este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco, cuando el yoduro de potasio reacciona con el cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de

yoduro de mercurio, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro.⁵⁷

Reacción de Dragendorff

Este reactivo contiene yoduro de bismuto potasio, donde al reaccionar $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ con el ácido (HCl) y con yoduro de potasio, forma complejos de color naranja.⁵⁷

1.11.2. Identificación de Glucósidos cardiotónicos

Prueba de Baljet

Identifica lactonas α , β -insaturadas y se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, que presenta coloración rojo claro a oscuro.⁵⁷

1.11.3. Identificación de Triterpenoides y/o esteroides

Prueba de Liebermann-Burchard

Es una reacción donde el esteroles se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En esta prueba ocurre la protonación del grupo OH del esteroles habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ión carbonio 3,5 colestadieno que constituye la primera parte para la formación de color.⁵⁸

1.11.4. Identificación de Taninos

Prueba de gelatina-sal

Se trata de la observación de un precipitado ya que los taninos tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas formando compuestos insolubles.⁵⁷

1.11.5. Identificación de Flavonoides

Prueba de Shinoda (Zn/HCl)

Reacción del magnesio en medio ácido, que reduce el flavonoide generando un producto coloreado que va del rojo anaranjado al violeta.⁵⁹

1.11.6. Identificación de Quinonas

Prueba de Borntrager

Se fundamenta en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y se produce una oxidación de las antranas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de complejos de color rojo.⁶⁰

1.11.7. Identificación de Cumarinas

Prueba de Erlich

En esta prueba se genera una Lactonización del ácido *cis*-O-hidroxicinámico o ácido cumarínico, determinándose la presencia de grupo furano, la muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución de p-dimetilaminobenzaldehído, en etanol y después cloruro de hidrógeno gaseoso, formándose una coloración naranja.⁶⁰

1.12. Actividad Antioxidante

1.12.1. Antioxidantes

Es cualquier tipo de molécula que tenga la capacidad de retardar o prevenir la oxidación mediante la donación de uno o más electrones, con lo que busca dar una estabilización a un componente de origen biológico que se encuentra desapareado por acción del ataque químico de alguna especie de radical libre.⁶¹

1.12.2. Características de los antioxidantes

Estas moléculas tienen la capacidad de oxidarse de manera casi inmediata, de este modo detienen o previenen la desencadenación de una propagación oxidativa, la cual, estabiliza el radical generado por la reacción y provoca también la regeneración del antioxidante. Esto ocasiona una disminución del daño oxidativo en el hospedero de la reacción. Los organismos utilizan un sistema oxidante de protección a nivel fisiológico y bioquímico. El nivel fisiológico regula los niveles de O₂ en los tejidos y el nivel bioquímico, la defensa varía entre la utilización enzimática y la no enzimática.⁶²

1.13. Fenoles totales

Los compuestos fenólicos son una de las clases principales de metabolitos secundarios que existen en las especies vegetales, llevando a cabo diferentes funciones en la fisiología de las plantas, las cuales van desde el crecimiento, la reproducción de las plantas y también formar parte de los procesos de protección inmunológica de las especies vegetales. En los últimos años han cobrado importancia debido a las propiedades antioxidantes que se le atribuyen a este tipo de compuestos, siendo coadyuvantes en los procesos de salud de los humanos.⁶³

La concentración de estos compuestos varía respecto a cada tipo de especie vegetal, variedad y sección de la planta a considerar (Fruto, tallo, raíz, brote, hojas), la exposición a la luz, entorno de desarrollo, procesamiento del cultivo, hasta las condiciones de almacenado.^{63,64}

Se basa en una propiedad química de los compuestos fenólicos, estos al encontrarse a un pH básico en presencia del reactivo Folin-Ciocalteu, se produce una coloración azul que es espectrofotométricamente medible a un ancho de banda de 765 nm.⁶³

El reactivo está constituido por una mezcla de molibdato sódico y wolframato sódico en ácido fosfórico, estos reaccionan con los compuestos fenólicos de las muestras. Se forma un ácido fosfomolibdotúngstico (Debido a las sales en medio ácido), con una coloración amarillenta, esta coloración se ve reducida por la presencia de los grupos fenólicos, se ve formado un complejo azul intenso. Dicha intensidad es la que se mide con ayuda del espectrofotómetro para conocer el contenido fenólico de la muestra de interés (Anexo 2).^{63,64}

La reacción que ocurre es de tipo redox, por esto, también se puede tomar como un método para medir la actividad antioxidante total. La oxidación de los compuestos fenólicos en las diferentes muestras ocasiona la aparición de una coloración azul a un máximo de absorbancia de 765 nm y que se mide con ayuda de un espectrofotómetro, la cual está basada en una recta patrón de un reactivo patrón, siendo el ácido gálico el patrón más utilizado. Este método es por demás sensible y preciso.⁶⁵

1.14. Flavonoides totales

Esta reacción está basada en la formación de complejos entre los flavonoides y el Cloruro de Aluminio. Este mecanismo está fundamentado en la formación de dichos complejos estables en el carbono 4 y los grupos hidroxilos del carbono número 3 y 5 de los flavonoles y flavonas.⁶⁶

La cantidad total de flavonoides se mide con ayuda de un reactivo patrón, en este caso el más utilizado es la Quercetina, esta al ponerse en contacto Nitrito de Sodio (NaNO_2), Cloruro de Aluminio (AlCl_3) e Hidróxido de Sodio (NaOH) se produce la formación de un complejo entre las moléculas de Aluminio y los flavonoides correspondiente (Anexo 2). La absorbancia se mide a los 510 nm.^{67,68}

1.15. Taninos condensados

Este es un método conocido como el de la vainillina. Dicho método es muy utilizado para cuantificar los taninos condensados (Proantocianidinas) en diversas especies vegetales. Esta prueba es específica para el flavan-3-ol, dihidrocalconas y proantocianidinas que poseen una unión simple en la posición 2,3 y que además tienen grupos funcionales metahidroxil libres en el anillo B.⁶⁹

La catequina es un ejemplo del monómero flavan-3-ol y es el estándar más utilizado para este tipo de ensayos. Se basa en la reacción de condensación que sufre la vainillina con las proantocianidinas en soluciones con pH ácido. La vainillina sufre una reacción con el anillo del flavonoide en la posición 6 o 8, dando un producto intermedio, el cual se deshidrata fácilmente para pasar de una tonalidad rosa claro a un rojo intenso (Anexo 2).⁷⁰

Este ensayo debe realizarse en la oscuridad y a temperaturas controladas, ya que esto asegurara que los resultados sean exactos, repetibles y reproducibles. Las lecturas espectrofotométricas se realizan a una longitud de onda de 500 nm.⁷¹

1.16. Determinación de capacidad antioxidante total mediante la metodología de DPPH

Para evaluar actividad antioxidante se recurre a diferentes métodos, siendo uno de los más populares, donde se utiliza un radical libre de nombre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo mejor conocido por las siglas DPPH. Este determina las actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio líquido.⁷²

El fundamento del método radica en la reducción de la absorbancia. Esta se mide a 480 nm del radical DPPH* por acción de la presencia de antioxidante. Se basa en la medida de absorbancia del radical DPPH* disuelto en metanol a una longitud de onda de 480 nm (Anexo 2). Se añade 0.1 ml de la muestra o del reactivo patrón a la mezcla es homogenizada y se mantiene en la oscuridad por 30 min. Se miden las absorbancias antes de agregar la muestra (A_0) y a los 30 y 60 minutos transcurridos (A_t).⁷³

Se calcula la concentración de DPPH* gracias a una curva de calibración que es obtenida por regresión lineal. Estos resultados se deben expresar en TEAC, es decir, la actividad equivalente al Trolox (mg de muestra peso fresco). El reactivo antioxidante sintético utilizado por excelencia es el Trolox, en una concentración que debe estar entre 0,08-1,28 mM en una solución metanólica al 80%. Se deben ensayar en iguales condiciones. Los resultados se expresan en TAEC.⁷³

1.17. Cromatografía de gases Acoplada a Masas (GC/MS)

La cromatografía de gases (GC) se basa en la separación de analitos entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria. En primera instancia, se coloca la muestra en un inyector, el cual ingresa la muestra en forma de spray y se combina con un gas portador, que generalmente se trata de Helio, este acarrea la muestra dentro de una columna capilar recubierta de compuestos de sílice, esta columna se encuentra dentro de un horno a una temperatura determinada, la cual debe de estar entre 200°C y 400°C, ya que, en este rango de temperatura se encuentran los compuestos semivolátiles y volátiles. Las variaciones en temperatura se conocen

como “rampas de temperatura” que tienen como función dividir la temperatura en rangos para asegurar la separación de los componentes de manera correcta.⁷⁴

Dependiendo de la polaridad de los compuestos presentes en la muestra de interés, será mayor o menor el tiempo de retención de estos compuestos en la columna de sílice. Es decir, entre mayor afinidad tengan los compuestos por la columna, mayor será el tiempo que se tarden en llegar a la zona de la fuente de ionización.⁷⁵

El analito puede ser térmicamente ionizado por campo eléctrico o por impacto energético de electrones, iones o protones, que es el principio en el que se basa el detector que se usará, es un método de ionización en el que los electrones energéticos interactúan con los átomos o moléculas de fase sólida o gaseosa para producir iones. En este proceso, un electrón de la molécula de analito se expulsa durante el proceso de colisión para convertir la molécula en un ion positivo con un número impar de electrones.^{76,77}

Una vez fragmentada la molécula en iones, este pasa a un filtro, en este caso, siendo un cuadrupolo que separa los iones por su relación carga-masa, estos pasan al detector que interpreta las señales obtenidas, dando como resultado una señal que se transforma para expresarse en una relación de abundancia con respecto al tiempo. Las señales obtenidas se comparan con bases de datos para así poder tener una referencia de los compuestos que se han encontrado.⁷⁸

1.18. Hongos de estudio

1.18.1. *Thricoderma harzianum*

Es un hongo muy común del suelo, también se encuentra en troncos caídos y estiércol, pertenece a la subdivisión *Deuteromycete*. Es utilizado en la agricultura como agente de control biológico debido a sus propiedades como biopesticida, biofertilizante y bioestimulante. Existen varias especies del *Thricoderma* con muchas características que diferencian, poseen facilidades para colonizar las raíces de las plantas, *Thricoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Este hongo no es dañino si se presenta, al contrario, contribuye al bienestar de la planta donde se

localice. Se utilizará este hongo a manera de referencia, para verificar si el accionar fungicida del extracto funciona tanto en hongos patógenos, como en los que no lo son.⁷⁹

Las características macroscópicas de la colonia con 7 días de desarrollo son: Radio de 5-6 cm, de apariencia aterciopelada, micelio blanquecino y con el tiempo se torna verdoso. Se pueden formar anillos concéntricos, característicos de dicha especie. A nivel microscópico, este hongo se caracteriza por varias cosas específicas, como: Los conidióforos presentan una ramificación piramidal, una ramificación principal alargada. Las fiálides presentan forma de botella con un centro más ancho hasta el final formando una especie de cuello. Las partes del hongo observadas muestran una ligera tonalidad azulosa traslucida (Anexo 3).⁸⁰

1.18.2. *Fusarium spp.*

Este es un género extenso de hongos caracterizados por su crecimiento filamentoso. Se encuentran ampliamente distribuidos por suelos y plantas. Tienen como característica particular la forma de sus esporas, las cuales son fácilmente reconocibles al observarse en el microscopio, ya que tienen una forma de arco o media luna. Mayormente, las especies de estos hongos son saprófitos, algunas pueden producir micotoxinas que pueden llegar a afectar a la salud de los hospederos, ya sean animales, plantas o seres humanos.⁸¹

Son patógenos facultativos, pueden sobrevivir en agua y suelo en descomposición. Producen varios tipos de toxinas, que pueden ser: fumonisinas o tricotecenos. Las cuales pueden provocar diversas enfermedades, como: Queratomycosis, infecciones cutáneas u onicomicosis.⁸²

El principal tipo de producto agrícola que se ve afectado por estos agentes fúngicos son los cereales, tales como: La cebada, el trigo y el maíz. Aunque la patogenicidad de esta especie de hongos no es tan preocupante, ya que toda esta relacionada solo a afecciones cutáneas superficiales, es importante su tratamiento y erradicación, ya que los síntomas relacionados a esta son muy molestos y dolorosos para quien lo padece.^{81,82}

Microscópicamente hablando, *Fusarium spp.* es fácilmente reconocible, ya que sus estructuras presentan características muy especiales, como: Las microconidios presentan una curvatura muy singular, parecida a un plátano, suelen presentar de 5-10 septos y se normalmente se observar conidióforos ramificados.

Las clamidosporas presentan una forma oval, globosa y por lo regular están indiscriminadamente ubicadas alrededor del campo de observación. De igual manera, las características macroscópicas del desarrollo de la colonia suelen ser inicialmente blancas, con un radio de 4-7 cm. De texturas algodonosas, densas y de una coloración inicial rojiza. En PDA el micelio suele tener una coloración que va de lo amarillento a tonalidades naranjas (Anexo 3).⁸³

1.18.3. *Aspergillus spp.*

Género de alrededor de seiscientos hongos. Se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas. *Aspergillus* es un hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas). El hábitat natural de las especies de *Aspergillus* son el heno y el compostaje. Dentro del tipo de hifas se encuentran las no pigmentadas, que reciben el nombre de hialohifomicetos. A su vez tiene dos formas de presentación: una saprofítica, en que aparece como un hongo con hifas septadas del que surgen los conidióforos, los cuales a su vez tienen una ampliación: la cabeza aspergilar de la que surgen unas estructuras de forma ampular, que son las fiálides, de las que surgirán las estructuras reproductivas (también llamados propágulos), y que reciben el nombre de fialoconidias.⁸⁴

Las características macroscópicas de este agente fúngico son: Un micelio algodonoso de crecimiento rápido y después de un lapso corto de tiempo se torna a una coloración verdosa-amarillenta. Posee una textura gruesa y pulverulenta. Microscópicamente hablando, se caracteriza por tener cabezuelas radiadas en diferentes direcciones, cubren toda la vesícula y generalmente son biseriadas, pero es posible observar unas cuentas uniseriadas. Tienen conidióforos de tamaño variable, hialinos y rugosos, principalmente cerca de la vesícula. Las conidias son globosas a subglobosas equinuladas, de color verde pálido (Anexo 3).^{85,86}

1.18.3.1. Micotoxinas

Son sustancias químicas producidas por hongos, que pueden causar enfermedades y muerte, tanto a hombres como a animales. Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios, formados por una serie de reacciones consecutivas, catalizadas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario; por ejemplo: acetato, mebolato, malonato y ciertos aminoácidos. La producción de micotoxinas está asociada al proceso de esporulación del hongo, estrechamente relacionado con las condiciones ambientales y la concentración de nutrientes en el medio.⁸⁷

Las enfermedades que causan las micotoxinas son conocidas con el nombre de micotoxicosis. En altas concentraciones, las micotoxinas pueden producir síndromes agudos de enfermedad, en tanto que a niveles bajos son carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos producen alteraciones mitóticas, interfieren con el desarrollo fetal y pueden reducir la tasa de crecimiento en animales jóvenes, Además, alteran la respuesta inmunológica, haciendo a los animales más susceptibles a infecciones. Afectan, entre otros órganos y sistemas blanco, al hígado, el riñón, el sistema nervioso, endocrino e inmune.⁸⁷

1.18.3.2. Aflatoxinas

Micotoxinas producidas por cepas toxigénicas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas sustancias son altamente cancerígenas, producen toxicidad y cáncer de hígado. Se han detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento en el hogar. El maní y el maíz son productos que se contaminan con facilidad. Las aflatoxinas suelen designarse con letras, que se refieren a una característica física o de otro tipo del compuesto, por ejemplo, las B1 y B2 presentan fluorescencia azul y las G1 y G2, fluorescencia verde cuando se exponen a radiación ultravioleta de onda larga. Las cepas toxicógenas de *Aspergillus flavus* generalmente producen solo aflatoxina B₁ y B₂, mientras que las cepas toxicógenas de *Aspergillus parasiticus*, producen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.⁸⁷

Las aflatoxinas ingeridas, que se absorben por el tracto gastrointestinal, son metabólicamente activadas o detoxificadas en las células de la mucosa intestinal y en el hígado, donde sufren una biotransformación por medio de procesos de epoxidación, hidroxilación, o desmetilación, conjugación y procesos espontáneos. La contaminación de alimentos con aflatoxinas es un problema de salud pública mundial.⁸⁷

Las pruebas de actividad biológica permiten conocer el potencial que pueden presentar las especies vegetales, ya sea, en forma de material crudo, extractos, infusiones, tinturas entre otras; así como también compuestos puros útiles en el área farmacéutica. Debido a la amplia variedad de compuestos que contienen las plantas es importante examinar las fuentes naturales, con el fin de establecer la presencia de compuestos biológicamente activos o su posible toxicidad.⁸⁸

1.19. Determinación de la actividad antifúngica

La finalidad de este tipo de ensayos es conocer el efecto que se da como resultado de la interacción del extracto de interés con los hongos de estudio, es decir, verificar en que forma afecta la presencia de los extractos a los hongos, en caso de existir algún tipo de diferencias en el crecimiento de un cultivo de la especie fúngica de estudio que se da con y sin la presencia de los extractos.⁸⁹

Los principales tipos de estudios para conocer esta actividad antifúngica son los cuantitativos y cualitativos. Los cuantitativos son aquellos que sirven para realizar una determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), en este tipo de estudios se busca conocer la concentración necesaria para evitar el crecimiento del cultivo fúngico en un determinado lapso de tiempo *in vitro* previamente estandarizado.⁹⁰

El método cualitativo se conoce como “Difusión de Agar”. Este ensayo básicamente lo que proporciona es una dilucidación casi inmediata para saber si el fitopatógeno de interés es susceptible o no a el extracto o sustancia con la que se ponga a prueba. Este es el método más popular a todos los niveles de estudios microbiológicos, debido al poco tiempo que lleva su elaboración y el tipo de información de susceptibilidad proporciona.⁹¹

1.19.1. Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer)

Método cualitativo, es caracterizado por su facilidad para ser estandarizado y por ser indicado para microorganismos de manejo simple, crecimiento no tan exigente y rápido. El estudio debe arrancar con una muestra del fitopatógeno fúngico en estado puro, por lo cual, primeramente, se debe de realizar un aislamiento en placa con un medio de crecimiento adecuado para las necesidades del organismo, en este caso PDA.⁹²

Este método consiste básicamente en que se debe agregar en la parte superficial de una placa de agar PDA previamente inoculada con el fitopatógeno de interés, discos de papel filtro impregnados con los diferentes extractos o sustancias de estudio. En cuanto el disco es impregnado, se debe colocar en la superficie del agar, esto forma un gradiente de concentración. Después de un lapso de 18-24 horas de incubación, los discos estarán o no rodeados de un halo de inhibición de crecimiento (Anexo 3).⁹³

1.20. Justificación

Debido entonces a la necesidad de tener en el mercado alternativas de menor impacto ecológico, así como de la búsqueda de nuevas alternativas de origen natural en el tratamiento de plagas fúngicas, es importante el estudio de extractos de origen natural, los cuales no sólo aminoren la presencia de los agentes fitopatogénicos de interés, sino que también sean de menor impacto ecológico.

El vacío en la información sobre el potencial antifúngico, antioxidante de la *Asphodellus fistulosus* y el laxo estudio de la caracterización química de los fitocompuestos de dicha planta, hacen viable la realización de este estudio, además de necesario. A causa de que los beneficios que esto podría conllevar si el extracto hidroalcohólico consiguiera dichos objetivos sin manifestar algún otro tipo de problema, representarían una opción viable para erradicar los hongos patógenos *Aspergillus spp.* y la disminución del uso de fungicidas sintéticos.

Varias serían las ventajas o beneficios del éxito de este extracto, cómo: la disminución de hongos que representan un peligro muy grande a la salud pública,

menor impacto ambiental por el uso de este extracto, un fungicida natural de bajo costo y la disminución de la pérdida de cultivos debido a los hongos *Aspergillus spp.*

La planta *A. fistulosus*, fue seleccionada para ser estudiada y obtener los extractos que serán evaluados para conocer la composición química y la evaluación de dicho extracto para conocer su acción biológica antifúngica y antioxidante.

Los factores necesarios para el desarrollo adecuado de la planta *A. fistulosus* concuerdan con las características ambientales del estado de Zacatecas, ya que es un clima desértico o semidesértico, humedad ambiental y la temperatura favorable para su crecimiento, además de su posición geográfica, ya que la altura del estado es importante.

Existe sólo un estudio que reporta una caracterización química de la *A. fistulosus* de título "Chemistry Of *Asphodelus Fistulosus*"¹⁵, en dicho artículo trabajaron sólo con las partes aéreas de la planta y el extracto fue metanólico. Lograron identificar seis antraquinonas; Asphodelin, Asphodelin 10'-antron, aloesaponarina II, aloe-emodina, crisoptanol y desoxyeritrolaccina. Además de dos flavonoides: crisoeeriol y luteolina. Se identificaron por ensayos fitoquímicos, UV-Vis, IR y H-NMR.¹⁵

No se encontró información acerca de su potencial antifúngico, ni antioxidante. Existen también reportes de estudios realizados para conocer su utilidad en biorremediación en sitios contaminados por pasivos mineros.^{16,17}

La planta es invasora y crece de manera silvestre, no necesita de cuidados especiales para su reproducción o su manutención, se considera ser una especie indeseable, ya que crece sobre especies de importancia como el agave o el maguey y es considerada como maleza en estos casos. Dicha planta, no es nativa del estado de Zacatecas, pero se ha adaptado al clima de la región y crece de manera abundante en el estado por lo cual, el trabajar con una especie de crecimiento regional en el lugar de residencia de la investigación, representa varias ventajas en la logística del estudio. La *A. fistulosus*, no es una especie de intereses, no tiene un valor comercial, no representa un riesgo el tener un conflicto de interés con

productores o personas que se vean beneficiadas económicamente por dicha planta.

1.21. Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de la *A. fistulosus* presenta actividad antifúngica y antioxidante debido a la presencia de fitoquímicos tales como las antraquinonas y los flavonoides.

1.22. Objetivos

1.22.1. Objetivo General

Realizar el análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Asphodellus fistulosus* L y evaluar su actividad biológica y antifúngica.

1.22.2. Objetivos específicos

- Colectar los especímenes de *Asphodellus fistulosus* L y su georreferenciación en el sitio de estudio.
- Estandarizar la metodología de extracción de los metabolitos de la *A. fistulosus*.
- Obtener el extracto hidroalcohólico de *A. fistulosus*
- Realizar el análisis preliminar fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Asphodellus fistulosus* L
- Caracterizar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de *Asphodellus fistulosus* L
- Estudiar la actividad biológica de *Asphodellus fistulosus* L mediante la evaluación antioxidante del extracto hidroalcohólico de *A. fistulosus*
- Evaluar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Asphodellus fistulosus* L frente a dos especies de hongos *Thricoderma harzianum*, *Aspergillus spp* y *Fusarium spp*.

II. Material y Métodos

2.1. Material vegetal

Se colectaron un total de ocho plantas de *A. fistulosus*, de las cuales se obtuvieron del Campus UAZ siglo XXI, ubicado en Zacatecas, Zac. Con un límite

norte, aproximadamente cinco metros al norte de la orilla de la carretera, 10 m al oeste del acceso principal. Con presencia de Vegetación secundaria en superficie ocupada anteriormente por matorral xerófilo. La *A. fistulosus* es una hierba perenne, de aproximadamente 60 cm de altura, color verde brillante, en fructificación, flores escasas, color blanco con una línea café rojizo y abundante. Correspondientes a las coordenadas 22°- 46´- 7.2" Norte, 102°-38´-36.1" Este, con una altitud de 2329 msnm.⁹⁴

La colecta se realizó el 31 de agosto de 2020 y los pasos que se siguieron para la recolección fueron los siguientes:

- Se recorrió toda la zona del Campus XXI.
- Se registraron cada uno de los puntos de crecimiento con un GPS (eTrex-20. GARMIN).
- Se hizo un segundo recorrido por el área en una fecha posterior y se seleccionaron 8 especímenes de estudio.
- Se removió el terreno y se sacaron cada una de las plantas de interés por completo y se envolvieron en papel periódico de manera individual.
- Cinco plantas se destinaron a ser procesadas y dos se analizaron para estudiarlas para asegurarse de que se tratara de la planta de interés y la planta restante se almacenó en caso de necesitarse.⁹⁴

2.2. Secado de la *Asphodellus fistulosus*

Una vez que las plantas se llevaron al laboratorio, se procedió a realizar las siguientes acciones:

- Se limpió y enjuagó cada una de las plantas por completo.
- Se realizó una división de la planta en tallos, frutos y raíces.
- Se pesó cada una de las divisiones obtenidas y se pusieron en interacción con N₂. Se pesó nuevamente cada fracción para asegurarse de que cada parte tuvo una diferencia de alrededor del 70% de peso, lo cual indica que esta fracción ya se encontraba seca.
- Se trituroó cada fracción en un mortero y un molino (Hamilton 80335R)

- Se almacenaron los restos de las plantas a -67°C (Revco 88000).⁵¹

2.3. Obtención de los extractos de plantas

Para obtener cada uno de los extractos se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Se pesaron 3.5 g de material vegetal en una balanza analítica (VELAB VE-204B)
- Se agregaron 31.5 mL de la solución extractora de Metanol (JT. Baker): Agua (HYCEL): Ácido Fórmico (JT. Baker). Con relación de 80:18:2, se homogenizó en un vortex (Labnet, VX100) y se maceró por 7 días.
- En un sonicador (GEX, 130PB) se colocó la muestra a 14 KHz por 2 minutos.
- Se filtró (Whatman No. 40) y se depositaron en recipientes ámbar. Se almacenaron a 4°C .⁹⁵

2.4. Pruebas cualitativas de perfil químico

El perfil químico de los extractos se obtuvo de acuerdo con lo descrito por los Métodos de Investigación Fitoquímica tradicionales, en tubos de ensayo 10 mL, siendo un total de 22 pruebas, cada una repetida por quintuplicado, las cuales se describen a continuación.⁹⁶

2.4.1. Prueba con KMnO_4 para detectar insaturaciones

Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se agregaron 2 gotas de KMnO_4 (SIGMA®) al 2 % en agua. La prueba fue positiva ya que hubo una decoloración o formación de precipitado café (formación de dióxido de magnesio).^{36, 96}

2.4.2. Prueba de Salkowski para detectar esteroides y triterpenos

Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se agregó 1 mL H_2SO_4 (JT. Baker®). La prueba fue positiva para esteroides o metilesteroides ya que hubo los colores amarillo o rojo.^{36, 96}

2.4.3. Prueba detectar cumarinas

Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico se disolvieron en NaOH (JT. Baker®) al 10 %. La prueba fue positiva cuando se desarrolló una coloración amarilla que se elimina al acidular la mezcla.^{36, 96}

2.4.4. Prueba con FeCl₃ para detectar oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)

Se agregaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se resuspendieron en 1 ml de agua y se añadieron unas gotas de FeCl₃ (SIGMA®) al 12.5 % en agua. La prueba fue positiva cuando se formó un precipitado rojo, azul-violeta o verde.^{36, 96}

2.4.5. Prueba para detectar florataninos

Se pusieron a ebullición 0.1 ml de muestra del extracto en solución alcohólica más 2 ml de HCl (SIGMA®) al 1%. La presencia de un precipitado rojo indica que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.6. Prueba para detectar lactonas

Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se agregaron 3 gotas de NaOH 10%. El color amarillo o anaranjado se pierde al agregar unas gotas de HCl lo que indicó la presencia de un anillo lactónico.^{36, 96}

2.4.7. Prueba de Shinoda para detectar flavonoides

En un tubo de ensaye se agregaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico, se añadió limadura de magnesio (0.5 g) y tres gotas de HCl concentrado. La presencia de flavonoides fue positiva al desarrollarse coloración anaranjada, roja, rosa, azul y violeta.^{36, 96}

2.4.8. Prueba con amoniac para detectar flavonoides

Se agregaron 0.25 ml de NH₃ (JT. Baker®) a 0.25 ml de la muestra en solución alcohólica. Se añadieron adicionalmente 0.1 ml de H₂SO₄. (JT. Baker®). La aparición de un color amarillo indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.9. Prueba de Ácido sulfúrico para flavonoles, flavonas, chalconas, y quinonas

Se disolvieron 1 ml de muestra en 2-3 gotas de H₂SO₄, la prueba fue positiva al existir un cambio de coloración. Si es amarilla, es positivo para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso es positivo a chalconas y rojo-púrpura positivo para quinona.^{36, 96}

2.4.10. Prueba de agitación para saponinas

Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se disolvieron con agua en un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente durante 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja por 30 minutos, se considera una prueba positiva.^{36, 96}

2.4.11. Prueba para saponinas con Bicarbonato de Sodio

Se preparo una solución de bicarbonato de sodio al 10%. Se tomaron de 3 a 4 gotas del extracto alcohólico y se agregaron de 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Se agitó ligeramente y se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio (SIGMA®). La aparición de burbujas y la permanencia de estas por al menos 1 minuto, indicó la presencia de saponinas.^{36, 96}

2.4.12. Prueba de Salkowski para saponinas

Se disolvieron de 2-3 gotas de la muestra en 0.5 ml de cloroformo (JT. Baker®). Se le agregaron 0.5 ml de H₂SO₄. La aparición de un color rojo indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.13. Prueba de Baljet para Sesquiterpelactonas

Se agregaron 3-4 gotas del reactivo de Baljet, compuesto por la solución A (Ác. Pícrico 1% etanol, SIGMA®) y solución B (NaOH 10% en agua) a 2-3 gotas de la muestra en solución alcohólica. La aparición de una coloración naranja-rojo oscuro indica que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.14. Prueba de aromaticidad

Se preparo una mezcla de 1 ml de H₂SO₄ con una gota de formaldehído (SIGMA®). Se añadieron 1-5 gotas de muestra en solución alcohólica y se agregó

una gota de la mezcla anterior. La prueba fue positiva si existe la aparición de un color roja-violeta.^{36, 96}

2.4.15. Prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos

Se agregó 1 ml de muestra alcohólica y de 3-4 gotas de reactivo de Liebermann-Burchard (10 gotas de Anhídrido acético, JT. Baker® y 2 gotas de H₂SO₄). La formación de un color azul, verde, rojo, anaranjado, indicó que la prueba fue positiva. Estas coloraciones cambian con respecto al tiempo.^{36, 96}

2.4.16. Prueba para detectar antocianinas

A 0.1 ml de la muestra del extracto en solución alcohólica se agregaron 0.5 de HCl al 10%. Se pusieron a ebullición en baño maría. La aparición de un color rosa pálido indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.17. Prueba para detectar alcaloides

Se agregaron 0.4 mL de reactivo de Mayer (HgCl₂, JT. Baker® y KI, JT. Baker®) a 0.2 mL del extracto de estudio. La aparición de una coloración amarillenta con presencia de precipitados indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.18. Prueba para detectar terpenoides

A 0.5 ml de la muestra del extracto en solución alcohólica se le agregan 0.4 ml de cloroformo, después se le añadieron 0.4 ml de H₂SO₄. Se agregaron lentamente y por las paredes del tubo de ensayo, ya que la reacción puede ser violenta. La aparición de un color marrón rojizo en la interfaz indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.4.19. Prueba para detectar esteroides

Se añadió 1 ml de Ácido acético (SIMGA®) concentrado a 0.25 ml de la muestra del extracto en solución alcohólica. Adicionalmente, se agregó 1 ml de H₂SO₄. La aparición de un color azul-violeta a verde, indicó que la prueba fue positiva.^{36, 96}

2.5. Mediciones de pH

El método para realizar las mediciones de pH a cada uno de las fracciones de la *Asphodellus fistulosus* se realizó llevando a cabo los siguientes pasos:

- Se calibró el Potenciómetro (Orion, Star A211) con soluciones de pH= 4,7 y 10.
- Se limpió el electrodo con agua destilada y se secó con ayuda de un papel.
- Se midió cada una de las muestras, limpiando el electrodo entre cada una de ellas.
- Al finalizar las mediciones se limpió el electrodo y se colocó en una solución estabilizadora.⁹⁷

2.6. Determinación de capacidad antioxidante

2.7. Capacidad antioxidante por método FRAP

Para la realización de esta prueba, se debe preparar una solución de Buffer de acetatos. Los pasos para esta preparación se enlistan a continuación:

- Se pesaron 1.8 g de acetato de sodio anhidrido (SIGMA).
- Se pesaron 3.1 g de acetato de sodio (SIGMA).
- Se agregaron 16 ml de ácido acético (SIGMA).
- Se aforó con agua destilada (JT. Baker).⁹⁸

2.7.1. Preparación de reactivos para el ensayo de FRAP

La preparación de cada solución se encuentra en el Anexo 4.⁹⁸

2.7.2. Preparación de la curva de calibración para FRAP

Las condiciones de la curva de calibración se encuentran en el Anexo 5.⁹⁸

2.7.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para FRAP

Para realizar las lecturas en el espectrofotómetro se siguieron los pasos de a continuación:

- Se colocaron 20 μ l del estándar o extracto en un tubo eppendorf.
- Se agregaron 250 μ l del reactivo FRAP.
- Se dejó reposar por 30 min.
- Se leyeron las absorbancias a $\lambda = 630$ nm (BioRad Benchmark Plus®).

- Se realizaron los procedimientos por triplicado.
- Se expresan los resultados en Trolox equivalente en mmol o mg Eq/100 g de peso fresco o por porcentaje de inhibición.
- Calcular la concentración.
- Se multiplica por el peso de la muestra para sacar el cálculo $x/100$.⁹⁸

Fórmula 1

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = (X)(P. M.)(V. E)$$

- X: [mg/ml] del extracto.
- P.M.: Peso de la muestra vegetal.
- V.E.: Volumen obtenido del extracto.⁹⁸

2.8. Capacidad antioxidante por método DPPH

2.8.1. Preparación del reactivo DPPH

Para obtener un reactivo DPPH (SIGMA) revisar el Anexo 4.⁹⁹

2.8.2. Preparación de la curva de calibración para DPPH

Las condiciones de la curva de calibración se encuentran en el Anexo 5.⁹⁹

2.8.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para DPPH

Para realizar la lectura de DPPH se siguieron los pasos mostrados a continuación:

- Se colocaron en un tubo eppendorf 280 μl de DPPH.
- Se agregaron 30 μl del extracto o del estándar.
- Se dejó reposar por 30 minutos.
- Se leyeron las absorbancias a $\lambda = 480 \text{ nm}$ (BioRad Benchmark Plus®).
- Los procedimientos se realizaron por triplicado.
- La preparación de DPPH se hizo al momento de uso.
- Absorbancias de 1.00 o lo más cercano a 1.
- Si es $>$ la absorbancia, se diluyó con metanol.
- Si es $<$ la absorbancia, se agregó reactivo.

- Se mide el % de inhibición.⁹⁹

Fórmula

Seguir la fórmula 1.

2.9. Fenoles totales

2.9.1. Preparación de reactivos

Para conocer las condiciones de las soluciones, consultar el Anexo 4.¹⁰⁰

2.9.2. Preparación de la curva de calibración para fenoles totales

Las condiciones de la curva de calibración se encuentran en el Anexo 5.¹⁰⁰

2.9.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para fenoles totales

Los pasos para las lecturas de fenoles totales son los siguientes:

- Se colocaron en un tubo eppendorf 30 µl del extracto o del estándar.
- Se agregaron 120 µl del Na₂CO₃ (SIGMA).
- Se adicionaron 150 µl del Folín.
- Se cubrieron los tubos con papel aluminio y dejaron reposar por 2 hr.
- Se leyeron absorbancias a $\lambda = 765$ nm (BioRad Benchmark Plus®).¹⁰⁰

2.10. Flavonoides totales

2.10.1. Preparación de reactivos

La preparación de estas soluciones se puede consultar en el Anexo 4.¹⁰¹

2.10.2. Preparación de la curva de calibración para flavonoides totales

Las condiciones de la curva de calibración se encuentran en el Anexo 5.¹⁰¹

2.10.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para flavonoides Totales

El procedimiento que se realizó para obtener las diferentes lecturas tanto de los estándares utilizados, así como de los extractos analizados para el ensayo de flavonoides totales es el siguiente:

- Se colocaron en un tubo eppendorf 100 µl del extracto o del estándar más 40 µl de agua destilada.

- Al tiempo cero se agregaron 30 µl de NaNO₂ (SIGMA).
- Al minuto 5 se adicionaron 30 µl de AlCl₃ (SIGMA).
- Al minuto 6 se adicionaron 200 µl de NaOH (SIGMA).
- Se agregaron 240 µl de agua destilada.
- Se leyeron las absorbancias a $\lambda = 510$ nm (BioRad Benchmark Plus®).¹⁰¹

2.11. Taninos condensados

2.11.1. Preparación de reactivos

La preparación de solución se puede consultar en el Anexo 4.¹⁰²

2.11.2. Preparación de la curva de calibración para taninos condensados

Las condiciones de la curva de calibración se encuentran en el Anexo 5.¹⁰²

2.11.3. Procedimiento para las lecturas en el espectrofotómetro para taninos condensados

El procedimiento que se realizó para obtener las diferentes lecturas tanto de los estándares utilizados, así como de los extractos analizados para el ensayo de taninos condensados es el siguiente:

- Se agregaron 240 µl de agua destilada.
- Se leyeron las absorbancias a $\lambda = 510$ nm (BioRad Benchmark Plus®).
- Al tiempo cero se agregaron 100 µl de muestra del extracto o del estándar más 500 µl del reactivo. Se mezclaron.
- Se mantuvo el ensayo a 30°C por 20 min.
- Se leyeron absorbancias a $\lambda = 500$ nm (BioRad Benchmark Plus®).¹⁰²

2.12. Evaluación de los extractos de la planta *Asphodellus fistulosus* como antifúngico

Todo lo correspondiente a la evaluación antifúngica de los extractos se realizó en colaboración con personal de la Universidad Interserrana del Estado de Puebla Ahuacatlán perteneciente a la Licenciatura en Biotecnología a cargo del Maestro En Ciencias Francisco Javier Camacho Martínez desarrollando la

experimentación en el Laboratorio de Microbiología, localizado en Ahuacatlán, Puebla, México.

2.12.1. Colección de hongos y aislamiento

Los aislamientos de *Aspergillus spp.*, *Thricoderma harzianum* y *Fusarium spp.* fueron colectados durante el 2020-2021 en diferentes localidades y cultivos en la sierra norte y nororiental del estado de Puebla, México:

- Cuetzalan, *Thricoderma harzianum*.
- Ahuacatlán, *Aspergillus spp.*
- Ahuacatlán, *Fusarium spp.*

Se identificaron tanto macroscópica, como microscópicamente las cepas para verificar que estuviese trabajando con los hongos correctos (Anexo 6).

2.12.2. Diseño experimental

Se llevó a cabo un experimento para determinar la eficacia de los 3 extractos de la planta *Asphodellus fistulosus* y así evaluar el potencial antifúngico de cada extracto a evaluar.

- Extracto I (E.I): Raíz.
- Extracto II (E.II): Tallo.
- Extracto III (E.III): Fruto.

En cada caja se colocaron los 3 extractos de la *A. fistulosus* un extracto por cada división y a su vez, se pusieron a interactuar con los hongos de interés para verificar si estos extractos disminuyen el desarrollo de los hongos.

Se tomaron medidas de la caja para conocer las distancias apropiadas para la colocación de cada una de las partes necesarias, es decir, en donde se colocarían cada uno de los extractos y la distancia adecuada a colocar los diferentes fitopatógenos de interés, siendo la distancia entre el extracto y el hongo de 1.05 cm

Cada una de las cajas con división se hizo por triplicado, es decir por cada hongo se hizo tres cajas Petri con la misma división. En el Anexo 6 se pueden observar las características antes descritas.

A su vez, se realizó un testigo en el cual se sustituyeron los extractos de la *A. fistulosus* por dos agentes químicos de los cuales se tiene claro conocimiento sobre su potencial antifúngico en contra de las especies estudiadas. En este caso se utilizó un agente químico de marca comercial conocido como “Softy” y un extracto de origen natural de Neem-Canela. El primero se utilizó concentrado y el segundo de ellos concentrado y diluido al 50%.

2.12.3. Cultivo de los hongos

Los pasos a seguir para el cultivo de los fitopatógenos en interacción con los extractos de *A. fistulosus* y los testigos se pueden consultar en el Anexo 7.

2.12.3.1. Preparación del Agar PDA

Las cantidades y el procedimiento para la elaboración del PDA se pueden consultar en el Anexo 7.

2.13. Condiciones de la GC/MS

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases (GC) (Agilent 6890) acoplado a un detector de espectrometría de masas (MS) (Agilent 5975) en modo de ionización por impacto electrónico (EI). El puerto de inyección se hizo funcionar en modo splitless. La temperatura del puerto de inyección fue de 270 ° C; helio utilizado como gas portador a una presión de 36 PSI con un flujo constante de 0,9 mL / min. La separación cromatográfica se llevó a cabo a través de una columna HP 5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25148 µm) (Agilent). El ajuste del horno fue el siguiente: 80 ° C, seguido de un incremento hasta los 250°C durante 5 minutos, y un post-corrída de 34 minutos. Los parámetros de sintonía fueron emisión: 35 µA; energía: 69,9. Se empleó el modo SCAN (50–350 m / z) para identificar los compuestos.^{103,104}

Los espectros fueron obtenidos gracias a la comparación de los resultados con la base de datos “National Institute of Standards and Technology” con el URL: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>

III. Resultados

3.1. Ubicación, identificación y obtención de la planta *Asphodellus fistulosus*

La señalización de los puntos de crecimiento de la *Asphodellus fistulosus* encontrados en el área correspondiente al Campus Siglo XXI se pueden observar en el Anexo 8.

Se encontraron un total de 228 puntos de crecimiento, se seleccionaron 8 plantas que cumplían con las características necesarias morfológicas y físicas del terreno para ser extraídas.

Las plantas obtenidas se extrajeron en su totalidad, incluyendo raíces y se acomodaron de forma individual en papel periódico. Se registraron los datos indispensables de la planta. En el Anexo 8 se puede observar la planta seleccionada ya extraída, su colocación en el papel periódico, tanto para ser procesada con el fin de la obtención del extracto, así como para la realización del catálogo y ficha técnica de la *Asphodellus fistulosus*.

Uno de los puntos clave para la correcta identificación de la planta es analizar una por una las partes de interés, en especial las semillas y frutos, ya que las características de estas son prácticamente únicas entre especies. En el caso de la *Asphodelus fistulosus*, los frutos tienen una cápsula de 3 válvulas, con dos o tres semillas por válvula, en promedio. Las semillas tienen un largo de 2.5-4 mm y de ancho 1-2 mm, con una sección transversal triangular a sectorial, de bordes afilados.

La semilla tiene dos caras planas y de dos a tres cavidades, un lado posterior convexo. Tienen una tonalidad café, algunas presentan una franja naranja tenue, de hilum discreto, embrión axial-lineal, que se extiende de polo a casi el otro y con endospermos visibles. Las semillas y cápsulas descritas se pueden observar en el Anexo 8, en esta se pueden observar las cualidades físicas mencionadas.^{105,106}

Las etiquetas de registro de la *Asphodellus fistulosus* realizadas por parte del Herbario de la Universidad Autónoma de Zacatecas, se pueden observar en el Anexo 8, la cual contiene los datos necesarios y características físicas de la planta para poder estar seguros de que se está trabajando con la planta indicada.

3.2. Obtención del extracto

Se procedió de acuerdo al protocolo de extracción de cada una de las partes de estudio: Raíz, tallo y frutos. Como parte del secado previo necesario para la extracción, se utilizó Nitrógeno líquido (N₂) ya que este remueve el agua fácilmente del material vegetal. Se tomó en cuenta que la planta de estudio tiene un promedio de 70-80% de agua, así al momento de realizar el secado, se hizo un primer pesaje de la planta colocada, se agregó el N₂ hasta obtener una diferencia de peso de ese porcentaje.¹⁰⁷

Se lograron obtener un total de 15 extractos metanólicos al 80% de cada una de las fracciones, teniendo cada extracto una coloración característica, amarillo claro: Tallos, amarillo ámbar: Raíces y amarillo oscuro: frutos. Siendo almacenados a 4°C para su análisis posterior en recipientes ámbar. Los procesos realizados se pueden consultar en el Anexo 8.

3.3. Pruebas fitoquímicas

Se realizaron un total de 22 pruebas, cada una de ellas repetidas por quintuplicado. Algunas de las pruebas se pueden consultar en el Anexo 8.

El total de los resultados de las pruebas se encuentran expuestas en la tabla 1, la cual está dividida en tres espacios por cada una de las cinco muestras, debido a que estas se fraccionaron en tallos, raíces y frutos. Las pruebas se realizaron por quintuplicado, pero no hubo variaciones entre los resultados individuales de cada una de ellas, por lo que se muestran los resultados en un solo símbolo, ya sea positivo o negativo.

Tabla 1. Resultados de las pruebas fitoquímicas de los extractos de la *Asphodellus fistulosus*.

Pruebas cualitativas	Muestras														
	1			2			3			4			5		
	T	R	F	T	R	F	T	R	F	T	R	F	T	R	F
Insaturaciones (KMnO ₄)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Esteroles y triterpenos (Salkowski)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ésteres (Cumarinas)	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Oxidrilos Fenólicos (Taninos vegetales)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Florataninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbohidratos (Lactonas)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Flavonoides (Shinoda)	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Flavonoides (Amoniaco)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonas (H₂SO₄)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Flavonoides (H₂SO₄)	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Quinonas (H₂SO₄)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Chalconas (H₂SO₄)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas (Agitación)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Saponinas (NaHCO₃)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas (Salkowski)	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Sesquiterpelactonas (Baljet)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aromaticidad	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Esteroles y triterpenos (Liebermann-Burchard)	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Terpenoides	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Esteroides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: Tallos, R: Raíz, F: Frutos. +: Resultado Positivo y -: Resultado negativo.

Los tallos están constituidos principalmente de compuestos con insaturaciones, esteroides y triterpenos, ya que en la prueba de Salkowski, todas las muestras fueron positivas, sólo la muestra de la planta 1 fue positiva para ésteres, para lactonas, sólo la muestra 1 y 2 fueron positivas, sólo la muestra 5 fue positiva para flavonoides por la prueba de Shinoda, todas positivas para flavonoides en la prueba con amoníaco, las muestras 2 y 5 tienen la presencia de flavonas, las muestras 1,3 y 4, fueron positivas para flavonoides por el método del H_2SO_4 , todas las muestras fueron positivas para saponinas por los métodos de agitación u de $NaHCO_3$, todas fueron positivas para la prueba de Baljet para Sesquiterpelactonas, sólo las muestras 2 y 4 fueron positivas para la prueba de aromaticidad, 3,4 y 5 positivos para esteroides y triterpenos por el método de Liebermann-Burchard, sólo la 3 no fue positivo para los alcaloides y sólo la cinco fue negativa para alcaloides. Con respecto a las raíces, todas presentan insaturaciones, todas positivas para esteroides y triterpenos por el método de Salkowski, todas positivas para cumarinas, todas positivas para lactonas, todas positivas para flavonoides por Shinoda y por amoníaco, 1,4 y 4 positivos para flavonas, 2 y 3 positivos para chalconas, todas positivas para saponinas por los tres métodos diferentes, todas positivas para la prueba de Baljet, todas positivas para la prueba de aromaticidad, sólo la muestra 1 positiva para esteroides y triterpenos por Liebermann-Burchard, todas positivas para alcaloides, a excepción de la muestra 4 y todos fueron positivos para la prueba de terpenoides. Frutos, 1,4 y 5 positivas para la prueba de insaturaciones, todas positivas para la prueba de esteroides y triterpenos por Salkowski, todas positivas para cumarinas, menos la muestra 1, todas positivas para lactonas, 1 y 5 positivas para flavonoides por Shinoda, todas positivas para flavonoides por amoníaco, la muestra 1 fue positiva para flavonas, 2, 3 y 5 positivas para flavonoides por H_2SO_4 , la muestra 4 positiva para quinonas, sólo las muestras 4 y 5 fueron positivas para saponinas por agitación, todas positivas por $NaHCO_3$, 1, 4 y 5 positivas para saponinas por Salkowski, todas positivas para Sesquiterpelactonas, 1, 4 y 5 positivas para compuestos aromáticos y para esteroides y triterpenos por Liebermann-Burchard y todas fueron positivas para terpenoides, a excepción de la muestra 1. Entonces, los resultados nos indican que no hay una diferencia

importante en los extractos, ya que el comportamiento químico en todos es básicamente igual. Por lo tanto, se decidió homologar los siguientes estudios, es decir, se realizaron nuevamente los extractos de igual manera a lo establecido inicialmente, pero mezclando las partes iguales de la planta, es decir, se tomaron 2 g de cada tallo, 2 g de cada raíz y 2 g de cada fruto, dando un total de 10 g en cada muestra y se hicieron los extractos con 90 ml del sistema de disolvente inicial para obtener la relación 1:10.

3.4. Mediciones de pH

Las mediciones de pH se realizaron solo en una ocasión. Los resultados se obtenidos oscilan entre los pH de 3.96-4.25, siendo estos resultados ácidos. Todos Los resultados se pueden consultar en el Anexo 8.

3.5. Capacidad antioxidante

3.5.1. Capacidad antioxidante DPPH

Para obtener los distintos valores del porcentaje de inhibición se toma como referencia los resultados obtenidos con respecto a la curva de calibración (Anexo 5) del estándar de Trolox en metanol usando concentraciones que fueron de 0-2 mg/ml.

La figura 2 muestra la curva de calibración, que es resultado de las mediciones de las diferentes concentraciones del estándar.

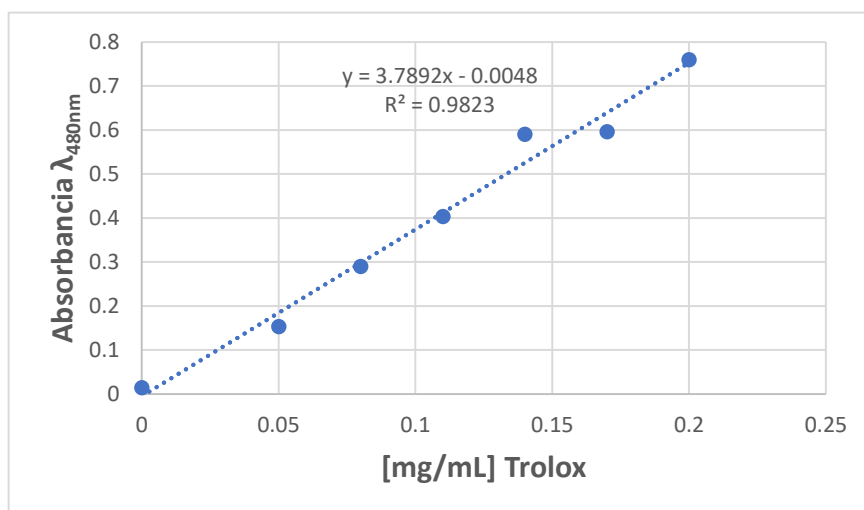


Figura 2. Curva de calibración para DPPH.

Los resultados de las absorbancias obtenidas de los diferentes extractos analizados se pueden consultar en el Anexo 8.

Una vez obtenidas las absorbancias de cada uno de los extractos, se debe tomar en cuenta la absorbancia del DPPH como referencia y seguir la fórmula 2:

$$\% \text{ Decoloración DPPH} = \left(\frac{ADPPH - Abm_i}{ADPPH} \right) * 100$$

Los valores de absorbancia de DPPH se pueden observar en el Anexo 8.

Tabla 2. Resultados de DPPH de los extractos de la *Asphodellus fistulosus*.

Extracto	DPPH (%)	D.E.
F	11.85	0.132
R	9.38	0.097
T	11.10	0.105

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. DPPH (%): Porcentaje de inhibición del extracto en DPPH. D.E.: Desviación estándar.

Los resultados se pueden expresar en mg Eq Trolox/g Peso seco con la fórmula 1.

El peso del material vegetal utilizado para cada extracto fue de 10 g y el volumen final del sistema de disolventes fue de 90 ml, sustituyendo dichos valores para ejemplificar el análisis dimensional de uno de los cálculos, el resultado los extractos serían:

- **Fruto:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = 0.1185 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} (10\text{g})(90\text{ml}) = 106.65 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

- **Raíz:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = 0.0938 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} (10\text{g})(90\text{ml}) = 84.42 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

- **Tallo:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = 0.1110 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} (10\text{g})(90\text{ml}) = 99.9 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

3.5.2. Capacidad antioxidante FRAP

Para obtener los distintos valores del porcentaje de inhibición se toma como referencia los resultados obtenidos con respecto a la curva de calibración (Anexo 5) del estándar de Trolox en metanol usando concentraciones que fueron de 0-2 mg/ml.

La figura 3 muestra la curva de calibración, que es resultado de las mediciones de las diferentes concentraciones del estándar.

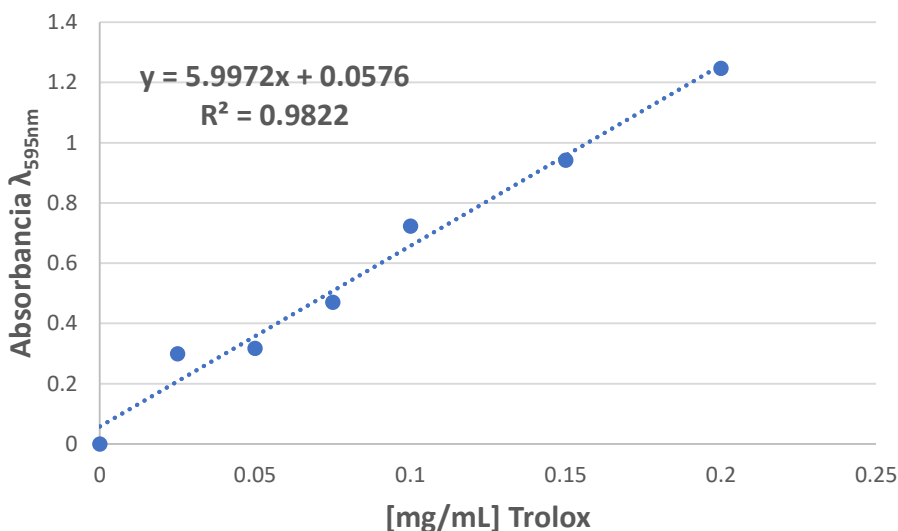


Figura 3. Curva de calibración para FRAP.

Las absorbancias tanto de las referencias, así como de los extractos analizados y los procedimientos para conocer los resultados, se pueden consultar en el Anexo 8.

En la tabla 3 se pueden observar los resultados del poder reductor de cada uno de los extractos analizados.

Tabla 3. Resultados de los extractos en Poder reductor (%).

Extracto	Promedio	Poder reductor (%)	D.E.
F	0.15444	15.44	0.0078
R	0.1394	13.94	0.0046
T	0.1742	17.42	0.0063

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. D.E.: Desviación estándar.

Los resultados también se pueden expresar en concentración de igual forma que en DPPH, siguiendo la fórmula 1:

- **Fruto:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = \left(0.1544 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10 \text{ g})(90 \text{ ml}) = 138.96 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

- **Raíz:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = \left(0.1394 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10 \text{ g})(90 \text{ ml}) = 125.46 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

- **Tallo:**

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = \left(0.1742 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10 \text{ g})(90 \text{ ml}) = 156.78 \frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}}$$

3.5.3. Fenoles totales

Para obtener los distintos valores de fenoles totales se toman como referencia los resultados obtenidos con respecto a la curva de calibración (Anexo 5) de ácido gálico con concentraciones de 0-0.12 [mg/ml]. Dicha curva se puede observar en la figura 4.

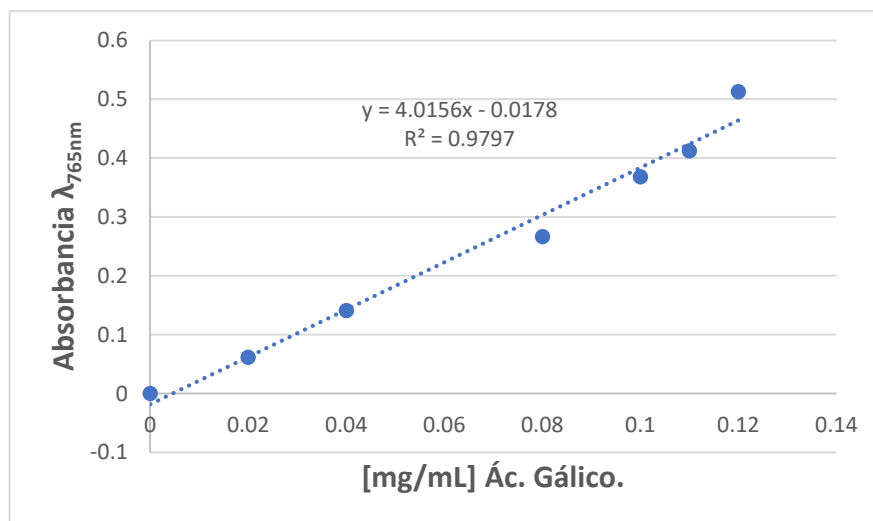


Figura 4. Curva de calibración para fenoles totales.

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos, así como los procedimientos para obtener los valores y resultados, se pueden consultar en el Anexo 8.

Los resultados se expresan como mg/ml de ácido gálico, los cuales se ven resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de fenoles totales de los extractos de *A. fistulosus*.

Extracto	Fenoles [mg/ml]	D.E.
F	0.3994	0.0166
R	0.2908	0.0186
T	0.3563	0.0229

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. [mg/ml]: Concentración en miligramos sobre mililitros. D.E.: Desviación estándar.

Los resultados también se pueden expresar como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100g de peso fresco (PF). Debido a que el peso original utilizado para la obtención de los extractos fueron 10 g por cada extracto, entonces para obtener dicha relación se debe multiplicar el resultado anterior por 10.

- **Fruto:**

$$\frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.3994 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 3.994 \frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Raíz:**

$$\frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.2908 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 2.908 \frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Tallo:**

$$\frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.3563 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 3.563 \frac{\text{mg Eq GAE}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

3.5.4. Flavonoides totales

Para obtener los distintos valores de fenoles totales se toman como referencia los resultados obtenidos con respecto a la curva de calibración (Anexo 5) realizada con ayuda del estándar de referencia que en este caso fue el reactivo catequina con concentraciones de 0-0.6 [mg/ml]. Dicha curva se puede observar en la figura 5.

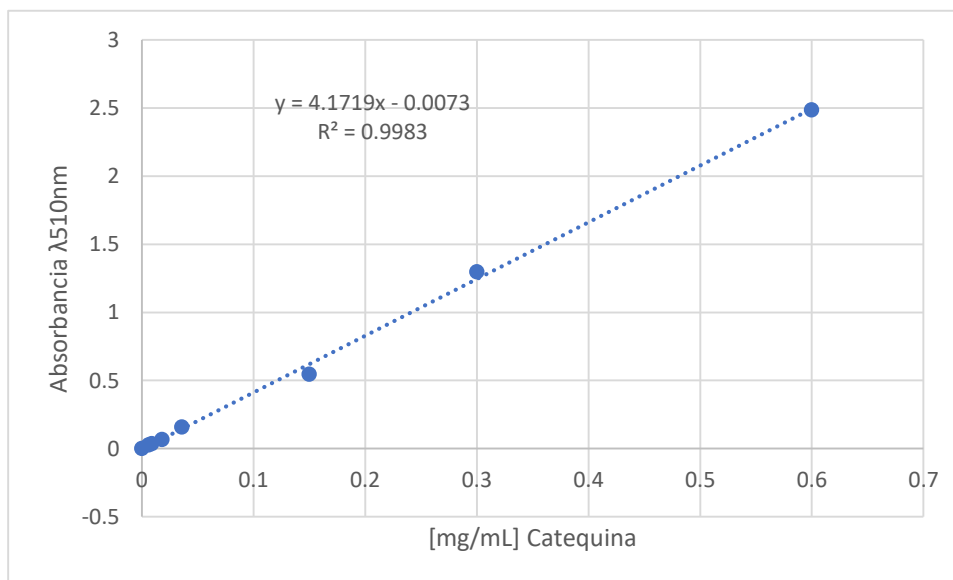


Figura 5. Curva de calibración para flavonoides totales.

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos analizados, así como el procedimiento para obtener los valores resultantes, se pueden consultar en el Anexo 8.

Los resultados se expresan como miligramos sobre mililitros de catequina, los cuales se ven resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de flavonoides totales de los extractos de *A. fistulosus*.

Extracto	Flavonoides [mg/ml]	D.E.
F	0.2049	0.0120
R	0.1500	0.0067
T	0.1634	0.0079

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. [mg/ml]: Concentración en miligramos sobre mililitros. D.E.: Desviación estándar.

Los resultados también se pueden expresar como mg equivalentes de catequina (CAT)/100g de peso fresco (PF). Debido a que el peso original utilizado para la obtención de los extractos fueron 10 g por cada extracto, entonces para obtener dicha relación se debe multiplicar el resultado anterior por 10.

- **Fruto:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.2049 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 2.049 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Raíz:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.1500 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 1.5 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Tallo:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = \left(0.1634 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)(10) = 1.634 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

3.5.5. Taninos condensados

Para obtener los distintos valores de fenoles totales se toman como referencia los resultados obtenidos con respecto a la curva de calibración (Anexo 5) realizada con ayuda del estándar de referencia que en este caso fue el reactivo catequina con concentraciones de 0-3 [mg/ml]. Dicha curva se puede observar en la figura 6.

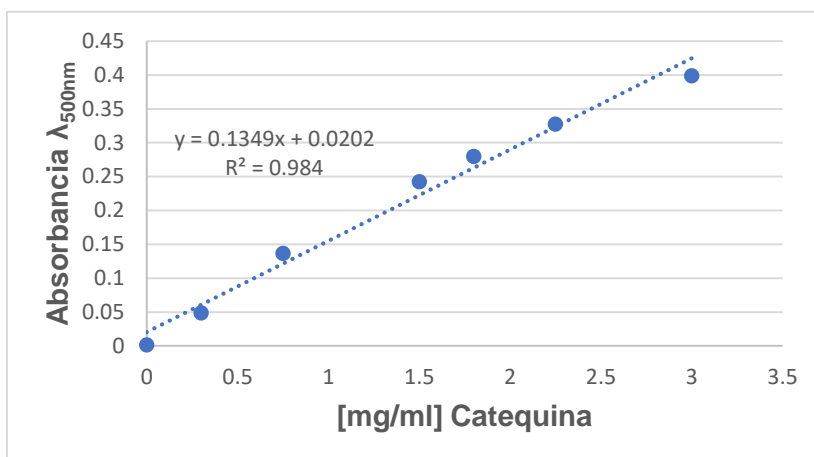


Figura 6. Curva de calibración para taninos condensados.

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos analizados, así como el procedimiento realizado para obtener los valores finales, se pueden consultar en el Anexo 8.

Los resultados se expresan como mg/ml de catequina, los cuales se ven resumidos en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de taninos condensados de los extractos de *A. fistulosus*.

Extracto	Taninos condensados [mg/ml]	D.E.
F	0.3128	0.0295
R	0.2201	0.0087
T	0.2453	0.0087

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. [mg/ml]: Concentración en miligramos sobre mililitros. D.E.: Desviación estándar.

Los resultados también se pueden expresar como mg equivalentes de catequina (CAT)/100g de peso fresco (PF). Debido a que el peso original utilizado

para la obtención de los extractos fueron 10 g por cada extracto, entonces para obtener dicha relación se debe multiplicar el resultado anterior por 10.

- **Fruto:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = (0.3128 \frac{\text{mg}}{\text{ml}})(10) = 3.128 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Raíz:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = (0.2201 \frac{\text{mg}}{\text{ml}})(10) = 2.201 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

- **Tallo:**

$$\frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}} = (0.2453 \frac{\text{mg}}{\text{ml}})(10) = 2.453 \frac{\text{mg Eq CAT}}{100 \text{ g peso fresco}}$$

3.6. Evaluación antifúngica de los extractos de *Asphodellus fistulosus*

El 22 de febrero del 2021, 4 días después de haber sembrado se observa un leve pero muy significativo crecimiento de *Thricoderma harzianum*, en el caso de *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* muestra un leve crecimiento en el medio de cultivo.

El día 23 del mismo mes, *Thricoderma harzianum* muestra nuevamente más crecimiento y en *Fusarium spp.* comienza a verse una cierta inhibición en presencia del extracto, y *Aspergillus spp.* sigue creciendo lentamente. Posteriormente, el día 24 *Thricoderma harzianum* crece de manera más abundante, *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* empiezan a dejar de crecer.

Al comparar el crecimiento de las distintas especies fúngicas en PDA a condiciones normales en contra del desarrollo de estos mismos hongos en presencia de los diferentes extractos de la planta *A. fistulosus*, no existe una inhibición en el halo de crecimiento propio de cada hongo, por el contrario, se registra un notorio crecimiento de cada fitopatógeno en presencia de los extractos, con respecto al desarrollo normal de cada una de las diferentes especies fúngicas.

Es decir, ninguno de los extractos tiene efecto inhibitorio al desarrollo de los

hongos, sino que estimula su crecimiento. En la tabla 7 se ve sintetizada la información del comportamiento de cada uno de los extractos estudiados con respecto al efecto ejercido de estos sobre las diferentes especies fúngica.

Tabla 7. Resultados de la interacción de los hongos con los extractos de *A. fistulosus* y testigos.

Dia	Hongo	Crecimiento (Leve, Moderado y Abundante) de los hongos en presencia de:				
		Extracto de <i>A. fistulosus</i>			Testigo Aerosol Desinfectante	Testigo Extracto de Neem-Canela
		I. Raíz	II. Tallo	III. Fruto		
3	<i>Thricoderma harzianum</i>	Moderado	Abundante	Moderado	Leve	Leve
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Moderado	Abundante	Moderado	Leve	Leve
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Moderado	Abundante	Moderado	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
4	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante	Abundante	Moderado	Leve
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante	Abundante	Moderado	Leve
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante	Abundante	Moderado	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve

	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
5	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante +	Abundante	Moderado	Moderado
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante +	Abundante	Moderado	Moderado
	<i>Thricoderma harzianum</i>	Abundante	Abundante +	Abundante	Moderado	Moderado
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Fusarium spp.</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
	<i>Aspergillus spp.</i>	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve

A. fistulosus: Asphodelus fistulosus. +: Señal de mayor crecimiento fúngico.

El principal resultado es la actividad bioestimulante, esto se puede observar en la figura 7 en la cual se puede comparar claramente el crecimiento de cada hongo en condiciones normales y el desarrollo de estas mismas especies fúngicas, pero con la adición de los diferentes extractos de raíz, tallo y fruto de la *A. fistulosus*, además de la referencia de la acción de los productos químicos de Neem-Canela y “Softy” utilizados.

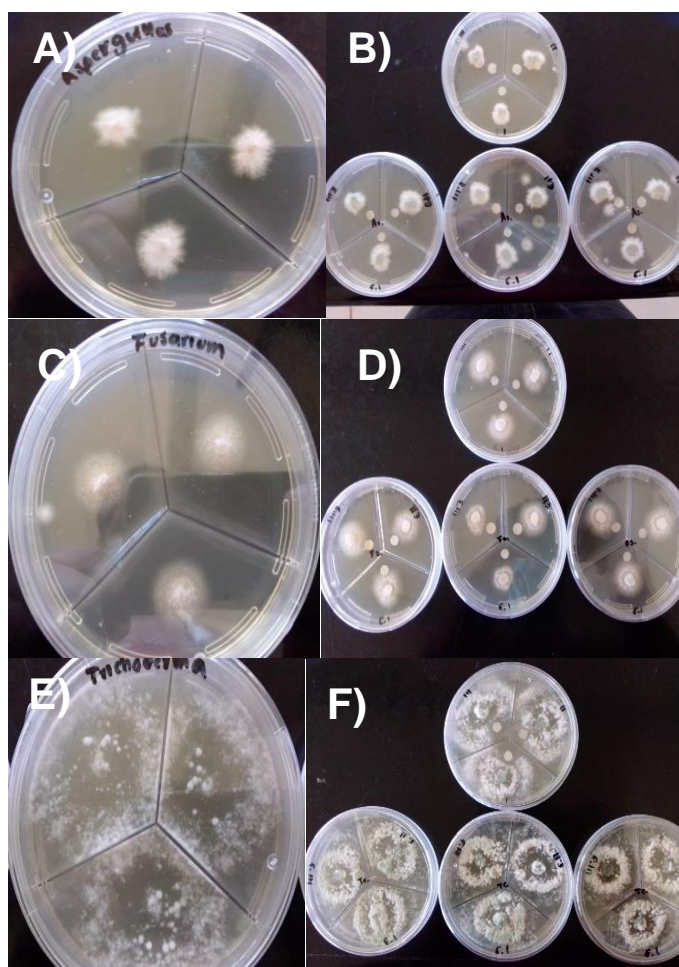


Figura 7. A) Crecimiento normal *Aspergillus spp.* a las 72 horas. B) Crecimiento de *Aspergillus spp.* con los testigos y los extractos de *A. fistulosus* a las 72 horas. C) Crecimiento normal *Fusarium spp.* a las 72 horas. D) Crecimiento de *Fusarium spp.* con los testigos y los extractos de *A. fistulosus* a las 72 horas. E) Crecimiento normal *Thricoderma harzianum* a las 72 horas. F) Crecimiento de *Thricoderma harzianum* con los testigos y los extractos de *A. fistulosus* a las 72 horas.

3.7. Cromatografía de Gases Acoplada a Masas (GC/MS)

En las figuras 8,9 y 10 se muestran los espectros obtenidos por la GC/MS de cada uno de los extractos de *A. fistulosus*.

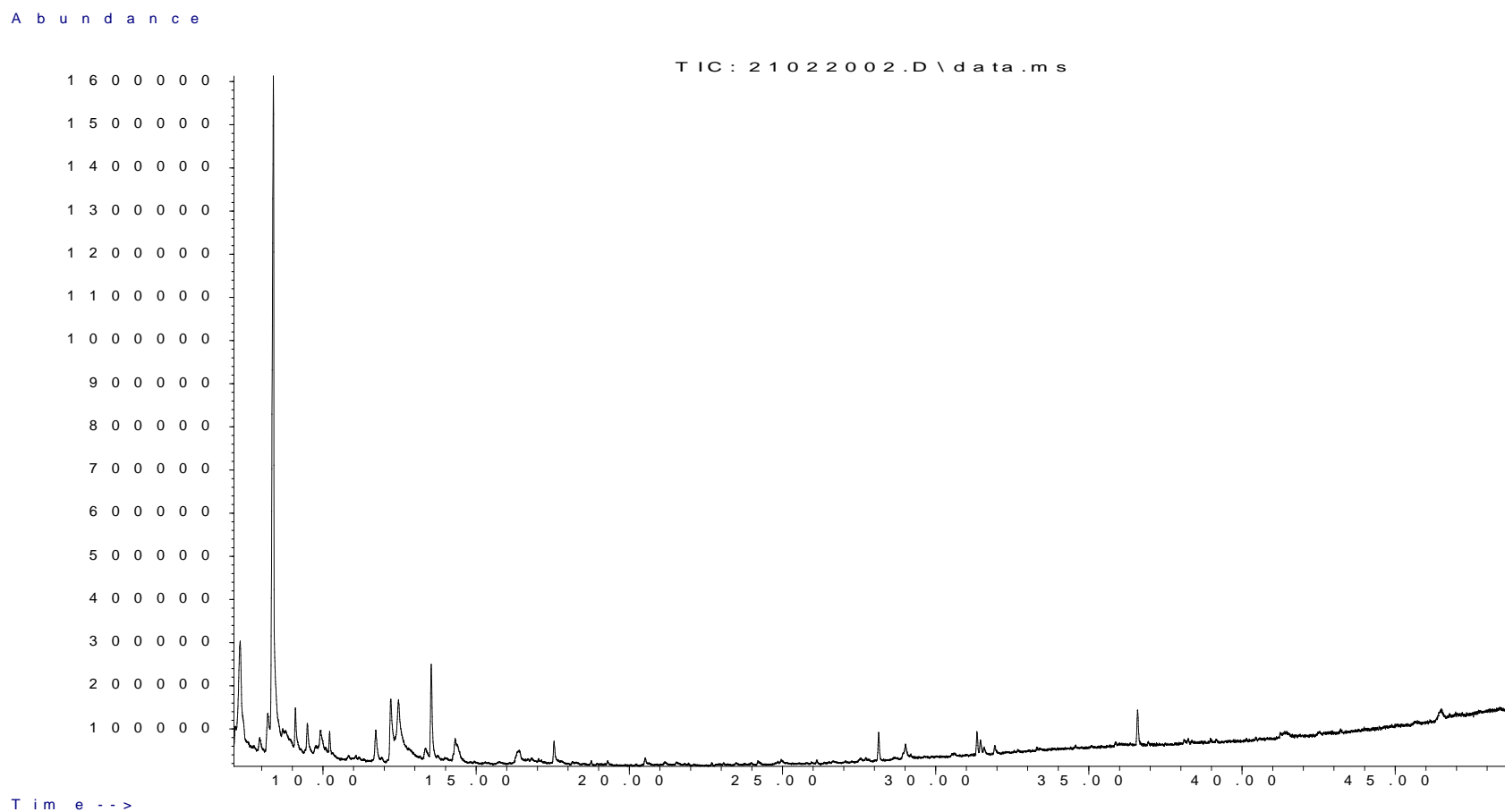


Figura 8. Espectro de GC/MS del extracto de fruto.

A b u n d a n c e

T I C : 2 1 0 2 2 0 0 3 . D \ d a t a . m s

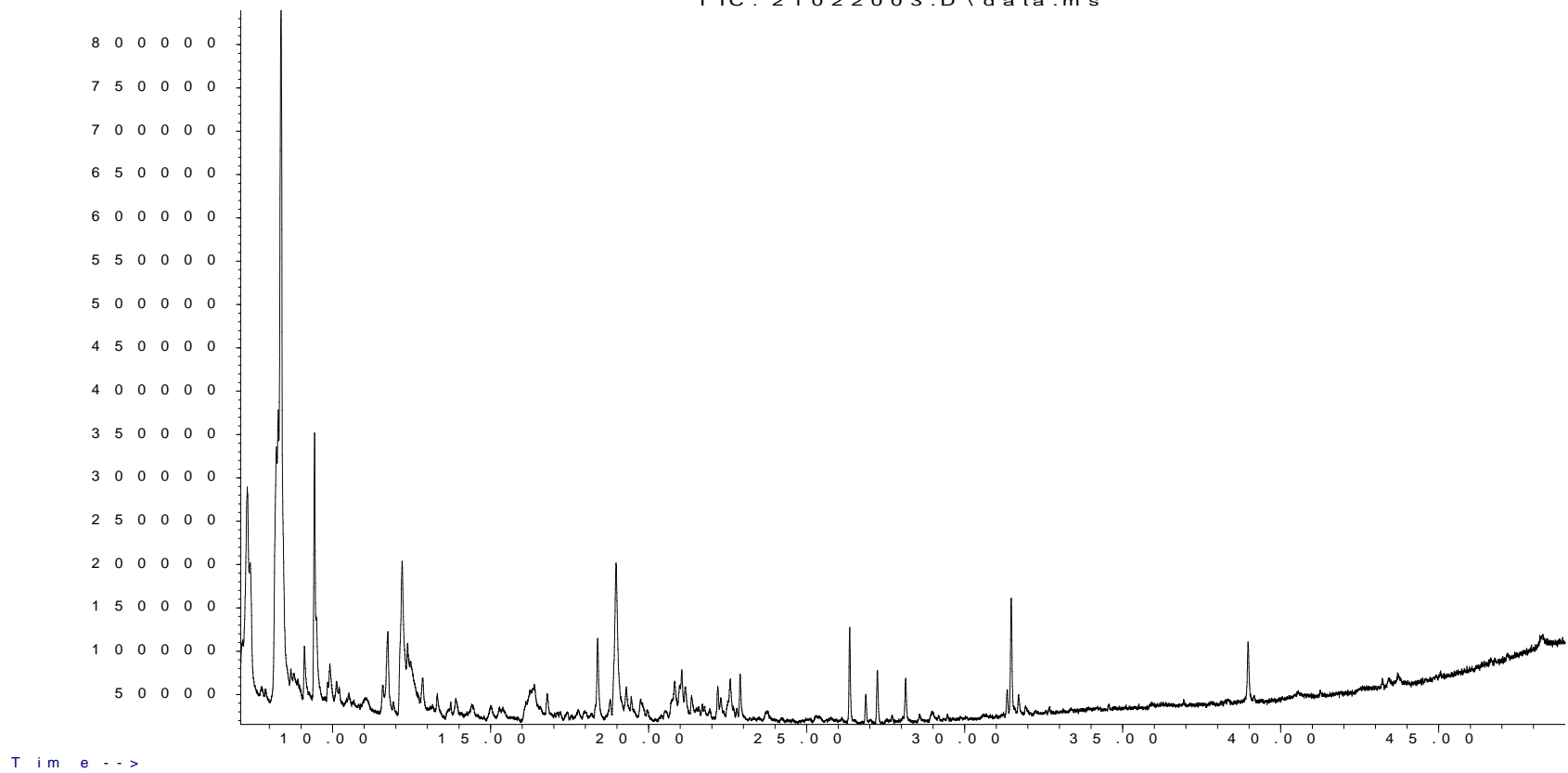


Figura 9. Espectro de GC/MS del extracto de tallo.

Abundance

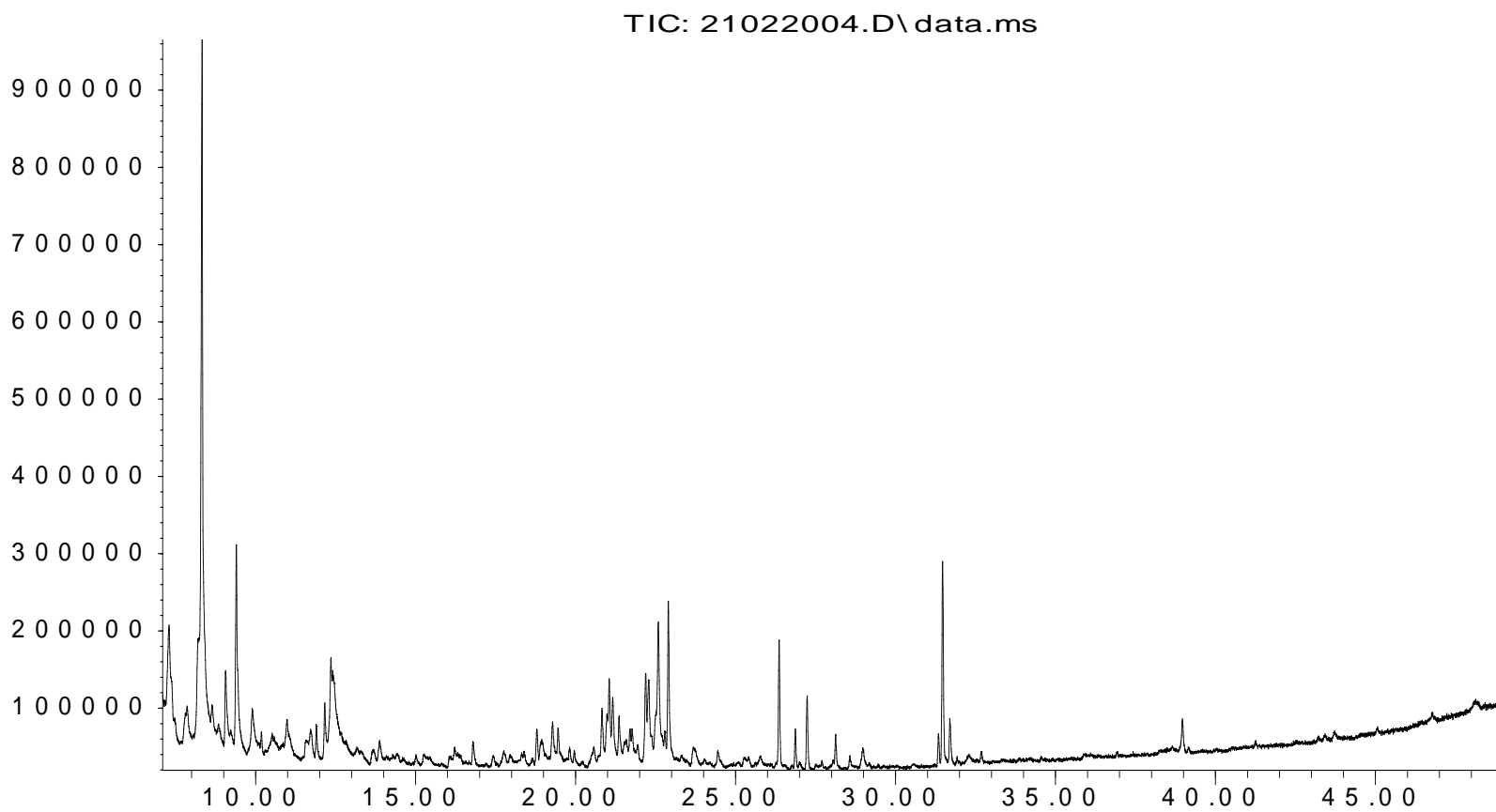


Figura 10. Espectro de GC/MS del extracto de raíz.

En cada uno de los extractos de *A. fistulosus* se encontraron alrededor de 300 fitocompuestos. De estos, sólo se tomaron en cuenta sólo los compuestos más abundantes, debido a que se cree que la propiedad bioestimulante observada en el desarrollo de los diferentes agentes fúngicos es debida a estos fitocompuestos.

En la tabla 8 se ven plasmados los datos de los compuestos más abundantes encontrados, además de datos como los tiempos de retención (RT), el número de pico (Pk #) y la abundancia (A%) para el extracto de fruto.

Tabla 8. Compuestos más abundantes en el extracto de fruto.

Compuestos	Pk #	RT	A%
(p-Methoxyphenyl)-acetonyl-dimethylsilane	2	7.3	7.88
Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester	9	8.202	2.14
1,2-Benzenediol, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl)-	10	8.384	22.35
2-Phenyl-4-chloromethyl-5-methyl-1,2,3-triazole	14	9.1	2.14
Oxime-, methoxy-phenyl-	16	9.494	2.16
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	19	9.92	1.99
2,6-Dimethyl-5-methylphenylaminopyridin-3,4-dicarboxyimide	37	12.218	2.71
2-Ethylacridine	38	12.467	5.19
Bis(2-furfuryl) disulfide	44	13.536	2.92
2-p-Nitrophenyl-5-isopropoxy-oxadiazole-1,3,4	65	16.406	1.2

Pk#: Número de pico. RT: Tiempo de retención. A%: Abundancia.

En la tabla 9 se ven plasmados los datos de los compuestos más abundantes encontrados, además de datos como los tiempos de retención (RT), el número de pico (Pk #) y la abundancia (Área%) para el extracto de tallo.

Tabla 9. Compuestos más abundantes en el extracto de tallo.

Compuestos	Pk #	RT	Área %
(p-Methoxyphenyl)-acetyl-dimethylsilane	3	7.305	4.23
Acetamide, N-[4-(trimethylsilyl)phenyl]-	7	8.285	3.25
1,2-Benzenediol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	9	8.368	14.58
3-Acetoxy-3-hydroxypropionic acid, methyl ester	15	9.432	4.6
3-Acetoxy-3-hydroxypropionic	16	9.842	4.5
Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester	33	12.201	4.21
5H-Naphtho[2,3-c] carbazole, 5-methyl-	34	12.374	1.42
Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	80	18.974	4.56
1,5-Heptadiyne	91	20.826	1.33
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z, Z, Z)-	197	31.474	1.67

Pk#: Número de pico. RT: Tiempo de retención. A%: Abundancia.

En la tabla 10 se ven plasmados los datos de los compuestos más abundantes encontrados, además de datos como los tiempos de retención (RT), el número de pico (Pk #) y la abundancia (Área%) para el extracto de raíz.

Tabla 10. Compuestos más abundantes en el extracto de raíz.

Compuestos	Pk #	RT	Área %
(p-Methoxyphenyl)-acetyl-dimethylsilane	9	8.327	14.26
3-Acetoxy-3-hydroxypropionic acid, methyl ester	15	9.401	3.58
7-Oxabicyclo [4.1.0] hept-3-ene-2,5-dione, 3- (hydroxymethyl)-	31	12.410	3.83
3,5-Hexadien-2-ol, 2-methyl-	32	12.411	4.83
.alpha.-Cadinol	108	22.585	3.96
Bicyclo [4.4.0] dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9- methylene-	107	22.284	2.06

1,4-Methano-1H-indene, octahydro-1,7a-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-, [1s-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7a.beta.)]-	108	22.585	3.96
Ethenone, 1-[5-[(5-methyl-2-furanyl)methyl]-2-furanyl]-	110	22.902	2.65
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z, Z, Z)-	166	21.473	2.51
Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	244	48.134	1.94

Pk#: Número de pico. RT: Tiempo de retención. A%: Abundancia.

Las estructuras químicas de las moléculas mencionadas en las tablas se pueden consultar en el Anexo 9.

IV. Discusión

Estudios previos como el de Malmir, M. *et al.* 2018¹⁰⁸ señalan que las plantas del género *Asphodellus* se caracterizan por tener la presencia química de flavonoides, antraquinonas, terpenoides, saponinas y en general, derivados de ácidos fenólicos, esto concuerda hasta el momento, ya que los resultados de las pruebas fitoquímicas arrojan que efectivamente, en las diferentes muestras existe la presencia de flavonoides, terpenoides, saponinas y quinonas, aunque no se hizo una prueba específica para antraquinonas, como la prueba de Bornträger-Kraus lo cual sería recomendable para tener una mejor referencia.

Así mismo, estudios más específicos como el de Abd, F. *et al.* 1997¹⁰⁹ mencionan que al realizar un extracto por maceración caliente se obtienen seis tipos de antraquinonas y dos tipos de flavonoides y se reporta que se trabajó con la planta completa. Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que, aunque no se especifica en los ensayos fitoquímicos, existen compuestos de naturaleza flavonoide y quinona, además de que en el trabajo si se separaron las partes de la planta en tallos, frutos y raíces.

Específicamente hablando de los tallos, estudios como el de Hammouda *et al.*,¹¹⁰ resaltan que la composición química principal de los tallos son antraquinonas, como Aloe-emodina y crisofanol, por lo que se puede decir que tenemos diferencias, debido a que, de todas las pruebas realizadas para quinonas, sólo de la planta 4, el fruto tuvo presencia de quinonas y ninguno de los tallos fue reportado positivo para esta prueba, por lo que es necesario realizar las pruebas específicas para antraquinonas para tener una mejor noción de los resultados.

Con respecto a los frutos, investigaciones como la de Fell, K. *et al.* 1968¹¹¹ y Khan, S. *et al.* 1961¹¹² coinciden en que tienen presencia de antraquinonas, lo cual coincide con otras investigaciones ya mencionadas, carbohidratos como la sacarosa y rafinosa, en lo cual coincide con los resultados, ya que en todas las pruebas de frutos para carbohidratos, fueron positivas.

De igual manera, los artículos concuerdan en la presencia de triterpenoides como β -sitosterol; β -amirina, lo cual concuerda con los resultados de los análisis fitoquímicos ya que, para todas las muestras, la prueba de Salkowski para esteroides

y triterpenos los resultados, fueron positivos, en el caso de la prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos. Concerniente a la parte de las raíces, en el estudio realizado por Hammouda, F. *et al.* 1974¹¹⁰. Sólo se conocen la presencia de antraquinonas, como el Crisofanol y la Asfodelina, lo cual no podemos discutir, ya que no se realizaron pruebas específicas para antraquinonas y sólo una de las muestras fue positiva para quinonas, por lo que es necesario complementar con estas pruebas específicas para antraquinonas.

De igual manera, los mismos resultados internos varían al comparar algunas de las pruebas destinadas para la detección de los mismos compuestos, por ejemplo, para flavonoides, la muestra de tallo de la planta 1 fue negativa para la prueba de Shinoda, pero positiva para las pruebas de amoníaco y ácido sulfúrico. Otro ejemplo, para las raíces de la planta 2 las dos primeras pruebas para flavonoides fueron positivas, no así la de ácido sulfúrico. En realidad, ninguna de las tres pruebas para flavonoides coincidió al 100% con todas las muestras. Es el mismo caso de las pruebas de esteroides y triterpenos, tanto por el método de Salkowski, como el método de Liebermann-Burchard, ya que en el caso de Salkowski, todas las muestras fueron positivas para y para Liebermann-Burchard, sólo 7 muestras fueron positivas.

En todos los estudios anteriormente mencionados, la naturaleza del extracto fue metanólica, pero con la aplicación de calor con una temperatura de 70-80°C por lo que se puede inferir que pudo existir la pérdida de compuestos termolábiles, como las saponinas y alcaloides, debido a que sus puntos de estabilidad térmica son muy bajos (45-65°C) por lo cual, en ninguno de los artículos revisados se menciona la presencia de estos dos metabolitos.

A diferencia de los resultados obtenidos, ya que, si se reportan la existencia de compuestos termolábiles, debido a que el método seleccionado de extracción fue la sonicación y esta no necesita de temperatura para extraer los compuestos de interés. De la misma manera, no se encontró registro acerca del pH de las muestras, a diferencia de los resultados obtenidos, ya que en general las muestras fueron en un rango de 3.78-4.25, esto podría ser debido tanto a la adición del ácido fórmico a la solución extractora o a la naturaleza ácida de los metabolitos presentes.

Las condiciones geográficas específicas y la edad de las plantas muestreadas podrían desempeñar un papel importante en las variaciones, como sugieren Baraza, E. *et al.* 2008¹¹³. Con respecto a la actividad antioxidante, el extracto de fruto tuvo un porcentaje de DPPH de: $11.85 \pm 0.132\%$, raíz: $9.38 \pm 0.097\%$ y tallo: $11.10 \pm 0.105\%$. Al comparar los resultados de congéneres de esta planta, como lo reportado por Peksel, I. *et al.* 2013¹¹⁴, en donde se estudió *A. Aestivus*, y se reportó un DPPH: $34.34 \pm 0.01\%$ en un extracto de acetona, además de un DPPH: $78.72 \pm 0.23\%$ en una extracción metanólica. Los resultados de *A. Aestivus* son claramente mayores a lo encontrado de *A. fistulosus*, por lo que se puede decir que su poder de inhibición es menor al de su congénere reportado.

También, con respecto al poder reductor reportado gracias al ensayo de FRAP, se encontró que la *A. fistulosus* tuvo en fruto: 138.6 ± 0.0078 mg Eq Trolox/ g Peso seco, raíz: 125.1 mg Eq Trolox/ g Peso seco y 156.78 ± 0.0063 mg Eq Trolox/ g Peso seco. Lo cual difiere con lo reportado en otra planta *Aphodellus*, ya que, por ejemplo, Lazarova, Z. *et al.* 2020¹¹⁵ informan que *A. albus* presentan: FRAP= 81.58 ± 0.84 mg Eq Trolox/ g Peso seco en diclorometano, 31.94 ± 0.58 en metanol y 27.25 ± 0.78 en agua mg Eq Trolox/ g Peso seco. También, Lazarova, Z. *et al.* 2020¹¹⁵ también trabajaron con la planta *A. Aestivus*, la cual presento FRAP: 27.55 ± 1.42 mg Eq Trolox/ g Peso seco en diclorometano, 17.56 ± 0.56 en metanol mg Eq Trolox/ g Peso seco en diclorometano y 24.83 ± 0.38 en agua mg Eq Trolox/ g Peso seco. Estos resultados son menores a lo encontrado en la investigación realizada, por lo que se puede decir que la actividad en FRAP por parte de *A. fistulosus* es mayor que la de su congénere. Esto se puede deber al sistema de disolventes o bien al método de extracción, ya que esto fue la principal diferencia entre los dos trabajos.

Con respecto a los fenoles totales encontrados, la investigación sobre *A. fistulosus* arrojó los siguientes resultados en Fruto: 3.994 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, raíz: 2.908 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y 3.563 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Estos resultados difieren mucho con lo encontrado por Di Petrillo, A. *et al.* 2016¹¹⁶ pues, aquí se menciona que el extracto etanólico de *A. microcarpus* presentó un contenido total de fenoles de: 39.35 ± 4.2 mg Eq GAE / 100 g peso

fresco, lo cual es muy superior a lo encontrado en nuestra investigación, además en ese mismo trabajo, se reportó un contenido total de flavonoides de: 54.44 ± 13.6 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, el cual, de igual forma, es muy superior a lo encontrado en nuestra investigación en cada uno de los extractos de *A. fistulosus*, pues en este trabajo se reportaron las concentraciones en fruto: 2.049 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, raíz: 1.5 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y tallo: 1.634 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Siendo estos muy pequeños a comparación del congénere reportado. Esta actividad se puede deber en primera instancia obvia, al mayor contenido fitoquímico por parte de *A. microcarpus*, a la diferencia nutrimental del lugar de crecimiento, a la temporalidad de cosecha y también, a los métodos y disolventes utilizados para la extracción. Por último, el contenido de taninos condensados encontrado en la *A. fistulosus* para fruto fue de: 3.128 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, raíz: 2.201 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y 2.453 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Dichos resultados, según lo encontrado por Laouini, S. et al. 2015¹¹⁷, son muy inferiores, pues, la *A. tenuifolius* presenta un contenido de taninos condensados de 59.8 ± 0.6 mg Eq CE / 100 g peso fresco en metanol y 49.2 ± 0.5 mg Eq CE / 100 g peso fresco en etanol.

La gran diferencia entre ambas plantas en el contenido de taninos condensados puede adjudicarse principalmente al metabolismo secundario de cada planta, al sistema de disolventes o bien a la temporalidad de cosecha. Por otra parte, ninguno de los extractos de *A. fistulosus* reportó una actividad antifúngica en contra de alguno de los agentes fúngicos utilizados, pero se encontró evidencia presuntiva de que todos los hongos estudiados presentaron un mayor crecimiento en presencia de los extractos al compararlos con el crecimiento normal que tuvieron una ausencia de los extractos de *A. fistulosus*, por lo que se presume que estos extractos ejercen un efecto bioestimulante.

La biosíntesis y concentración de compuestos fenólicos en las plantas depende del genotipo, factores bióticos (plagas, infección por patógenos) y al estrés abiótico (luz, temperatura, fuente de nutrientes, disponibilidad de agua, condiciones de crecimiento y radiación UV), además de las condiciones de almacenamiento y tratamiento postcosecha, se producen por medio de la vía del ácido shikímico,

donde la fenilalanina amonio liasa (PAL), es la enzima clave que cataliza su biosíntesis, como se ve reportado en Cartea, M. *et al.* 2011¹¹⁸.

Esto puede atribuirse a diferentes cuestiones, las cuales están ligadas a la composición química de dichos extractos. Como lo mencionan Malmir, M. *et al.* 2018¹⁰⁸, la composición química de los congéneres *Asphodellus*, es rica en metabolitos como flavonoides, antraquinonas y terpenoides, los cuales están ligados a diferentes cuestiones antioxidantes y de ayuda en diferentes cuestiones celulares, por lo cual, se puede proponer que una de las razones por las cuales se presenta esta capacidad bioestimulante, se pueda deber a la presencia de algún fitocompuesto, además, como se sabe, el crecimiento de los hongos se ve estimulado por diferentes cuestiones, siendo la presencia de nutrientes un aspecto importante a tomar en cuenta, es decir, es válido pensar que los extractos de *A. fistulosus* aportan una cantidad extra de nutrientes, que pueden encontrarse en formas diferentes, como aminoácidos o azúcares, por eso, es pertinente proponer la realización de estudios como los propuestos en Vázquez-Jorge, Y. *et al.* 2014¹¹⁹ en el cual se menciona que para determinar la presencia de aminoácidos o péptidos se debe llevar a cabo un estudio conocido como “Prueba de Sakaguchi” en la que por medio de la adición de reactivos se puede denotar la presencia o ausencia de dichos componentes químicos, con lo cual se podría atribuir o no que la capacidad bioestimulante se debe a la presencia de estos nutrientes extras.

Otros nutrientes a los que se les puede atribuir esta cuestión bioestimulante, puede ser al contenido extra de azúcar, por lo que proponer un estudio como lo estipulado en Moreano Pilatasig, M. *et al.* 2015¹²⁰, que para conocer el contenido de azúcares reductores y con esto hacer una correlación entre el contenido de azúcar de los extractos y la capacidad bioestimulante demostrada por estos.

Cabe la posibilidad de realizar estudios más especializados, en los cuales se midan las propiedades enzimáticas de cada una de las especies fúngicas en presencia de los diferentes extractos y medir por medio de análisis moleculares el cómo se expresan diferentes enzimas que estén relacionadas al crecimiento de los hongos, pero estos escapan del objetivo de este trabajo.

Los resultados de la GC/MS señalan que la composición química de los fitoquímicos encontrados no corresponde a lo señalado en investigaciones como la de Hammouda *et al*,¹¹⁰ quien reporta que la *A. fistulosus* presenta flavonoides y antraquinonas, lo cual, en la investigación no se encontró ninguno de estos compuestos tal cual, sólo se detectaron derivados insaturados, algunos alcoholes, éteres y compuestos fenólicos en general. Estos hallazgos pueden deberse a las diferencias experimentales como la composición de las plantas usadas en esta experimentación y las utilizadas por el estudio comparado o bien, a una necesidad de realizar nuevamente el estudio cromatográfico haciendo cambios de condiciones hasta encontrar algunas moléculas como los flavonoides, los cuales justifiquen un resultado positivo relacionado a lo obtenido en las pruebas fitoquímicas preliminares. Se encontraron algunas coincidencias estructurales entre compuestos, esto justifica el comportamiento químico tan similar entre sí.

V. Conclusión

Se demostró que todos los extractos hidroalcohólicos de fruto, tallo y raíz de la *A. fistulosus* presentan un contenido fitoquímico preliminar muy similar entre sí, ya que en ninguno de estos se presenta una diferencia composicional importante, solamente variando en los tipos de flavonoides encontrados. Siendo los componentes más recurrentes los flavonoides, terpenoides, alcaloides, lactonas, saponinas, sesquiterpelactonas y compuestos aromáticos.

Al determinar las propiedades antioxidantes por medio de los cinco estudios realizados, se encontró que el extracto con un mayor poder de decoloración de DPPH fue el de fruto con un $11.85 \pm 0.132\%$, seguido del de tallo con un $11.10 \pm 0.105\%$ y por último el de raíz con un $9.38 \pm 0.097\%$.

El poder reductor según FRAP demostró que los extractos de *A. fistulosus* presentan una actividad importante, siendo el extracto de tallo el más activo con un 156.78 ± 0.0063 mg Eq Trolox/ g Peso seco, seguido del extracto de fruto con un FRAP de 138.6 ± 0.0078 mg Eq Trolox/ g Peso seco y por último de raíz con un FRAP de 125.1 mg Eq Trolox/ g Peso seco.

Se puede considerar que los extractos de *A. fistulosus* no presentan una actividad antioxidante muy importante, siendo el extracto de fruto con un 3.994 mg Eq GAE / 100 g peso fresco el que presenta una mayor concentración, después aparece el extracto tallo con un 3.563 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y por al final el extracto de raíz con 2.908 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Para flavonoides totales el extracto con mayor concentración de estos compuestos fue fruto: 2.049 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, después el extracto de tallo con una concentración de 1.634 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y finalmente el de raíz, el cual reporta una concentración de 1.5 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Lo concerniente a el contenido de taninos condensados arrojó que el extracto con mayor concentración de estos compuestos fue el de fruto con un 3.128 mg Eq GAE / 100 g peso fresco, seguido del extracto de tallo con 2.453 mg Eq GAE / 100 g peso fresco y por último el de raíz con un 2.201 mg Eq GAE / 100 g peso fresco. Siendo entonces el extracto de fruto el de mayor concentración de fenoles, flavonoides y taninos condensados.

No se encontró actividad biológica antifúngica en contra de *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* y *T. harzianum* por parte de *A. fistulosus*. No existió un efecto de inhibición observable en el crecimiento de estos agentes fúngicos. Se notó un efecto bioestimulante, pues todos los hongos presentaron un mayor crecimiento en las cajas Petri donde se agregaron los diferentes extractos a comparación del desarrollo normal de los hongos.

La composición química encontrada en los extractos de *A. fistulosus* con ayuda de la GC/MS no coincide con lo reportado en la bibliografía. Esto indica variaciones químicas entre congéneres, puesto que sólo se consiguió encontrar compuestos insaturados, algunos alcoholes, ésteres y derivados fenólicos y no flavonoides y antraquinonas como se esperaba.

La hipótesis de que los extractos de *A. fistulosus* presentan actividad antioxidante se acepta, pero no la hipótesis de que estos extractos ejercen una actividad antifúngica, al menos no sobre los agentes fúngicos empleados para el desarrollo de esta investigación, aunque se observó una actividad bioestimulante para una especie de hongo que podría ser competidora para los hongos patógenos

VI. Perspectivas.

Aunque los extractos de la *A. fistulosus* no demostraron presentar una actividad antifúngica sobre las diferentes especies de estudio, la propiedad bioestimulante encontrada es sumamente rescatable, ya que esto marca una nueva ventana de oportunidad para desarrollar investigaciones acerca del porque estos extractos brindar dicha propiedad al ser agregado a los diferentes agentes fúngicos. Si se lograra demostrar por medio de estudios complementarios más específicos que los extractos utilizados en la investigación realmente ejercer un efecto bioestimulante sobre los agentes fúngicos, en especial sobre *Thricoderma*, sería un hallazgo de suma importancia, ya que esto podría ser utilizado en la industria agrícola como un coadyuvante a la hora de realizar los cultivos, especialmente de maíz, por ejemplo, en la industria del maíz, pues la *Thricoderma* es utilizada como un bioestimulante protector del maíz y tener una sustancia química de origen natural que ayude a que el hongo se desarrolle de mayor y mejor manera, significaría un gran avance en lo concerniente a la producción del maíz.

Es necesario realizar mucho trabajo de investigación para poder demostrar lo antes mencionado, pero esto abre una brecha para poder continuar estudiando a profundidad los extractos de *A. fistulosus* a un nivel académico superior.

VII. Referencias

1. Villaseñor, J. L., Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **2016**, *87* (3), 559-902.
2. Sychrová, A.; Koláriková, I.; Žemlička, M.; Šmejkal, K. J. P. R., Natural compounds with dual antimicrobial and anti-inflammatory effects. **2020**, *19* (6), 1471-1502.
3. Cragg, G. M.; Newman, D. J., Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830* (6), 3670-3695.
4. Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **2002**, *82* (1), 47-95.
5. Zhang, Q.-W.; Lin, L.-G.; Ye, W.-C., Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* **2018**, *13*, 20-20.
6. Hüter, O. F., Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochemistry reviews* **2011**, *10* (2), 185-194.
7. Jenks, J. D.; Salzer, H. J. F.; Hoenigl, M., Improving the rates of Aspergillus detection: an update on current diagnostic strategies. **2019**, *17* (1), 39-50.
8. Denning, D. W.; Page, I. D.; Chakaya, J.; Jabeen, K.; Jude, C. M.; Cornet, M.; Alastruey-Izquierdo, A.; Bongomin, F.; Bowyer, P.; Chakrabarti, A.; Gago, S.; Guto, J.; Hochhegger, B.; Hoenigl, M.; Irfan, M.; Irurhe, N.; Izumikawa, K.; Kirenga, B.; Manduku, V.; Moazam, S.; Oladele, R. O.; Richardson, M. D.; Tudela, J. L. R.; Rozaliyani, A.; Salzer, H. J. F.; Sawyer, R.; Simukulwa, N. F.; Skrahina, A.; Sriruttan, C.; Setianingrum, F.; Wilopo, B. A. P.; Cole, D. C.; Getahun, H., Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource-Constrained Settings. *Emerging infectious diseases* **2018**, *24* (8).
9. Fisher, M., Henk D a, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, et al. *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature* **2012**, *484*, 186-94.
10. Bongomin, F.; Batac, C. R.; Richardson, M. D.; Denning, D. W., A Review of Onychomycosis Due to Aspergillus Species. **2018**, *183* (3), 485-493.
11. Friedman, D. Z. P.; Schwartz, I. S., Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* **2019**, *5* (3).
12. El-Fattah, H., Chemistry of Asphodelus fistulosus. *Pharmaceutical Biology* **2008**, *35*, 274-277.
13. Abdel-Gawad, M.; Raynaud, J.; Nétien, G., [Free anthraquinones of Asphodelus albus var. delphinensis and A. cerasifer (author's transl)]. *Planta Med* **1976**, *30* (3), 232-6.
14. Mayouf, N.; Charef, N.; Saoudi, S.; Baghiani, A.; Khenouf, S.; Arrar, L., Antioxidant and anti-inflammatory effect of Asphodelus microcarpus methanolic extracts. *Journal of ethnopharmacology* **2019**, *239*, 111914.
15. Abd El-Fattah, H., Chemistry of Asphodelus fistulosus. *International Journal of Pharmacognosy* **1997**, *35* (4), 274-277.
16. JALES, F.; ZAMORA, I. B. M. A. H., ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE PLOMO Y CADMIO POR ASPHODELUS FISTULOSUS L. Y BRASSICA JUNCEA L. PARA.
17. Alderete-Suárez, B. M.; Valles-Aragón, M. C.; Canales-Reyes, S.; del Rosario Peralta-Pérez, M.; Orrantia-Borunda, E., BIOCONCENTRACIÓN DE Pb, Cd Y As EN BIOMASA DE Eleocharis macrostachya (CYPERACEAE). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **2019**, *35*, 93-101.
18. Yunta, C.; Hemmings, K.; Stevenson, B.; Koekemoer, L. L.; Matambo, T.; Pignatelli, P.; Voice, M.; Nász, S.; Paine, M. J., Cross-resistance profiles of malaria mosquito P450s associated with pyrethroid resistance against WHO insecticides. *Pesticide biochemistry and physiology* **2019**, *161*, 61-67.
19. Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M., Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry* **2004**, *85* (4), 633-640.

20. Hernández-Carlos, B.; Gamboa-Angulo, M., Insecticidal and nematicidal contributions of Mexican flora in the search for safer biopesticides. *Molecules* **2019**, *24* (5), 897.
21. Díaz Lifante, Z. M. J. L., 17, 211-226., Observaciones sobre el comportamiento en la germinación de las semillas de *Asphodelus* L.(Asphodelaceae). **1993**.
22. Lorda López, M., El complejo *Asphodelus Fistulosus*-A. Ayardi (Asphodelaceae) en el Valle medio del Ebro. **2010**.
23. Montañó, N. M.; Alarcón, A.; Camargo-Ricalde, S. L.; Hernández-Cuevas, L. V.; Álvarez-Sánchez, J.; González-Chávez, M. d. C. A.; Gavito, M. E.; Sánchez-Gallen, I.; Ramos-Zapata, J.; Guadarrama, P., Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects. *Symbiosis* **2012**, *57* (3), 111-126.
24. Rodríguez-Serrano, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; Zabalza, A.; Corpas, F. J.; Gomez, M.; Del Rio, L. A.; Sandalio, L. M., Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell & Environment* **2006**, *29* (8), 1532-1544.
25. Rzedowski, J., Geographical relationships of the flora of Mexican dry regions. *Vegetation and Vegetational History of Northern Latin America Papers* **1973**.
26. Reimers, E.; Cusimamani, E.; Rodriguez, E.; Zepeda del Valle, J.; Polesny, Z.; Pawera, L., An ethnobotanical study of medicinal plants used in Zacatecas state, Mexico. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **2018**, *87* (2).
27. Ríos Muñoz, C.; Espinosa Martínez, D.; Ballesteros-Barrera, C.; Ameneyro-Cruz, G.; Ortega, G.; Arroyo-Cabrales, J.; León-Paniagua, L., Mamíferos de Zacatecas. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época* **2017**, *7*, 1-24.
28. Geografía, I. N. d. E. y., *Anuario estadístico y geográfico de Zacatecas 2015*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía: 2015.
29. Sujatha, G.; Kumar, G. S.; Muruganandan, J.; Prasad, T. S., Aloe vera in dentistry. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **2014**, *8* (10), Zi01-2.
30. Chase, M. W.; Reveal, J. L.; Fay, M. F., A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, *161* (2), 132-136.
31. Villaseñor Ríos, J. L.; Espinosa García, F. J., *Catálogo de malezas de México*. 1998.
32. Rzedowski Rotter, J.; Calderón de Rzedowski, G. *Flora fanerogámica del Valle de México*; Instituto de Ecología. México: 1985.
33. Rodríguez Torres, P., Evaluación fisiológica de especies vegetales que crecen en sitios impactados por residuos generadores de drenaje ácido de roca. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT* **2013**.
34. Seco, I. A.; Invernón, V. R.; de la Estrella González, M.; Nieto, E. L.; Alcaraz, J. A. D., Manual de laboratorio de Botánica. El herbario. Recolección, procesamiento e identificación de plantas vasculares. *Reduca (Biología)* **2012**, *5* (2).
35. Guzmán-Pantoja, L. E.; Lina-García, L. P.; Bustos-Zagal, G.; Hernández-Velázquez, V. M., Current status: Mexican medicinal plants with insecticidal potential. *Bioactive Compounds in Phytomedicine; Rasooli, I., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia* **2012**, *1*, 39-66.
36. Bañuelos-Valenzuela, R.; Delgadillo-Ruiz, L.; Echavarría-Cháirez, F.; Delgadillo-Ruiz, O.; Meza-López, C., Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia* **2018**, *52* (3), 309-321.
37. Valdés, R.; Balbín, M. I., Curso de fisiología y bioquímica vegetal. *La Habana, Cuba: Universidad Nacional de Ciencias Agrarias de la Habana* **2000**.
38. Ikan, R., *Natural products: a laboratory guide*. Academic Press: 1991.

39. Venkatesan, G. K.; Kuppusamy, A.; Devarajan, S.; Krishna, A. K., REVIEW ON MEDICINAL POTENTIAL OF ALKALOIDS AND SAPONINS. **2019**.
40. García, A. Á.; Carril, E. P.-U., Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)* **2011**, 2 (3).
41. Hill, R. A.; Connolly, J. D., Triterpenoids. *Natural product reports* **2018**, 35 (12), 1294-1329.
42. Salminen, J. P.; Karonen, M.; Sinkkonen, J., Chemical ecology of tannins: recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure–activity patterns. *Chemistry–A European Journal* **2011**, 17 (10), 2806-2816.
43. Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J., Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* **2002**, 17 (6), 271-278.
44. Neta, P.; Huie, R.; Maruthamuthu, P.; Steenken, S., Solvent effects in the reactions of peroxy radicals with organic reductants: evidence for proton-transfer-mediated electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, 93 (22), 7654-7659.
45. Martínez, A., Quinonas y compuestos relacionados. *Universidad de Antioquia, curso de farmacognosia y fitoquímica* **2005**.
46. Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Aqil, M., Bianthraquinones from *Cassia siamea*. *Phytochemistry* **2001**, 56 (8), 849-851.
47. Cohen, P. A.; Towers, G. N., Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *Journal of natural products* **1995**, 58 (4), 520-526.
48. Muñoz, O., *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología*. Editorial Universitaria: 2001.
49. Haber, R. Y., Composición química cualitativa de las hojas de. *Fitoterapia* **1995**, 66 (3), 3.
50. Lapornik, B.; Prošek, M.; Wondra, A. G., Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering* **2005**, 71 (2), 214-222.
51. Pandey, A.; Tripathi, S., Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2014**, 2 (5).
52. Muñoz López de Bustamante, F. *Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado*; 847114624X; Mundi-prensa: 2002.
53. Murthy, C.; Bhattacharya, S., Cryogenic grinding of black pepper. *Journal of Food Engineering* **2008**, 85 (1), 18-28.
54. Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M.; Sharif, K.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.; Omar, A. J. J. o. f. e., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **2013**, 117 (4), 426-436.
55. Azwanida, N. J. M. A. P., A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **2015**, 4 (196), 2167-0412.
56. Luo, Q.; Zhang, J.-R.; Li, H.-B.; Wu, D.-T.; Geng, F.; Corke, H.; Wei, X.-L.; Gan, R.-Y. J. A., Green extraction of antioxidant polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*). **2020**, 9 (9), 785.
57. Orantes, E., Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Quararibea yunckeri* Standley Subsp. *izabalensis* WS Alverson ex Véliz (Bombacaceae). *línea, actualizado en agosto del 2008*.
58. Adu, J. K.; Amengor, C. D.; Kabiri, N.; Orman, E.; Patamia, S. A. G.; Okrah, B. K., Validation of a Simple and Robust Liebermann–Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana. *International journal of food science* **2019**, 2019.
59. Ortega, L. A. J.; Ramírez, L. B.; Meza, M. P. T., CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y FITOQUÍMICA DE FRUTOS DE SAPUCHE (*Randia laevigata* Standl.). *e-CUCBA* **2020**, (13), 10-10.
60. Rojas, L. C.; Uribe, Y. H.; Martínez, N. S.; Niño, D. R., Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia forestal* **2009**, 12 (1), 161-170.

61. Gulcin, İ. J. A. o. t., Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **2020**, *94* (3), 651-715.
62. Lourenço, S. C.; Moldão-Martins, M.; Alves, V. D. J. M., Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **2019**, *24* (22), 4132.
63. García Martínez, E. M.; Fernández Segovia, I.; Fuentes López, A., Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. **2015**.
64. Rasouli, H.; Farzaei, M. H.; Khodarahmi, R. J. I. J. o. F. P., Polyphenols and their benefits: A review. **2017**, *20* (sup2), 1700-1741.
65. Chen, L.-Y.; Cheng, C.-W.; Liang, J.-Y. J. F. c., Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **2015**, *170*, 10-15.
66. Kurkin, V.; Pravdivtseva, O.; Shaikhutdinov, I. K.; Kurkina, A.; Volkova, N. J. P. C. J., Quantitative Determination of Total Flavonoids in Blood-Red Hawthorn Fruit. **2020**, *54* (1), 36-39.
67. Patle, T. K.; Shrivastava, K.; Kurrey, R.; Upadhyay, S.; Jangde, R.; Chauhan, R. J. S. A. P. A. M.; Spectroscopy, B., Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy. **2020**, *242*, 118717.
68. Pȩkal, A.; Pyrzynska, K. J. F. A. M., Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **2014**, *7* (9), 1776-1782.
69. Dykes, L., Tannin analysis in sorghum grains. In *Sorghum*, Springer: 2019; pp 109-120.
70. Zeller, W. E. J. C. S., Activity, purification, and analysis of condensed tannins: Current state of affairs and future endeavors. **2019**, *59* (3), 886-904.
71. Schofield, P.; Mbugua, D.; Pell, A. J. A. f. s.; technology, Analysis of condensed tannins: a review. **2001**, *91* (1-2), 21-40.
72. Yoshida, Y.; Umeno, A.; Shichiri, M., Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **2012**, 12-112.
73. Guija-Poma, E.; Inocente-Camones, M. Á.; Ponce-Pardo, J.; Zarzosa-Norabuena, E. J. H. M., Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. **2015**, *15* (1), 57-60.
74. Bandoni, A., Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. *Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina* **2000**, 417.
75. Chimona, C.; Karioti, A.; Skaltsa, H.; Rhizopoulou, S. J. P. B.-A. I. J. D. w. a. A. o. P. B., Occurrence of secondary metabolites in tepals of *Asphodelus ramosus* L. **2014**, *148* (1), 31-34.
76. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., Principios de análisis instrumental. **2008**.
77. Stemmler, E. A.; Hites, R. A., *Electron capture negative ion mass spectra of environmental contaminants and related compounds*. New York, NY (USA); VCH: United States, 1988.
78. Mishra, P. M.; Sree, A. J. A. J. o. P. S., Antibacterial activity and GCMS analysis of the extract of leaves of *Finlaysonia obovata* (a mangrove plant). **2007**.
79. Harman, G. E., Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **2006**, *96* (2), 190-194.
80. Acurio Vásconez, R. D.; España Imbaquingo, C. K. J. L. G. R. d. C. d. I. V., Aislamiento, caracterización y evaluación de *trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*lolium perenne*) y trébol blanco (*trifolium repens*). **2017**, *25* (1), 53-61.
81. Valle, R. V.; Aguilar, M. M. M. J. R. M. d. F., Características Vegetativas y Susceptibilidad de Variedades de Ajo (*Allium sativum* L.) Infectadas por *Fusarium* spp. **2004**, *22* (3), 435-438.
82. Morales, C. A.; Solórzano, A.; Rojas, A. P. J. R. d. I. A. C. d. D. y. C. D., Características epidemiológicas y clínicas de las onicomycosis causadas por *Fusarium* spp. en un centro de referencia de Bogotá, Colombia, 2001-2010. **2013**, *21* (1), 21-28.

83. Corrales, L. C. J. N., evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. **2010**, 8 (13).
84. Goldani, L. Z.; Zavascki, A. P.; Maia, A. L., Fungal thyroiditis: an overview. *Mycopathologia* **2006**, 161 (3), 129-139.
85. Salazar, C. L.; Rua, Á. L. J. H. M., Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. **2012**, 3 (2), 93-96.
86. Gago, S.; Denning, D. W.; Bowyer, P. J. M. m., Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. **2019**, 57 (Supplement_2), S219-S227.
87. Bogantes- Ledezma, P.; Bogantes-Ledezma, D.; Bogantes- Ledezma, S., Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense* **2004**, 46, 174-178.
88. Rivas-Morales, C.; Oranday-Cárdenas, M. A.; Verde-Star, M. J., *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience: 2016.
89. Xoca-Orozco, L. A.; Zamora-Gasga, V.; Espinosa-Alonso, G.; Velázquez-Estrada, R. M.; López-García, U.; Sáyago-Ayerdi, S.; Chacón-López, A. J. B., Actividad antioxidante y antifúngica in vitro de extractos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). **2018**, 20 (2), 104-109.
90. Giordani, C.; Simonetti, G.; Natsagdorj, D.; Chojjamts, G.; Ghirga, F.; Calcaterra, A.; Quaglio, D.; De Angelis, G.; Toniolo, C.; Pasqua, G. J. N. p. r., Antifungal activity of Mongolian medicinal plant extracts. **2020**, 34 (4), 449-455.
91. Gurama, H. M.; Maude, F. M.; Jibrin, M. U.; Oluwatovi, O.; Sani, A.; Inuwa, M.; Yahaya, S.; Chikere, U. J. C.; Research, P., Phytochemical Analysis, Cytotoxicity and Antifungal Activities of *Guiera Senegalensis* Leaves Extract Review. **2020**, 2 (1), 1-4.
92. Kourmouli, A.; Valenti, M.; van Rijn, E.; Beaumont, H. J.; Kalantzi, O.-I.; Schmidt-Ott, A.; Biskos, G. J. J. o. N. R., Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? **2018**, 20 (3), 1-6.
93. Hassan, A.; Usman, J.; Kaleem, F.; Omair, M.; Khalid, A.; Iqbal, M. J. B. j. o. i. D., Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **2011**, 15 (4), 305-311.
94. Guerra, Y. R.; Sáenz, M. A. V.; Ramos, H. H.; Re, S. S., Guía metodológica para la obtención de información en el estudio etnobotánico de especies forestales en comunidades amazónicas. *Revista Cubana de Ciencias Forestales: CFORES* **2019**, 7 (1), 98-110.
95. Tzanova, M.; Atanasov, V.; Yaneva, Z.; Ivanova, D.; Dinev, T., Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes* **2020**, 8 (10), 1222.
96. Domínguez, X. A. *Métodos de investigación fitoquímica*; 1973.
97. Silva Valencia, J. C.; Santillan Rayco, M. A., Formulación y elaboración de un jarabe a base de extracto acuoso de hojas de *Medicago sativa* L. "Alfalfa" para reducir la anemia. **2020**.
98. Rodríguez-Bonilla, P.; Gandía-Herrero, F.; Matencio, A.; García-Carmona, F.; López-Nicolás, J. M. J. F. A. M., Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. **2017**, 10 (9), 2994-3000.
99. Hegedús, O.; Borovicza, B.; Szarka, K.; Vargová, A.; Reménység, D.; Maťová, A.; Czibor, B.; Hegedüsová, A. J. P. S. J. o. F. S., Fruit red colorants impact on the antiradical activity determined by DPPH method. **2020**, 14, 473-482.
100. Martín-Gómez, J.; Varo, M. Á.; Mérida, J.; Serratosa, M. P. J. L., Influence of drying processes on anthocyanin profiles, total phenolic compounds and antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium corymbosum*). **2020**, 120, 108931.
101. Phuyal, N.; Jha, P. K.; Raturi, P. P.; Rajbhandary, S. J. T. S. W. J., Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. **2020**, 2020.

102. González-Gómez, J.; Ayala-Burgos, A.; Gutiérrez-Vázquez, E. J. L. R. f. R. D., Determinación de fenoles totales y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la región de Tierra Caliente Michoacán, México. **2006**, *18* (11).
103. Peña-Álvarez, A.; Castillo-Alanís, A. J. T. R. E. e. C. Q.-B., Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). **2015**, *18* (1), 29-42.
104. Carpio Zabaleta, C. M.; Estrada Reyes, D. J., Química, actividad larvicida sobre *Aedes aegypti* y evaluación antioxidante del extracto total en etanol de las hojas secas de *Croton conduplicatus* Kunth. **2016**.
105. Cavagnaro, T.; Smith, F. A.; Lorimer, M.; Haskard, K.; Ayling, S. M.; Smith, S. E. J. N. P., Quantitative development of Paris-type arbuscular mycorrhizas formed between *Asphodelus fistulosus* and *Glomus coronatum*. **2001**, *149* (1), 105-113.
106. Cullen, J. J. B. c. o. w. i. A. C., Canberra, *Asphodelus fistulosus* L.—onion weed. **2012**, 83-85.
107. Khan, S. A.; Qureshi, M. I.; Bhatti, M. K. J. J. o. t. A. O. C. S., Composition of the oil of *asphodelus fistulosus* (piaz) seeds. **1961**, *38* (8), 452-453.
108. Malmir, M.; Serrano, R.; Caniça, M.; Silva-Lima, B.; Silva, O. J. P., A comprehensive review on the medicinal plants from the genus *Asphodelus*. **2018**, *7* (1), 20.
109. Abd El-Fattah, H. J. I. j. o. p., Chemistry of *Asphodelus fistulosus*. **1997**, *35* (4), 274-277.
110. Hammouda, F.; FM, H.; AM, R.; MM, S. E. N., Quantitative determination and seasonal variation of the anthraquinones of certain Egyptian *Asphodelus* species. **1974**.
111. Fell, K.; Hammouda, F.; Rizk, A., The constituents of the seeds of *Asphodelus microcarpus* Viviani and *A. fistulosus* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1968**, *20* (8), 646-649.
112. Khan, S. A.; Qureshi, M. I.; Bhatti, M. K., Composition of the oil of *asphodelus fistulosus* (piaz) seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1961**, *38* (8), 452-453.
113. Baraza, E.; Ángeles, S.; García, Á.; Valiente-Banuet, A. J. I., Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. **2008**, *33* (12), 891-896.
114. Peksel, A.; Imamoglu, S.; Altas Kiyamaz, N.; Orhan, N. J. I. J. o. F. P., Antioxidant and radical scavenging activities of *Asphodelus aestivus* Brot. extracts. **2013**, *16* (6), 1339-1350.
115. Lazarova, I.; Zengin, G.; Sinan, K. I.; Aneva, I.; Uysal, S.; Picot-Allain, M. C. N.; Aktumsek, A.; Bouyahya, A.; Mahomoodally, M. F. J. F. R. I., Metabolomics profiling and biological properties of root extracts from two *Asphodelus* species: *A. albus* and *A. aestivus*. **2020**, *134*, 109277.
116. Di Petrillo, A.; González-Paramás, A. M.; Era, B.; Medda, R.; Pintus, F.; Santos-Buelga, C.; Fais, A. J. B. c.; medicine, a., Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. **2016**, *16* (1), 1-9.
117. Laouini, S. E.; Ladjel, S.; Ouahrani, M. R. J. I. J. o. P.; Research, C., In vitro assays of the antibacterial and antioxidant properties of extracts from *Asphodelus tenuifolius* Cav and its main constituents: a comparative study. **2015**, *7* (02), 119-125.
118. Cartea, M. E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P. J. M., Phenolic compounds in Brassica vegetables. **2011**, *16* (1), 251-280.
119. Vázquez-Jorge, Y. G.; Guerra-Molina, L.; Quintana-Tamayo, J. F.; Ramírez-Arzuaga, J.; Fernando-Ballesteros, R.; Vázquez-Jorge, Y. J. R. C. d. Q., Caracterización físico-química y contenido de proteínas de extractos fluidos del ostión de mangle (*Crassostrea* spp.). **2014**, *26* (1), 66-74.
120. Moreano Pilatasig, M. M. Determinación de azúcares reductores y su relación con carbohidratos no absorbidos en niños (a) del centro de educación inicial “María Montessori” del cantón Latacunga en el período 2014-2015. Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera ..., 2015.

Anexos

Anexo 1. Fundamento de sonicación y composición del Sonicador

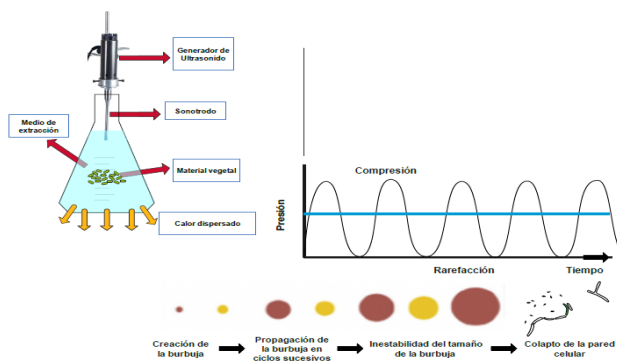


Figura 11. Mecanismo de acción de la Sonicación.⁵

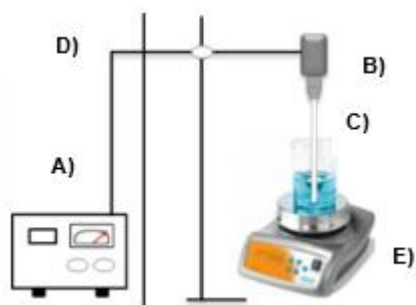


Figura 12. Composición tradicional de un equipo de Sonicación.⁵

Anexo 2. Mecanismos de reacción de las pruebas de antioxidantes

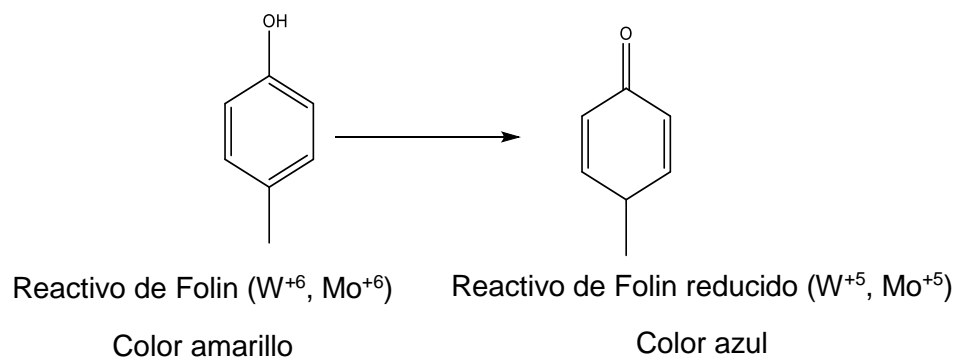


Figura 13. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.^{63,65}

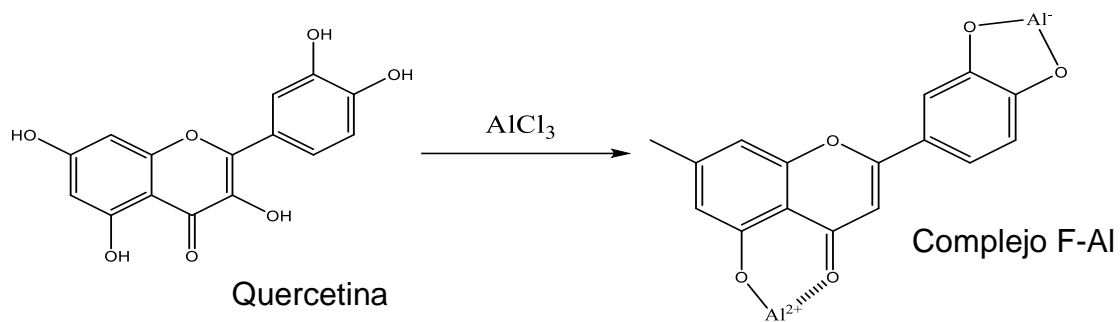


Figura 14. Obtención del complejo Flavonoide-Al.¹⁰¹

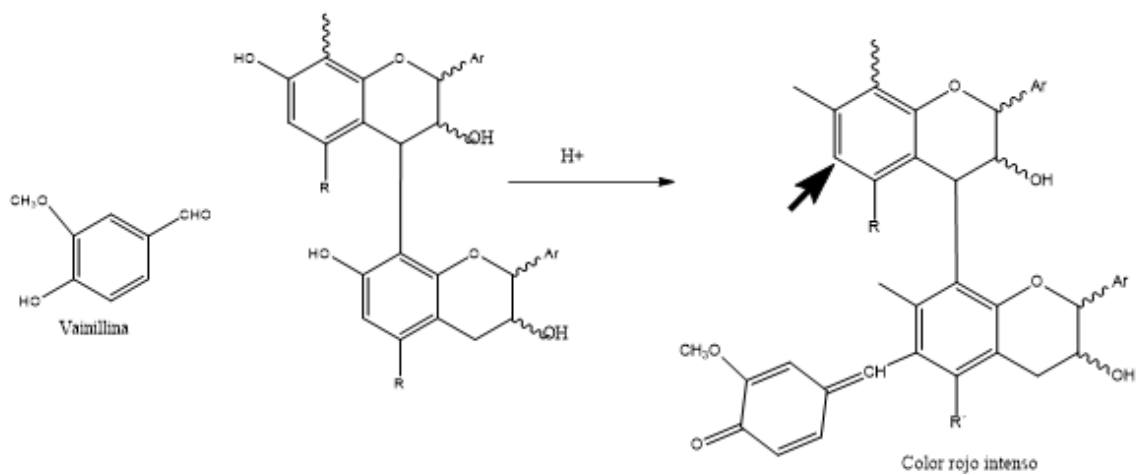


Figura 15. Mecanismo de reacción del ensayo de Vainilina. La cabeza de flecha señala el segundo punto potencial de reacción.¹⁰²

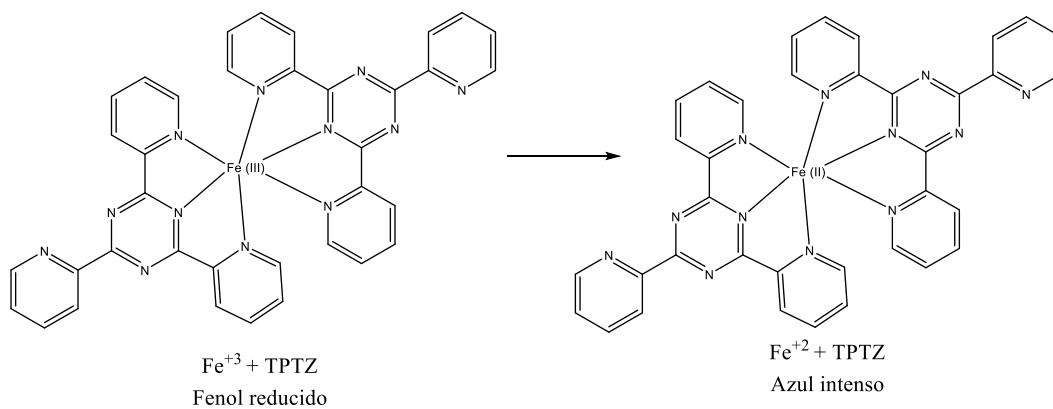


Figura 16. Reacción del TPTZ y Fe (III).⁹⁸

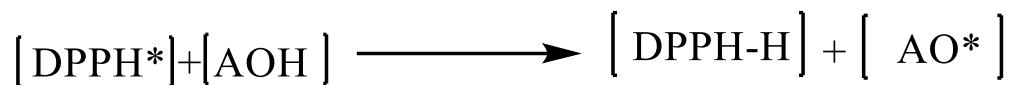


Figura 17. Reacción del radical DPPH* y el antioxidante.⁷³

Anexo 3. Morfología de las cepas fúngicas y método de difusión

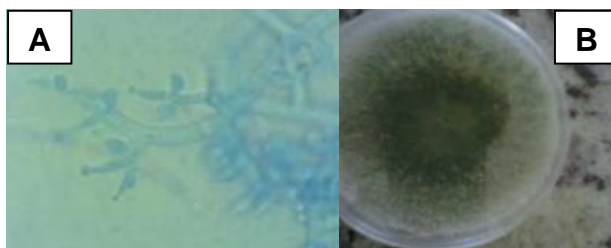


Figura 18. A) Estructura microscópica de *T. harzianum*. B) Estructura macroscópica de *T. harzianum*.⁸⁰

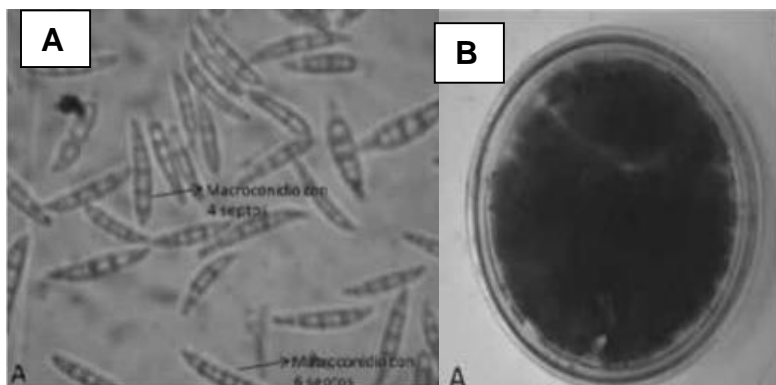


Figura 19. Estructura microscópica de *Fusarium* spp. B) Estructura macroscópica de *Fusarium* spp.⁸³

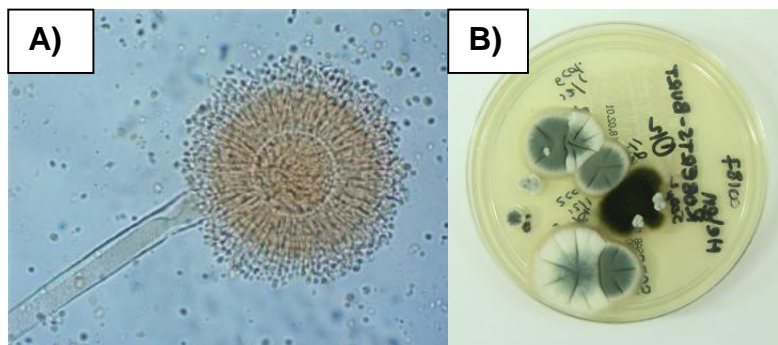


Figura 20. A) Vista microscópica de *Aspergillus* spp. B) Vista macroscópica de *Aspergillus* spp.⁸⁵



Figura 20. Disco de Kirby-Bauer con halos de inhibición.⁹²

Anexo 4. Preparación de reactivos para pruebas antioxidantes

Reactivo FRAP

- **HCl 40 mM** (SIGMA) $\rho_{\text{HCl}}=1.12 \text{ g/ml}$

100 ml	40 mmol	1 mol	36 g HCl	1 ml	100 pureza
	1000 ml	1000 mmol	1 mmol	1.12 g	36.5%

0.35225 ml o 352.25 μl en 100 ml de agua.

- **TPTZA 10 mM** (SIGMA)

20 ml	10 mmol	1 mol	312.34 g	=	0.06246g	TPTZ
	1000 ml	1000 mmol	1 mol			

Se pesaron 0.06246 g de TPTZ y se diluyó en 20 ml de HCl 40 mM

- **FeCl₃ 20 mM** (J.T. Baker)

25 ml	20 mmol	1 mol	162.206 g	=	0.081103 g FeCl₃
	1000 ml	1000 mmol	1 mol		

Preparación:

- 200 μl de buffer de acetatos
- 20 μl de TPTZ
- 20 μl FeCl₃

Se preparó al momento de realizar las lecturas.⁹⁸

Reactivo DPPH

DPPH (SIGMA) a una concentración de 0.5 mg/ml se pesaron 1.97 mg de DPPH ($\rho = 1.4$ g/ml) y se disolvieron en 50 ml de metanol (SIGMA).⁹⁹

Reactivos para fenoles totales

- **Solución stock de ácido gálico (Merck).** Se pesó 1 mg de ácido gálico y disolver en 5 ml de metanol (SIGMA).
- **Solución de reactivo de Folin-Ciocalteu (BioPack).** Se diluyó 1:10 el reactivo con agua destilada (SIGMA).
- **Solución de carbonato de sodio (BioPack) 7.5% w/v.** Se pesaron 0.75 g de Na_2CO_3 y aforar a 20 ml con agua destilada.¹⁰⁰

Reactivos para flavonoides totales

- **Solución de hidrato de catequina (SIGMA).** Se disolvieron 3 mg de hidrato de catequina en 5 ml de metanol al 80%.
- **Solución de nitrato de sodio al 5% (MEYER).** Se disolvieron 1.25 g de nitrato de sodio en 25 ml de agua destilada.
- **Solución de cloruro de aluminio al 10% (JT. Baker).** Se disolvieron 2.5 g de cloruro de aluminio en 25 ml de agua destilada.
- **Solución de Hidróxido de sodio al 1N (SIGMA).** Se disolvió 1 g de NaOH en 25 ml de agua destilada.¹⁰¹

Reactivos para taninos condensados

- **Solución de hidrato de catequina 3 mg/ml (SIGMA).** Se disolvieron 15 mg de hidrato de catequina en 5 ml de metanol al 80%.
- **HCl 8% (SIGMA):** Se tomaron 11 ml de HCl al 36.5% y se aforaron a 50 ml con metanol al 80%.
- **Vainillina 1% (MEYER):** Se tomaron 0.1 g de vainillina y se aforaron a 10 ml de metanol 80%.
- **Reactivo taninos condensados:** Se agregaron partes iguales del HCl 8% y vainillina 1% y resultó en una solución metanólica de 4% de HCl y 0.5% de vainillina. Se preparó al momento de ser utilizada.
- **HCl 4% (Blanco de reacción):** Se tomaron 1.1 ml de HCl concentrado y se aforaron a 10 ml con metanol 80%.¹⁰²

Anexo 5. Curvas de calibración

FRAP

Tabla 11. Concentraciones de Trolox para la obtención de la curva de calibración para FRAP.

Tubo	[mg/ml Trolox]	Trolox μl	Metanol μl
1	0.2	200	800
2	0.15	150	850
3	0.10	100	900
4	0.075	75	925
5	0.05	50	950
6	0.025	25	975
7	0	0	1000

mg/ml: Concentración en miligramos por mililitros. μ l: Microlitros.

DPPH

Tabla 12. Concentraciones de Trolox para la obtención de la curva de calibración para el ensayo DPPH.

Trolox (μl)	Metanol (μl)	Concentración [mg/ml]
200	800	0.20
170	830	0.17
140	860	0.14
110	890	0.11
80	920	0.08
50	950	0.5
0	1000	0

mg/ml: Concentración en miligramos por mililitros. μ l: Microlitros.

Fenoles totales

Tabla 13. Curva de calibración para el ensayo de fenoles totales.

Soln. de Ác. Gálico (μl)	Metanol 80% (μl)	Concentración [mg/ml]
0	1000	0
100	900	0.02

200	800	0.04
400	600	0.08
500	500	0.10
525	475	0.11
600	400	0.12

Ác. Ácido mg/ml: Concentración en miligramos por mililitros. μ l: Microlitros.

Flavonoides totales

Tabla 14. Concentraciones para la curva de calibración de flavonoides totales.

Stock de catequina (μl)	Metanol 80% (μl)	Concentración [mg/ml]
0	1000	0
10	990	0.006
15	985	0.009
30	970	0.018
60	940	0.036
250	750	0.15
500	500	0.3
1000	0	0.6

mg/ml: Concentración en miligramos por mililitros. μ l: Microlitros.

Taninos condensados

Tabla 15. Concentraciones para la curva de calibración de taninos condensados.

Stock de catequina (μl)	Metanol 80% (μl)	Concentración [mg/ml]
0	1000	0
100	900	0.3
250	750	0.75
500	500	1.5
600	400	1.8
830	170	2.55
1000	0	3

mg/ml: Concentración en miligramos por mililitros. μ l: Microlitros.

Anexo 6. Identificación de fitopatógenos y diseño experimental

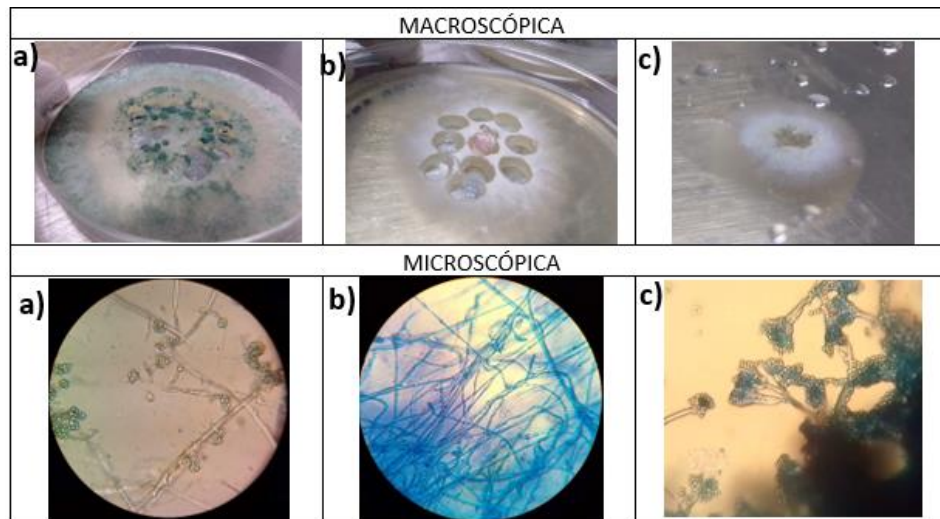


Figura 21. a) Vista macroscópica y microscópica de *Thricoderma Harzianum*, b) Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium spp.* y c) Vista macroscópica y microscópica de *Aspergillus spp.*

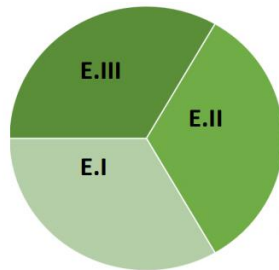


Figura 22. Distribución de los extractos en una caja Petri con división.

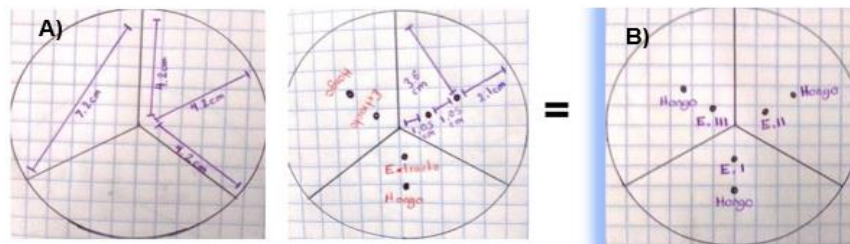


Figura 23. A) Dimensiones interiores de las cajas Petri. B) Distribución según el diseño del bioensayo.

Anexo 7. Cultivo de hongos

Preparación del agar

- Se pesaron 39 g del agar y se colocaron en medio litro de agua destilada.
- Se dejaron reposar por 15 minutos.
- Se colocó esta mezcla a calentar, siendo agitada gentil y frecuentemente por 1 min hasta o hasta que fuese disuelta por completa.
- Se esterilizó a condiciones normales junto con el demás equipo utilizado para el bioensayo, como se ve mencionado en la figura 24.

Procedimiento para cultivo.

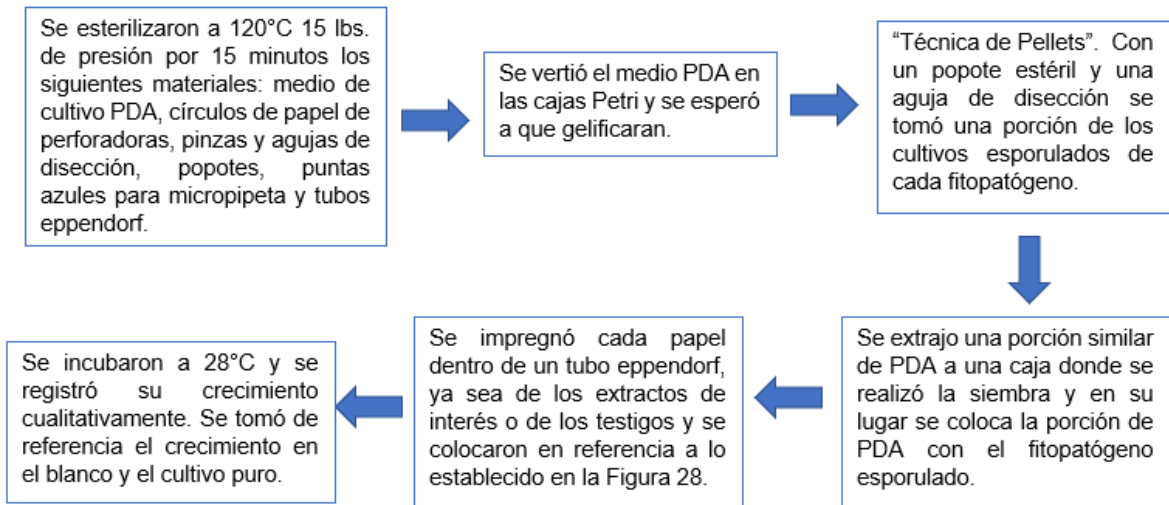


Figura 24. Desarrollo experimental del bioensayo.

Anexo 8. Complemento de resultados



Figura 25. Puntos de crecimiento de la *Asphodellus fistulosus* encontrados en el Campus Siglo XXI de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Obtenida del software: Google Earth Pro®

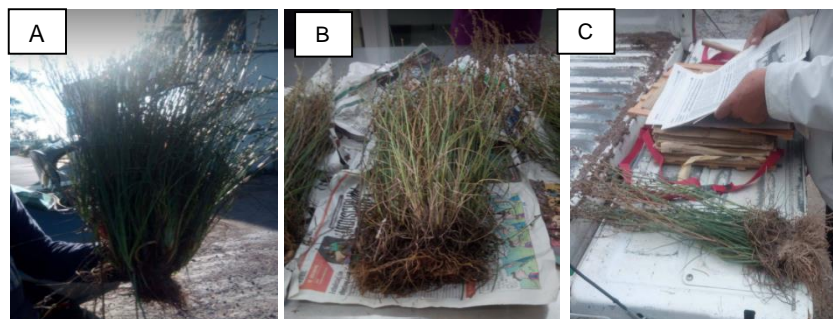


Figura 26. A) Planta obtenida en su totalidad. B) Planta destinada para las extracciones. C) Herborización de las plantas.



Figura 27. A) Grupo de semillas, B) Semilla individual y C) Cápsula de *A. fistulosus*.

HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS	HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
<p><i>Asphodelus fistulosus</i> L.</p> <p>Edo. Zacatecas, mpio. Zacatecas. Campus UAZ siglo XXI, límite norte, aproximadamente cinco metros al norte de la orilla de la carretera, 10 m al oeste del acceso principal. Vegetación secundaria en superficie ocupada anteriormente por matorral xerófilo.</p> <p>Hierba perenne, de aproximadamente 60 cm de altura, color verde brillante, en fructificación, flores escasas, color blanco con una línea café rojizo. Abundante.</p> <p>22° 46' 7.2" N 102° 38' 36.1" W Alt. 2329 msnm Fecha de colecta. 31/08/2020.</p> <p>Col. P. I. Silva M. & M.J. Varela F. 1 Det. J.J. Balleza C. 2/09/2020</p>	<p><i>Asphodelus fistulosus</i> L.</p> <p>Edo. Zacatecas, mpio. Zacatecas. Campus UAZ siglo XXI, límite norte, aproximadamente cinco metros al norte de la orilla de la carretera, 10 m al oeste del acceso principal. Vegetación secundaria en superficie ocupada anteriormente por matorral xerófilo.</p> <p>Hierba perenne, de aproximadamente 60 cm de altura, color verde brillante, en fructificación, flores escasas, color blanco con una línea café rojizo. Abundante.</p> <p>22° 46' 7.2" N 102° 38' 36.1" W Alt. 2329 msnm Fecha de colecta. 31/08/2020.</p> <p>Col. P. I. Silva M. & M.J. Varela F. 1 Det. J.J. Balleza C. 2/09/2020</p>

Figura 28. Etiquetas de registro de la *Asphodelus fistulosus* expedidas por el Herbario de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

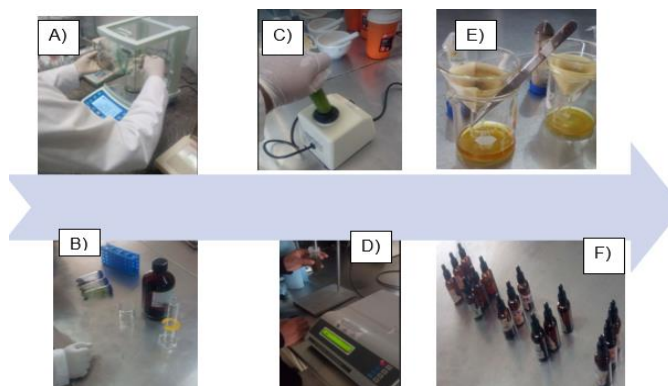


Figura 29. A) Pesado de cada fracción de la planta. B) Adición del sistema de disolventes. C) Homogenización. D) Sonicación. E) Filtración. F) Muestras separadas.

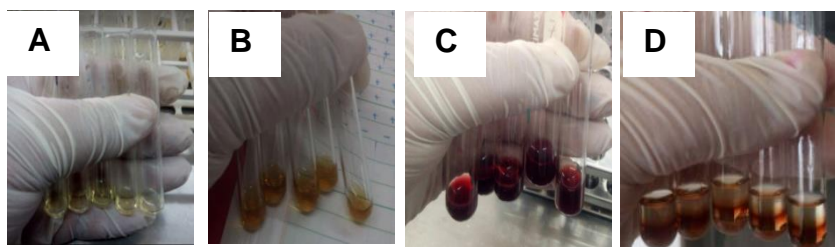


Figura 30. A) Prueba positiva para Flavonoides. B) Prueba Shinoda positiva para Flavonoides. C) Prueba positiva para antraquinonas. D) Prueba positiva para terpenoides.

Mediciones de pH

Tabla 16. Resultado de las mediciones de pH de los extractos.

Muestra (T, R y F)	pH
1 (T)	4.21
1 (R)	4.00
1 (F)	4.20
2 (T)	4.15
2 (F)	3.96
2 (R)	4.24
3 (T)	4.25
3 (F)	3.98
3 (R)	4.11
4 (T)	4.23
4 (F)	4.10
4 (R)	3.98
5 (T)	3.78
5 (F)	4.19
5 (R)	3.99

T= Tallos, R=Raíz y F= Frutos.

Cálculos de capacidad antioxidante

DPPH

Tabla 17. Absorbancias de los extractos de Fruto, raíz y tallo de *A. fistulosus*.

Muestra	[F]	[R]	[T]
1	0.685	0.695	0.599
2	0.548	0.65	0.623

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo.

Una vez obtenidas las absorbancias de cada uno de los extractos, se debe tomar en cuenta la absorbancia del DPPH como referencia y seguir la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg Eq Trolox}}{\text{g peso seco}} = x \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) (\text{peso muestra}) (\text{vol. obtenido del extracto})$$

Se debe entonces tomar los valores de absorbancia de DPPH, los cuales en este caso se ven plasmados en la tabla 18.

Tabla 18. Absorbancias del reactivo DPPH.

	Abs 1	Abs 2	Abs 3
Reactivo DPPH	1.11	1.036	1.046

Abs: Absorbancia.

Se sigue entonces lo establecido en la fórmula para cada absorbancia, se promedian los resultados y se obtiene la desviación estándar de cada cálculo. En la fórmula se muestra un ejemplo del cálculo de % Decoloración DPPH para la primera de las absorbancias de Fruto.

$$\% \text{ Decoloración DPPH} = \left(\frac{1.1 - 0.685}{1.1} \right) = 0.3828$$

Este valor se sustituye en la ecuación de la curva de calibración $y = 3.7892x - 0.0048$ con una $R^2 = 0.9823$, se despeja el valor de "x" para conocer la concentración deseada y este valor se multiplica por 100 para saber el % de Decoloración DPPH de la muestra.

FRAP

En este caso, los resultados se obtienen despejando x de la ecuación de la curva de calibración: $y = 5.9972x + 0.0576$ con una $R^2 = 0.9822$, sustituyendo los

valores de “y” en lugar de los promedios de las absorbancias obtenidas para cada uno de los extractos y con esto obtener los valores de “x”, correspondientes a los mg/ml de cada muestra. En la tabla 19 se observan los diferentes valores de absorbancias de los extractos analizados.

Tabla 19. Absorbancias del reactivo DPPH.

	1	2	3
F	0.965	0.949	1.037
R	0.862	0.907	0.913
T	1.061	1.135	1.112

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo.

Al despejar el valor de x con respecto a la ecuación de la recta otorgada por la curva de calibración con referencia a “y” (valores de absorbancia de cada extracto) los valores de [mg/ml] Trolox obtenidos se observan en la tabla 20.

Tabla 20. mg/ml Trolox de cada extracto para FRAP.

	1	2	3
F	0.1513	0.1486	0.1633
R	0.1341	0.1416	0.1426
T	0.1673	0.1796	0.1758

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. mg/ml: Concentración de miligramos por mililitro.

Se promedian los resultados, se obtienen las desviaciones estándar y se multiplican por 100 para conocer el poder reductor de cada extracto.

Fenoles totales

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos analizados se pueden ver en la tabla 21.

Tabla 21. Absorbancias para los extractos de *A. fistulosus*.

	1	2	3
F	1.578	1.524	1.657
R	1.082	1.138	1.23
T	1.32	1.415	1.505

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo

En este caso, los resultados se obtienen despejando “x” de la ecuación de la curva de calibración: $y = 4.0156x - 0.0178$ con una $R^2 = 0.9797$. Se sustituyendo los valores de “y” en lugar de las absorbancias obtenidas se obtienen los diferentes valores de “x”, correspondientes al valor de [mg/ml] para cada uno de los extractos.

En la tabla 22 se observar los diferentes valores de absorbancias de los extractos analizados, junto con el valor promedio y la desviación estándar.

Tabla 22. Valores promedio de fenoles totales.

	1	2	3	Promedio	D.E.
F	0.3974	0.3839	0.4170	0.3994	0.0166
R	0.2738	0.2878	0.3107	0.2908	0.0186
T	0.3331	0.3568	0.3789	0.3563	0.0229

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. D.E.= Desviación estándar.

Flavonoides totales

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos analizados se pueden ver en la tabla 23.

Tabla 23. Absorbancias de los extractos de *A. fistulosus* para el ensayo de flavonoides totales.

	1	2	3
F	0.79	0.87	0.883
R	0.587	0.641	0.628
T	0.7	0.637	0.687

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo.

Los resultados se obtienen despejando “x” de la ecuación de la curva de calibración: $y = 4.1719x - 0.0073$ con una $R^2 = 0.9983$. Se sustituyendo los valores de “y” en lugar de las absorbancias obtenidas se obtienen los diferentes valores de “x”, correspondientes al valor de [mg/ml] para cada uno de los extractos.

En la tabla 24 se observar los diferentes valores de absorbancias de los extractos analizados, junto con el valor promedio y la desviación estándar.

Tabla 24. Valores promedios para flavonoides totales.

	1	2	3	Promedio	D.E.
F	0.1911	0.2102	0.2134	0.2049	0.0120
R	0.1424	0.1553	0.1522	0.1500	0.0067
T	0.1695	0.1544	0.1664	0.1634	0.0079

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. D.E.= Desviación estándar.

Taninos condensados

Los valores obtenidos de absorbancias de cada uno de los extractos analizados se pueden ver en la tabla 25.

Tabla 25. Absorbancias de los extractos de *A. fistulosus* para taninos condensados.

	1	2	3
F	0.0602	0.06	0.067
R	0.0512	0.0496	0.0489
T	0.055	0.0562	0.0487

F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo.

En este caso, los resultados se obtienen despejando “x” de la ecuación de la curva de calibración: $y = 0.1349x + 0.0202$ con una $R^2 = 0.984$. Se sustituyendo los valores de “y” en lugar de las absorbancias obtenidas se obtienen los diferentes valores de “x”, correspondientes al valor de [mg/ml] para cada uno de los extractos.

En la tabla 26 se observar los diferentes valores de absorbancias de los extractos analizados, junto con el valor promedio y la desviación estándar.

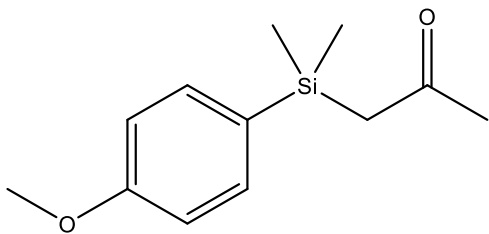
Tabla 26. Valores promedios para taninos condensados.

	1	2	3	Promedio	D.E.
F	0.2965	0.2950	0.3469	0.3128	0.0295
R	0.2297	0.2179	0.2127	0.2201	0.0087
T	0.2579	0.2668	0.2112	0.2453	0.0298

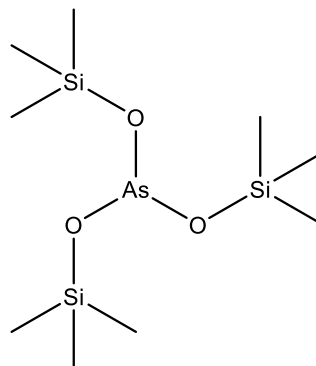
F: Fruto, R: Raíz y T: Tallo. D.E.= Desviación estándar.

Anexo 9. Estructuras moleculares encontradas en GC/MS

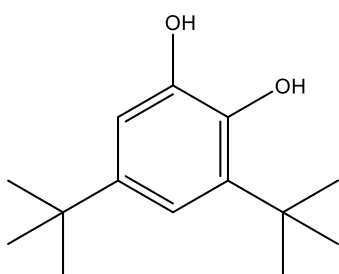
Fruto



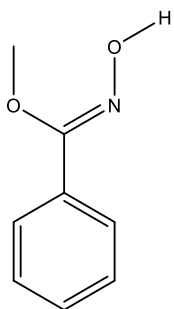
(p-Methoxyphenyl)-acetonyl-dimethylsilane.



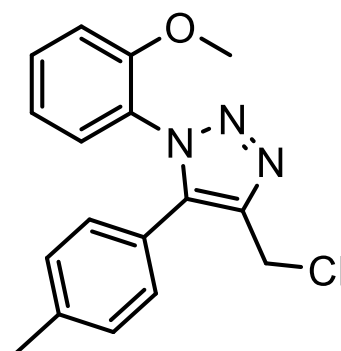
Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester



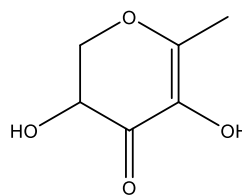
1,2-Benzenediol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-



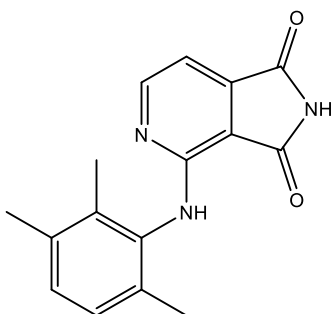
Oxime-, methoxy-phenyl-



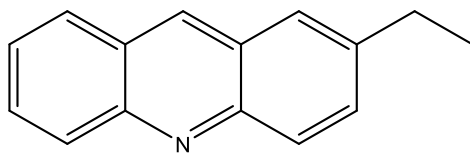
2-Phenyl-4-chloromethyl-5-methyl-1,2,3-triazole



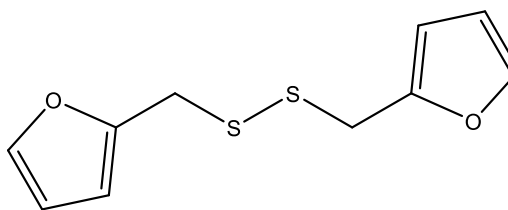
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-



2,6-Dimethyl-5-methylphenylaminopyridin-3,4-dicarboxyimide



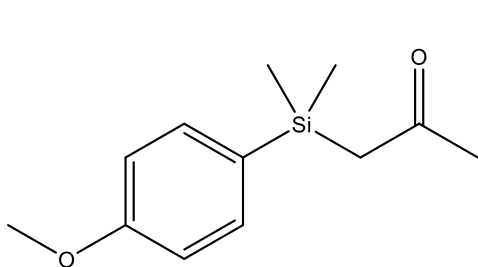
2-Ethylacridine



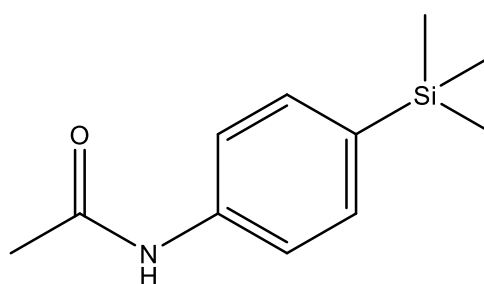
Bis(2-furfuryl) disulfide

Figura 31. Conjunto de moléculas encontradas en extractos de fruto.

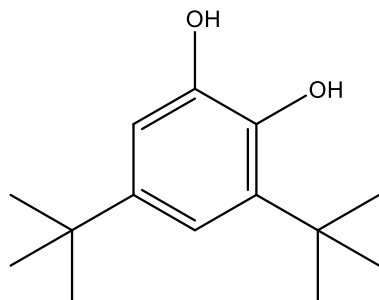
Tallo



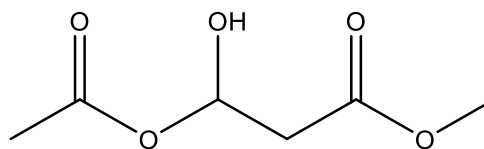
(p-Methoxyphenyl)-
acetonyl-dimethylsilane



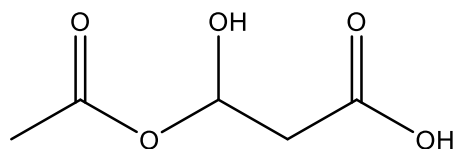
Acetamide, N-[4-
(trimethylsilyl)phenyl]-



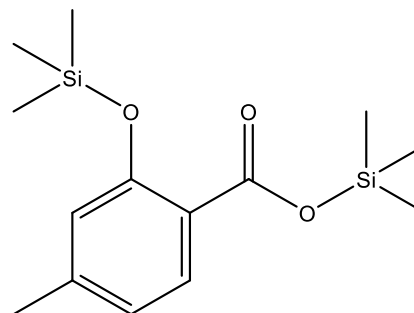
1,2-Benzenediol, 3,5-
bis(1,1-dimethylethyl)-



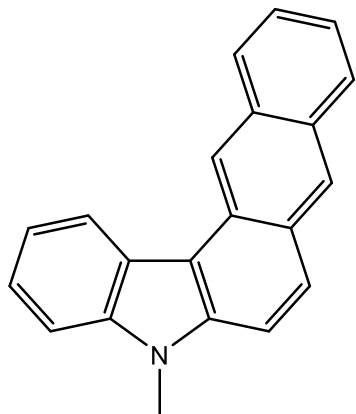
3-Acetoxy-3-
hydroxypropionic acid,
methyl ester



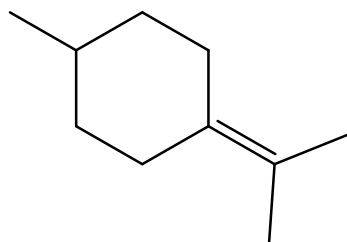
3-Acetoxy-3-
hydroxypropionic



Benzoic acid, 4-methyl-2-
trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester

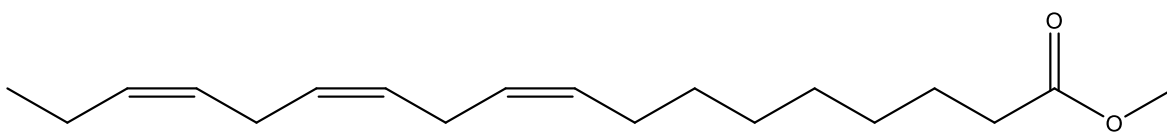
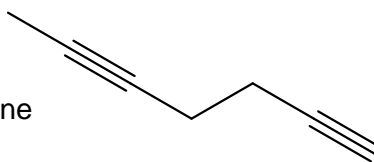


5H-Naphtho[2,3-c] carbazole, 5-methyl-



Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-

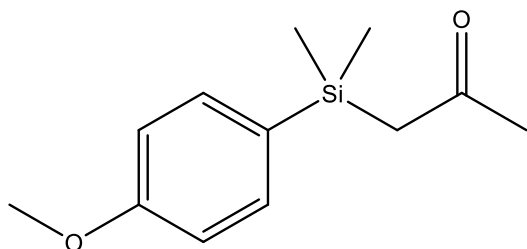
1,5-Heptadiyne



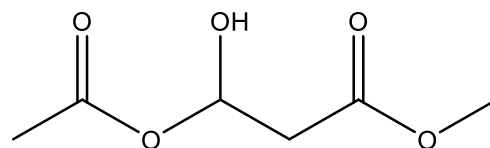
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z, Z, Z)-

Figura 32. Conjunto de moléculas encontradas en extractos de tallo.

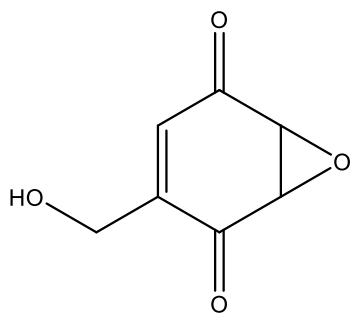
Raíz



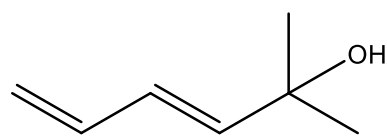
(p-Methoxyphenyl)-acetonyl-dimethylsilane



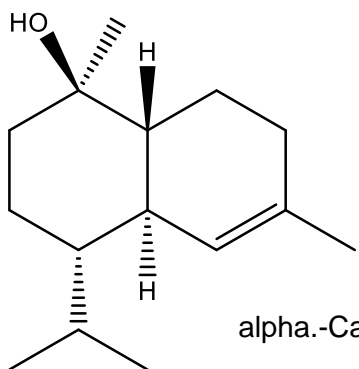
3-Acetoxy-3-hydroxypropionic acid, methyl ester



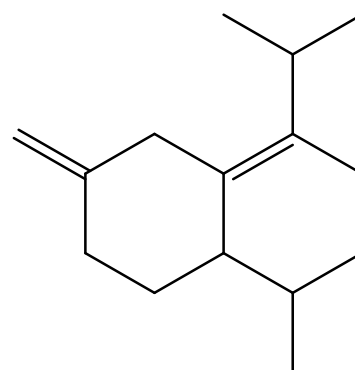
7-Oxabicyclo [4.1.0] hept-3-ene-2,5-dione, 3-(hydroxymethyl)-



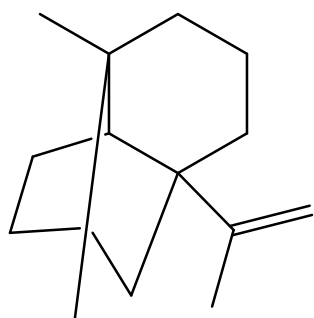
3,5-Hexadien-2-ol, 2-methyl-



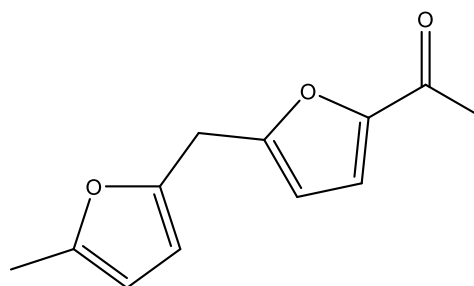
alpha.-Cadinol



Bicyclo [4.4.0] dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-



1,4-Methano-1H-indene, octahydro-1,7a-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-, [1s-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7a.beta.)]-



Ethanone, 1-[5-[(5-methyl-2-furanyl)methyl]-2-furanyl]-

9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z, Z, Z)-

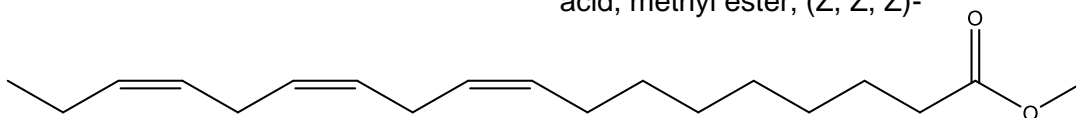


Figura 33. Conjunto de moléculas encontradas en extractos de tallo.