



TESIS

**Caracterización antioxidante y propiedades antimicrobianas
de extractos de frutos de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*)**

QUE PRESENTA:

L.C.A. Jesús Isaac Cisneros Casillas

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Norma Alejandra Mancilla Margalli

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. Arturo Moisés Chávez Rodríguez

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. JULIO, 2021



Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a Dios por darme la dicha de tener salud, bienestar y hacerme coincidir en los tiempos indicados y con las personas adecuadas para poder culminar de manera satisfactoria mis estudios de maestría, que si bien no fue fácil, fue una de las etapas de mi vida que más disfruté y aprecié, así también agradezco a la vida por darme día a día la vitalidad y la motivación para continuar superándome tanto personal como profesionalmente para poder influir de la mejor manera en la sociedad y las futuras generaciones.

Agradezco con mucha sinceridad y cariño a mi comité académico: la Dra. Norma Alejandra Mancilla Margalli mi directora de Tesis, quien siempre me apoyó tanto en lo académico como en lo personal, además de su paciencia, espacio de trabajo, tiempo invertido y confianza para el desarrollo del presente trabajo, a mi codirector el Dr. Arturo Moisés Chávez Rodríguez por creer en mí desde el primer momento además de la motivación que infundió en mí, conocimientos transmitidos, así como el seguimiento y herramientas necesarias para la conclusión de este proyecto, y a mis asesores la Dra. Mayra Itzcalotzin Montero Cortés y el Dr. Héctor Flores Martínez quienes me aconsejaron y asesoraron en todas las dudas que surgieron durante todo este proceso de la elaboración de la Tesis, y en general reitero mi agradecimiento a los cuatro miembros de este comité por sus innumerables enseñanzas que fueron de tanta utilidad para formarme como maestro en ciencias, y por siempre tener esa accesibilidad y empatía que mostraron en todo momento hacia mí, sin dejar atrás al gran empeño que tuvieron para culminar con este proyecto que con tanto esfuerzo hemos logrado.

También quiero agradecer a mi familia, a mi padre Jesús, a mi madre Susana, a mi hermana Daniela y a mi novia Paloma, por siempre brindarme su amor, por estar conmigo en las buenas y en las malas y por su apoyo tanto moral, económico y motivacional que son vitales para poder seguir adelante con todas mis metas, sin olvidar a mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo cuando se les necesitó durante este periodo de aprendizaje.



Por último quiero agradecer al Instituto Tecnológico de Tlajomulco por poner a mi disposición las instalaciones y laboratorios, a los maestros que me impartieron clases y los cuales estuvieron durante todo este periodo de estudios de la maestría transmitiéndome grandes conocimientos tan importantes que me ayudaron para llegar al final de esta etapa, y al CONACyT, por poner a nuestra disposición el Programa Nacional de Posgrados de Calidad quien impulsa a la ciencia y nos ofrece un apoyo económico, además de monitorear todos los procesos y actividades para el correcto desarrollo de los estudiantes.

Índice general

1.-Resumen	1
2. Introducción	3
3.-Marco teórico	4
3.1.- <i>Rhus spp.</i>	4
3.1.1-Usos y consumo de agrillo (<i>Rhus trilobata</i>)	4
3.1.2.-Propiedades bioactivas del género <i>Rhus spp.</i>	5
3.1.2.1.-Actividad antioxidante y antimicrobiana de <i>Rhus spp.</i>	7
3.2.-Extracción de compuestos naturales	8
3.3.-Especies reactivas de oxígeno (ROS)	8
3.4.-Antioxidantes	10
3.4.1.-Actividad y capacidad antioxidante	11
3.4.2.-Caracterización antioxidante.....	12
3.4.3.-Compuestos fenólicos.....	13
3.4.4.-Polifenoles en prevención de enfermedades.....	15
3.4.5.-Polifenoles como agentes antimicrobianos.....	16
3.4.6.-Actividad antimicrobiana	17
3.4.6.1-Mecanismos de acción antimicrobiana.....	17
3.5.- Patógenos post-cosecha de interés	18
4.-Justificación	20
5.-Hipótesis	21
6.-Objetivo General:	21
7.-Materiales y métodos	21
7.1.- Obtención de la materia prima	21
7.2.-Diseño de experimentos.....	21
7.3.- Obtención y caracterización de extractos de distinta polaridad en semilla, cáscara y frutos de agrillo silvestre (<i>Rhus allophyloides</i>).....	23
7.3.1.- Obtención de extractos.....	24
7.3.2.- Cuantificación de fenoles totales.....	26
7.3.2.1.-Ensayo de Folin-Ciocalteu.....	26



7.3.2.2. Ensayo de fenoles totales por método enzimático con peroxidasa de rábano picante (HRP).....	27
7.3.3.- Cuantificación de flavonoides totales.....	28
7.3.4.- Extracción y cuantificación de carotenoides totales.....	29
7.4.-Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de agrillo.....	30
7.4.1.-Inhibición radicalaria.....	30
7.4.1.1.-Método DPPH.....	30
7.4.1.2.-Método ABTS.....	32
7.4.2.-Reducción del ion férrico: método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Assay).....	34
7.4.3. Actividad quelante.....	36
7.4.4.-Determinación de factores que más influyen en las pruebas antioxidantes.....	37
7.5.-Caracterización de las propiedades antimicrobianas de los extractos de agrillo (<i>Rhus spp</i>).....	38
7.5.1.-Activación de las cepas y obtención de conidias.....	38
7.5.2.-Inhibición del crecimiento micelial.....	39
7.5.2.1.-Técnica de dispersión de extracto en caja Petri.....	39
7.5.2.2.-Validación de la respuesta inhibitoria de los extractos en ensayos en microplaca.....	40
7.5.2.3-Determinación de la concentración mínima inhibitoria 95 (CMI ₉₅) en microplaca.....	41
7.5.2.4-Poder fungicida o fungistático de las muestras seleccionadas.....	42
7.6.-Análisis estadístico.....	43
8.-Resultados y discusión.....	43
8.1.-Rendimiento de extractos.....	43
8.1.2.-Cuantificación de fenoles totales.....	46
8.1.2.1.-Método de Folin-Ciocalteu.....	46
8.1.2.2.-Método enzimático de peroxidasa de rábano picante.....	46
8.1.3.-Contenido total de flavonoides.....	50
8.1.4.-Cuantificación de carotenoides: Contenido total de β -Caroteno y Luteína.....	53

8.2.-Caracterización de las actividades antioxidantes de extractos de fruto de agrillo silvestre (<i>Rhus allophyloides</i>).....	55
8.2.1.-Inhibición radicalaria.....	55
8.2.1.1.-Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH*).....	55
8.2.1.2.-Radical ácido 2,2-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfónico (ABTS ^{•+}).....	58
8.2.2.-Capacidad de reducción de ion férrico, método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Assay).....	61
8.2.3.-Ensayo de actividad quelante (determinación del ion ferroso).....	62
8.2.4.-Determinación de factores que más influyen en las pruebas antioxidantes.....	64
8.3.-Evaluación de la capacidad antifúngicas de los extractos de agrillo (<i>Rhus allophyloides</i>).....	65
8.3.1.-Pruebas antifúngicas en caja Petri.....	66
8.3.2.-Pruebas antifúngicas en microplaca.....	71
8.3.3.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria del 95% (CMI ₉₅)..	76
8.3.4.-Efecto fungicida o fungistático de extractos de agrillo.....	79
9. Conclusiones.....	80
10.-Referencias.....	81

Índice de cuadros

Cuadro 1. Actividades biológicas reportadas de compuestos y fracciones extraídas del género *Rhus*. Rayne y Mazza (2007).

Cuadro 2. Clases de polifenoles, fuente de obtención y estructura química.

Cuadro 3. Diseño factorial completo al azar de 3 factores de 2, 3 y 4 niveles

Cuadro 4. Abreviaturas de identificación para las muestras utilizadas en el proyecto.

Cuadro 5. Características de solventes usados y su polaridad creciente

Cuadro 6. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de agrillo cuantificados por los métodos Folin-Ciocalteu y el enzimático (peroxidasa de rábano). Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas en una comparación de medias de dos muestras con una prueba *t*-student y $\alpha = 0.05$.

Índice de figuras

Figura 1. Especies reactivas de oxígeno. Se muestran las estructuras de radicales ROS, así como no radicales (pro-oxidantes).

Figura 2. Métodos de evaluación de capacidad antioxidante. A) El radical DPPH de color morado (λ 517 nm) es estabilizado por la transferencia de un H^+ por parte de una molécula antioxidante, dando una coloración amarilla; B) El radical ABTS de color verde (λ 730 nm) es estabilizado por transferencia de H^+ quedando el ABTS incoloro; C) El complejo Fe^{+3} -TPTZ de color amarillo es reducido (transferencia de electrones) a Fe^{+2} -TPTZ formando un complejo de color azul intenso (λ 595 nm). En círculos rojos se indican los principales cambios moleculares.

Figura 3. Estructura base de los flavonoides. Estos se clasifican de acuerdo a la posición del anillo B y al grado de oxidación del anillo C. Se representación los criterios sugeridos para que un compuesto antioxidante pueda actuar estabilizando los radicales libres

Figura 4. Planta de agrillo *Rhus allophylloides*

Figura 5. A) Limpieza manual de agrillo. B) Tamiz de separación

Figura 6. Obtención de extractos del agrillo en condiciones de oscuridad y agitación.

Figura 7. Filtración de extractos de agrillo con cada uno de los solventes

Figura 8. A) Rotavapor IKA® RV/HB 10 digital. B) Liofilizadora Labconco®

Figura 9. Curva de calibración de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. El ácido gálico fue utilizado como estándar

Figura 10. Curva de calibración de fenoles totales por el método enzimático "HRP". Se utilizó ácido gálico como estándar

Figura 11. Curva de calibración de flavonoides totales. Se utilizó quercitina como estándar.

Figura 12. Separación de éter de petróleo y acetona con ayuda de embudo separador

Figura 13. Curva de absorbancia del DPPH• con diferentes concentraciones del estándar Trólox.

Figura 14. Inhibición del radical DPPH a diferentes concentraciones de Trólox.

Figura 15. Curva de absorbancia del ABTS^{•+} con diferentes concentraciones del estándar Trólox.

Figura 16. Inhibición del radical ABTS^{•+} a diferentes concentraciones de Trólox

Figura 17. Curva de calibración de la absorbancia del complejo TPTZ-Fe⁺² a diferentes concentraciones de Fe₂SO₄·7H₂O.

Figura 18. Curva de calibración de la absorbancia de la concentración del ácido ascórbico utilizando como estándar a 595 nm.

Figura 19. Disminución de la absorbancia por disminución en la concentración del complejo ferrocina-Fe⁺² en presencia de diferentes concentraciones de EDTA.

Figura 20. Curva de calibración de actividad quelante de la inhibición del complejo ferrocina-Fe⁺². Se usó EDTA como estándar.

Figura 21. Rendimientos de extracción de muestras de fruto de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 22. Análisis de efectos principales de las medias en el rendimiento de los extractos.

Figura 23. Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 24. Efectos principales de las medias de contenido de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu.

Figura 25. Cuantificación de fenoles totales por el método HRP. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 26. Efectos principales de las medias de contenido de compuestos fenólicos por el método HRP.

Figura 27. Cuantificación de flavonoides en extractos de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 28. Efectos principales de las medias de contenido de flavonoides.

Figura 29. Correlación del contenido de flavonoides con la determinación de compuestos fenólicos en diferentes extractos de agrillo. Se compara los compuestos fenólicos determinados por el método de Folin-Ciocalteu y el enzimático.

Figura 30. Capacidad antioxidante estabilizadora de radicales DPPH. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 31. Efectos principales de las medias de los valores de TEAC por el método del radical DPPH.

Figura 32. Concentración máxima inhibitoria del 50% de DPPH IC₅₀. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 33. Efectos principales de las medias de los valores de IC₅₀ por el método del radical DPPH.

Figura 34. Capacidad antioxidante equivalente Trólox de extractos de agrillo con el método de ABTS^{•+}. Se comparan los extractos de diferentes partes del fruto. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 35. Valores de IC₅₀ de extractos de diferentes partes del fruto de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$). Gráfica 35D) presenta una escala diferente en el eje “y”.

Figura 36. Efectos principales de las medias de los valores de TEAC por el método ABTS^{•+}.

Figura 37. Efectos principales de las medias de los valores de IC₅₀ por el método ABTS^{•+}.

Figura 38. Capacidad antioxidante por reducción de ión férrico de extractos de diferentes partes de fruto de agrillo, ensayo FRAP. Los resultados se expresados como equivalentes de ácido ascórbico (EAA, $\mu\text{g/g DW}$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 39. Análisis de efectos principales de las medias de los valores de equivalentes de ácido ascórbico por el método de FRAP.

Figura 40. Determinación de equivalentes de EDTA capaces de quelar el ion ferroso en un 71.57% ($\mu\text{g/g DW}$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$). La gráfica D muestra valores distintos en el eje “y”.

Figura 41. Efectos principales de las medias de los valores de equivalentes de EDTA para quelación de ion Fe^{+2} .

Figura 42. Porcentaje total de cada uno de los factores determinantes en los ensayos antioxidantes

Figura 43. Imágenes del crecimiento micelial. A) Control positivo con antifúngico comercial “Captan”; B) DMSO como control negativo; C) Agua como control negativo. D) Inhibición de colonias fúngicas con extracto etanólico de cáscara

Figura 44. Inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 45. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Fusarium solani* en caja Petri.

Figura 46. Inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 47. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotricum acutatum* en caja Petri.

Figura 48. Inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloesporioides* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 49. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotricum gloesporioides* en caja Petri.

Figura 50. Inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 51. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Penicillium digitatum* en caja Petri.

Figura 52. Efecto de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 53. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Fusarium solani* en microplaca

Figura 54. Efecto de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum acutatum* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 55. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Colletotrichum acutatum* en microplaca

Figura 56. Efecto de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 57. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotrichum gloesporioides* en microplaca

Figura 58. Efecto de inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 59. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Penicillium digitatum* en microplaca

Figura 60. Balance global del promedio de inhibición de los extractos probados contra todas las cepas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

Figura 61. Curva dosis-respuesta de inhibición de extractos de agrillo contra diferentes fitopatógenos. A) *Fusarium solani*; B) *Colletotrichum acutatum*; C) *Colletotrichum gloesporioides*; D) *Penicillium digitatum*.

Figura 62. Efecto fungicida y fungistático de extractos de agrillo en *F. solani*, *C. acutatum*, *C. gloesporioides* y *P. digitatum*. A) Extracto S-H; B) extracto C-Et; C) extracto F-Et.

1.- RESUMEN

El género *Rhus* comprende especies en donde se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios, especialmente compuestos fenólicos que destacan por su capacidad antioxidante y antimicrobiana. Las evidencias de la relación del consumo de estos metabolitos con la reducción de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, despierta el interés por el análisis de especies poco caracterizadas. Este es el caso de *Rhus allophylloides* (agrillo), distribuida en regiones áridas de México y cuyos frutos son usados en la elaboración de dulces. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las propiedades antioxidantes y antifúngicas de extractos de diferentes partes del fruto de agrillo (cáscara, semilla o fruto completo), de dos localidades (Jalisco y Michoacán) y extraídos con solventes de distinta polaridad (agua, etanol, acetona y hexano). La mayor cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenos se presentó en los extractos acetónicos y etanólicos de cáscara, así como mejor actividad antiradicalaria (DPPH• y ABTS•+). Los extractos hexánicos de las semillas presentaron actividad quelante; en tanto que fue baja la capacidad de los extractos para reducir el ion Fe^{+3} (FRAP). El origen del fruto, no tuvo influencia en estas propiedades.

Se evaluó las propiedades fungicidas y fungiestáticas de los extractos en fitopatógenos de interés agroalimentario (*Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides* y *Penicillium digitatum*), alcanzando una inhibición del crecimiento micelial del 100% en concentraciones de 18 mg/mL. Destacan los extractos etanólicos de cáscara y frutos, así como hexánico de semilla con los menores valores de concentración mínima inhibitoria del 95% (CMI₉₅) de las cepas utilizadas.

1. ABSTRACT

The genus *Rhus* includes species where the presence of secondary metabolites has been reported, mainly phenolic compounds that stand out for their antioxidative and antimicrobial properties. Extensive evidences associate the consumption of those metabolites and the relief of illness related to oxidative stress, which motivates the analysis of less characterized species. *Rhus allophylloides* (agrillo) is distributed in the arid regions of Mexico and is commonly used to sweetmeats.

Therefore, the main objective of this work was to characterize the antioxidant and antifungal properties of extracts of different parts of agrillo fruits (peel, seed and fruit) from two regions (Jalisco and Michoacan) and extracted with solvents of different polarity (water, ethanol, acetone and hexane). Phenols, flavonoids and carotenes are present mainly in the acetonic and ethanolic extracts of the peel; they presented the highest scavenging capacity for DPPH• and ABTS⁺; meanwhile, the hexanic extract of seed presented high chelating capacity. The ability for reducing Fe⁺³ (FRAP) was low in all extracts tested. The origin of agrillo fruits did not influence these properties.

The fungicide and fungistatic properties of extracts also were evaluated with phytopathogen with impact on agrofood sector (*Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides* y *Penicillium digitatum*). The extracts inhibited the mycelial growth 100% at 18 mg/mL. Ethanolic extracts of peel and fruits, in addition to hexanic from seeds, stood out with the lowest values for the minimum inhibitory concentration to obtain 95% of inhibition of the growth of the tested strains.

2. INTRODUCCIÓN

El agrillo (*Rhus allophyloides*) se caracteriza por tener frutos o drupas rojas con tricomas glandulares en su superficie. Pertenece a la familia Anacardiaceae, con el género *Rhus* que contiene más de 250 especies que se distribuyen en gran parte del mundo. En el estado de Michoacán y la región Altos de Jalisco, el fruto del agrillo es muy apreciado, principalmente en el municipio de Arandas, ya que con él se elaboran aguas frescas, paletas de hielo y dulce.

En las últimas décadas, varias publicaciones han demostrado actividades biológicas de los extractos de *Rhus*, entre ellas propiedades antifibrogénicas, antifúngicas, antiinflamatorias, antimaláricas, antimicrobianas, antimutágenas, antioxidantes, antitrombina, antitumorogénicas, antivíricas e hipoglicémicas.

Las propiedades que se analizaron en el fruto de agrillo son las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, las cuales ya se han reportado en varias especies del género *Rhus spp.* como *R. verniciflua*, *R. succedanea.*, *R. coriarea*, *R. hirta*, *R. retinorrhoea*, *R. galabra* y *R. coraria*. La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos y lipídico se han reportado a través de la estabilización del radical DPPH, inhibición en la degradación de desoxirribosa, inhibición de la reacción de Fenton, sistemas de prueba de emulsión lipídica, estabilización en la oxidación de aceites de distintos frutos etc. En referencia a las actividades antimicrobianas, se han reportado actividades antifúngicas y antivirales con distintas especies de bacterias, hongos y virus (Hernández y Terrazas, 2006; Rayne y Mazza, 2007; Quintana-Camargo *et al.*, 2016).

Los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos bioactivos de materiales vegetales se basan principalmente en la selección del método de extracción adecuado. Por lo que algunos autores recomiendan la mezcla o el uso de varios solventes que proporcionen una variación de polaridad capaz de extraer compuestos de diferentes grados de polaridad (Azmir, *et al.*, 2013; Fernández-Agulló *et al.*, 2013; Alves-Alcântara *et al.*, 2019).

3.-MARCO TEÓRICO

3.1. *Rhus spp.*

El agrillo (*Rhus allophyloides*) se caracteriza por tener frutos o bien drupas rojas con tricomas glandulares en su superficie y pertenece a la familia *Anacardiaceae* del género *Rhus* (contiene más de 250 especies individuales que se distribuyen en muchas partes del mundo) y al subgénero *Lobadium* que contiene unas 25 especies, agrupadas en las secciones *Lobadium*, *Styphonia* y *Terebinthifolia*, que se distribuyen principalmente en México y el suroeste de los Estados Unidos. Este género se encuentra en las regiones templadas, áridas y tropicales de todo el mundo, con miembros representativos según la ubicación geográfica y algunas especies, puede crecer en regiones agrícolamente no viables, por ejemplo dentro del subgénero *Lobadium*, hay especies que crecen en tipos de vegetación de matorral xerófilo, micrófilo y espinoso (*R. microphylla*, *R. trilobata* y *R. aromatica*), y semicálidas templadas en bosques de pino (*R. allophyloides*), bosques de pino-encino y matorral (Hernández y Terrazas, 2006; Rayne y Mazza, 2007).

3.1.1. Usos y consumo de agrillo (*Rhus trilobata*)

En el estado de Michoacán y la región Altos de Jalisco, el fruto del agrillo (identificado como *Rhus trilobata*, *Rhus allophyloides*, entre otras especies con similitud morfológica) es muy apreciado, principalmente en el municipio de Arandas, ya que con él se elaboran aguas frescas, paletas de hielo y dulce. Este fruto se colecta en los cerros de la región en los meses de febrero a abril. Se tiene una demanda considerable de los connacionales radicados en Estados Unidos. En otros países, se reporta su uso alimenticio y propiedades medicinales; en la herbolaria tradicional y algunas culturas indígenas, han utilizado diversas especies de *Rhus* con fines medicinales; otras culturas han sugerido un uso potencial para comercializar la bioactividad de estas plantas sin competir por los usos del suelo para la producción de alimentos. Además, es una especie arbustiva con potencial de restauración de suelos y ecosistemas de zonas degradadas. A pesar de la importancia local, (*Rhus trilobata* y *R. allophyloides*) son especies poco estudiadas, de las cuales se desconocen las

propiedades fitoquímicas y características morfológicas (Rayne y Mazza, 2007; Quintana-Camargo, *et. al.*, 2016).

3.1.2. Propiedades bioactivas del género *Rhus* spp.

En las últimas décadas, varias publicaciones han reportado sobre las actividades biológicas de los extractos de *Rhus* spp tales como propiedades antifibrogénicas, antifúngicas, antiinflamatorias, antimaláricas, antimicrobianas, antimutagénicas, antioxidantes, antitrombina, antitumorogénicas, antivíricas e hipoglicémicas, actividades atribuidas a diferentes tipos de especies de *Rhus*, diferentes partes de la planta y diferentes tipos de extractos como se muestra en el Cuadro 1, volviendo atractivo a este género en el que posiblemente se centren esfuerzos sustanciales de investigación en química verde, ya que su capacidad para crecer en tierras marginales, producir productos bioactivos potencialmente útiles los cuales se pueden extraer del material vegetal utilizando solventes ambientalmente benignos (por ejemplo, etanol, agua) que permiten usos finales tanto alimentarios como industriales de naturaleza ubicua que justifican su consideración como una especie de gran potencial para la investigación de bioproductos y bioprocesos Sin embargo, muchos de estos beneficios bioactivos se han centrado solo en unos pocos miembros de este género, por lo que no todas las especies estudiadas hasta la fecha han sido completamente caracterizadas (Rayne y Mazza, 2007).

Cuadro 1. Actividades biológicas reportadas de compuestos y fracciones extraídas del género *Rhus*. Rayne y Mazza (2007).

Actividad biológica	Especies	Parte de la planta	Compuestos y/o tipo de extractos
Antifibrogénica	<i>R. verniciflua</i>	Corteza	Buteína
Antifúngica	<i>R. glabra</i>	Ramas	Extracto metanol
Antiinflamatoria	<i>R. undulate</i>	Raíz	Éter dimetilico de apigenina
Antimalárica	<i>R. retinorrhoea</i>	Hojas	7-O-metilnaringenina, eriodictiol, 7,3'-O-dimetilquercetina, 7-O-metilapigenina,
Antimicrobiana	<i>R. retinorrhoea</i> <i>R. glabra</i> <i>R. coriaria</i>	Hojas Ramas Semillas Fruto	7-O-metilnaringenina; galato de metilo; ácido 4-metoxi-3,5-dihidroxibenzoico y ácido gálico Extracto de metanol Extractos de etanol y metanol

Antimutagénico	<i>R. verniciflua</i>	Madera Ramas	Extracto de agua Etanol / agua (19: 1 v / v) Extracto de hidrodestilación Fracción soluble en agua de extracto de metanol dividida contra cloroformo Etanol / agua (4: 1 v / v) Garbanzol, sulfuretina, fisetina, fustin y mollisacacidina Ácido protocatecuico, fustin, fisetina, sulfuretina y buteína
Antioxidante	<i>R. verniciflua</i> <i>R. succedanea</i> <i>R. succedanea</i> <i>R. coraria</i> <i>R. hirta</i>	Ramas Corteza Sabia Frutas Hojas Todo Planta	Extracto de etanol Fustin, quercitina, buteína y sulfuretina Extracto de etanol crudo Extracto de etanol / agua (3: 1 v / v) 10 '(Z), 13' (E), 15 '(E) - heptadecatrienilhidroquinona, 10' (Z), 13 '(E) - heptadecadienilhidroquinona y 10 '(Z) heptadecenilhidroquinona Extracto de metanol Extracto de agua Fracción soluble en agua de extracto de metanol dividida contra cloroformo Extracto de metanol Fracciones de acetato de etilo y metanol después del desgrasado inicial (éter de petróleo), extracción con agua / metanol (1: 4 v / v) y reparto (n-hexano / etilo) Ácido 6-pentadecilsalicílico
Antitrombina	<i>R. verniciflua</i>	Tallos	Ácido 6-pentadecilsalicílico
Antitumorogénica	<i>R. verniciflua</i>	Ramas	Extracto de etanol Ácido protocatecuico, fustin, fisetina, sulfuretina y buteína
Antiviral	<i>R. succedanea</i>	Fruta	Robustaflavona, amentoflavona, agathisflavona, volkensiflavona, succedaneaflavona y rhusflavanona
Citotóxica	<i>R. verniciflua</i>	Ramas	Extracto de etanol
Hipoglucémica	<i>R. coraria</i>	Frutas	Extracto de metanol
Leucopénico	<i>R. vernificera</i>	Sabia	Extractos de polisacáridos

3.1.2.1. Actividad antioxidante y antimicrobiana de *Rhus spp.*

La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos y lipídicos de *Rhus spp.* se ha reportado a través de distintos mecanismos como la estabilización del radical DPPH, inhibición en la degradación de desoxirribosa, inhibición de la reacción de Fenton, estabilización de emulsiones lipídicas, inhibición o retardo de la oxidación de aceites de distintos frutos etc. *R. verniciflua*, *R. succedanea*, *R. coriarea* y *R. hirta* son algunas especies cuya actividad antioxidante se ha reportado. Los extractos de *Rhus spp.* también son notables por sus actividades antimicrobianas, aunque hay poca información disponible sobre sus actividades antifúngicas y antivirales. En especies como *R. retinorrhoea*, *R. galabra* y *R. coraria* se reporta actividad antimicrobiana. Por ejemplo *R. galabra* tiene efectos de amplio espectro de inhibición de bacterias probadas como *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* DC2, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacter phlei*, *Pseudomonas aeruginosa* H187, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* methS, *Staphylococcus aureus* methR P00017 y *Salmonella typhimurium* TA98, así como en diversos tipos de hongos incluyendo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium tricinctum*, *Microsporium cookei*, *M. gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viridae* y *Trichophyton mentagrophytes*. Este tipo de inhibición es atribuido a sustancias como galato de metilo con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 13 µg/mL, 4-metoxi-3, ácido 5-dihydroxibenzoico con un MIC de 25 µg/mL y ácido gálico con un MIC de > 1,000 µg/mL. Además, otros estudios atribuyen esta propiedad a compuestos taninos con un MIC de 10 a 26 mg/mL (dependiendo de la especie bacteriana). Solo un estudio ha examinado las propiedades antivirales de amplio espectro de los extractos de *Rhus*, y el trabajo se centró en los biflavonoides aislados de semillas de *R. succedanea*. Se aislaron seis bioflavonoides: robustaflavona, amentoflavona, agathisflavona, volkensiflavona, succedaneaflavanone y rhusflavanone y se probaron las actividades inhibitorias contra un número de virus, incluidos los virus respiratorios (influenza A, sincitial respiratorio de influenza, parainfluenza tipo 3, adenovirus tipo 5 y sarampión) y los virus del herpes (HSV-1, HSV-2, HCM y VZV) (Rayne y Mazza, 2007). Kossah et. al. (2011) también reportaron que el extracto de fruto de *R. typhina* muestra una fuerte actividad antimicrobiana con

una dependencia de la concentración y un amplio espectro antimicrobiano de bacterias Gram-positivas como *Bacillus cereus* y Gram-negativas como *Helicobacter pylori*.

3.2. Extracción de compuestos naturales

El uso de compuestos bioactivos en diferentes sectores comerciales como las industrias farmacéutica, alimentaria y química, significa la necesidad de encontrar el método más apropiado y estándar para extraer estos componentes activos de los materiales vegetales. Los estudios cualitativos y cuantitativos de compuestos bioactivos de materiales vegetales se basan principalmente en la selección del método de extracción adecuado. El desarrollo de técnicas cromatográficas y espectrométricas modernas hace que el análisis de compuestos bioactivos sea más fácil que antes, pero el éxito aún depende de los métodos de extracción, los parámetros de entrada y la naturaleza exacta de las partes de la planta (Azmir *et al.*, 2013).

La extracción con disolventes es el método más común utilizado para aislar antioxidantes naturales y compuestos antimicrobianos. Los disolventes más adecuados para la extracción de compuestos fenólicos y compuestos antimicrobianos, desde el punto de vista de la inocuidad de los alimentos, son agua, etanol y acetona. Por lo que algunos autores recomiendan la mezcla o el uso de varios solventes que proporcionen una variación de polaridad capaz de extraer compuestos fenólicos de diferentes grados de polaridad (Fernández-Agulló *et. al.*, 2013; Alves-Alcântara *et. al.*, 2019).

3.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se ha demostrado que el aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), definidas como moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareados, tienen un impacto en la patogénesis de enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus tipo 2, Parkinson, enfermedades hepáticas y cardiovasculares. Las ROS incluyen los radicales libres como los radicales aniónicos de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), alcoxilo (RO^{\bullet}), hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), así como moléculas

neutras como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). La Figura 1 muestra la estructura de algunas de estas especies.

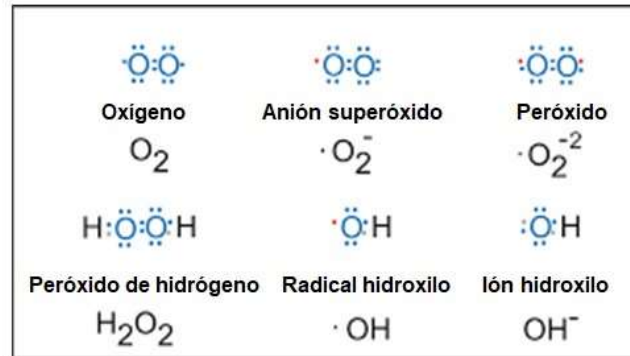


Figura 1. Especies reactivas de oxígeno. Se muestran las estructuras de radicales ROS, así como no radicales (pro-oxidantes).

Los ROS son altamente reactivos con una vida media de microsegundos; son clave para formar otros radicales libres a través de reacciones en cadena, ocurriendo una rápida propagación de radicales al reaccionar con moléculas aledañas, ocasionando mayor daño potencial. De hecho, un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante una reacción en cadena. Los ROS se liberan durante el metabolismo oxidativo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos) y radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Su producción también se relaciona con el consumo o uso de tóxicos como alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación inadecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas; se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico. Estas especies dañinas pueden afectar todas las macromoléculas celulares, incluidas proteínas, lípidos y DNA, y pueden ejercer efectos adversos sobre el organismo. Sin embargo, los antioxidantes pueden reducir la formación de ROS a través de su estabilización, desactivando los metales de transición redox activos y/o induciendo vías específicas de señalización para modular la defensa celular (Coronado *et al.*, 2015; Bakuradze *et. al.*, 2019).

3.4. Antioxidantes

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. En general previenen los efectos adversos de especies oxidantes reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos, además de su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos y su calidad nutricional y organoléptica.

En general, se consideran dos tipos de antioxidantes: endógenos y exógenos. Los endógenos son producidos por el cuerpo y pueden ser enzimáticos, por ejemplo, superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD2), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) o, moléculas antioxidantes no enzimáticas como el glutatión (GSH), péptidos que contienen histidina, proteínas como la transferrina y ferritina, ácido dihidrolipoico y ubiquinol (CoQH₂). Mientras que los antioxidantes exógenos, son adquiridos por el humano a través de la dieta; dentro de estos se encuentra el α -tocoferol (vitamina E), el β -caroteno (provitamina A), el ácido ascórbico (vitamina C) y los compuestos fenólicos, donde se destacan flavonoides y poliflavonoides, además de los antioxidantes sintéticos como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), ter-butilhidroquinona (TBHQ) y propilgalato (PG). Estos antioxidantes por ejemplo pueden ejercer su efecto a través de la eliminación de radicales o el secuestro de iones de metales de transición (como el hierro), la descomposición del peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos, la extinción de los prooxidantes activos como la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como evitar la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear como el glutatión y glutatión-S-transferasa, pueden actuar en la reparación del daño biológico como por ejemplo, en la reducción de las formas oxidadas de los ácidos nucleicos.

Los antioxidantes se pueden clasificar dependiendo sus mecanismos de acción; los antioxidantes primarios (que incluyen compuestos fenólicos) rompen las cadenas reactivas de oxidación que actúan principalmente a través de la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS); por ejemplo, en la cadena respiratoria de las mitocondrias dichos antioxidantes son generalmente buenos agentes reductores, ejercen su

acción a través de la donación de cationes de hidrógeno (H^+ protones), de electrones (e^-), o ambos (es decir, transferencia de electrones acoplados a protones), y se clasifican como transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y transferencia de electrones (TE) (Zapata *et al.*, 2007; Apak *et al.*, 2016; Seabra de Oliveira *et al.*, 2019, Hu *et al.*, 2020). Los antioxidantes secundarios actúan a través de otros mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Zapata *et al.*, 2007).

3.4.1. Actividad y capacidad antioxidante

Algunos métodos de la literatura no distinguen entre la "capacidad antioxidante" y la "actividad antioxidante" de los antioxidantes no enzimáticos, que son los ensayos de punto final que miden la eficiencia de la acción antioxidante (es decir, la inactivación de especies reactivas) y deben diferenciarse de los ensayos basados en la cinética que miden la velocidad de reacción. Por esta razón la literatura define a la actividad antioxidante como aquella que se relaciona con la cinética de la acción antioxidante para disminuir las especies reactivas, generalmente expresada como tasas de reacción o porcentajes de captación por unidad de tiempo y la capacidad antioxidante como la eficiencia de conversión termodinámica de especies reactivas por antioxidantes, es decir el número de moles de las especies reactivas capturadas por un mol de antioxidante durante un período fijo.

La propiedad antioxidante puede medirse encontrando la velocidad (métodos cinéticos de actividad antioxidante "AO") o la eficiencia de conversión termodinámica (métodos de capacidad antioxidante "CA") para la reacción de una sonda oxidante adecuada con el antioxidante. Los ensayos de AO como TRAP (parámetro antioxidante que atrapa el radical peroxil total), el blanqueo de crocina, ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) TOSC (capacidad total de eliminación de oxirradical), etc. suelen ser competitivos y funcionan en un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno (TAH), mientras que la medición CA los métodos generalmente no son ensayos competitivos y de modo de acción mixto (TE/TAH).

3.4.2. Caracterización antioxidante

Los ensayos de cuantificación de los radicales radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]) y 2,2-azino-di-(3-etilbenzotialozina-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}), ensayo de poder antioxidante de la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), la capacidad reductora antioxidante del ion de cobre (CUPRAC) y el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), son algunos de los métodos que se han aplicado ampliamente en frutos y hortalizas para evaluar sus propiedades antioxidantes. En la Figura 2 se esquematiza los fundamentos de las principales técnicas utilizadas para determinar la capacidad antioxidante de una muestra. Sin embargo, debido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en estos ensayos, ninguna prueba individual puede caracterizar completamente el perfil de cada muestra; siendo lo ideal, la caracterización del material a través del uso de distintos métodos utilizados (Arvaniti *et. al.*, 2019).

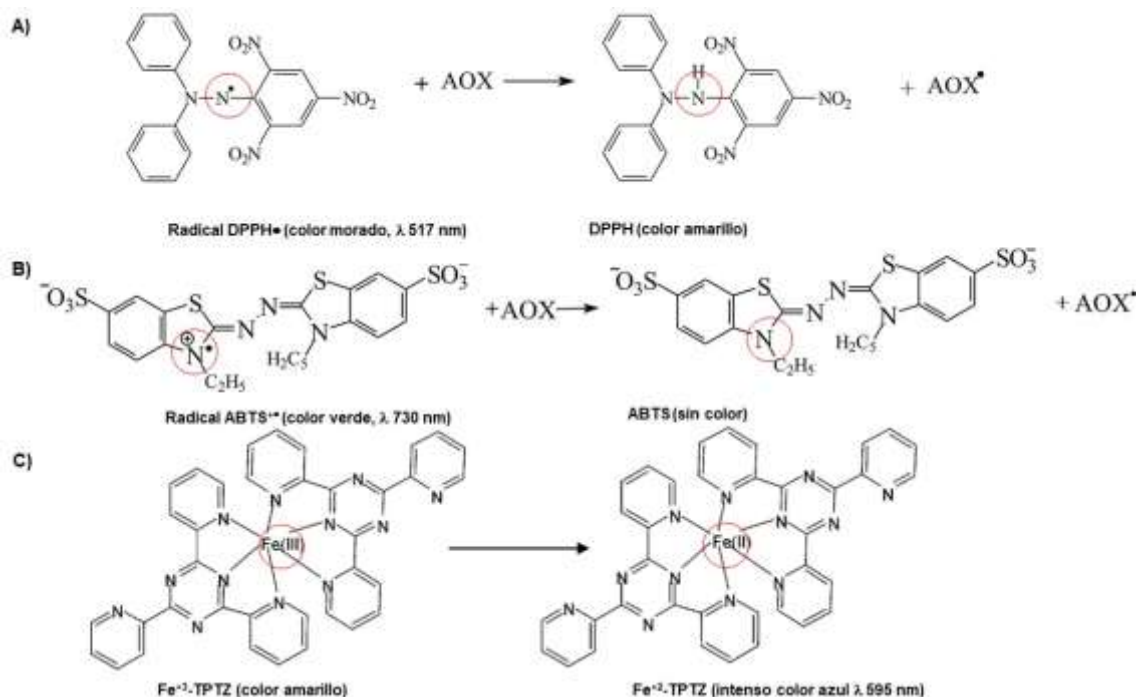


Figura 2. Métodos de evaluación de capacidad antioxidante. A) El radical DPPH de color morado (λ 517 nm) es estabilizado por la transferencia de un H⁺ por parte de una molécula antioxidante, dando una coloración amarilla; B) El radical ABTS de color verde (λ 730 nm) es estabilizado por transferencia de H⁺ quedando el ABTS incoloro; C) El complejo Fe⁺³-TPTZ de color amarillo es reducido (transferencia de electrones) a Fe⁺²-TPTZ formando un complejo de color azul intenso (λ 595 nm). En círculos rojos se indican los principales cambios moleculares.

3.4.3. Compuestos fenólicos

Los fenoles son metabolitos secundarios producidos por plantas superiores que se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos bencénicos teniendo como grupo funcional uno o más grupos hidroxilo. Generalmente, los compuestos fenólicos se conjugan con azúcares o ácidos orgánicos y se dividen principalmente en dos grupos: flavonoides y no flavonoides. Desempeñan múltiples funciones esenciales en la fisiología de las plantas actúan colectivamente como un arsenal eficaz contra la miríada de tensiones bióticas y abióticas a las que ellos, como organismos sésiles, pueden estar potencialmente expuestos durante su vida. Los flavonoides comparten un esqueleto de carbono común de los difenilpropanos, dos anillos de benceno (anillo A y B) unidos por una cadena lineal de tres carbonos. La cadena central de tres carbonos forma un anillo pirano cerrado (anillo C) con un anillo A de benceno (Figura 3). Los principales grupos de no flavonoides son ácidos fenólicos, que se pueden subdividir en derivados del ácido benzoico, como el ácido gálico y el ácido protocatecuico, y los derivados del ácido cinámico, que consisten principalmente en ácido cumárico, cafeico y ferúlico, y otros estilbenos como el resveratrol, que existe en las formas isoméricas *cis* y *trans*, y los lignanos, producidos por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. Se han identificado más de 4000 flavonoides en frutas, verduras y bebidas derivadas de plantas, como el té y el vino, y la lista está en constante crecimiento, algunos ejemplos se muestran en el Cuadro 2 (Daglia, 2011; González-Jiménez *et. al.*, 2015).

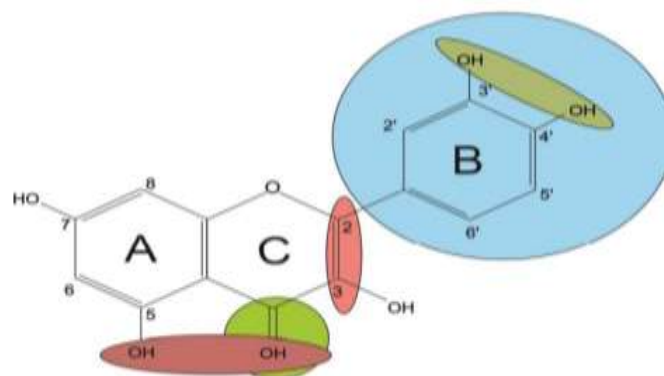
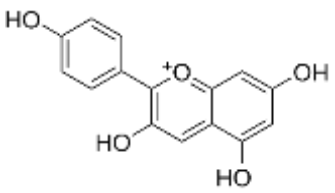
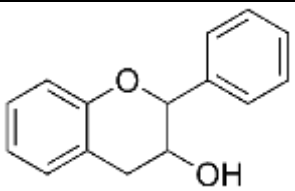
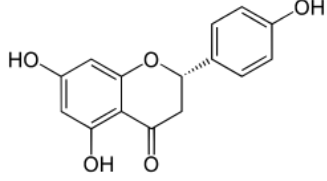
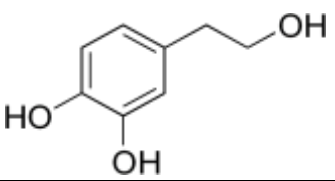
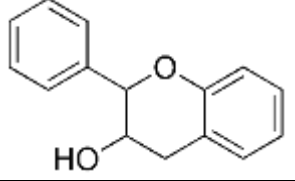
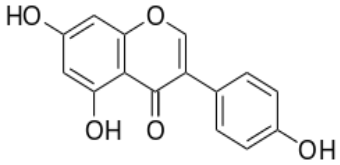
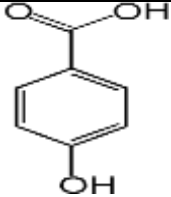
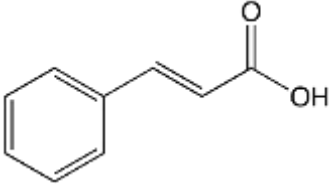
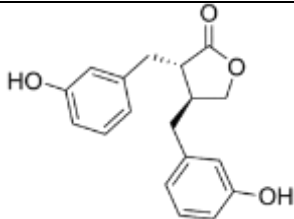
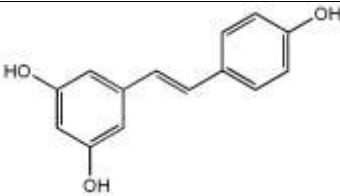
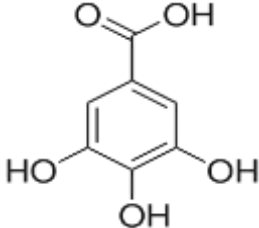


Figura 3. Estructura base de los flavonoides. Estos se clasifican de acuerdo a la posición del anillo B y al grado de oxidación del anillo C. Se representación los criterios sugeridos para que un compuesto antioxidante pueda actuar estabilizando los radicales libres

Debido a la presencia de grupos funcionales hidroxilo unidos a anillos bencénicos que facilitan la deslocalización electrónica, los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes principalmente por su capacidad de estabilizar radicales libres. Esta capacidad aumenta cuando se cumplen los siguientes criterios: 1) la presencia de una estructura 3',4'-dihidroxi- en el anillo B; 2) la presencia de un doble enlace 2,3 en conjunción con el grupo 4-oxo en el heterociclo, lo que permite la conjugación entre los anillos A y B; 3) la presencia de grupos 3 y 4-hidroxilo en el anillo B junto con una función 4-oxo en los anillos A y C como se muestra en la Figura 3 (Apak et. al., 2016).

Cuadro 2. Clases de polifenoles, fuente de obtención y estructura química.

Clase de polifenol	Ejemplos	Fuente	Estructura química
Antocianidinas	Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y sus glicósidos	Vino tinto, algunas variedades de cereales, berenjenas, frijoles, rábanos	
Flavanoles	Catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina	Té verde	
Flavanonas	Hesperetina, hesperidina, homoeriodictiol, naringenina, naringina	Pomelo, naranja, limón, jitomate y algunas plantas aromáticas (menta)	
Flavonas	Apigenina, luteolina, tangeretina, nobiletina, sinensetina	Perejil, apio, mijo, trigo, piel de cítricos	
Flavonoles	Kaempferol, miricetina, quercetina y su glicósidos	Cebolla, col rizada, puerros, brócoli, arándanos, vino tinto y té	

Isoflavonas	Daidzeína, genisteína, gliciteína	Soya, cacahuete, leguminosas	
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico	Té, trigo, frutas rojas (frambuesa, grosella, fresa)	
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido sinápico	Kiwis, arándanos, manzanas, trigo, arroz, avena	
Lignan	Pinoresinol, podofilotoxina Enterolactona	Semilla de lino, semillas de sésamo, cereales (centeno, trigo, avena, cebada), brócoli, col	
Estilbenos	Resveratrol	Vino	
Taninos (proantocianidinas)	Procianidinas	Té, vinos, chocolate	

Modificado de González-Jiménez, *et. al.*, (2015).

3.4.4. Polifenoles en prevención de enfermedades

Existen grandes efectos benéficos asociados a la ingesta de alimentos ricos en polifenoles que impactan en la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) y el cáncer. Numerosos estudios de observación prospectivos han examinado la relación entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles y el riesgo de estas enfermedades. Estos estudios son importantes porque evalúan el efecto sobre la salud humana de la exposición a largo plazo a concentraciones fisiológicas de polifenoles de la dieta. Por ejemplo, el consumo de polifenoles ronda los 800-900 mg/día en la dieta finlandesa, mientras que en España ronda

los 1100 mg/día. Los principales factores que influyen en la ingesta de polifenoles son los hábitos culturales y las preferencias alimentarias y se debe prestar más atención a los complementos dietéticos que contienen polifenoles, que se consumen cada vez más. Su actividad protectora se ha atribuido inicialmente a sus propiedades antioxidantes, eliminadoras de radicales libres y quelantes de metales. Los beneficios derivados de los polifenoles parecen estar mediados por la modulación de vías bioquímicas y mecanismos de señalización que actúan de forma independiente o sinérgica. Así, los polifenoles pueden actuar en la atenuación de la expresión de genes inflamatorios, reducción de los triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos libres y lipoproteínas de baja densidad (LDL) séricas, aumento de las lipoproteínas de alta densidad séricas (HDL), inhibición de la proliferación celular, la angiogénesis y las telomerasas, además, participan en la regulación de procesos apoptóticos y la autofagia.

Muchos de estos eventos parecen ser modulados a través de la influencia de fenoles sobre los ROS, RNS y la producción de eicosanoides (mediadores en la disminución de las ECV y el cáncer). La mayoría de los polifenoles tienen propiedades quelantes de metales, lo que podría explicar su efecto antioxidante al evitar que los metales de transición con actividad redox catalicen la formación de radicales libres y la posterior oxidación de biomoléculas. Un ejemplo es el efecto de la quercetina la cual quela el hierro, que participa en la generación de radicales hidroxilo, y el resveratrol quela el cobre y, en consecuencia, reduce la oxidación de las LDL humanas *in vitro* (Mitjavila y Moreno, 2012).

3.4.5. Polifenoles como agentes antimicrobianos

Entre los fenoles, los flavanoles, flavonoles y taninos han recibido la mayor atención debido a su mayor actividad antimicrobiana y amplio espectro en comparación con otros fenoles, y al hecho de que la mayoría de éstos son capaces de suprimir una serie de factores de virulencia microbiana tales como la inhibición de la formación de biopelículas, la reducción de la adhesión de los ligandos del huésped y la neutralización de toxinas bacterianas. El efecto de los compuestos fenólicos, además, muestran sinergismo con los antibióticos. Las propiedades antimicrobianas evidenciadas para ciertas clases de polifenoles se han propuesto para desarrollar nuevos conservadores de alimentos, debido a la

creciente presión de los consumidores sobre la industria alimentaria para evitar los conservadores sintéticos, o para desarrollar terapias innovadoras para el tratamiento de diversas infecciones microbianas, considerando el aumento de la resistencia microbiana frente a la terapia antibiótica convencional (Daglia, 2011).

3.4.6. Actividad antimicrobiana

Los antimicrobianos naturales, compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento (Chavarrias, 2006).

Se han descubierto propiedades en especies de origen vegetal que contrarrestan la descomposición de alimentos debida a sus propiedades antimicrobianas. Estas especies contienen compuestos fenólicos que poseen una amplia actividad antibacteriana, antiviral o antifúngica, pero sobretodo, su importancia radica en que las bacterias no generan resistencia contra ellos.

Entre los compuestos antimicrobianos a destacar, en general, son los ácidos orgánicos, así como los compuestos fenólicos provenientes de diferentes plantas, que tienen impacto negativo en las cepas microbianas por lo cual reducen el crecimiento de células fúngicas y bacterianas ya que afecta la resistencia de sus membranas interfiriendo en su metabolismo, entre otros posibles modos de acción, que retardan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (Cerón-Carrillo *et. al.*, 2014; Juárez *et. al.*, 2015; Khaneghah *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que el aumento de la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos que emergen del uso extensivo de éstos, puede hacer que los agentes antimicrobianos actuales sean insuficientes para controlar al menos algunas infecciones de microorganismos patógenos, por lo que el uso de compuestos naturales es una alternativa atractiva para combatir la resistencia de muchas de las especies de este tipo de microorganismos (Juárez *et. al.*, 2015).

3.4.6.1. Mecanismos de acción antimicrobiana

El mecanismo inhibitorio de los ácidos orgánicos se debe principalmente al paso del compuesto en su forma protonada hacia la membrana plasmática. En

consecuencia, cuando el compuesto se encuentra con un pH más alto dentro de la célula, el ácido se disocia, liberando protones y aniones cargados que no pueden pasar a través de la membrana plasmática. En las levaduras podría deberse al inicio de una reacción de estrés, por lo que los esfuerzos para volver a la homeostasis, resultan en el agotamiento de las reservas de energía existentes utilizadas para el crecimiento y otras actividades metabólicas críticas. Así también las interacciones electrostáticas con grupos de fosfato cargados negativamente en las membranas celulares microbianas ocasionan que los fragmentos hidrófobos pueden insertarse en la membrana y generar poros los cuales facilita que una sustancia antimicrobiana ingresa a la célula, interfiriendo en los mecanismos de síntesis de proteínas. Por ejemplo, el mecanismo de la acción antimicrobiana de las antocianidinas implica aumentar la energía libre de Gibbs de adhesión a las células epiteliales, lo que hace que la unión de las bacterias a estas células sea termodinámicamente desfavorable, previniendo así infecciones del tracto urinario (Khaneghah *et al.*, 2018).

3.5. Patógenos post-cosecha de interés

Los hongos pueden contaminar varios productos agrícolas antes de la cosecha o en condiciones posteriores a la cosecha (post-cosecha) y se consideran los microorganismos más comunes que estropean los alimentos y que, además pueden producir micotoxinas. Debido a sus diversos efectos tóxicos y alta estabilidad térmica, las micotoxinas en los alimentos y piensos son potencialmente peligrosas para la salud de los seres humanos y los animales. Las malas prácticas de recolección, el almacenamiento inadecuado y las condiciones menos que óptimas durante el transporte, la comercialización y el procesamiento, pueden contribuir al crecimiento de hongos y aumentar el riesgo de producción de micotoxinas. A pesar de las mejoras modernas de higiene y las técnicas de producción de alimentos, la seguridad alimentaria es un problema de salud pública cada vez más importante. Se ha estimado que hasta el 30% de la población de los países industrializados padece una enfermedad transmitida por los alimentos cada año (Abbaszadeh *et. al.*, 2014).

Fusarium spp., constituye

un complejo de hongos filamentosos que se dispersan fácilmente en el medio ambiente a través del contacto directo, o a través del agua, el viento y los vectores. Generan grandes pérdidas económicas en la producción mundial de frutas, verduras, cereales y celulosa. Tienen la capacidad para producir micotoxinas que contaminan muchos productos agrícolas que afectan la salud humana y animal. Actualmente, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* son importantes patógenos oportunistas emergentes que causan queratitis, onicomicosis e infección micótica invasiva tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Dantas de Menezes *et.al.*, 2016; Paziani *et. al.*, 2019).

Por su parte, el género *Colletotrichum* comprende varios patógenos de plantas que causan enormes pérdidas de cultivos. El género consta de alrededor de 600 especies diferentes, que infectan alrededor de 3,200 especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Principalmente *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, atacan con frecuencia las frutas templadas, causando daños tanto a las frutas maduras como a las inmaduras, tal es el caso de pudrición roja de la caña de azúcar, de la corona de fresa y plátano, mancha marrón de caupí y plaga de plántulas en sorgo y papaya. Muchos patógenos *Colletotrichum spp.*, son transmitidos por semillas y causan pérdidas notables en condiciones favorables (Bhat *et. al.*, 2018; Rashid, *et. al.* 2018).

El *Penicillium* es uno de los hongos más comunes en una amplia gama de hábitats y la especie es conocida por su impacto. La función principal de *Penicillium* es la descomposición de materiales orgánicos en hábitats naturales y, desafortunadamente, algunas especies dañan los cultivos alimentarios atacando una amplia gama de frutas y verduras frescas que causan enfermedades durante el manejo post-cosecha (Rodríguez-Assaf *et. al.*, 2018). Los patógenos fúngicos post-cosecha devastadores incluye al *P. digitatum*, causante de moho verde (causante del 90% de las pérdidas de producción postcosecha), moho azul y pudrición agria en los cítricos (Xin *et. al.*, 2019).

Aspergillus spp. Existen aproximadamente 250 especies en el género *Aspergillus*, incluidas especies bien conocidas como *A. oryzae* y *A. niger*, especies patógenas como *A. fumigatus* y *A. parasiticus*, especies productoras de toxinas como *A. flavus* (que produce aflatoxinas), la especie más utilizada

para la investigación

genética básica *A. nidulans*, y *A. terreus* que produce lovastantina sustancia reductora del colesterol (He *et. al.*, 2018).

4.-JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay poca información sobre varios frutos silvestres que son apreciados y tradicionalmente consumidos por pobladores de distintas regiones de México. Este es el caso *Rhus allophylloides* (conocido como agrillo), que crece en zonas poco viables agrícolamente, como en ciertas localidades de Los Altos de Jalisco y en Puruándiro, Michoacán, entre otras regiones.

En otras especies del género *Rhus* se han encontrado gran cantidad de compuestos bioactivos presentes en la corteza, hojas, raíces y frutos (que pueden ser extraídas con diferentes solventes como hexano, acetona, alcohol, agua, etc.), con actividades biológicas que benefician al consumidor, por ejemplo, compuestos antioxidantes que repercuten favorablemente a la salud humana, ya que en la actualidad existen muchos tipos de enfermedades que provocan la muerte de muchas personas o deterioran su calidad de vida, como el cáncer o hipertensión, asociadas a la generación de radicales libres y los daños que éstos ocasionan, por lo cual es necesario continuar la investigación de los frutos aún no estudiados para la posible creación de productos alimenticios que ayuden a minimizar dichos padecimientos a través de su consumo.

Otro de los beneficios asociados a las sustancias bioactivas del agrillo, es su probable actividad antimicrobiana, la cual es de gran importancia en el área agrícola y de alimentos, ya que existe una variedad de agentes fitopatógenos que atacan a los cultivos deteriorando principalmente a los granos, hortalizas y frutos post cosecha así como alimentos procesados, lo que puede significar un riesgo para la salud de las personas que lo consumen o bien significan una gran pérdida económica para muchos productores, por lo que se podría desarrollar biopesticidas (de origen no químico) amigables con el medio ambiente, y que además no propicien resistencia que algunos microorganismos generan cuando se utilizan pesticidas químicos en exceso.

5. HIPÓTESIS

El agrillo (*Rhus allophyloides*) contiene compuestos con actividad antioxidante y antifúngicas

6.- OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar las propiedades antioxidantes y antifúngicas de extractos de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*).

ESPECÍFICOS

- 1.- Obtener los extractos con solventes de distintas polaridades y diferentes partes del fruto de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*)
- 2.- Caracterizar las actividades antioxidantes de extractos de fruto de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*)
- 3.-Evaluar las actividades antifúngicas de los extractos de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*).

7.-MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.-Obtención de la materia prima. La materia prima (fruto de agrillo) se recolectó de forma manual de las zonas silvestres del municipio de Arandas, Jalisco y del municipio de Puruándiro, Michoacán. La colecta se realizó durante la temporada de producción del fruto, que inicia en febrero y termina en abril. Los frutos eran maduros, identificados por su color rojo con tonos ligeramente naranjas, llegando a un contenido de $2.2 \pm 2^{\circ}$ Brix y una acidez de 2.8 (pH), por cada 10 g de muestra. La especie fue identificada como *Rhus allophyloides* por la Dra. Irma Guadalupe López Muraira, del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, a través de sus características taxonómicas (Figura 4).

7.2.-Diseño de experimentos

Se realizó un diseño factorial completo al azar en el que se consideraron tres factores que comprenden: Localidad (F1), partes de fruto (F2) y solventes (F3),

con 2, 3 y 4 niveles, respectivamente (Cuadro 2). Este diseño se realizó aleatoriamente y por triplicado, obteniendo un total de 72 corridas (experimentos). Las variables de respuesta fueron cantidad de compuestos fenólicos, actividad y/o capacidad antioxidante y su actividad antifúngica.



Figura 4. Planta de agrillo *Rhus allophylloides*

Cuadro 3. Diseño factorial completo al azar de 3 factores de 2, 3 y 4 niveles

Factores					
2 Niveles	1) Región	3 Niveles	2) Partes del fruto	4 Niveles	3) Solventes
	Arandas, Jalisco (J)		Fruto completo (F)		Hexano (H)
	Puruándiro, Michoacán (M)		Cáscara (C)		Acetona (Ac)
Semilla (S)	Etanol (Et)				
					Agua (Ag)

Para simplificar e identificar los diferentes tipos de muestras, se utilizó la siguiente nomenclatura, según se muestra en el Cuadro 4, donde la letra C refiere a la cáscara del fruto, F al fruto completo y S a la semilla.

En cuanto al solvente las letras Ag corresponde al agua, Et al etanol, Ac a la acetona y H al hexano, y por último, para referirse a la localidad, la J representa los frutos proveniente de la región de los Altos de Jalisco y la M a la zona de Puruándiro, Michoacán como se muestra a continuación en Cuadro 4.

Cuadro 4. Abreviaturas de identificación para las muestras utilizadas en el proyecto.

Nombre completo de la muestra	Abreviación
Cáscara-Agua-Jalisco	C-Ag-J
Cáscara-Agua-Michoacán	C-Ag-M
Fruto-Agua-Jalisco	F-Ag-J
Fruto-Agua-Michoacán	F-Ag-M
Semilla-Agua-Jalisco	S-Ag-J
Semilla-Agua-Michoacán	S-Ag-M
Cáscara-Etanol-Jalisco	C-Et-J
Cáscara-Etanol-Michoacán	C-Et-M
Fruto-Etanol-Jalisco	F-Et-J
Fruto-Etanol-Michoacán	F-Et-M
Semilla-Etanol-Jalisco	S-Et-J
Semilla-Etanol-Michoacán	S-Et-M
Cáscara-Acetona-Jalisco	C-Ac-J
Cáscara-Acetona-Michoacán	C-Ac-M
Fruto-Acetona-Jalisco	F-Ac-J
Fruto-Acetona-Michoacán	F-Ac-M
Semilla-Acetona-Jalisco	S-Ac-J
Semilla-Acetona-Michoacán	S-Ac-M
Cáscara-Hexano-Jalisco	C-H-J
Cáscara-Hexano-Michoacán	C-H-M
Fruto-Hexano-Jalisco	F-H-J
Fruto-Hexano-Michoacán	F-H-M
Semilla-Hexano-Jalisco	S-H-J
Semilla-Hexano-Michoacán	S-H-M

7.3. Obtención y caracterización de extractos de distinta polaridad en semilla, cáscara y frutos de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*)

Previamente al procesamiento de la muestra, el fruto de agrillo se limpió manualmente y con ayuda de un colador, con el fin de remover toda materia extraña y suciedad posible. Para los análisis se consideró la cáscara y semilla por separado además del fruto completo. Las muestras se trituraron con nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y pistilo para destruir membranas sin alterar su composición y así facilitar la extracción.

Una vez obtenidas las muestras pulverizadas, se pasaron por un tamiz del número 30 de tamaño de malla de 600 μm para obtener mayor zona de contacto

y facilitar la extracción de sus componentes (Figura 5). Finalmente, las muestras se pesaron y se secaron a 45 °C en una estufa Felisa® hasta peso constante (aproximadamente 24 h).

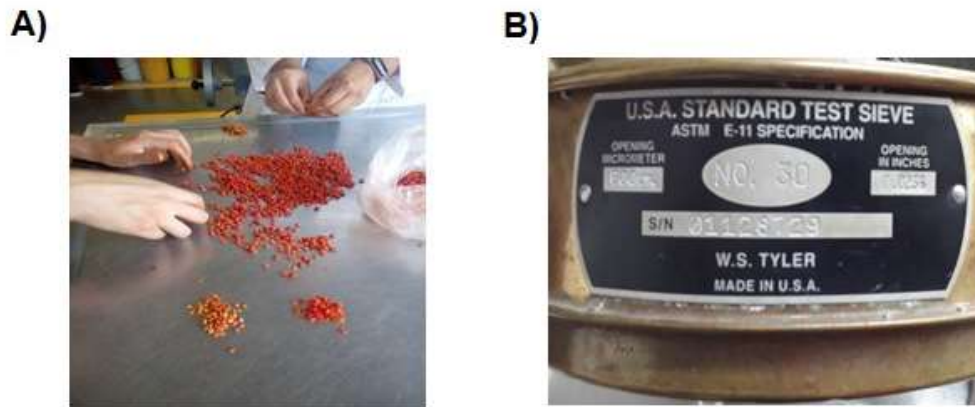


Figura 5. A) Limpieza manual de agrillo. B) Tamiz de separación

7.3.1. Obtención de extractos

Para la obtención de las extracciones se utilizaron solventes con polaridad distinta (del menos polar al más polar; Razali *et al.*, 2017). Los solventes utilizados fueron hexano, acetona, etanol 70% (v/v) y agua destilada (Cuadro 5). Se tomaron 5 g de peso seco (DW) de cada una de las muestras y se agitaron con cada solvente (Figura 6) en una relación 1:15 (w/v) durante 2 h a 300 rpm en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (Kossah *et al.*, 2011).



Figura 6. Obtención de extractos del agrillo en condiciones de oscuridad y agitación.

Cuadro 5. Características de solventes usados y su polaridad creciente

Solvente	Fórmula	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/mL)	Solubilidad en H ₂ O (g/100 g)	Polaridad relativa
Hexano	C ₆ H ₁₄	69	-95	0.655	0.0014	0.009
Acetona	C ₃ H ₆ O	56.2	-94.3	0.786	Miscible	0.355
Etanol	C ₂ H ₆ O	78.5	-114.1	0.789	Miscible	0.654
Agua	H ₂ O	100.0	0.0	0.998	Miscible	1.000

Posteriormente, se procedió a la filtración de los extractos utilizando una gasa de algodón, seguido de un filtro Millipore #1 con un poro de 11 µm (125 mm de diámetro) (Figura 7).

Finalmente, las muestras se llevaron a total sequedad, evaporando el solvente dependiendo de su naturaleza sin exceder los 45 °C. El hexano y la acetona se evaporaron a temperatura ambiente; el etanol se llevó a sequedad con la ayuda de un rotavapor IKA® RV/HB 10 digital y, el agua se retiró con una liofilizadora Labconco® (Figura 8). Los polvos finos obtenidos se pesaron para el cálculo de rendimiento de acuerdo a la ecuación 1

Ecuación 1.

$$Rendimiento(\%) = \frac{W2}{W1} * 100$$

Dónde, W1 es el peso de la muestra antes de la extracción

W2 es el peso de la muestra después de la extracción



Figura 7. Filtración de extractos de agrillo con cada uno de los solventes

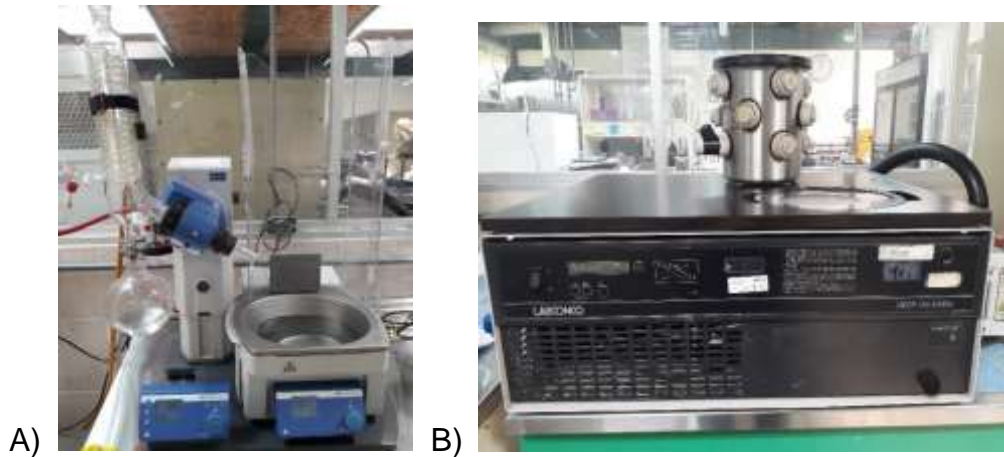


Figura 8. A) Rotavapor IKA® RV/HB 10 digital. B) Liofilizadora Labconco®

Los polvos obtenidos se resuspendieron en 10 mL de dimetil sulfóxido (DMSO), homogeneizando la solución con la ayuda de un baño de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner®CD-4820) por 15 min a temperatura ambiente.

Adicionalmente, los extractos acuosos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min en una centrífuga (®Hermle Z383 K), obteniéndose un precipitado de consistencia viscosa, debido a la presencia de carbohidratos. Este precipitado fue desechado, recuperando el sobrenadante.

7.3.2. Cuantificación de fenoles totales

7.3.2.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu

A 100 μL de muestra, estándar o etanol al 95% (como blanco) se añadieron 200 μL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada al 10% v/v. Se mezcló y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad. Posteriormente, se añadió 800 μL de Na_2CO_3 700 mM y se incubó 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se tomaron 250 μL de la mezcla de reacción que se depositaron en los pocillos del lector de microplaca i-Mark, Bio-Rad y se tomó la absorbancia a 750 nm.

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó según la ecuación de la recta ajustada de la curva de calibración (Figura 9), utilizando ácido gálico (GA) en un rango de concentración de 10 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como mg equivalentes de GA (GAE/g DW; Ainsworth y Gillespie, 2007).

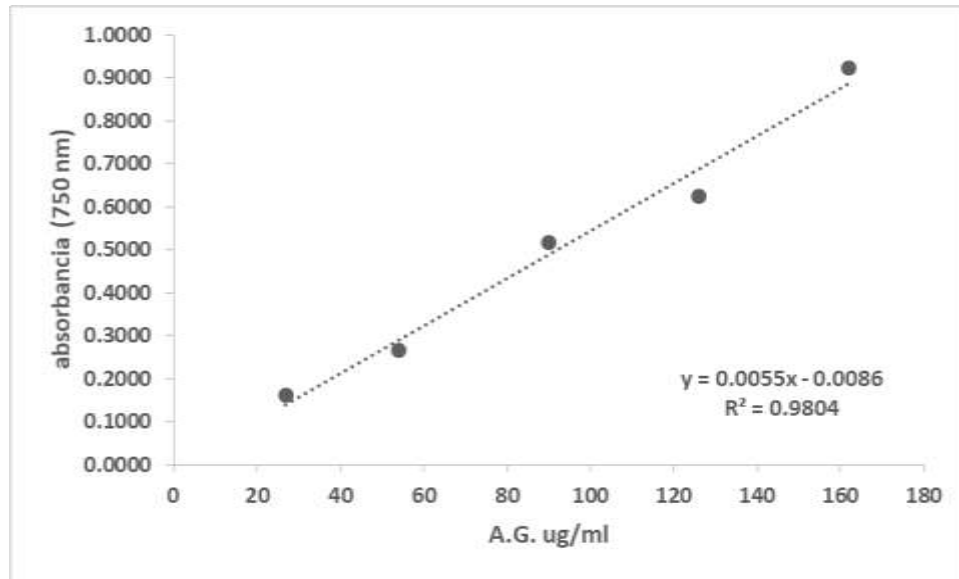


Figura 9. Curva de calibración de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. El ácido gálico fue utilizado como estándar.

7.3.2.2. Ensayo de fenoles totales por método enzimático con peroxidasa de rábano picante (HRP)

Todos los reactivos utilizados en este ensayo fueron disueltos en buffer de fosfato de potasio 0.1 M (pH 8.0), a excepción del H₂O₂ 40 mM, que se diluyó en agua. Se utilizó ácido gálico como estándar de referencia. Éste y la 4-aminopiridina (4-AP, reactivo de color) se prepararon en fresco y se mantuvieron protegidos de la luz.

Para un volumen final de reacción de 200 µL, se prepararon diferentes diluciones de ácido gálico (rango de 0.3 a 3 mM), que fueron colocados en las cavidades de una microplaca a un volumen de 133 µL. Posteriormente, se añadió 50 µL de 4-AP 12 mM (concentración final de 3 mM) y 7 µL de la enzima HRP 10 µM (concentración final 0.35 µM). Dado el volumen que se agrega de la enzima, es importante usar una punta por pocillo y aprovechar para mezclar la reacción suave y brevemente. Con una pipeta multicanal se agregaron 10 µL de H₂O₂ 40 mM (concentración final 2 mM) y, después se mezcló un par de veces, succionando la pipeta suavemente y se incubó por 5 min. Se tomó la lectura de absorbancia a 490 nm en el lector de microplacas. En el blanco se substituyó la muestra por el buffer y, éste se utilizó para restar el fondo de la reacción.

Los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g DW, de acuerdo a la curva de calibración que se muestra en la Figura 10 (Stevanato *et al.*, 2004).

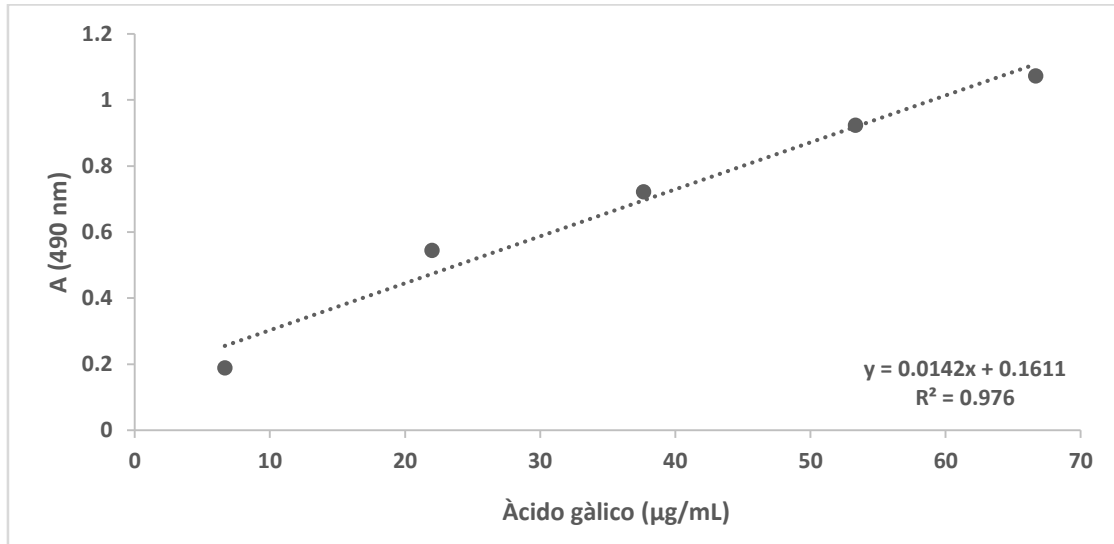


Figura 10. Curva de calibración de fenoles totales por el método enzimático “HRP”. Se utilizó ácido gálico como estándar.

7.3.3. Cuantificación de flavonoides totales

Se usó el método de AlCl_3 para determinar el contenido de flavonoides totales en los extractos. Se mezclaron 20 μL de extracto o estándar con 20 μL de AlCl_3 10% (w/v) disuelto en etanol al 60% (v/v). Se añadieron 20 μL de acetato de sodio 1 N y finalmente 180 μL de agua destilada. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se tomó la lectura a 415 nm. La curva estándar se realizó con quercitina (con concentraciones de 20-200 $\mu\text{g/mL}$), y los resultados fueron expresados como $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de quercitina.

En la preparación del AlCl_3 se deben tomar algunas precauciones utilizando cubre bocas y colocando la reacción en hielo. El contenido de flavonoides se calculó a partir de la curva de calibración de la Figura 11 (Chang *et al.*, 2002).

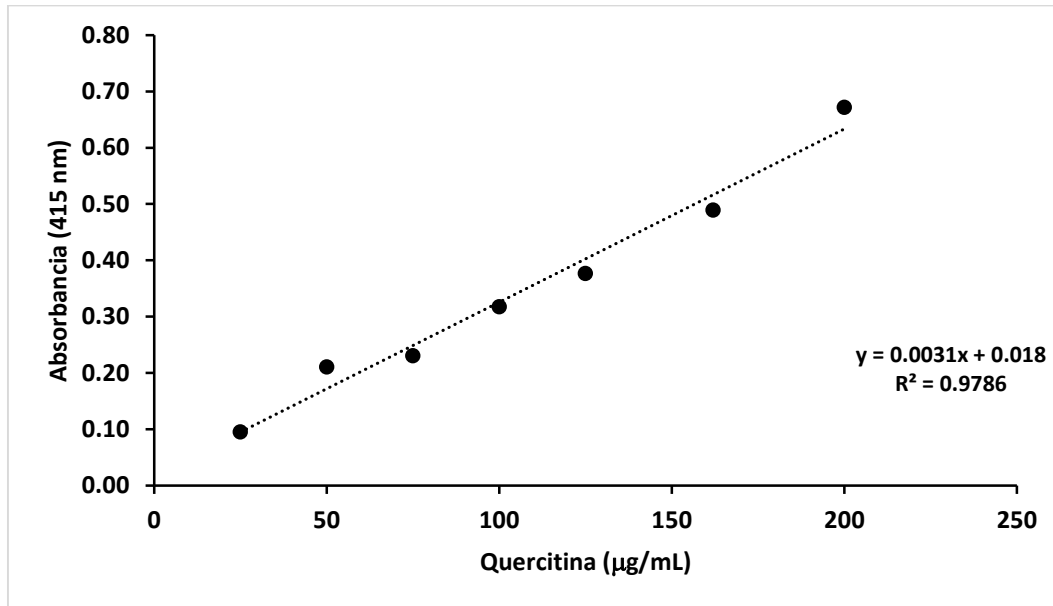


Figura 11. Curva de calibración de flavonoides totales. Se utilizó quercitina como estándar.

7.3.4. Extracción y cuantificación de carotenoides totales

Para la cuantificación de carotenoides totales se utilizó la metodología reportada por Mayer-Miebach y Spieß (2003). Se tomaron 5 g/DW de cáscara de agrillo (parte del fruto con mayor significancia en pruebas antioxidantes) la cual se procesó como se describe en el punto 8.3.1. El extracto acetónico (75 mL) se colocó en un embudo de separación y se mezcló con éter de petróleo, donde las fases se separaron por diferencia de densidad y se recuperó la fracción de éter de petróleo (fase superior). Esta fase orgánica se lavó con agua, utilizando nuevamente con el embudo de separación, para eliminar compuestos hidrofílicos (Figura 12). Los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro durante toda la noche. Finalmente, la muestra se resuspendió en 45 mL de hexano y se eliminó el sulfato de sodio. Se colocaron 250 µL de extracto en la microplaca y la absorbancia se leyó en el lector de placa (iMark Bio-Rad) a 450 nm. Como blanco se utilizó hexano sin muestra. Se tomó el coeficiente de absorptividad molar del β -caroteno (ϵ , 139200 L/mol cm) y luteína (ϵ , 147300 L/mol cm) disueltos en hexano. Los resultados se obtuvieron con la ecuación 2 de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer realizando la conversión a mg de carotenoides por cada g DW (Craft y Soares, 1992; Ribeiro *et al.*, 2001).

Ecuación 2:

$$C = \frac{A}{\varepsilon b}$$

Donde, C , es la concentración de la muestra (M)

A , es la absorbancia a 450 nm obtenida de la muestra

ε , es la absortividad molar (expresada en L/mol cm)

B , corresponde a la longitud de la celda que recorre el haz de luz (generalmente ajusta a una expresión de 1 cm)



Figura 12. Separación de éter de petróleo y acetona con ayuda de embudo separador

7.4. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de agrillo

7.4.1. Inhibición radicalaria

7.4.1.1. Método DPPH·

La determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH· se midió como la capacidad de los extractos para estabilizar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·). En una microplaca y en condiciones de oscuridad, se incubaron 20 μ L de extracto (a diferentes concentraciones) con 220 μ L de solución etanólica de DPPH· 0.1 mM. Después de 30 min se determinó la absorbancia a 515 nm (Tadolini et al., 2000; Tabart *et al.*, 2009). La muestra control consistió en la reacción de DPPH· sin extracto. Como estándar se utilizó Trólox en concentraciones de 10-150 μ g/mL y se realizó la curva de calibración correspondiente como se muestra en la Figura 13. El porcentaje de inhibición de DPPH· se determinó con la ecuación 3 que se describe a continuación:

Ecuación 2

$$\text{Actividad inhibitoria (\%)} = \frac{A_{515nm \text{ Control}} - A_{515nm \text{ Extracto}}}{A_{515nm \text{ Control}}} \times 100$$

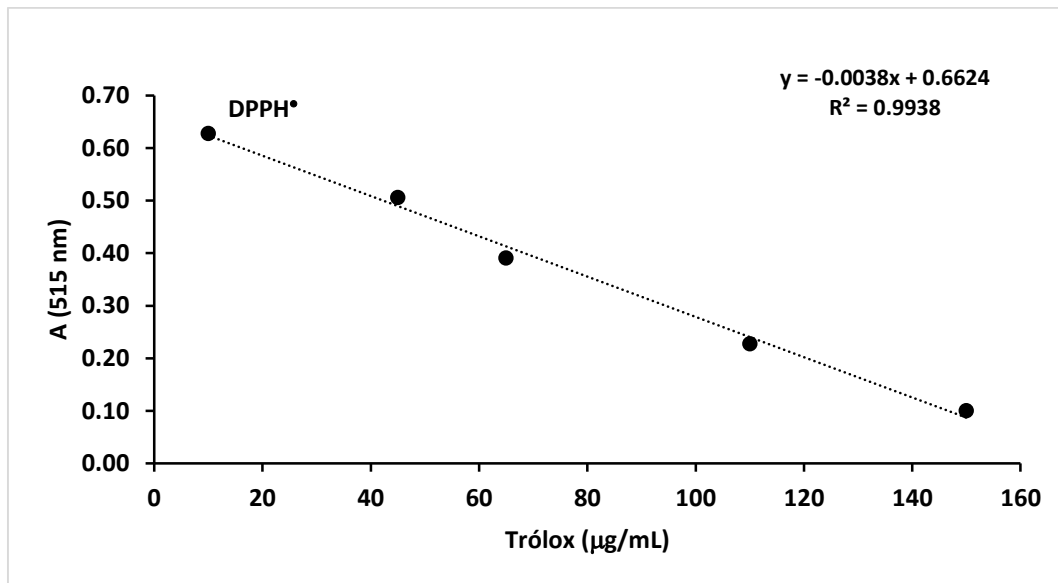


Figura 13. Curva de absorbancia del DPPH• con diferentes concentraciones del estándar Trolox.

En la Figura 14 se grafica el porcentaje de inhibición del radical DPPH• a diferentes concentraciones de Trolox. En base a esta curva de calibración se calcularon los valores de TEAC (capacidad antioxidante de equivalentes Trolox) los cuales correlacionan las pendientes del porcentaje de inhibición del estándar

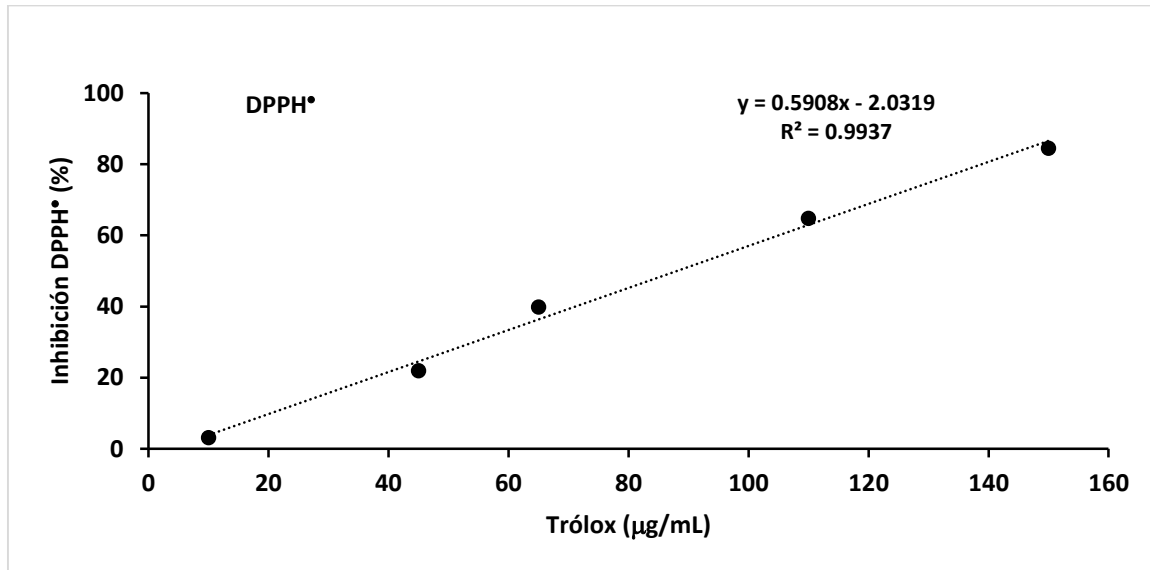


Figura 14. Inhibición del radical DPPH a diferentes concentraciones de Trólox. Trólox y la pendiente del porcentaje (%) de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones.

El IC₅₀, definido como la concentración del extracto a la cual se alcanza la inhibición del 50% del radical DPPH*, fue calculado a partir del comportamiento lineal de las curvas de los extractos o estándar utilizado (resultado de graficar la concentración del extracto (mg/g DW) vs porcentaje de inhibición del DPPH*). Se calcularon los valores de IC₅₀, donde se tomó el 50 % de inhibición radicalaria, se obtuvo utilizando la ecuación 3.

Ecuación 3:

$$\text{Valor de IC}_{50} = \frac{50 - b}{M}$$

Dónde, b , es la ordenada al origen

M es la pendiente

7.4.1.2 Método ABTS^{•+}

Para determinar la actividad antioxidante de la inhibición del radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico), se preparó el radical mezclando volúmenes iguales de solución de ABTS 14 mM y persulfato de potasio 4.8 mM (concentración final). Éstos se hicieron reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes del uso (este reactivo es estable a temperatura menor a los 4 ° C durante 5 días). La solución de ABTS^{•+}

se diluyó con 85 mL de agua destilada hasta alcanzar un valor de absorbancia cercano a 1 a una λ de 740 nm. Para los ensayos, se agregaron 10 μL de diferentes diluciones de extracto a 190 μL de solución de ABTS^{•+}. La mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 6 min. La absorbancia se midió a 740 nm. La muestra control consistió en el radical ABTS^{•+} sustituyendo el extracto con el solvente en el que está disuelta la muestra, en este caso se utilizó el DMSO (Lim *et al.*, 2019). La curva de calibración se realizó utilizando Trólox (40-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como se muestra en la Figura 15. El porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} se determinó con la ecuación 4.

Ecuación 4:

$$\text{Actividad inhibitoria (\%)} = \frac{A_{740\text{nm Control}} - A_{740\text{nm Extracto}}}{A_{740\text{nm Control}}} \times 100$$

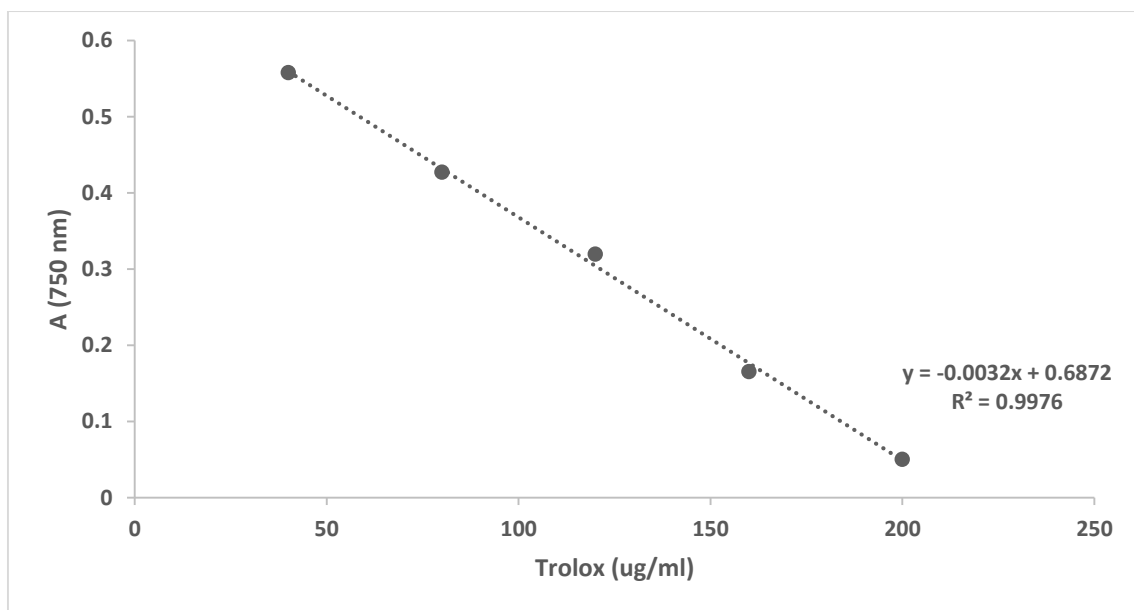


Figura 15. Curva de absorbancia del ABTS^{•+} con diferentes concentraciones del estándar Trólox.

Los valores de TEAC (capacidad antioxidante de equivalentes Trólox) se calcularon según el procedimiento mencionado en la sección 8.4.1.1., correlacionando las pendientes de las curvas de calibración del porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} utilizando el estándar Trólox (Figura 16) y la pendiente del porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} utilizando las diluciones de cada una de las muestras (extractos) como agentes reductores.

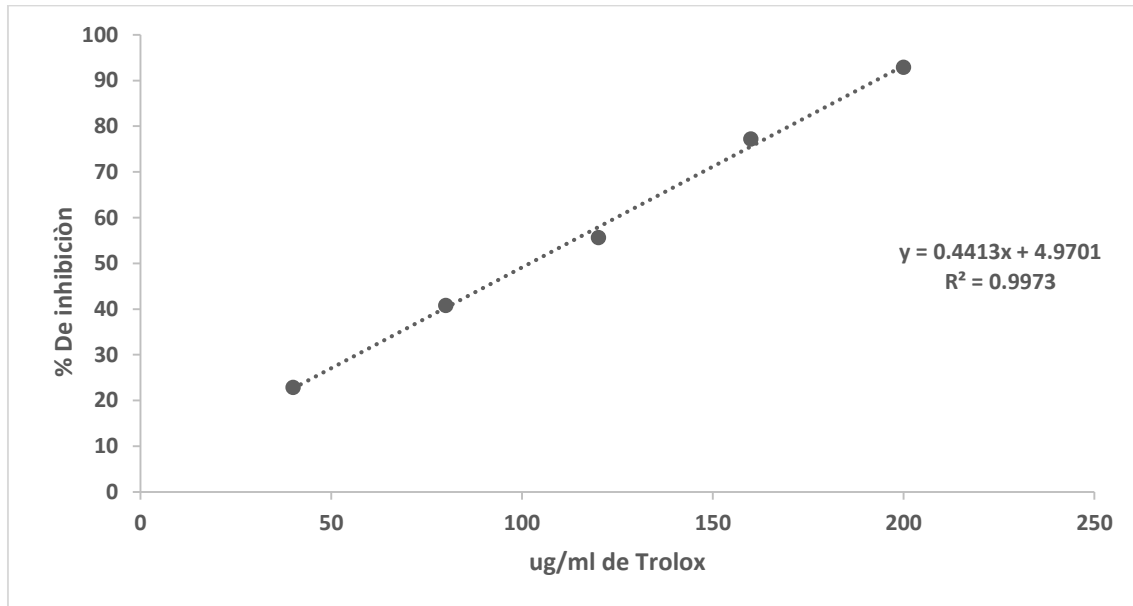


Figura 16. Inhibición del radical ABTS^{•+} a diferentes concentraciones de Trólox.

Utilizando la curva de calibración del % de inhibición del ABTS^{•+} utilizando cada una de las muestras, se calcularon los valores de IC₅₀ donde se tomó el 50 % de inhibición, obteniendo dicho resultado utilizando la ecuación 3. Los resultados se expresaron como la cantidad expresada en mg/gDW capaces de inhibir el 50% de radical ABTS^{•+}.

7.4.2. Reducción del ion férrico: método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Assay)

El método FRAP evalúa la actividad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el ión férrico (Fe⁺³) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-S-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe⁺²), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Este método FRAP se adaptó a microplaca con un volumen total de 250 µL, de acuerdo a lo reportado por Stratil *et al.* (2006). Brevemente, en un volumen de una solución acuosa reactiva TPTZ 10 mM que se diluyó en HCl hasta alcanzar una concentración de 0.04 N, se mezcló con un mismo volumen de FeCl₃ × 7H₂O 20 mM y diez volúmenes de buffer de acetato de sodio (3.1 g de acetato de sodio con 16 mL de ácido acético) hasta alcanzar un pH 3.6. La mezcla se incubó a 37 °C por 10 min. Se tomaron 225 µL de este reactivo que se mezcló con 25 µL de

la muestra, FeSO_4 o ácido ascórbico como estándar, y agua destilada para el blanco. Se usaron soluciones de trabajo frescas; el estándar FeSO_4 se usó (100 a 500 μM) y ácido ascórbico en un rango de 1 a 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de incubar durante 10 min, la absorbancia se midió a 595 nm en el lector i-Mark, Bio-Rad. Se utilizó la ecuación lineal de la curva de calibración de FeSO_4 (Figura 17). Posteriormente, los equivalentes de FeSO_4 del ácido ascórbico, así como de las muestras se determinaron utilizando la ecuación 4. Finalmente, los resultados se obtuvieron correlacionando la pendiente de la curva de calibración de ácido ascórbico (Figura 18) y la pendiente de la curva de calibración de cada una de las muestras con sus respectivas diluciones (ecuación 5). Los resultados se expresaron μM equivalentes de ácido ascórbico por cada g/DW.

Ecuación 4:

$$\mu\text{M equivalentes de FeSO}_4 = \frac{A + b}{m}$$

Donde: A, es la absorbancia del estándar o muestra

b, es el intercepto con el eje "y"

m, es la pendiente

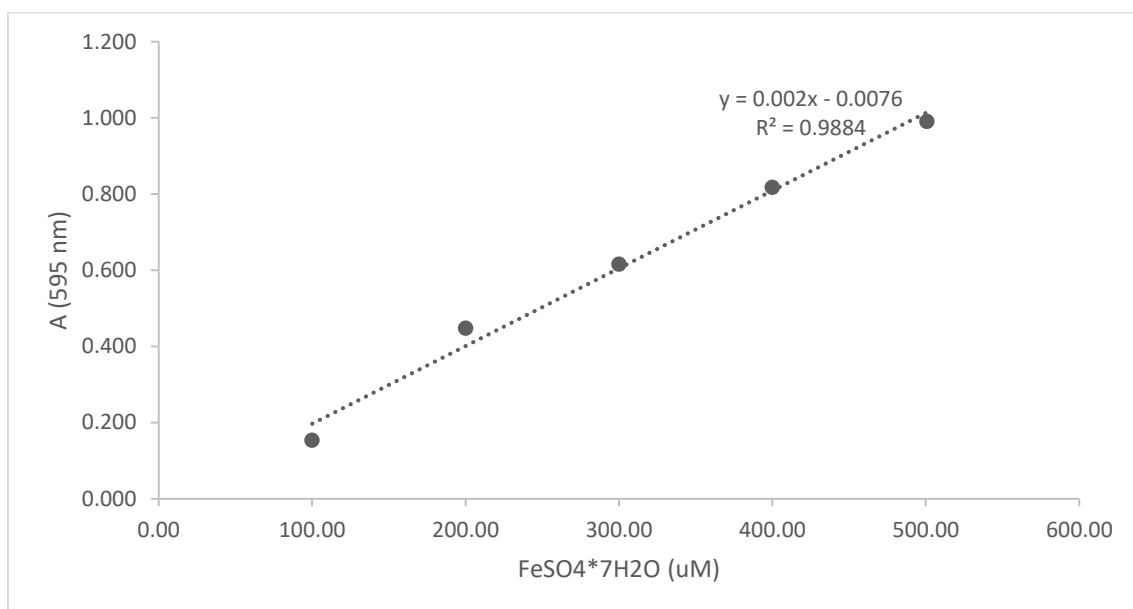


Figura 17. Curva de calibración de la absorbancia del complejo TPTZ- Fe^{+2} a diferentes concentraciones de $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ecuación 5:

$$\mu\text{M equivalentes de ácido ascórbico} = \frac{m \text{ Muestra}}{m \text{ curva de A. A.}}$$

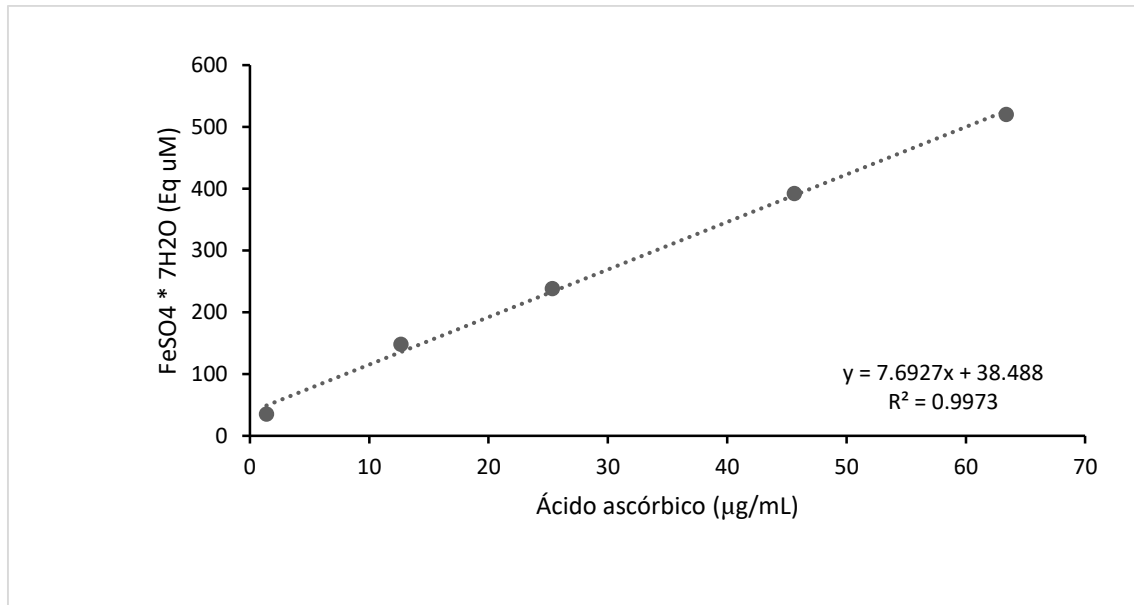


Figura 18. Curva de calibración de la absorbancia de la concentración del ácido ascórbico utilizando como estándar a 595 nm.

7.4.3. Actividad quelante

Las propiedades quelantes de los extractos de agrillo se determinaron a partir de la cuantificación de la disponibilidad del ion Fe^{+2} . A 100 μL de extracto se añadió 100 μL de $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mM y 3 mL de agua desionizada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante 30 s. Se añadió posteriormente, 100 μL de ferrozina 5 mM. Después de 10 min de incubación se evaluaron los cambios en la absorbancia a 550 nm en un BioPhotometer plus® por la formación del complejo Fe^{+2} (ferrozina) contra un blanco de reacción. Se usó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como estándar positivo para evaluar la capacidad quelante. Los resultados se obtuvieron a partir de la curva de calibración de la actividad quelante (Figura 19) y de la curva de inhibición del complejo Fe^{+2} (Figura 20). Las concentraciones del estándar se expresaron como $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de EDTA (Wang *et. al.*, 2008).

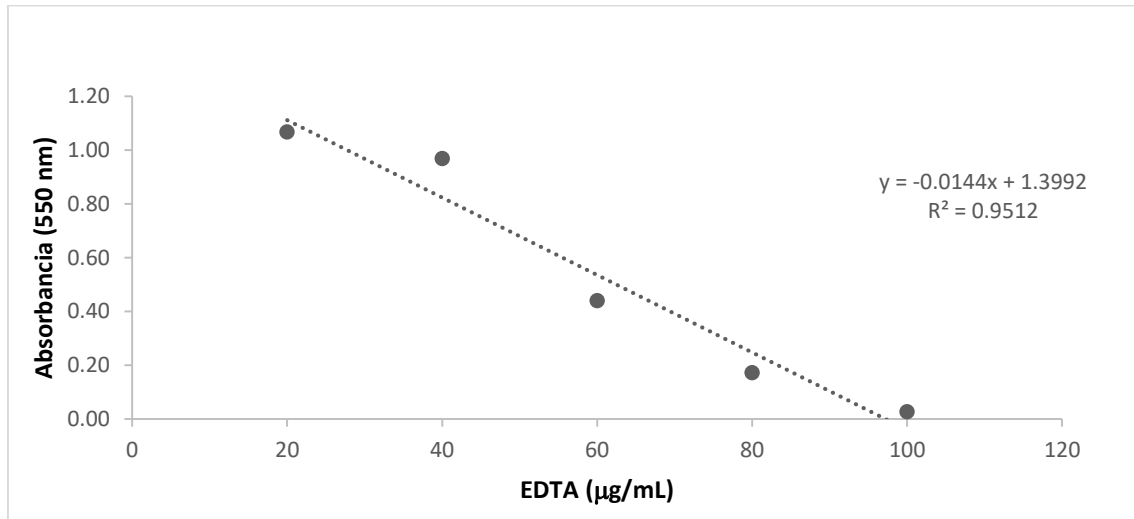


Figura 19. Disminución de la absorbancia por disminución en la concentración del complejo ferrocina-Fe⁺² en presencia de diferentes concentraciones de EDTA.

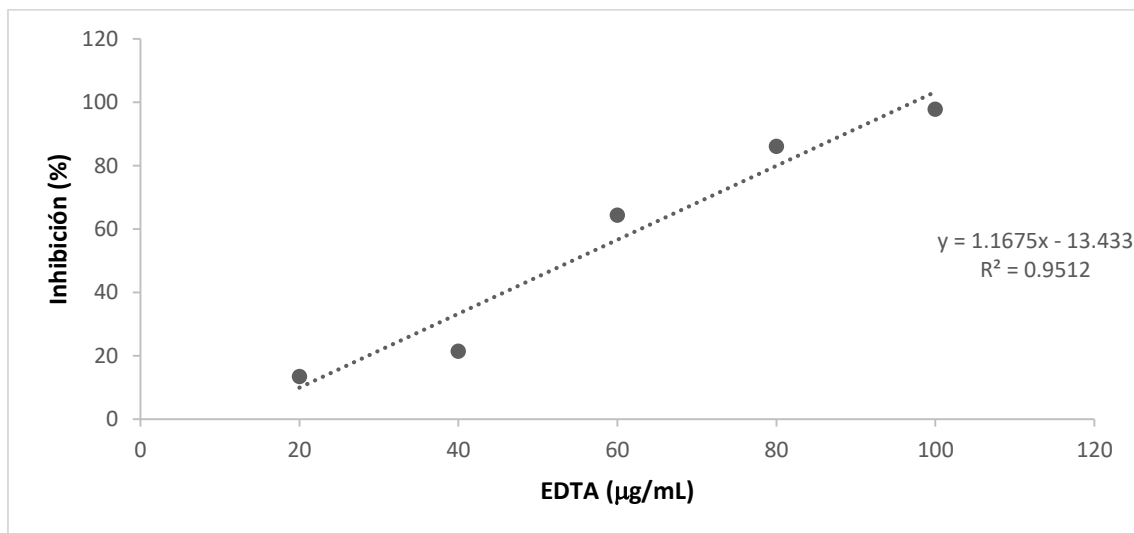


Figura 20. Curva de calibración de actividad quelante de la inhibición del complejo ferrocina-Fe⁺². Se usó EDTA como estándar.

7.4.4. Determinación de factores que más influyen en las pruebas antioxidantes

Para determinar cuál es el factor que influyó más en todas las pruebas antioxidantes, se procedió a cuantificar las medias para obtener el porcentaje de relevancia o significancia en cada una de las pruebas antioxidantes como se muestra en la ecuación 6, para posteriormente obtener la suma de porcentajes

de todas las pruebas y poder definir cuál factor es el más adecuado para la extracción y su posterior análisis.

Ecuación 6

$$\text{Influencia de factor (\%)} = \frac{\text{media de factor}}{\text{suma de medias de factores}} * 100$$

7.5. Caracterización de las propiedades antimicrobianas de los extractos de agrillo (*Rhus spp*)

7.5.1. Activación de las cepas y obtención de conidias

Para la evaluación de actividad antifúngicas de los diferentes extractos de agrillo, se utilizaron patógenos del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Entre las cepas a utilizar se encuentra el *Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporoides* y *Penicillium digitatum*.

Primeramente, se prepararon placas con medio papa dextrosa agar (PDA) añadiendo 39 g/L de agua destilada. Una vez obtenido el medio estéril y antes de que solidificara se le añadió 0.03 g/L de cloranfenicol y 0.03 g/L de sulfato de estreptomicina (antibacterianos) para evitar contaminación bacteriana

Después se sembró cada uno de los fitopatógenos los cuales estaban latentes en papel filtro (obtenidos del cepario), que se colocaron al centro de cada caja con PDA. Se incubaron a 26 ± 1 °C y después de transcurrir siete días, se evidenció la presencia de micelio y se procedió al conteo de conidios. El procedimiento para esto consistió en depositar 8 mL de agua estéril en cada una de las cajas Petri que contenían los patógenos, y con ayuda de un triángulo esterilizado se realizaron movimientos circulares en toda la placa para el desprendimiento de conidios. El sobrenadante se recuperó y se vertió en tubos Falcón®, de donde se tomaron cuatro alícuotas de 250 µL que se depositaron en tubos tipo Eppendorf®. Después se colocaron 50 µL de suspensión conidial en cada uno de los cuatro cuadrantes de una cámara de Neubauer para hacer el conteo de conidios en un microscopio Axiostar® utilizando un aumento de 100x. Para el cálculo de número de conidios/mL se utilizó la ecuación 7.

Ecuación 7:

$$\text{Conidias/mL} = \frac{\text{suma de conidios por cuadrante}}{2} \times M.D \times V.T.S.$$

Donde, M.D. corresponde a los 50 μL de suspensión de conidios depositados en los cuadrantes

V.T.S. corresponde al volumen total en μL (1000 μL correspondientes a las 4 alícuotas de 250 μL que se tomaron de los 8 mL de agua que se utilizaron para desprender los conidios)

Las cepas de *F. solani* y *C. acutatum* se ensayaron en una concentración de 1×10^5 conidias/mL. La cepa *C. gloesporoide* no esporuló suficiente, por lo que se utilizó la suspensión de la cepa pura (micelios) diluida en una relación 1:10 (v/v) en agua destilada; finalmente, *P. digitatum* se inoculó la concentración de 7.5×10^6 conidias/mL. Se realizaron pruebas preliminares que facilitaron la estimación de la concentración requerida para obtener un crecimiento micelial que abarcara la mayor parte de la caja Petri en el tiempo establecido (5 días).

7.5.2. Inhibición del crecimiento micelial

7.5.2.1. Técnica de dispersión de extracto en caja Petri

Una vez obtenidas las alícuotas de conidias ajustadas a la concentración requerida, se realizaron las pruebas antifúngicas por el método de “dispersión de extracto”. A partir de 5 g de muestra seca (DW) se obtuvieron los extractos de agrillo con los diferentes solventes y según el procedimiento descrito en el punto 8.3.1. Para la evaluación de la actividad antifúngica, no se consideró la región de colecta como una variable, ya que las pruebas antioxidantes revelaron que no hay diferencias significativas entre las dos zonas. Los extractos secos se resuspendieron en 2 mL de DMSO y se esterilizaron utilizando filtros Corning® con un poro de 0.45 μm . Se tomaron 200 μL (0.5 g DW/mL) de cada uno de los extractos y se depositaron en las cajas Petri, y con ayuda de un triángulo de vidrio se dispersaron homogéneamente en toda la placa. Posteriormente, se colocaron de forma equidistante, entre el centro y el perímetro de la caja Petri, discos de papel filtro de 9 mm de diámetro, previamente esterilizados. Sobre los papeles filtro se depositaron 25 μL de solución conidial de 2,500 conidias/mL

para las cepas *F. solani* y *C. acutatum* (Lima *et al.*, 2017) y 187,500 conidias/mL para la cepa *P. digitatum*, ya que esta última cepa tiene un crecimiento más deficiente y lento. Para la cepa *C. gloesporoide* se utilizó el micelio en suspensión (conidios incontables). Se realizaron controles con el mismo procedimiento, reemplazando los extractos por agua destilada o dimetilsulfóxido (DMSO) como controles negativos y, *N*-(triclorometilitio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida (Captan) a una concentración de 1 mg/mL como control positivo. Las cajas fueron incubadas a 26 ± 1 °C por cinco días. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Una vez transcurridos los días de incubación se midió el diámetro de las colonias con ayuda de una regla métrica (Suárez *et al.*, 2013). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la ecuación 8:

Ecuación 8:

$$\text{Inhibición del crecimiento micelial (\%, crecimiento radial)} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

Donde:

dc: considera el diámetro promedio de la colonia fúngica en el control positivo

dt: considera el diámetro promedio de la colonia fúngica con tratamiento.

7.5.2.2. Validación de la respuesta inhibitoria de los extractos en ensayos en microplaca

Una vez obtenidos los resultados en caja Petri se procedió a realizar las pruebas en microplaca, las cuales tenían como objetivo obtener cálculos más precisos en cuanto a la cantidad de extracto a adicionar, reducción en la utilización de material (cajas Petri y cantidad de extracto) y la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra las cepas fúngicas. Los resultados en caja Petri permitieron determinar la concentración de conidias de cada una de las cepas, así como identificar los extractos con efectos inhibitorios como los etanólicos, acetónicos y hexánicos (utilizados en pruebas de microplaca) y los que no tuvieron efectos inhibitorios, como es el caso de los extractos acuosos (descartados para esta prueba).

Para las pruebas antifúngicas en microplaca fue necesario la elaboración de extractos nuevos con el fin de utilizar material biológico con la menor degradación de sustancias bioactivas presentes, los cuales se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 8.3.1. con una variación de tiempo

de extracción (maceración por 24 h). Se preparó medio de cultivo caldo papa dextrosa clarificado (CPD-C), ideal para las pruebas espectrofotométricas. Para la elaboración de este caldo se necesitaron 22 g de papa deshidratada (de la utilizada en cocina para hacer puré) que se mezclaron en 200 mL de agua caliente con agitación vigorosa. Se agregaron 10 g de glucosa y luego se aforó a 1 L. Posteriormente para la clarificación del medio, éste se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante los cuales se colocaron en tubos eppendorf que se esterilizaron a 121°C por 20 min. Una vez obtenido el medio de cultivo, se adicionó Tween 20 al 5% (v/v) para facilitar la emulsificación de los extractos y la solubilización de bactericidas usados anteriormente (0.03 g/L de cloranfenicol y 0.03 g/L de sulfato de estreptomicina). A los extractos de agrillo utilizados también se les añadió la misma cantidad de Tween 20 para emulsificar todos los compuestos presentes evitando interferencia en la lectura espectrofotométrica. Para esta prueba se utilizó una microplaca estéril de 96 pocillos de 300 µL de capacidad. A cada pocillo se le colocó 130 µL de CPD-C, 35 µL de cada extracto diluido en DMSO al 50% (concentración de 18.9 mg/mL) y 25 µL de suspensión conidial, según la misma concentración utilizada en las cajas Petri. De igual manera se utilizó como control negativo agua destilada y DMSO al 50% y Captan como control negativo. Las microplacas fueron incubadas a 26 ± 1 °C y se realizó la lectura del primer y quinto día a 655 nm. Para determinar la inhibición del crecimiento micelial se utilizó la ecuación 9.

Ecuación 9:

$$\text{Inhibición del crecimiento micelial (\%)} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Donde:

A c = absorbancia a 655nm de la colonia fúngica control negativo

A t = absorbancia a 655 nm de la colonia fúngica con tratamiento

7.5.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria 95 (CMI₉₅) en microplaca

Una vez seleccionados los extractos que presentaron el mayor porcentaje de inhibición para cada una de las cepas (C-Et, F-Et y S-H), se procedió a la obtención del CMI₉₅, definida como la concentración mínima capaz de inhibir el

95% de la cepa utilizada (fúngica). Se ensayaron los extractos en un rango de concentración de 25 mg DW/mL. El porcentaje de inhibición se obtuvo con la ecuación 9. La CMI₉₅ se obtuvo con la concentración mínima de extracto que resultó de un 95% de inhibición para cada cepa la cual se obtuvo en base a una función lineal (ecuación 10) o logarítmica (ecuación 11) dependiendo del comportamiento de cada hongo.

Ecuación 10:

$$\text{CMI}_{95} \text{ en función lineal} = \frac{95 - b}{m}$$

Donde:

95 = al 95% de inhibición de la concentración mínima para cada cepa fúngica

b = es el intercepto con el eje "y"

m = es la pendiente

Ecuación 11:

$$\text{CMI}_{95} \text{ en función logarítmica} = \frac{95 - b}{m} \times 10^{\wedge}$$

Donde:

95 = al 95% de inhibición de la concentración mínima para cada cepa fúngica

b = es el intercepto con el eje "y"

m = es la pendiente

10[^] = Logaritmo

7.5.2.4 Poder fungicida o fungistático de las muestras seleccionadas

Para la determinación del efecto fungistático o fungicida, se seleccionaron los extractos de agrillo donde no se observó crecimiento fúngico (C-Et, F-Et y S-H) y se tomaron 50 µL (los cuales contenían las cepas fúngicas inhibidas) y se depositaron en discos de papel filtro estéril sobre una caja de Petri con medio PDA, sin presencia de extracto o fungicida, y se incubaron durante 5 días a 26 ± 1 °C. Para el efecto de los extractos de agrillo, se consideró como fungicidas a los extractos en donde no se observó crecimiento fúngico en esta segunda placa

de crecimiento; mientras que los extractos donde sí se presentó evidencia de crecimiento micelial, se consideraron que el efecto es fungistático.

7.6. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados experimentales fueron procesados con el programa estadístico “Minitab®” aplicando un análisis de varianza de una vía (Anova). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de los datos se analizaron mediante una prueba de “Tukey”.

Para las pruebas antifúngicas fue necesaria la transformación de datos porcentuales por el método de transformación de raíz cuadrada del arco-seno para su análisis estadístico (McCune y Grace, 2002).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Rendimiento de extractos

La extracción sólido-líquido con solventes de diferente polaridad se utiliza frecuentemente para el aislamiento y caracterización de compuestos antioxidantes. El rendimiento de la extracción, así como la actividad antioxidante de los extractos dependen de las características propias de la matriz, pero también están altamente influenciadas por la polaridad del solvente empleado, principalmente debido a la presencia de diferentes grupos funcionales (alcoholes, cetonas, alquilos) incluidos en los compuestos (Fernández-Agulló et al. 2012). En la Figura 21 se muestran los rendimientos obtenidos en las extracciones ensayadas con solventes en un gradiente de polaridad, desde el agua hasta el hexano.

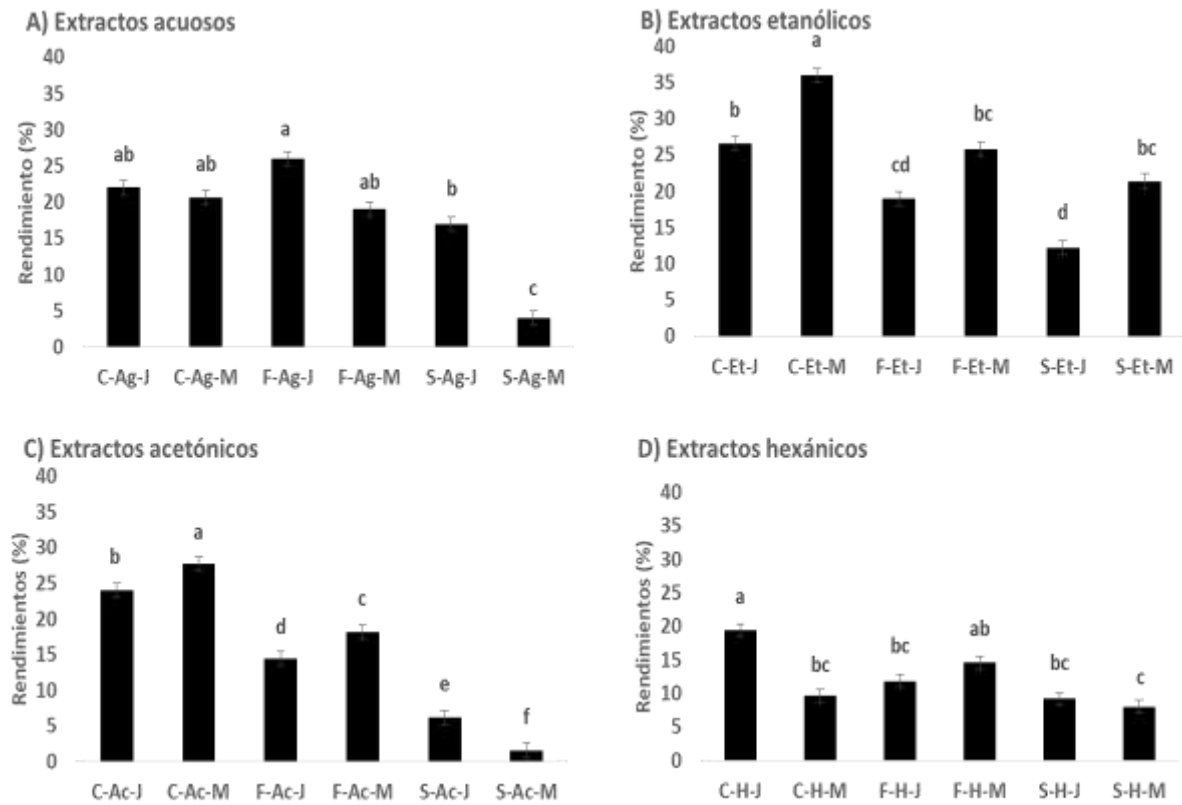


Figura 21. Rendimientos de extracción de muestras de fruto de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

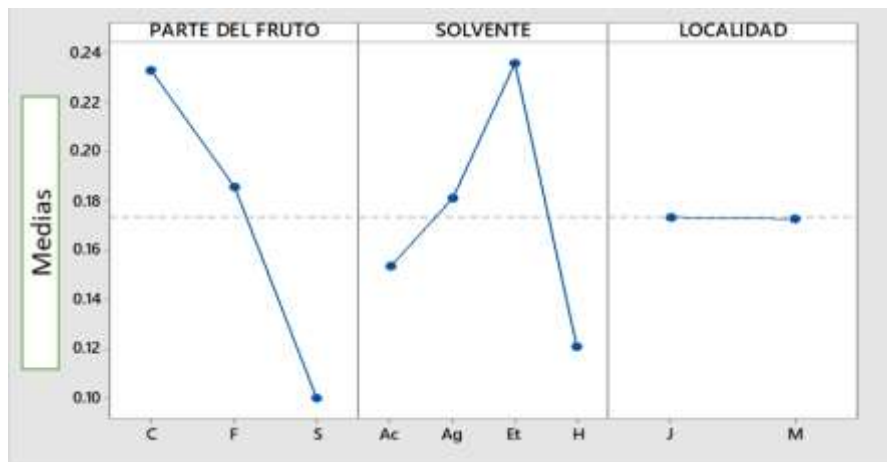


Figura 22. Análisis de efectos principales de las medias en el rendimiento de los extractos.

El rendimiento más alto se obtuvo con la cáscara del fruto proveniente de Michoacán extraída con etanol (C-Et-M), con un rendimiento del 36%; mientras que el menor rendimiento se obtuvo con la semilla proveniente de la misma región extraída con acetona (S-Ac-M) con 1.6%.

De la Figura 22 se evidencia, de manera general, que el etanol es el solvente con el que se obtuvo los mejores rendimientos, seguido del agua y acetona; mientras que el hexano, fue el solvente con el que se obtuvieron los menores rendimientos. Independiente del solvente utilizado, la cáscara fue la parte del fruto con el que se obtuvieron los mayores rendimientos; en tanto que la semilla, fue la parte del fruto de menor rendimiento.

La influencia de la polaridad del solvente se demuestra en varios trabajos. Fernández-Agulló et al. (2013) obtuvieron un rendimiento del 3.9% de extracto etanólico a partir de la cascarilla de nogal verde, pero un rendimiento de 44.11% cuando se usó agua como extrayente. Zuorro et al. (2019), por su parte, compararon los rendimientos en compuestos fenólicos de granos de cebada, utilizando agua o mezclas acuosas de acetona o etanol en diferentes proporciones. Los máximos rendimientos se alcanzaron cuando los solventes orgánicos estaban en una proporción del 60%. Sin embargo, un incremento en la proporción del solvente orgánico, disminuyó significativamente el rendimiento. El incremento en los rendimientos en la extracción requiere un proceso de optimización con variables a considerar, como el tiempo de extracción o si el material es fresco o seco. Con frecuencia se utilizan mezclas acuosas con solventes orgánicos y/o se modifica el pH del extrayente (Złotek et al., 2016). La temperatura es otro factor que influye en el rendimiento; temperaturas elevadas incrementan la solubilidad y con el coeficiente de difusión del soluto o bien, puede facilitar la ruptura de los tejidos de la matriz, permitiendo la difusión de más compuestos al solvente, por lo contrario, en las extracciones del fruto de agrillo, se evitó utilizar temperatura elevadas para evitar la degradación de compuestos antioxidantes, por lo que esto sería un factor importante que afectó al rendimiento obtenido en las muestras. Por otra parte, la relación sólido-líquido también es otra variable a considerar, ya que, de acuerdo con los principios de transferencia de masa, la difusividad aumenta al aumentar la relación sólido-líquido que aumentan las diferencias de concentración de compuestos en el medio, por lo cual es otro factor importante a tomar en cuenta, ya que las extracciones de fruto de agrillo se utilizó una relación 1:15 mientras que las extracciones de cascarilla de nuez verde utilizaron una relación 1:50 por lo que

se puede comprender un porcentaje más elevado de extracción en este último que en las extracciones de fruto de agrillo (Fernández-Agulló *et al.*, 2013).

8.1.2. Cuantificación de fenoles totales

El contenido total de compuestos fenólicos en los diferentes extractos de agrillo fue determinado por el método clásico de Folin-Ciocalteu y por un método enzimático que utiliza la enzima peroxidasa de rábano (HRP). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra es un parámetro importante, ya que estos metabolitos contribuyen de manera considerable a las propiedades antioxidantes (Isik, *et al.*, 2011). A continuación, se muestran los resultados de ambos ensayos, haciendo una comparativa entre sí.

8.1.2.1. Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales de los extractos determinados a través del ensayo de Folin-Ciocalteu se muestran en la Figura 23. El extracto acetónico de la cáscara de Michoacán (C-Ac-M) presentó el mayor contenido de fenoles totales con 2.12 mg/g DW y la muestra con menor cantidad de fenoles fue la semilla de Jalisco extraída con hexano (S-H-J) con 0.31 mg/g DW.

El análisis de efectos de los factores se muestra en la Figura 24, indica que las partes del fruto y los solventes utilizados son factores significativos en el contenido de compuestos fenólicos. La cáscara es la parte del fruto de donde se obtuvo mayor cantidad de compuestos fenólicos; mientras que la semilla, fue la parte del fruto con menor contenido de compuestos fenólicos. Respecto a los solventes, el etanol fue el más apropiado para la extracción de estos metabolitos secundarios y el hexano, el menos eficiente. La localidad no fue un factor con diferencias significativas.

8.1.2.2. Método enzimático de peroxidasa de rábano picante

En la Figura 25 se muestra la cantidad de fenoles totales cuantificados por el método enzimático de HRP. Las muestras con la mayor y menor cantidad de compuestos fenólicos coincidieron con lo cuantificado a través del método de Folin-Ciocalteu; sin embargo, el nivel de sensibilidad del método enzimático fue hasta diez veces mayor, destacando la muestra C-Ac-M con 27.93 mg/g DW y la

menor cantidad se obtuvo en la muestra S-H-J con 0.33 mg/ g DW, siendo la cáscara la mejor parte del fruto para la obtención de compuestos fenólicos y la acetona el mejor solvente.

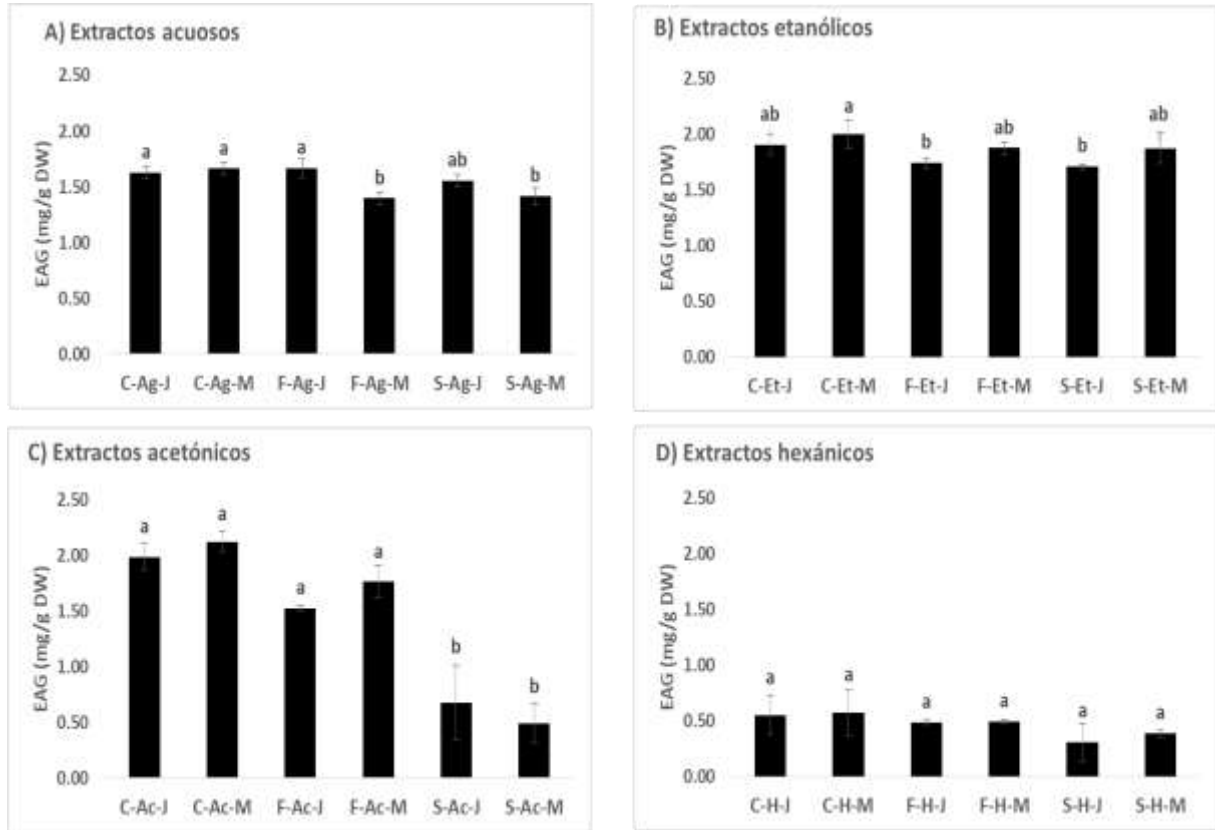


Figura 23. Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

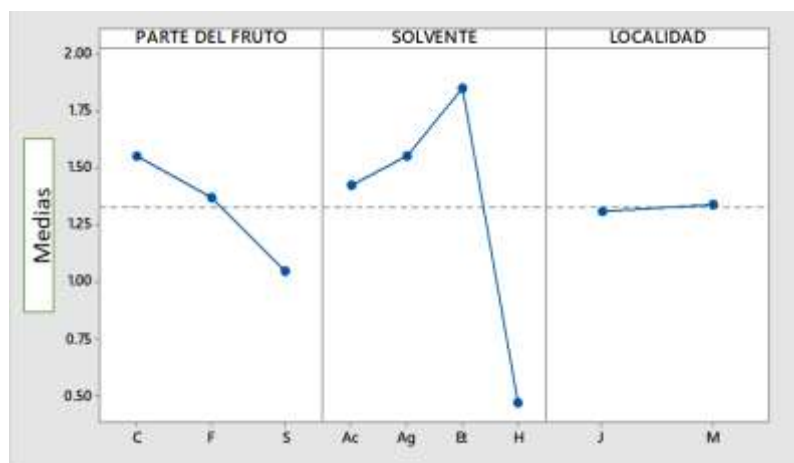


Figura 24. Efectos principales de las medias de contenido de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu.

Las diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos, se mostraron en las partes del fruto y los solventes. El lugar de procedencia del agrillo no tuvo diferencias significativas (Figura 26).

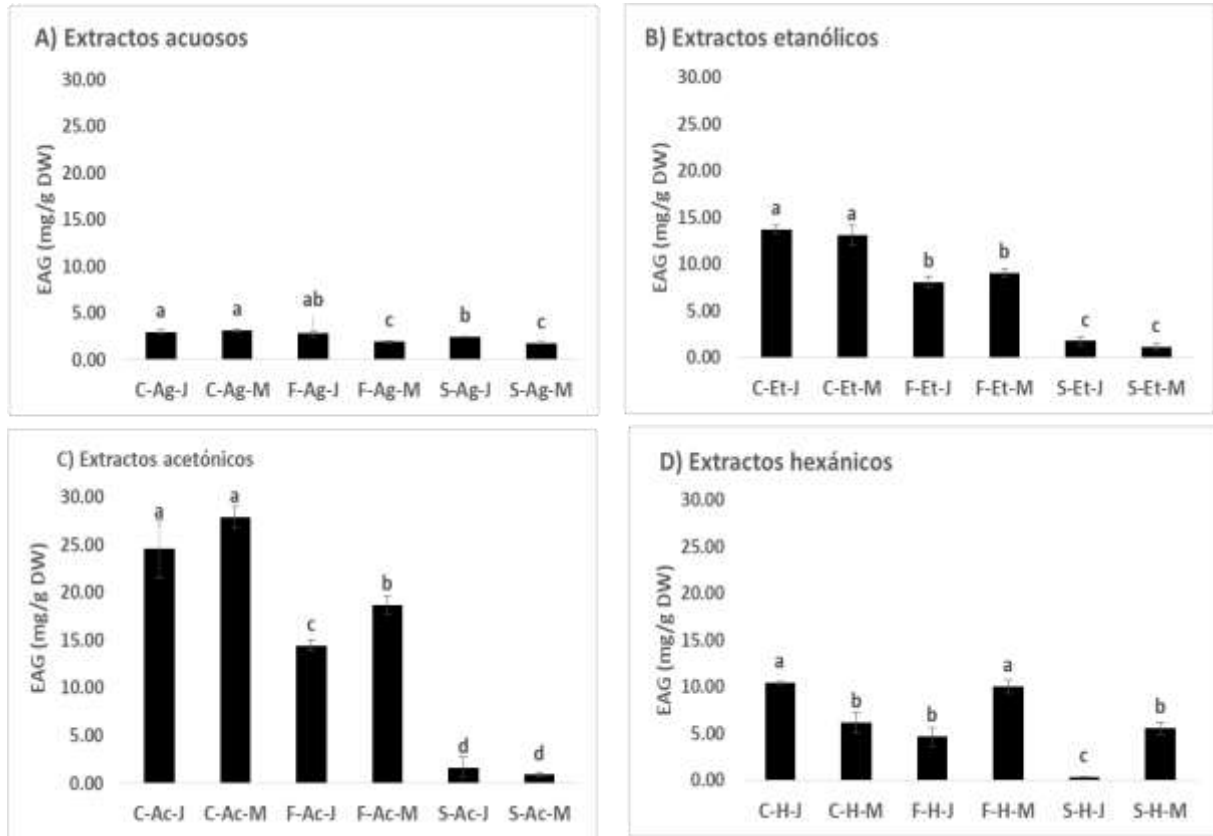


Figura 25. Cuantificación de fenoles totales por el método HRP. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

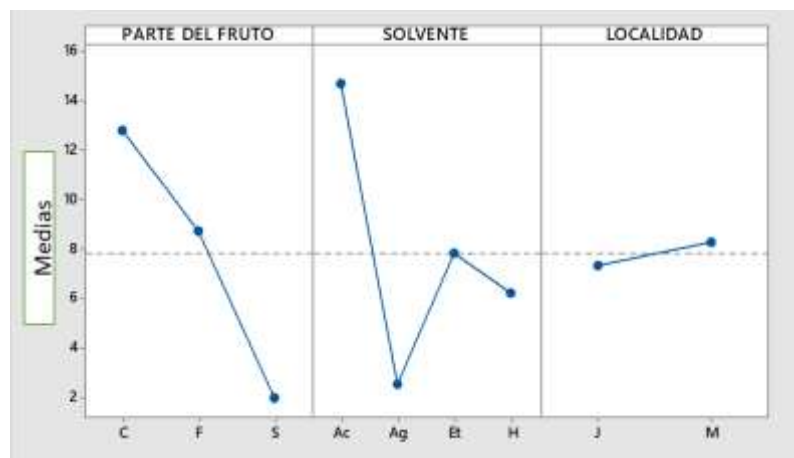


Figura 26. Efectos principales de las medias de contenido de compuestos fenólicos por el método HRP.

En el Cuadro 6 se muestra una comparación entre los valores de fenoles totales cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu y el método enzimático HRP. La sensibilidad de ambos métodos se comparó mediante un análisis de comparación de medias de dos muestras (*t*-student), donde se observa una cantidad más elevada de fenoles cuantificados a través de la prueba de HRP, con excepción de los extractos de semilla, donde no hubo diferencia significativa en los dos métodos empleados. Esta sensibilidad fue de un factor de 1.8× en los extractos acuosos, de 12× y 13× en extractos acetónicos y hasta 20× para algunos hexánicos.

El ensayo de Folin-Ciocalteu es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos, dada la facilidad de la prueba y los costos de reactivos; sin embargo, es bien sabido que este método de óxido-reducción tiene poca especificidad y puede proporcionar valores sobreestimados, ya que hay interferencia de compuestos no fenólicos que pudieran estar presente en la muestra como ácidos orgánicos (cítrico, ascórbico) y sulfitos. Mientras que el método enzimático puede considerarse más confiable dado que la HRP, al igual que otras peroxidasas, actúa específicamente sobre las estructuras fenólicas, pero sin discriminación del número o posición de los grupos hidroxilo (Stevanato et al., 2004; Mathé et al., 2010). Adicionalmente, el ensayo enzimático requiere tiempos de incubación más cortos, lo que puede estar asociado a una menor degradación de los compuestos fenólicos (Isik *et al.*, 2011).

La mayor cantidad de compuestos fenólicos totales obtenida en ambas pruebas (2.12 y 27.93 mg/g DW), se encuentran por debajo de lo reportado por Wu *et al.* (2013) en el fruto de *R. hirta* donde el contenido de fenoles fue de 81.6 mg/g DW extraídos en etanol y 46.3 mg/g DW en agua; sin embargo, el rango de valores obtenido en este trabajo es mayor a lo reportado por Said y Amzad-Hossain (2018) con 3.86 mg/g DW en plátanos maduros. La cuantificación de fenoles totales puede variar por el contenido natural de antioxidantes de cada fruto, el método y condiciones de extracción y el tipo de prueba analítica.

Cuadro 6. Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de agrillo cuantificados por los métodos Folin-Ciocalteu y el enzimático (peroxidasa de rábano). Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas en una comparación de medias de dos muestras con una prueba *t*-student y $\alpha = 0.05$.

Fenoles totales EAG (mg/g DW) de extractos de agrillo		
Muestra	Folin-Ciocalteu	HRP
C-Ag-J	1.63 ± 0.06 ^b	3.01 ± 0.22 ^a
C-Ag-M	1.66 ± 0.05 ^b	3.15 ± 0.17 ^a
F-Ag-J	1.67 ± 0.09 ^b	2.83 ± 0.33 ^a
F-Ag-M	1.40 ± 0.05 ^b	1.95 ± 0.09 ^a
S-Ag-J	1.56 ± 0.05 ^b	2.47 ± 0.08 ^a
S-Ag-M	1.42 ± 0.08 ^b	1.80 ± 0.09 ^a
C-Et-J	1.91 ± 0.10 ^b	13.77 ± 0.45 ^a
C-Et-M	2.00 ± 0.13 ^b	13.15 ± 1.02 ^a
F-Et-J	1.74 ± 0.05 ^b	8.12 ± 0.56 ^a
F-Et-M	1.88 ± 0.05 ^b	9.07 ± 0.44 ^a
S-Et-J	1.71 ± 0.02 ^a	1.80 ± 0.35 ^a
S-Et-M	1.88 ± 0.13 ^a	1.15 ± 0.33 ^b
C-Ac-J	1.99 ± 0.12 ^b	24.59 ± 3.0 ^a
C-Ac-M	2.12 ± 0.09 ^b	27.93 ± 1.13 ^a
F-Ac-J	1.53 ± 0.03 ^b	14.48 ± 0.54 ^a
F-Ac-M	1.77 ± 0.15 ^b	18.70 ± 0.88 ^a
S-Ac-J	0.67 ± 0.63 ^a	1.65 ± 1.06 ^a
S-Ac-M	0.49 ± 0.17 ^b	0.90 ± 0.19 ^a
C-He-J	0.55 ± 0.17 ^b	10.47 ± 0.14 ^a
C-He-M	0.58 ± 0.21 ^b	6.20 ± 1.15 ^a
F-He-J	0.49 ± 0.02 ^b	4.69 ± 1.00 ^a
F-He-M	0.50 ± 0.02 ^b	10.05 ± 0.74 ^a
S-He-J	0.31 ± 0.17 ^a	0.33 ± 0.04 ^a
S-He-M	0.39 ± 0.03 ^b	5.58 ± 0.62 ^a

8.1.3. Contenido total de flavonoides.

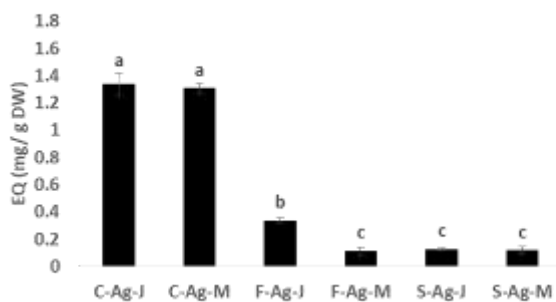
Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que se encuentran en flores y frutos principalmente. En muchas ocasiones, los flavonoides representan la mayor parte de los compuestos fenólicos encontrados en extractos de origen vegetal. El interés en su estudio, es debido a la asociación de su consumo con los efectos benéficos a la salud, por lo que su ingesta como ingrediente nutricional es la forma más fácil y segura para prevenir y combatir enfermedades (Panche et al., 2016).

El contenido total de flavonoides extraídos en las diferentes partes del fruto de agrillo, se presenta en la Figura 27, destacando el extracto etanólico de la cáscara de frutos de Jalisco (C-Et-J) con 1.45 EQ mg/g DW; mientras que el menor contenido se presentó en los extractos acetónicos de semilla en frutos de Michoacán (S-Ac-M) con EQ 0.039 mg/g DW. No se detectaron flavonoides en el extracto hexánico de las semillas proveniente de Michoacán (S-H-M).

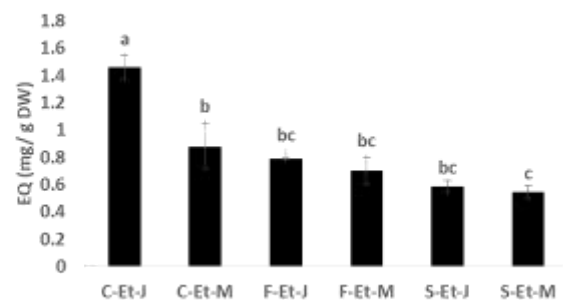
El análisis de efectos principales mostrados en la Figura 28 indica que las partes del fruto de agrillo y el solvente de extracción fueron factores que influyen en el contenido de flavonoides. La cáscara es la parte del fruto que contiene mayor cantidad de estos compuestos fenólicos; mientras que la semilla, presentó la menor concentración. Por otra parte, el etanol fue el solvente más eficiente para la extracción de los flavonoides, seguido de agua y acetona. La procedencia del fruto no tuvo un impacto en la concentración de flavonoides.

La cantidad de flavonoides encontradas en el fruto de agrillo es menor a lo reportado en frutos de *R. hirta*. En extractos etanólicos, Wu et al, (2013) encontraron valores promedio de 4.97 mg/g DW; mientras que en extractos acuosos reportaron un valor de 3.08 mg/g DW.

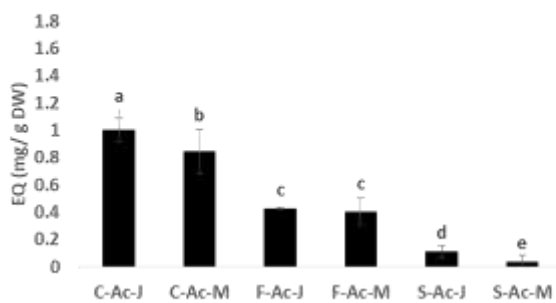
A) Extractos acuosos



B) Extractos etanólicos



C) Extractos acetónicos



D) Extractos hexánicos

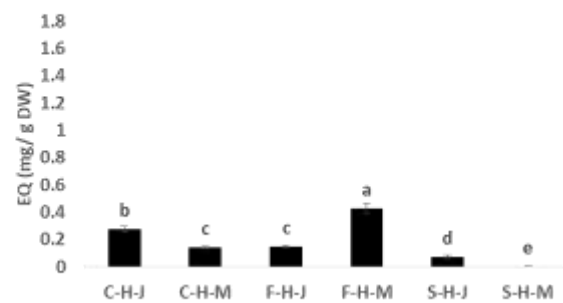


Figura 27. Cuantificación de flavonoides en extractos de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$)

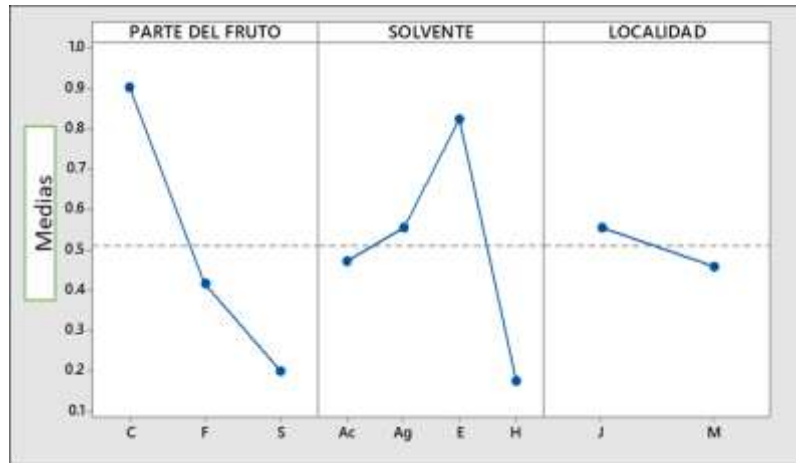


Figura 28. Efectos principales de las medias de contenido de flavonoides.

Estos autores también comprueban que los mejores rendimientos de flavonoides se obtienen en mezclas metanólicas o etanólicas en presencia de 20 a 60% de agua. Esto explica en parte, la mayor eficiencia de extracción de flavonoides cuando se utilizó etanol al 70% (v/v).

En la Figura 29 se muestra la correlación entre el contenido de flavonoides en los distintos extractos y la presencia de compuestos fenólicos cuantificados a través de Folin-Ciocalteu y el método enzimático. Los coeficientes de correlación presentan valores superiores cuando se consideran los compuestos fenólicos cuantificados con la HRP, con valores de 0.5535 para los extractos hexánicos hasta 0.8757 para los extractos acetónicos; mientras que los coeficientes obtenidos con Folin-Ciocalteu tuvieron valores inferiores a 0.5, excepto para los extractos acetónicos con un r^2 de 0.8238. Independientemente del método de cuantificación de fenólicos, el extracto acetónico presentó valores superiores a 0.8; lo que sugiere que los compuestos fenólicos extraídos con este solvente, son mayoritariamente flavonoides.

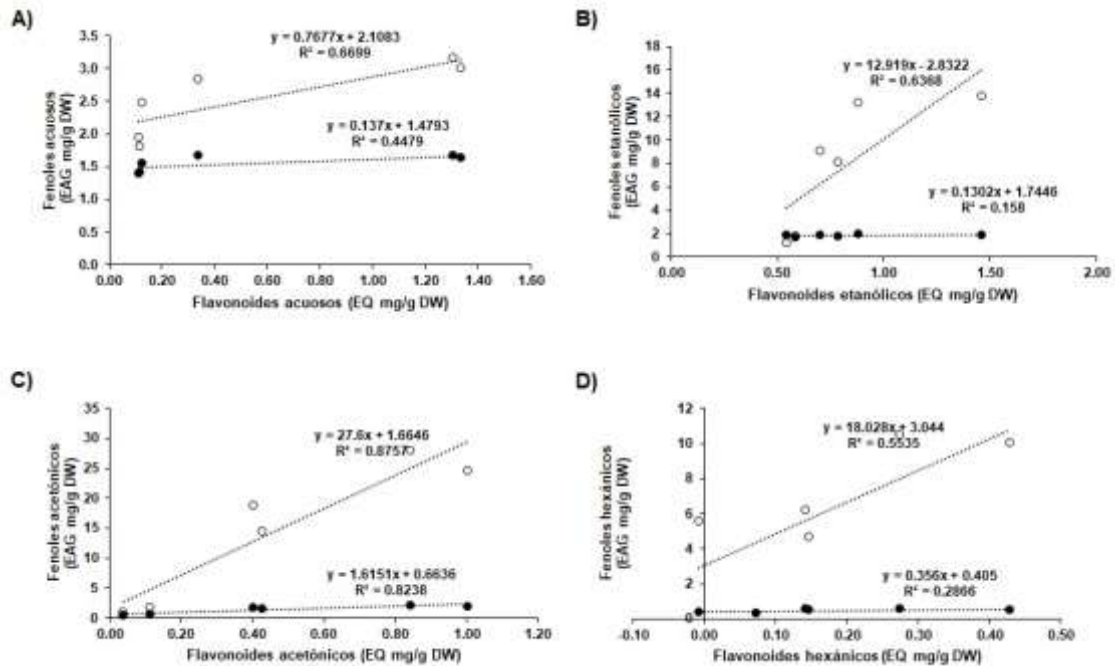


Figura 29. Correlación del contenido de flavonoides con la determinación de compuestos fenólicos en diferentes extractos de agrillo. Se compara los compuestos fenólicos determinados por el método de Folin-Ciocalteu y el enzimático.

8.1.4. Cuantificación de carotenoides: Contenido total de β -Caroteno y Luteína

Los carotenoides son otro tipo de compuestos bioactivos que despierta el interés en la ciencia de los alimentos ya que, como los compuestos fenólicos, tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios (Langi et al., 2018). Su ingesta a través de la dieta ha mostrado efectos anticancerígenos, antiartríticos y disminución en la degeneración macular y cataratas. Los carotenos son precursores de la vitamina A (provitamina A); los mamíferos requieren de su ingesta a través de la dieta para poder sintetizar esta vitamina. Estos terpenoides lipofílicos son considerados pigmentos, ya que proporcionan las coloraciones amarillas y rojas típicas de algunas flores y frutos como cempasúchil, jitomate y zanahoria. Durante la obtención de diferentes extractos de agrillo en este trabajo, fue común la formación de una fase oleosa de coloración rojiza que despertó el interés por tratar de determinar este tipo de nutrientes en la pigmentación rojiza de la cáscara de agrillo.

En el Cuadro 7 se muestra el contenido de β -caroteno y luteína en extractos acetónicos de cáscara de agrillo, determinados a través de coeficientes de

extinción molar reportados

para estos compuestos cuando están disueltos en hexano (Craft y Soares, 1992).

Cuadro 7. Contenido de carotenos en extractos acetónicos de cáscara de agrillo.

Tipo de carotenoide	mg/g DW
β -Caroteno	0.08528
Luteína	0.08222

Estos valores pueden considerarse muy altos, tomando en cuenta los niveles de clasificación propuestos por Britton y Khachik (2009), que consideran que un contenido de carotenoides mayor a 2 mg/100 g (0.02 mg/g; aunque no se menciona si es en base seca) debe tomarse como muy alto. En este nivel se agrupan con alto contenido de β -caroteno al durazno (0.00615-0.06433 mg/g), brócoli (0.0048-0.01080 mg/g), zanahoria (0.0183-0.147 mg/g), papa dulce (0.0762-0.16 mg/g), calabaza (0.0049-0.2 mg/g), cilantro (0.0504-0.0560) y jitomate (0.00115-0.066 mg/g), entre otros (Mangels et al., 1993; Olmedilla-Alonso, 2017). Kale, brócoli (0.018-0.02060 mg/g), grano de maíz (0.005-0.023 mg/g) y cilantro (0.102 mg/g) destacan por su muy alto contenido de luteína (Mangels et al., 1993).

No hay mucha información referente a la presencia de carotenoides en frutos de agrillo. Chaturvedi y Nagar (2001) reportan el análisis del contenido de β -caroteno en frutas y vegetales en la zona árida de Rajasthan, India y que son consumidos con frecuencia por la población regional. En este universo de estudio se reporta el contenido de este carotenoide en frutos de *R. myserensis*, con un valor promedio de 0.01488 mg/g DW; el contenido de este pigmento es disminuido a 0.0029 mg/g cuando el fruto es sometido a un proceso de blanqueado (inmersión en agua hirviendo por 1 min).

Por otra parte, en un reporte más antiguo, Nestler et al., (1949) reportan presencia de β -caroteno en *R. copallina* en un rango de 3.5-23.5 IU, *R. glabra* con valores de 1.4-14-6 IU y *R. typhina* con un contenido de 1.8-7.9 IU, donde cada unidad internacional (IU) equivale a 0.3 μ g de equivalentes de retinol. El amplio rango en la concentración de este pigmento, es debido a que ésta varía ampliamente de mes a mes, o incluso en frutos de la misma planta sin que los autores pudieran dar alguna explicación a esta variación.

Entre las estrategias antioxidantes de estos pigmentos se atribuye su capacidad de estabilizar dos ROS de significancia biológica, el oxígeno molecular singulete ($^1\text{O}_2$) y los radicales peroxilo (ROO^\bullet), así como en la desactivación de moléculas susceptibles a la excitación electrónica que pueda dar origen a estos radicales (Stahl y Sies, 2003). Por su naturaleza lipofílica y sus propiedades para interrumpir procesos de oxidación en cadena, se cree que brindan protección a lipoproteínas y membranas celulares. La capacidad antioxidante de estos compuestos determinada *in vitro* resulta controversial, dado que se argumenta que la mayoría de los radicales libres utilizados en este tipo de ensayos y/o medios de reacción son hidrofílicos. Algunos resultados de actividad antioxidante podrían estar subestimados (Yeum et al., 2009).

Por otra parte, algunas determinaciones de capacidad antiradicalaria utilizando el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, mencionan que esta capacidad está influenciada por la presencia de grupos polares adicionados en la estructura básica de los carotenoides (Miller et al., 1996; Manimala y Murugesan, 2014).

8.2. Caracterización de las actividades antioxidantes de extractos de fruto de agrillo silvestre (*Rhus allophyloides*)

8.2.1. Inhibición radicalaria

8.2.1.1. Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH $^\bullet$)

El ensayo que utiliza DPPH^\bullet como radical es el más utilizado para determinar la capacidad antiradicalaria de un compuesto o mezcla de compuestos, dado algunas ventajas de su uso como el que no se requiere preparación previa del radical, además de ser muy estable; sin embargo, por la naturaleza de la prueba, es selectiva a compuestos orgánicos solubles en alcoholes o cetona (Kuskoski, et. al, 2005).

La polaridad de los extractos de agrillo y características fisicoquímicas de algunas muestras, dificultaron el análisis con esta prueba ya que algunos de ellos mostraron turbidez, y por lo tanto impidieron una lectura confiable y certera. Las determinaciones se hicieron en los extractos etanólicos y acetónicos (excepto los de semilla), así como los extractos acuosos de cáscara (Figura 30). La inhibición del radical DPPH^\bullet se expresó como la capacidad antioxidante

equivalente de Trólox (TEAC). El extracto etanólico de cáscara de Jalisco presentó el valor más alto (C-Et-J, 25.17 $\mu\text{M/g DW}$), en tanto que el extracto acetónico del fruto de Jalisco tuvo el menor valor (F-Ac-J, 5.69 $\mu\text{M/g DW}$).

El análisis de efectos principales mostró que el solvente y la región fueron factores significativos que influyeron en la respuesta, siendo los extractos etanólicos con mejor capacidad para estabilizar al DPPH \cdot y la región de Michoacán tuvo mayor relevancia (Figura 31). La parte del fruto no tuvo diferencias significativas.

Asimismo, se determinó el IC₅₀, encontrándose que se requiere 137.90 μg del extracto acuoso de cáscara de Michoacán para inhibir el radical DPPH en un 50%; en comparación con los 787.99 μg requeridos para el extracto F-Ac-M. Las diferencias significativas para el IC₅₀ resultaron en la parte del fruto, siendo la cáscara la de mayor relevancia y el agua el solvente más significativo, mientras que la región no tuvo alguna diferencia significativa (Figuras 32 y 33).

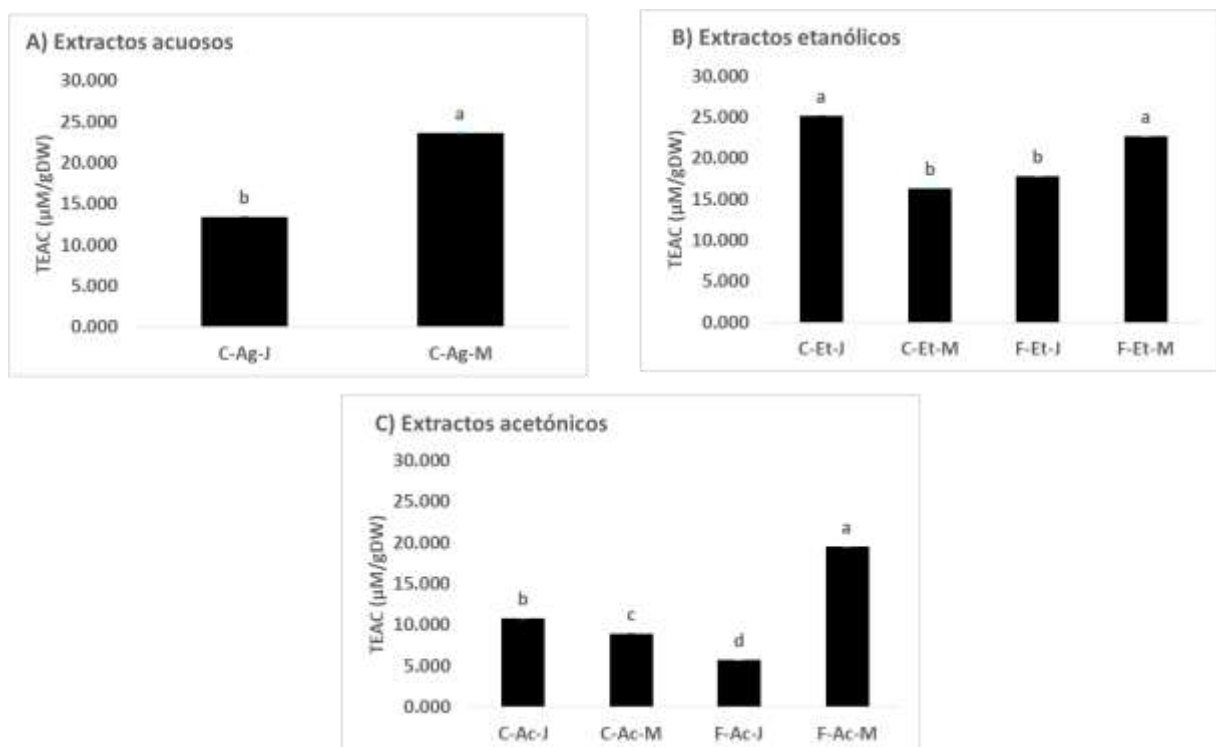


Figura 30. Capacidad antioxidante estabilizadora de radicales DPPH. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

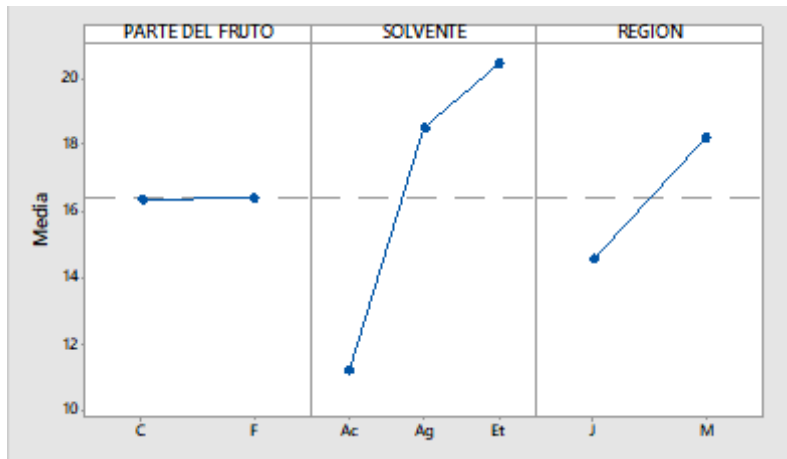


Figura 31. Efectos principales de las medias de los valores de TEAC por el método del radical DPPH.

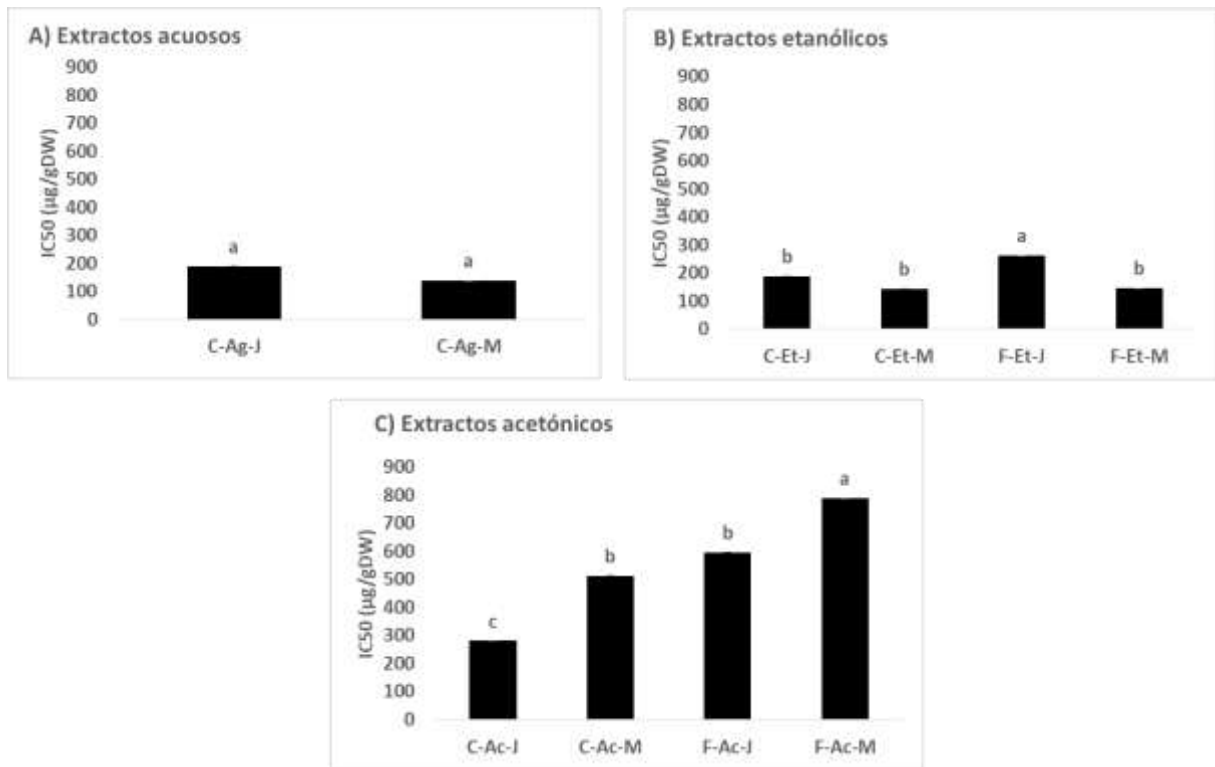


Figura 32. Concentración máxima inhibitoria del 50% de DPPH IC50. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

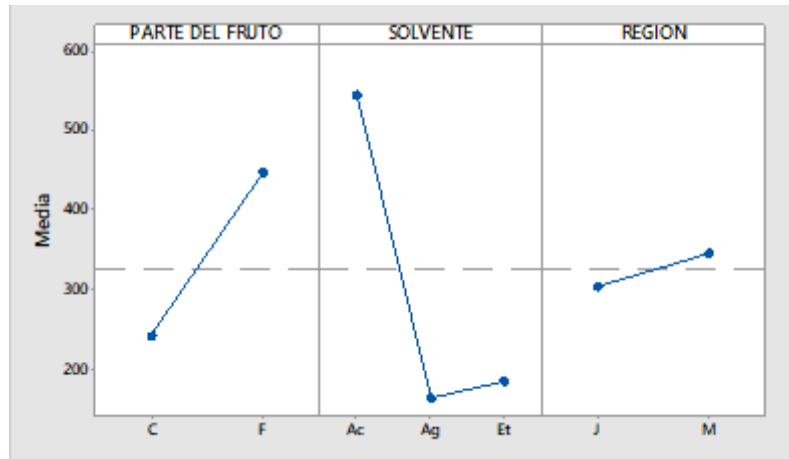


Figura 33. Efectos principales de las medias de los valores de IC50 por el método del radical DPPH.

8.2.1.2. Radical ácido 2,2-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Aunque el ensayo de ABTS^{•+} requiere una preparación previa del radical, tiene la ventaja de que se solubiliza en medios acuosos y orgánicos (Kuskoski, *et al.*, 2005). Los resultados de los valores TEAC indican que el extracto etanólico de cáscara Jalisco (C-Et-J) presentó el mayor valor con 50.47 $\mu\text{M/g DW}$, en comparación con el extracto hexánico de la semilla Jalisco (S-He-J) con un valor TEAC de 0.37 $\mu\text{M/g DW}$ (Figura 34).

En la determinación de los valores de IC50 (Figura 35) destaca el extracto etanólico del fruto Michoacán (F-Et-M) con 30.33 μg requeridos para inhibir 50% del ABTS^{•+}; contrastando con el extracto hexánico de la semilla Michoacán (S-He-M), con un requerimiento de 13.242 mg para tener el mismo efecto. En frutos de *R. hirta* y *R. thipyna* se reportan valores de IC50 de 3.7 μg y 3.2 μg , respectivamente (Kossah, *et al.*, 2011 y Wu, *et al.*, 2013).

El análisis de efectos principales muestra que la cáscara es la parte del fruto con mayor influencia en los valores más altos de TEAC y el etanol el mejor solvente (Figura 36). Mientras que la localidad no obtuvo diferencias significativas. Esta tendencia coincide con el análisis de efectos principales para los valores de IC50 (Figura 37).

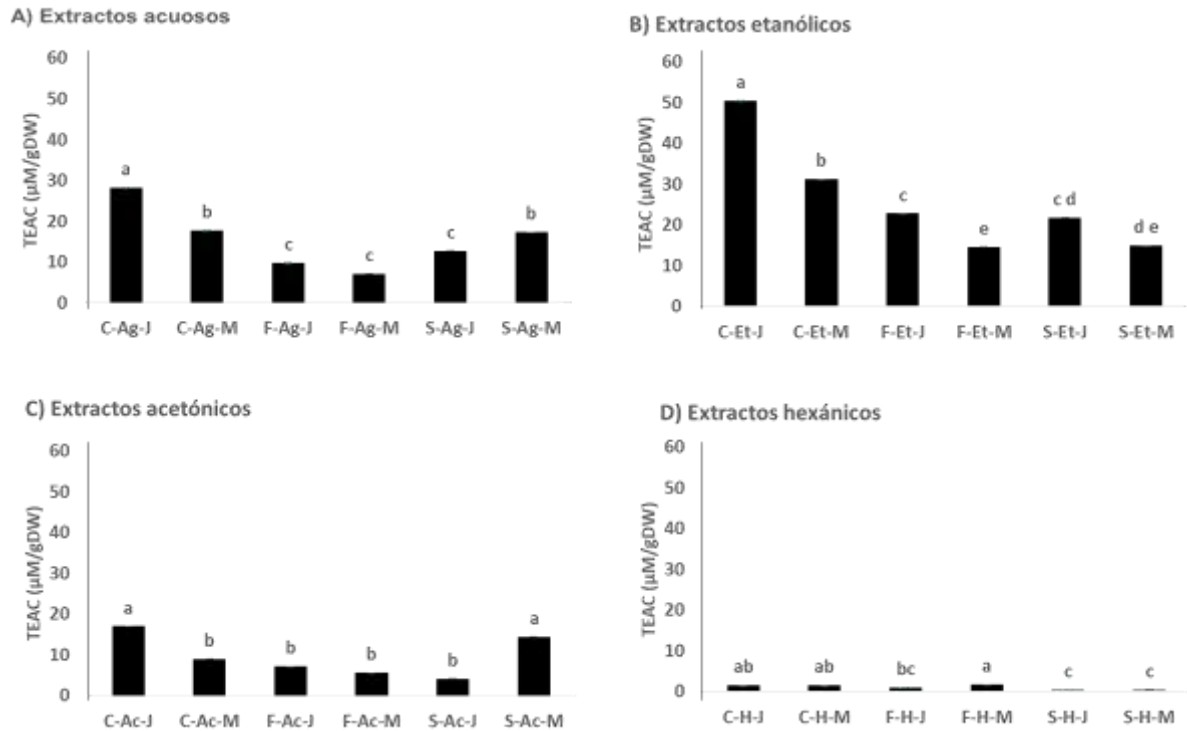


Figura 34. Capacidad antioxidante equivalente Trólox de extractos de agrillo con el método de ABTS^{•+}. Se comparan los extractos de diferentes partes del fruto. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

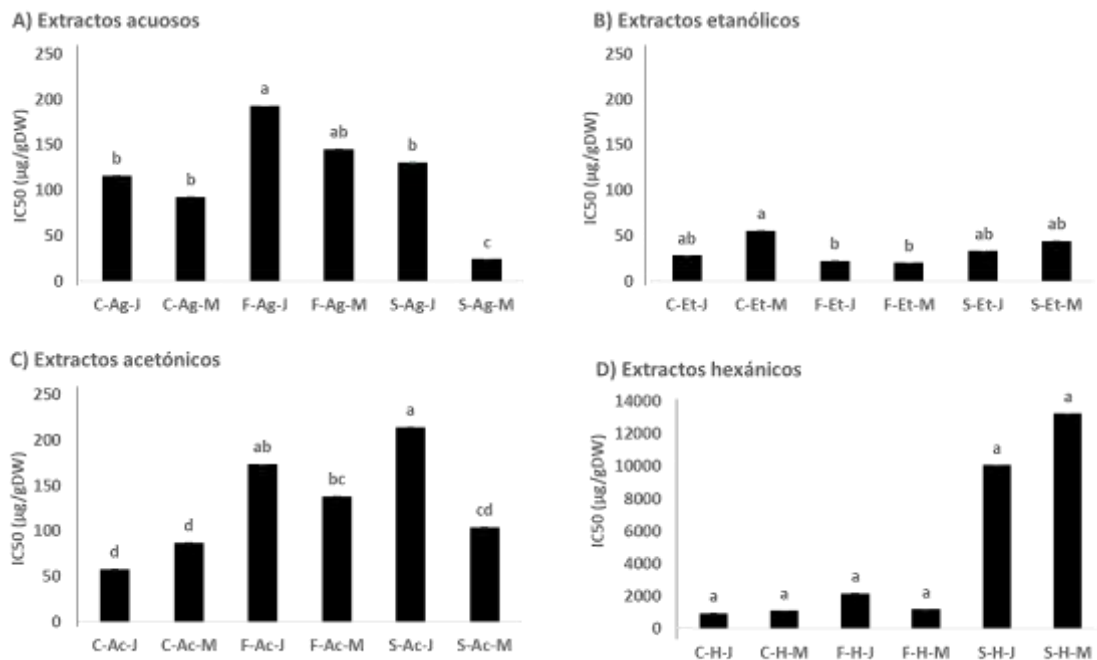


Figura 35. Valores de IC50 de extractos de diferentes partes del fruto de agrillo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$). Gráfica 35D) presenta una escala diferente en el eje "y".

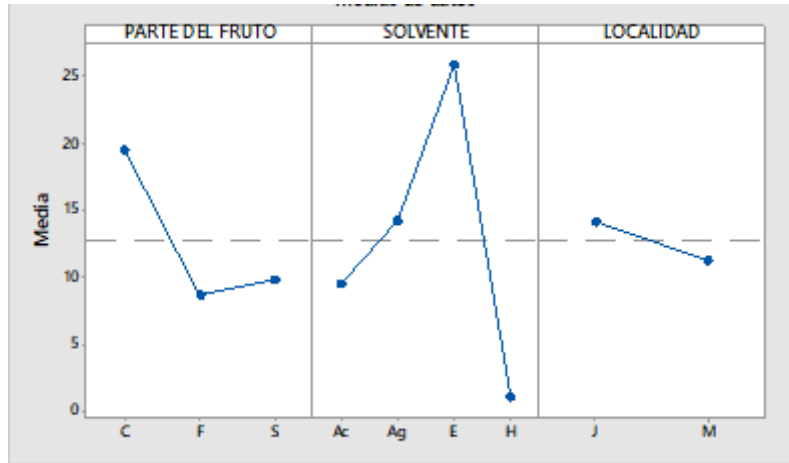


Figura 36. Efectos principales de las medias de los valores de TEAC por el método ABTS*+.

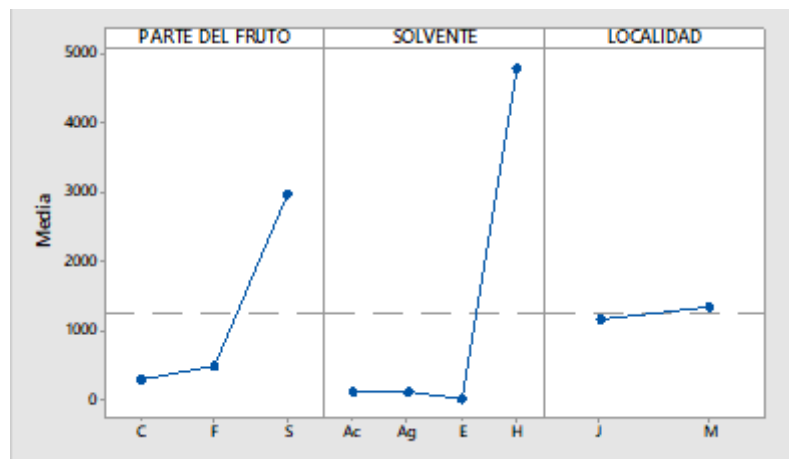


Figura 37. Efectos principales de las medias de los valores de IC50 por el método ABTS*+.

El método ABTS*+ resultó más adecuado en la determinación de la capacidad antioxidante para radicales. Además de que no se presentaron problemas de insolubilidad, en la mayoría de las veces el ensayo fue más sensible en un factor de dos. Los extractos con valores mayores de TEAC fueron los que presentaron valores menores de IC50.

8.2.2. Capacidad de reducción de ion férrico, método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Assay)

Resultados positivos en el ensayo FRAP indican la presencia de compuestos antioxidantes capaces de transferir electrones al ion férrico para su reducción a ferroso. Como molécula estándar se utilizó el ácido ascórbico (equivalentes de ácido ascórbico, EAA). En general, los extractos no presentan buena capacidad de reducir el ion férrico, con un rango de valores de 0.00018 EAA ($\mu\text{M/g DW}$) para el extracto hexánico de semilla Jalisco (S-He-J) a 0.0052 EAA para el extracto etanólico de la cáscara Jalisco (C-Et-J) (Figura 38).

Como valores de referencia puede considerarse los EAA determinados para Trólox ($4.74 \mu\text{M}$) y el ácido gálico ($5.62 \mu\text{M}$). Es importante mencionar que éstos fueron ensayados como estándares de pureza de grado reactivo, por lo que es de esperar valores EAA altos. Estos compuestos han demostrado su capacidad de reducir el ion férrico y a menudo, son usados también como estándares de referencia. Por otra parte, Yuan *et al.*, (2018) reportaron valores de $0.000117 \mu\text{M}$ equivalentes de Trólox/g FW en puré de frutos de aronia (*Aronia melanocarpa*) un fruto semejante a las berries y apreciado por su alto contenido en compuestos fenólicos.

El análisis de efectos principales indica que la parte del fruto elegida en el ensayo es significativa, donde la cáscara es la parte que tiene mayor contenido de compuestos con capacidad de reducir el ion férrico; mientras que el mejor solvente para extraerlos, es el etanol. La localidad no fue un efecto significativo (Figura 39).

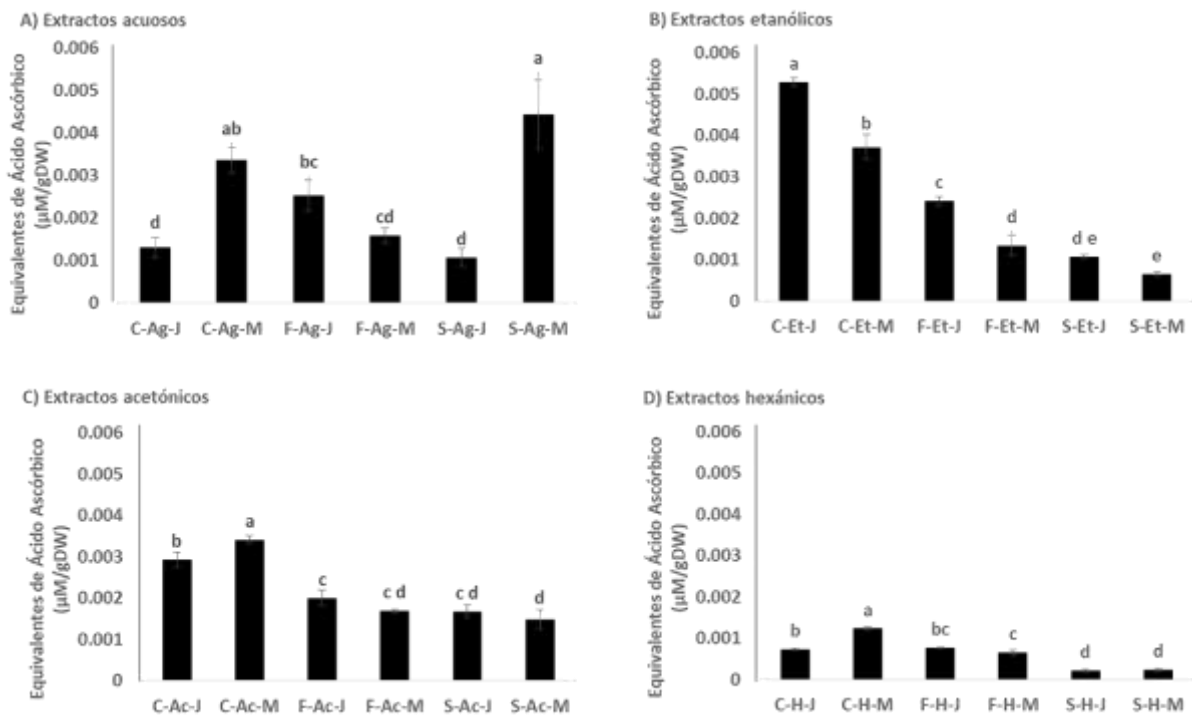


Figura 38. Capacidad antioxidante por reducción de ión férrico de extractos de diferentes partes de fruto de agrillo, ensayo FRAP. Los resultados se expresados como equivalentes de ácido ascórbico (EAA, µM/g DW). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

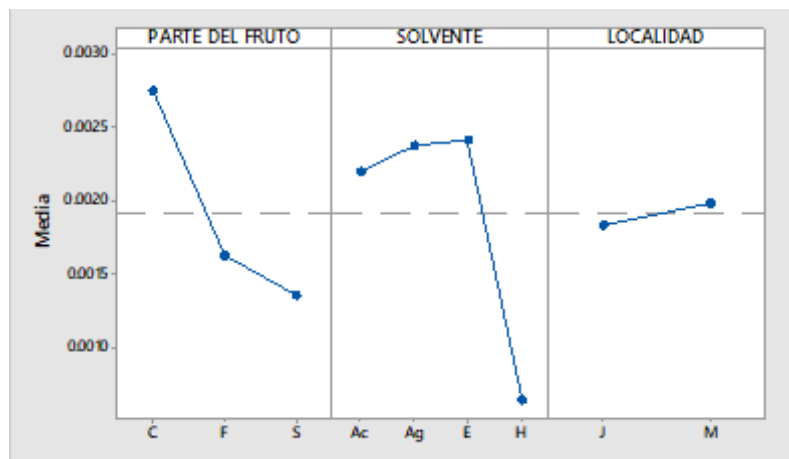


Figura 39. Análisis de efectos principales de las medias de los valores de equivalentes de ácido ascórbico por el método de FRAP.

8.2.3. Ensayo de actividad quelante (determinación del ion ferroso)

La capacidad de los compuestos de quelar el ion ferroso y dejarlo indisponible para que no se oxide a férrico, es otro mecanismo antioxidante. En este ensayo se utiliza EDTA como quelante de referencia, eligiendo arbitrariamente una concentración de 250 µM de EDTA que es capaz de inhibir el 71.57%. De esta

manera, en los extractos de

agrillo se determinó la cantidad de equivalentes de EDTA ($\mu\text{M/g DW}$) necesario para lograr el mismo porcentaje de quelación del ion Fe^{+2} , de manera que, entre mayor cantidad de equivalentes de EDTA menor es la actividad quelante del extracto.

La respuesta de actividad quelante fue buena para los extractos de agrillo (Figura 40). El extracto que requiere menor cantidad de equivalentes EDTA es la muestra F-Ag-J con $0.0027 \mu\text{M/g DW}$ y la muestra con mayor cantidad de equivalentes de EDTA fue la muestra C-H-J con $0.719 \mu\text{M/g DW}$. Todos los factores tuvieron diferencias significativas, siendo el fruto el más adecuado, el agua el mejor solvente y Michoacán, la mejor localidad de recolección de agrillo para los extractos con mejores niveles de quelación del ion ferroso (Figura 41).

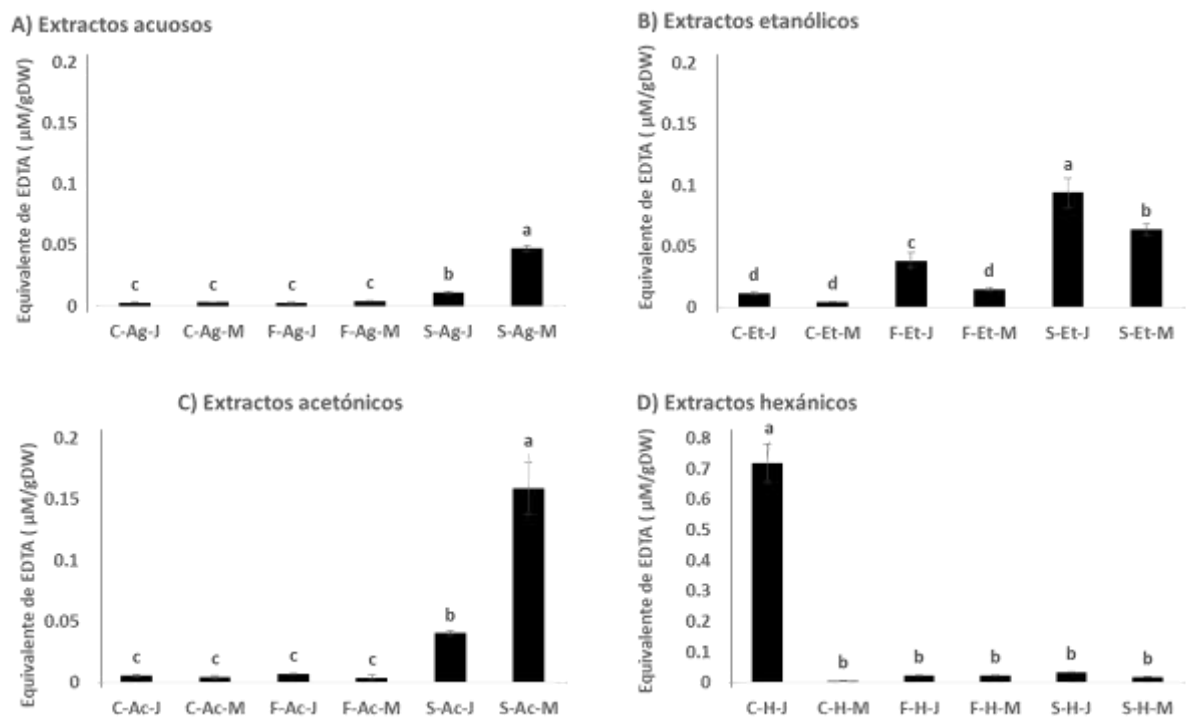


Figura 40. Determinación de equivalentes de EDTA capaces de quelar el ion ferroso en un 71.57% ($\mu\text{g/g DW}$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$). La gráfica D muestra valores distintos en el eje "y".

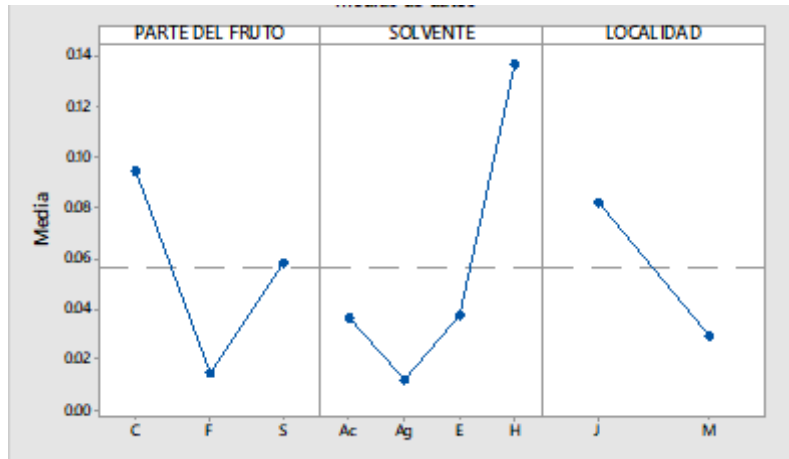


Figura 41. Efectos principales de las medias de los valores de equivalentes de EDTA para quelación de ion Fe^{+2} .

8.2.4. Determinación de factores que más influyen en las pruebas antioxidantes

La sumatoria del porcentaje de medias de los factores: parte del fruto, el solvente y localidad, se muestra en la Figura 42 donde se muestra que el porcentaje de mayor relevancia en la parte del fruto, fue la cáscara con 46.41%, el solvente mejor evaluado fue el agua con 31.83% y el etanol con 31.69% (diferencia entre valores porcentuales mínima), y por último la localidad, donde la de mayor relevancia fue Michoacán con 51.85%. Cabe mencionar que este último factor, solo mostró diferencias significativas en dos ensayos, por lo que puede descartarse como un valor que influye en los valores de las pruebas antioxidantes.

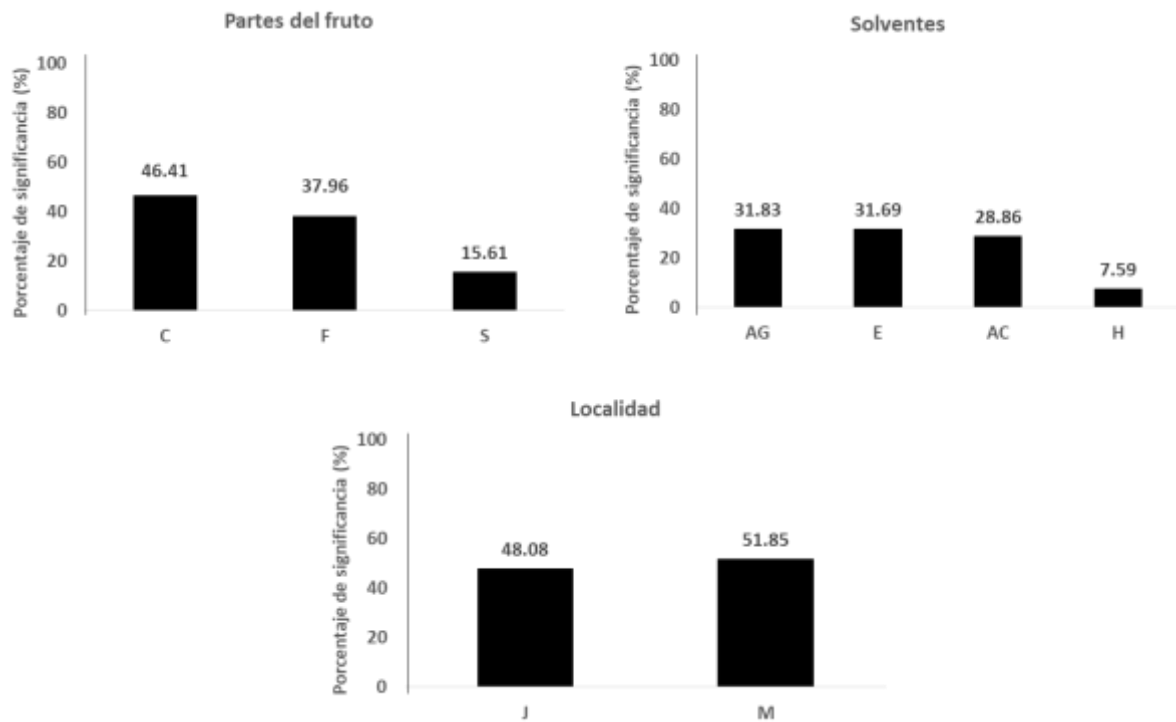


Figura 42. Porcentaje total de cada uno de los factores determinantes en los ensayos antioxidantes

8.3. Evaluación de la capacidad antifúngicas de los extractos de agrillo (*Rhus allophyloides*)

Una de las funciones ecológicas de los compuestos fenólicos en las plantas, es la de actuar como moléculas de defensa ante la presencia de agentes bióticos, incluyendo hongos, bacterias, virus o herbívoros. Algunos de estos compuestos como fitoanticipinas, se encuentran pre-formados en las plantas o en su estado inactivo (generalmente glicosilados) para que la planta pueda responder rápida y efectivamente ante la presencia de un agente. Otras moléculas, son sintetizadas *de novo*; es decir, se requiere la inducción de las vías para su síntesis. Estas son fitoalexinas y la gran mayoría, son de naturaleza fenólica (Lattanzio et al., 2006).

Para evaluar la toxicidad de este tipo de compuestos en hongos filamentosos, generalmente se determina *in vitro* como la reducción del crecimiento del micelio de los hongos. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de los extractos de agrillo utilizando cepas de *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum acutatum*, considerados como hongos de interés alimentario,

dato que son responsables de importantes pérdidas post-cosecha de numerosas frutas y hortalizas.

8.3.1. Pruebas antifúngicas en caja Petri

En un primer escrutinio, los extractos se probaron a una concentración de 0.5 g/mL; éstos fueron dispersados sobre un medio PDA solidificado en cajas de Petri. Las conidias de los hongos fueron inoculadas sobre discos de papel filtro estéril y, después de cinco días de incubación, se comparó el crecimiento micelial con el control positivo (captan). Los resultados se muestran en la Figura 43. Sin embargo, el control negativo, que consistió en DMSO mostró tener un porcentaje de inhibición significativo del 36.6% en la cepa de *P. digitatum*, (Figura 43B) por lo que, posteriormente, se utilizó agua para la disolución de los extractos con el fin de evitar la interferencia del disolvente orgánico.

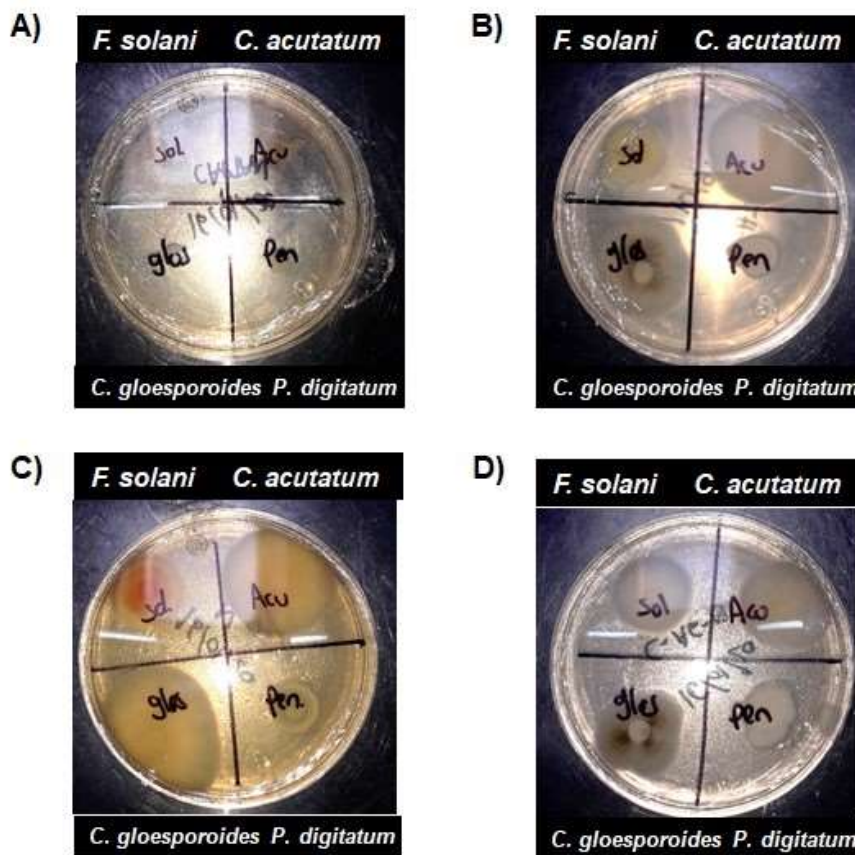


Figura 43. Imágenes del crecimiento micelial. A) Control positivo con antifúngico comercial “Captan”; B) DMSO como control negativo; C) Agua como control negativo. D) Inhibición de colonias fúngicas con extracto etanólico de cáscara.

El mayor poder inhibitorio del crecimiento micelial de *F. solani* se obtuvo con el extracto etanólico de la cáscara y del fruto, con un 53.77% y 46.23% de inhibición respectivamente (Figura 44), en contraste con el 6.60% de inhibición por parte del extracto etanólico de semilla.

El análisis de efectos principales indica diferencias significativas en partes del fruto y solvente, siendo la cascara la más relevante y el etanol el mejor solvente (Figura 45).

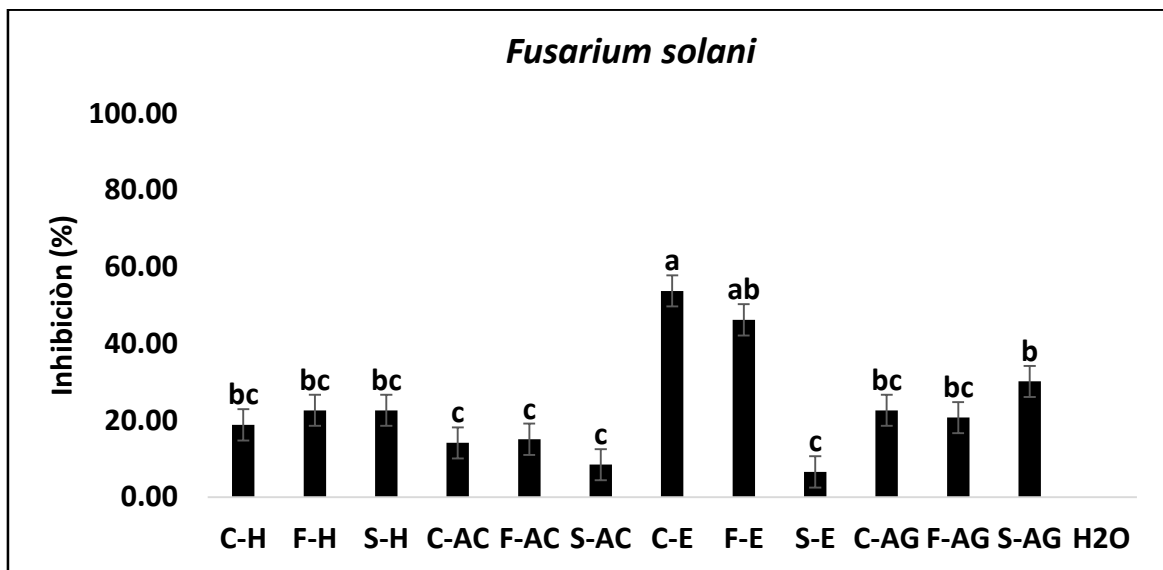


Figura 44. Inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

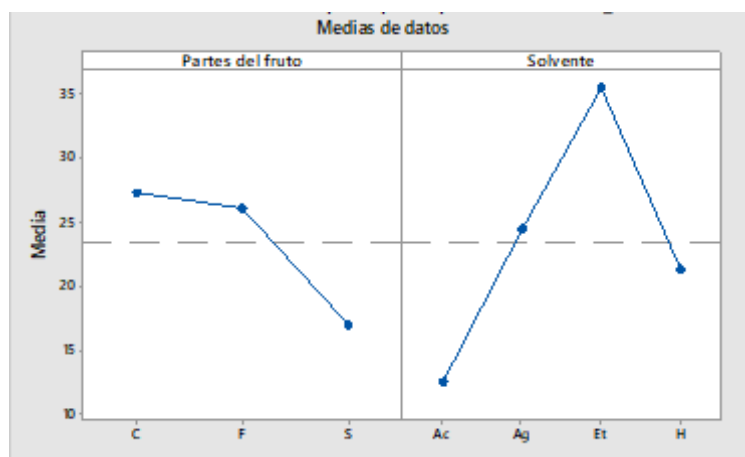


Figura 45. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Fusarium solani* en caja Petri.

En la Figura 46 se muestra el efecto de los extractos de agrillo sobre el crecimiento micelial de *C. acutatum*. El extracto con mayor poder inhibitorio fue el etanólico la cáscara con 54.63%; mientras el extracto con menor efecto inhibitorio fue el etanólico de semilla con el 7.41%. El análisis de medias indica diferencias significativas (Figura 47) en la parte del fruto y el solvente, donde el fruto completo es el de mayor significancia y el etanol el mejor solvente.

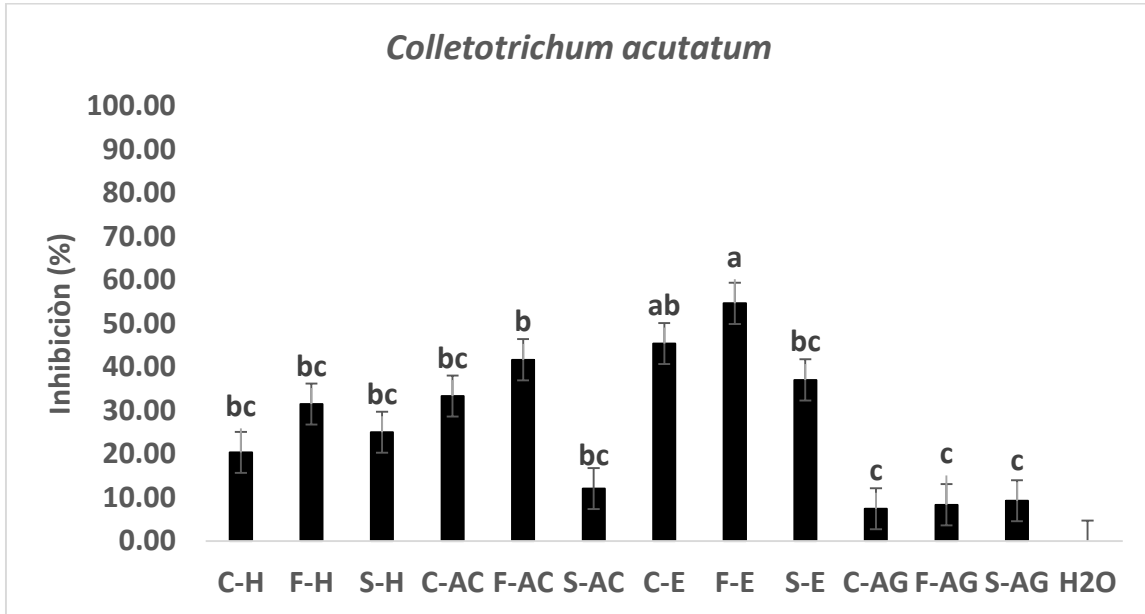


Figura 46. Inhibición del crecimiento micelial de *C. acutatum* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

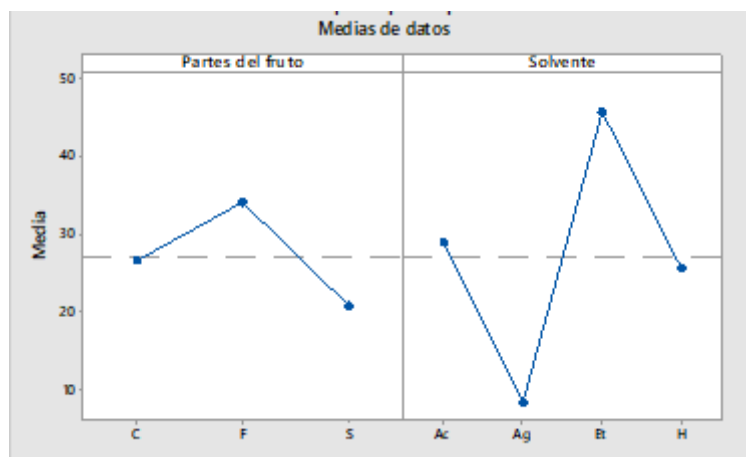


Figura 47. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotricum acutatum* en caja Petri.

Por su parte, el crecimiento de *C. gloeosporioides* fue inhibido en un 60.38% por la presencia del extracto etanólico de cáscara (C-E); mientras que el extracto con menor efecto fue el acetónico de semilla (S-Ac) con 15.09% de inhibición (Figura 48). La cáscara del fruto y el etanol fueron los elementos más significativos, según el análisis de efectos principales (Figura 49).

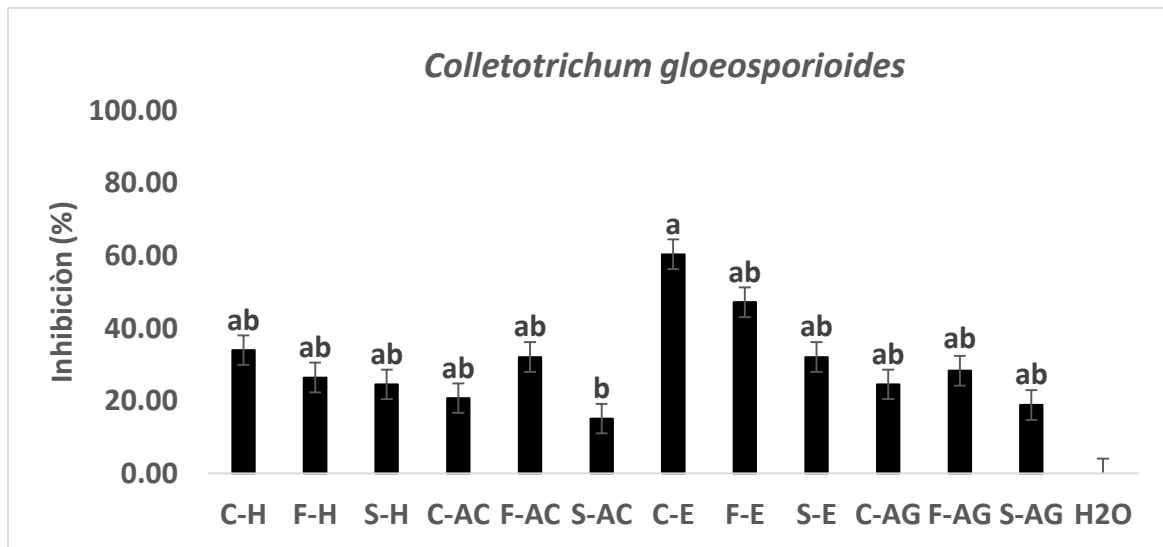


Figura 48. Inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

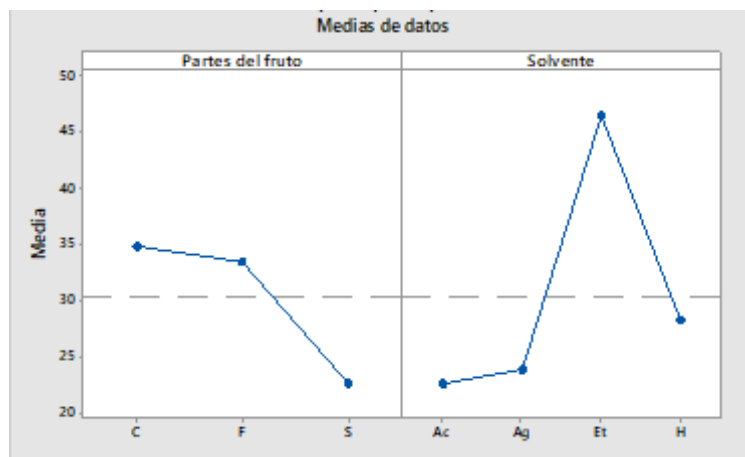


Figura 49. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* en caja Petri.

El hongo *P. digitatum* fue inhibido en más del 90% por los extractos etanólicos de la cáscara y la semilla (Figura 50). Los extractos acuosos de cáscara y fruta no presentaron ningún efecto de inhibición.

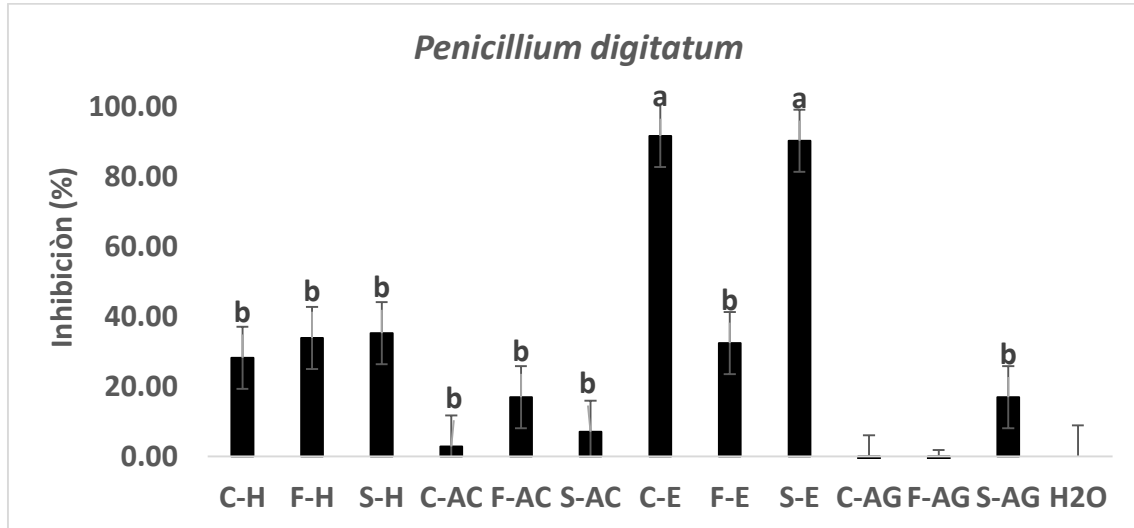


Figura 50. Inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en presencia de diferentes extractos de agrillo. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 0.5 g/mL. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

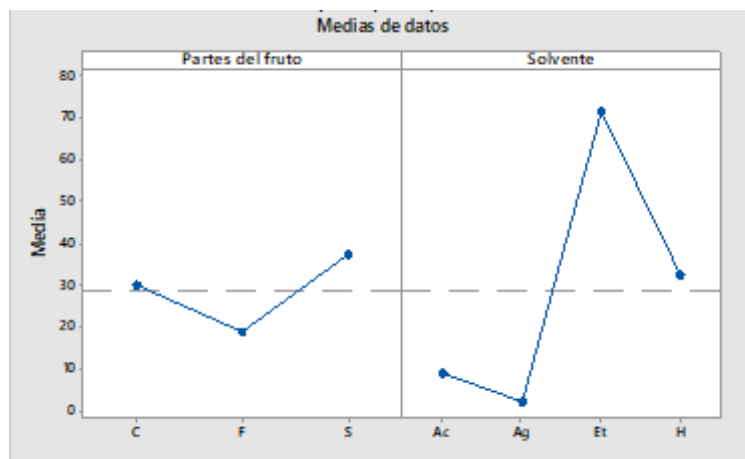


Figura 51. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Penicillium digitatum* en caja Petri.

Los extractos acuosos tuvieron presencia de carbohidratos, que en muchos casos sirvió como fuente de carbono para fomentar el crecimiento de los hongos, por lo que estos extractos fueron descartados para las pruebas siguientes.

8.3.2. Pruebas antifúngicas en microplaca

Además de elegir los extractos de agrillo con potencial fungicida, los ensayos anteriores permitieron establecer la concentración de conidias adecuadas para ensayar cada uno de los hongos en la determinación del CMI₉₅.

Los resultados en caja Petri mostrados en la sección anterior nos ayudaron a determinar las condiciones metodológicas para la realización de pruebas en microplaca, como la concentración de conidios de cada una de las cepas, así como identificar los extractos con efectos inhibitorios (etanólicos, acetónicos y hexánicos) y cuáles extractos presentaron bajo efecto inhibitorio o nulo (acuosos).

Los resultados obtenidos en las pruebas en microplaca fueron muy positivos, ya que se mostraron porcentajes de inhibición del 100% en todas las cepas como se muestran a continuación.

Fusarium solani. Los extractos se ensayaron a una concentración de 18.9 mg/mL. *F. solani* fue inhibido con todos los extractos probados (Figura 52). El extracto C-E logró inhibir 100% el crecimiento; mientras que SH, inhibió en un 99.45% y un menor grado de inhibición, lo presentó el extracto F-H que logró un efecto de inhibición del 76.84%. Los factores más relevantes fueron la cáscara y el etanol (Figura 53).

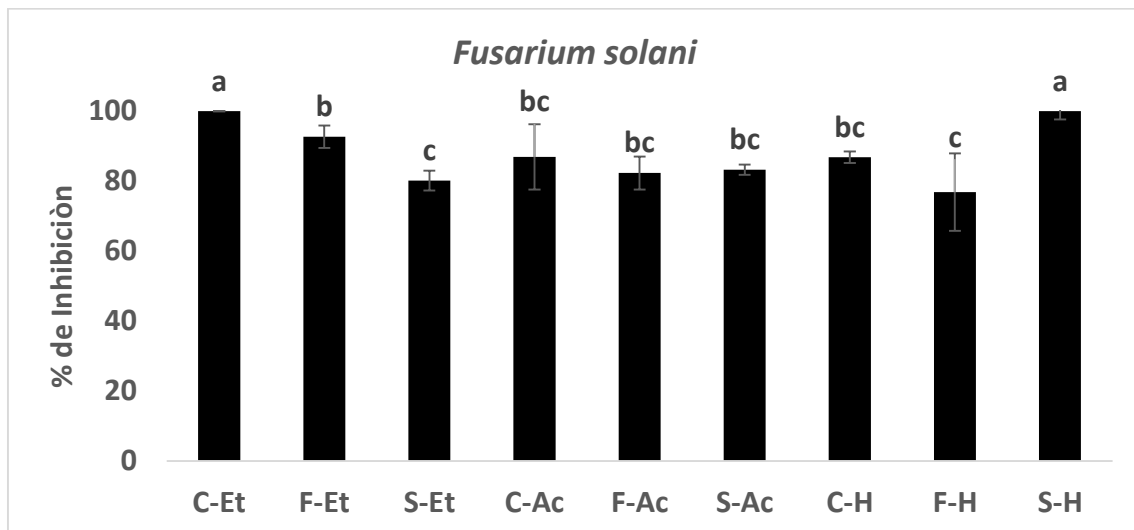


Figura 52. Efecto de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

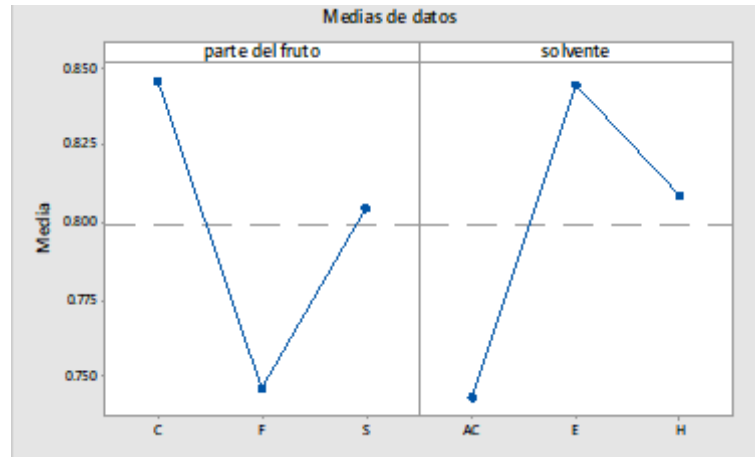


Figura 53. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Fusarium solani* en microplaca

F. solani es un patógeno de importancia en el área agrícola y de alimentos, ya que llega a causar necrosis en los tejidos de cultivos de relevancia agronómica y ocasionar pérdidas cuantiosas post-cosechas en frutos y hortalizas, por lo que su control es un área de interés científico y tecnológico. A través de la agrobiotecnología, se busca el uso de estrategias amigables con el ambiente, que eviten problemas de residualidad o de resistencia, como extractos de origen vegetal. Esta alternativa, además no implica riesgo en la salud del consumidor. Nguyen *et. al* (2013) reportaron la inhibición del crecimiento de *F. solani* en un 93% utilizando 2 mg/mL de una fracción cromatográfica purificada a partir de un extracto etanólico de corteza de *Terminalia nigrovenulosa* (Combretaceae), un árbol distribuido en China y la península de Malasia. Este efecto fue atribuido principalmente a la presencia de ácido gálico. El poder inhibitorio del extracto C-E es mayor, aunque a una concentración más elevada. Debe de considerarse, además, que el extracto probado por Nguyen *et al.*, tiene un mayor nivel de pureza que el ensayado en este trabajo, donde la interacción de los componentes de la mezcla puede tener efectos agonistas y/o antagonistas.

***Colletotrichum acutatum*.** La Figura 54 muestra el efecto inhibitorio de los diferentes extractos de agrillo en el crecimiento de *C. acutatum*. La mayoría de los extractos logró controlar significativamente el crecimiento de este hongo, en un rango del 52.39% para el extracto F-Ac hasta el 98.66% para el extracto C-Et. El análisis de los factores principales indica que el extracto de cáscara tuvo

mejor efecto; mientras que el hexano fue el solvente más efectivo para la inhibición de esta cepa (Figura 55).

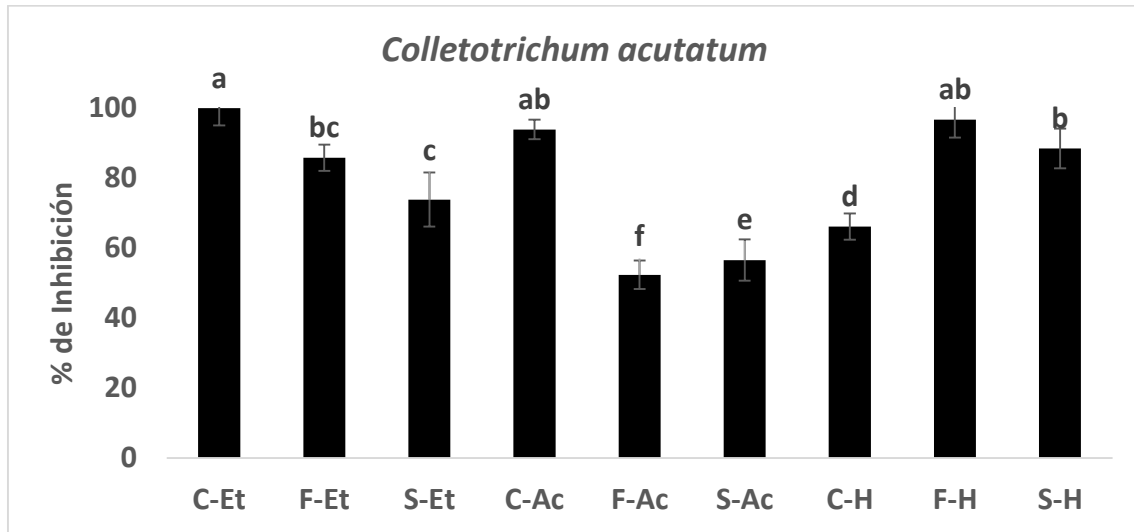


Figura 54. Efecto de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum acutatum* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

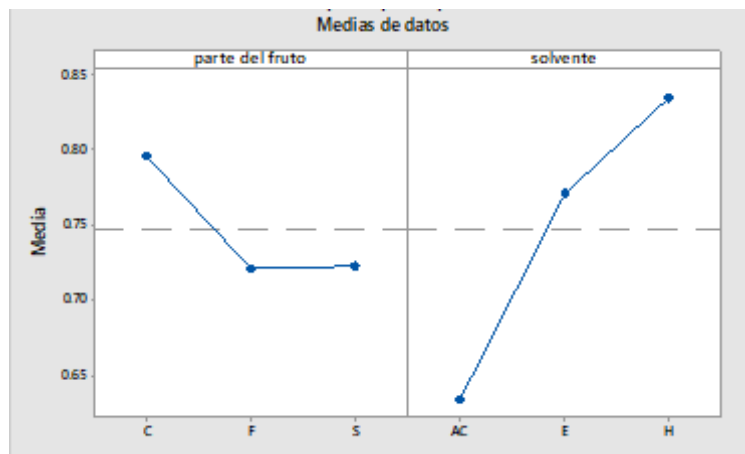


Figura 55. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Colletotrichum acutatum* en microplaca

Del mismo modo que con la cepa *F.solani*, los extractos C-Et y C-Ac fueron la más efectivos contra la cepa *C. acutatum*. La inhibición alcanzada alrededor del 98% es más efectiva que el 92% reportada por Rashid et al., (2018) para inhibir a *C. acutatum* a partir de un extracto acuoso de frutos de *R. coraria* en una concentración de 100 µg/mL.

Colletotrichum gloesporioides. Los extractos de agrillo fueron más efectivos en el proceso de inhibición del crecimiento de *C. gloesporioides*, logrando un

efecto del 95 y hasta el 100% en la inhibición del hongo (Figura 56). La mayoría de las muestras mostraron inhibición superior al 96% destacando las muestras C-Et, F-Et, C-H y S-H que obtuvieron valores cercanos al 100%. Jasso de Rodríguez *et. al.* (2011), también lograron la inhibición del crecimiento micelial al 100% de cepas de *C. gloesporioides* utilizando extractos etanólicos y hexánicos (0.5 µg/mL) de especies encontradas en el desierto mexicano como orégano (*Lippia graveolens*) y *Agave lechuguilla*.

El análisis de efectos principales, sugiere que el fruto tiene el mejor efecto inhibitorio; mientras que el etanol y hexano también fueron los mejores solventes para este mismo efecto (Figura 57).

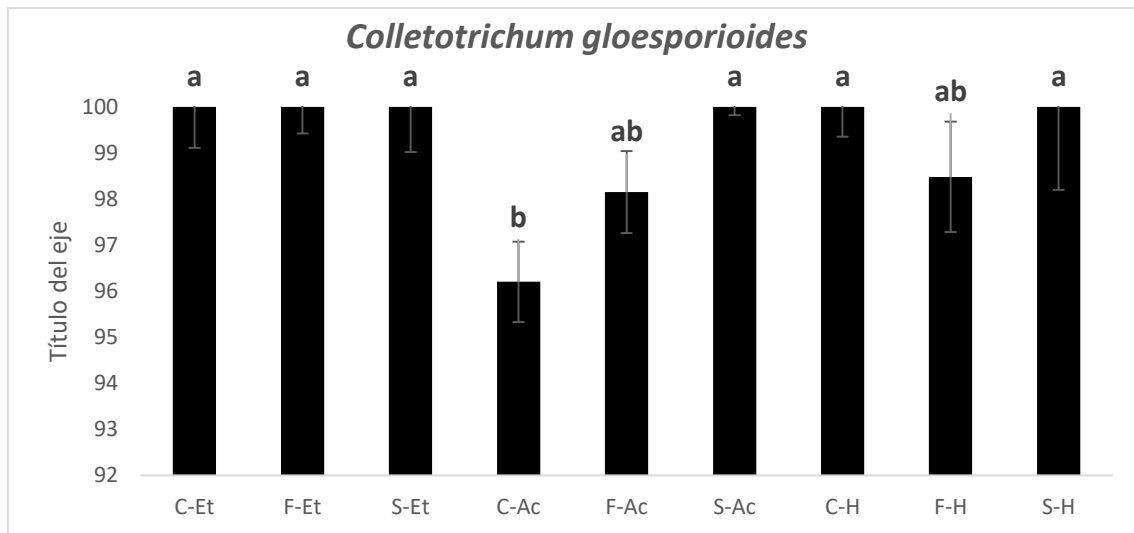


Figura 56. Efecto de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

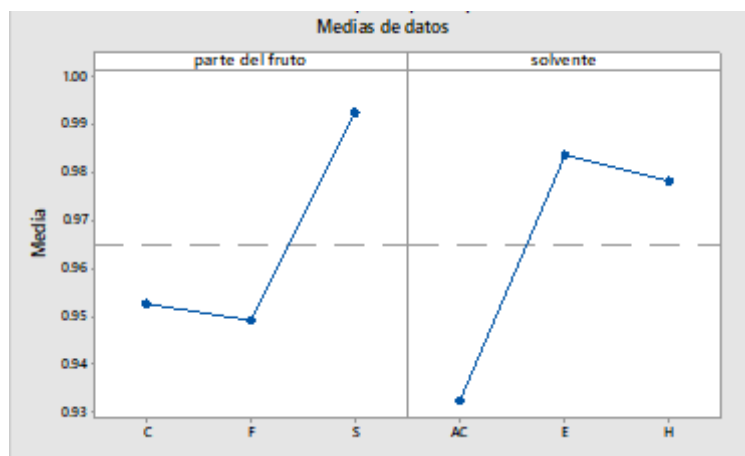


Figura 57. Efectos principales de las medias de los valores de la inhibición de *Colletotrichum gloesporioides* en microplaca

Penicillium digitatum. El rango de inhibición del micelio de *P. digitatum* varió en los diferentes extractos de agrillo, desde un 22.60% para los extractos etanólicos y acetónicos de semilla (S-Et y S-Ac) hasta la inhibición por completo de los extractos etanólico de cáscara (C-Et) y acetónico del fruto (F-Ac) como se muestra en la Figura 58. Las diferencias significativas solo resultaron en la parte del fruto destacando al fruto completo como el mejor de este factor, mientras que los solventes no mostraron diferencias significativas (Figura 59).

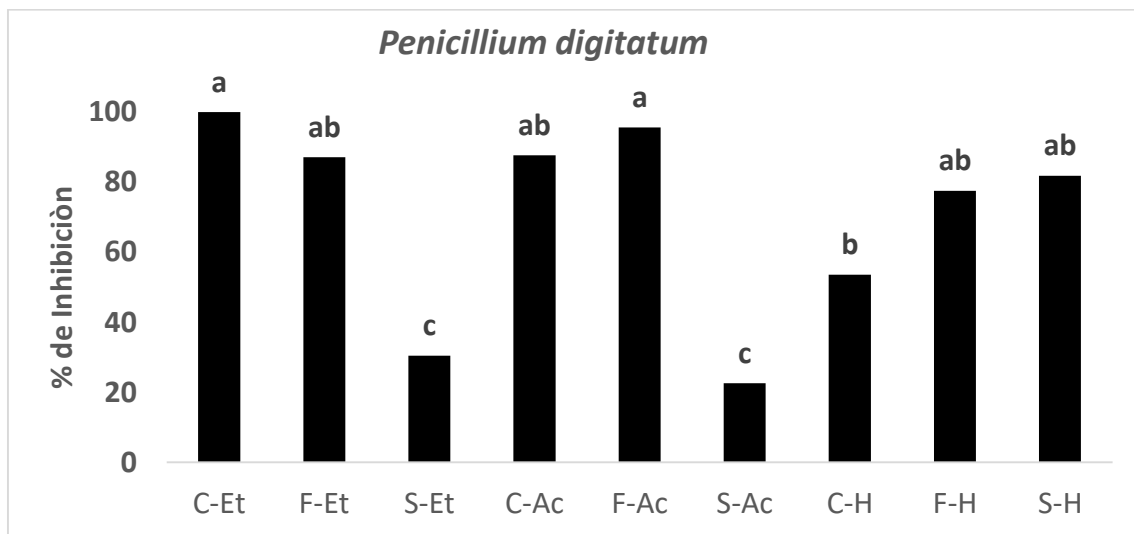


Figura 58. Efecto de inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum* en presencia de extractos de agrillo (18.9 mg DW/mL). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

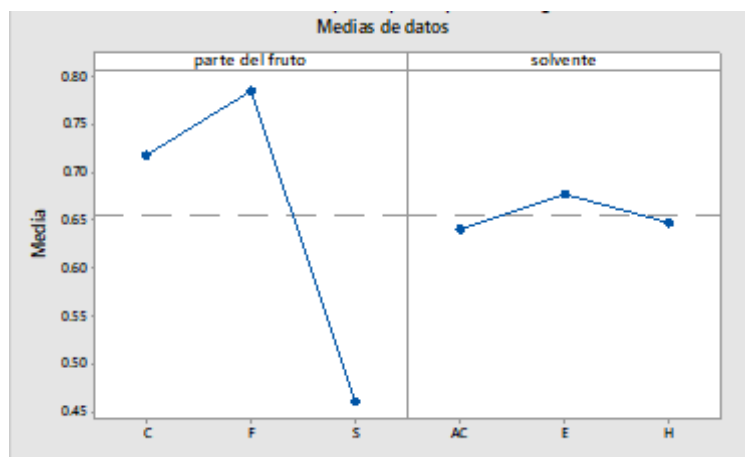


Figura 59. Efectos principales de las medias de los valores de inhibición de *Penicillium digitatum* en microplaca

El extracto C-Et, fue nuevamente el de mayor porcentaje de inhibición contra los patógenos; en este caso, para *P. digitatum* con el 100% de inhibición, porcentaje

más elevado que lo reportado por Ruiz, *et al.* (2017) que reporta el 80% de inhibición contra esta cepa, pero con una concentración ligeramente menor (18 mg/mL) de extracto de flavedo de limón radiado con UV. Esto sugiere que el extracto C-Et puede ser prometedor en el control de este patógeno, que resulta importante por las pérdidas post-cosecha que causa, especialmente en cítricos. Finalmente se realizó un gráfico del promedio global de inhibición de todos los extractos contra todas las cepas probadas (Figura 60) con el fin de elegir los extractos con mayor efecto en el control de los fitopatógenos.

En la figura 60 se puede observar que los extractos con más efecto antifúngico fueron las muestras C-Et, F-Et, C-Ac y S-H, las cuales fueron elegidas para la obtención del CMI₉₅; sin embargo, se descartó la muestra C-Ac ya que se observó la presencia de turbidez por la insolubilización de compuestos de todas las muestras acetónicas por lo que podría ser poco confiable dichos resultados obtenidos.

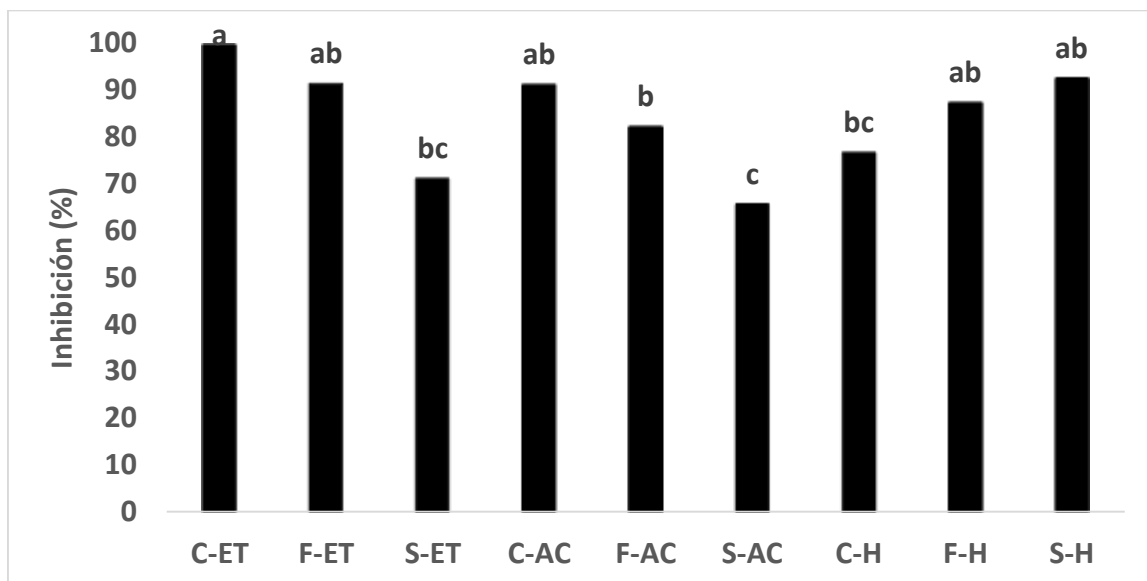


Figura 60. Balance global del promedio de inhibición de los extractos probados contra todas las cepas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (Prueba de Tukey cuando $P \leq 0.05$).

8.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del 95% (CMI₉₅)

Se eligieron tres extractos (C-Et, F-Et y S-H) para la determinación del CMI₉₅ a través de una curva de dosis-respuesta. De acuerdo al comportamiento de estas curvas, se ajustaron a una función logarítmica o lineal, según se muestra en el Cuadro 8 y gráficas de la Figura 61.

Cuadro 8. Concentración mínima inhibitoria del 95% (CMI₉₅) para tres extractos de agrillo.

	<i>Fusarium solani</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum gloesporoides</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
Extracto C-Et				
CMI₉₅ (mg/mL)	11.44	16.47	15.12	6.72
Función	Logarítmica	Lineal	Logarítmica	Logarítmica
Extracto F-Et				
CMI₉₅ (mg/mL)	21.28	23.95	24.41	26.15
Función	Lineal	Lineal	Logarítmica	Logarítmica
Extracto S-H				
CMI₉₅ (mg/mL)	9.38	9.46	5.47	6.88
Función	Lineal	Lineal	Lineal	Lineal

En la determinación del CMI₉₅ destaca el extracto S-H con los valores más bajos de concentración para inhibir los cuatro hongos ensayados (*F. solani* con 9.38 mg/mL, *C. acutatum* con 9.46 mg/mL *C. gloesporoides* con 5.47 mg/mL y *P. digitatum* con 6.88 mg/mL).

El CMI₉₅ en la muestra S-H (9.38 mg/mL) para la cepa *F. solani*, se observa que es una concentración mucho mayor a lo reportado por Wang *et.al.* (2016) de 108.934 µg/mL de extracto de *Momordica charantia* L. (melón amargo); sin embargo, este extracto logra inhibir a este hongo en un 50%.

Por su parte, el valor de CMI₉₅ de la muestra S-H contra *C. acutatum* (9.46 mg/mL) es mayor al publicado por Rashid, *et. al.* (2018) de 5 µg/mL de extracto de *R. coraria* para inhibir a este 92% al hongo.

En cuanto al hongo *C. gloesporoides* se determinó un valor de CMI₉₅ del extracto S-H de 5.47 mg/mL, una concentración más baja que lo reportado por Chávez-

Quintal *et. al.* (2011) con un valor de >10 mg/mL en extracto de hoja de *Carica papaya* L. cv. Maradol, con solamente un 50% de inhibición.

Finalmente, la concentración más baja de la CMI₉₅ para *P. digitatum* (6.88 mg/mL) se mostró en la muestra S-H, valor más elevado que en lo descrito por

Zhu *et. al.* (2019) con una concentración de 1 mg/mL de ácido tánico, logrando un 100% de inhibición para dicha cepa.

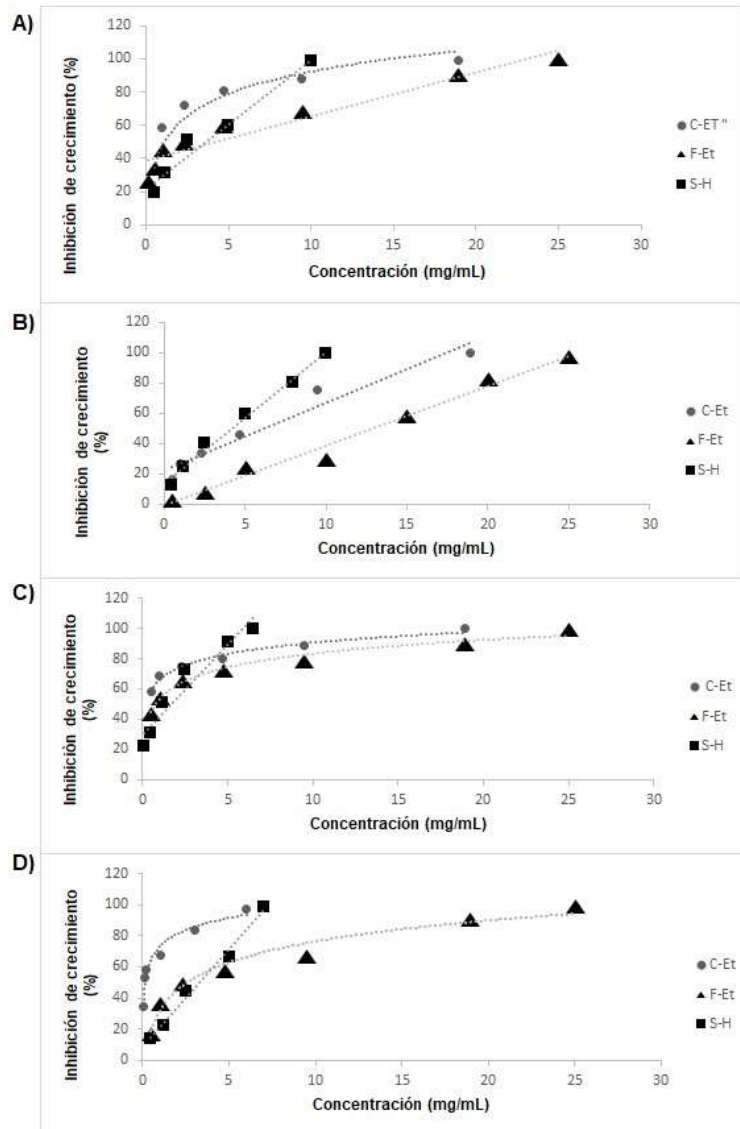


Figura 61. Curva dosis-respuesta de inhibición de extractos de agrillo contra diferentes fitopatógenos. A) *Fusarium solani*; B) *Colletotrichum acutatum*; C) *Colletotrichum gloeosporioides*; D) *Penicillium digitatum*.

8.3.4. Efecto fungicida o fungistático de extractos de agrillo

El efecto tóxico de los extractos de agrillo en los hongos fitopatógenos ensayados, puede ser de tipo fungicida o solo fungistático. Para comprobarlo, una pequeña alícuota del medio donde se inoculó el hongo (pero no creció), se inoculó en un medio nuevo sin la presencia de los extractos de agrillo. Si en este nuevo medio hay crecimiento del hongo, significa que los componentes del extracto fueron capaces de parar el crecimiento del hongo, pero éste recupera su crecimiento sin la presencia del agente inhibidor, teniendo el extracto, un poder fungistático. Por el contrario, si al inocular una alícuota del hongo a un medio sin el extracto, no hay crecimiento, significa que el extracto actúa como fungicida.

El extracto S-H mostró un efecto fungicida para todos los fitopatógenos ensayados; asimismo, el extracto C-Et también presentó un efecto fungicida en todos los hongos, excepto para *P. digitatum*, donde se comprobó un efecto fungistático y finalmente, el extracto F-Et mostró solo efecto fungicida contra *C. gloesporoides* como se muestra en la Figura 62.

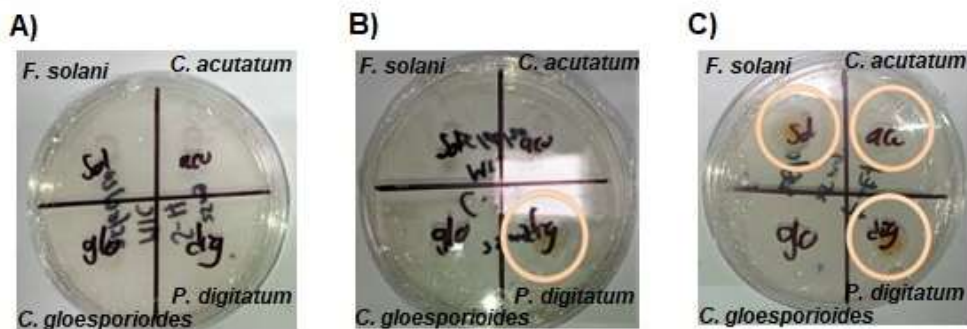


Figura 62. Efecto fungicida y fungistático de extractos de agrillo en *F. solani*, *C. acutatum*, *C. gloesporoides* y *P. digitatum*. A) Extracto S-H; B) extracto C-Et; C) extracto F-Et.

En este trabajo no se determinaron los mecanismos del efecto tóxico de los extractos de agrillo, actuando como fungicidas y/o fungistáticos; sin embargo, en la literatura se reporta que algunos compuestos fenólicos provocan la ruptura de la membrana y/o la pared celular con deformación morfológica, colapso y deterioro de los conidios y/o hifas. Asimismo, se menciona la participación de los

grupos hidroxilo y la presencia de un sistema de electrones deslocalizados como importantes para la actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros (Abbaszadeh, et. al, 2014).

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos y metodologías, y los datos de comparación de diversos autores que se mostraron en esta Tesis, se puede aceptar la hipótesis de que el fruto de agrillo (*Rhus allophyloides*) contiene compuestos con actividad antioxidante y antifúngicas.

Las diversas pruebas analíticas para medir la actividad y la capacidad antioxidante, fueron de gran utilidad para hacer comparaciones con los diferentes mecanismos de acción y determinar el potencial antioxidante que presenta el agrillo (*Rhus allophyloides*), donde se destacan los extractos acetónicos y etanólicos de cáscara, así como mejor actividad antiradicalaria (DPPH• y ABTS••) y su posible correlación con el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenos. Los extractos hexánicos de las semillas presentaron actividad quelante, en tanto que fue baja la capacidad de los extractos para reducir el ion Fe^{+3} (FRAP). El origen del fruto, no tuvo influencia en estas propiedades. Sin embargo aún es conveniente la realización de pruebas de naturaleza fisiológica al ser humano. Las pruebas antifúngicas mostraron las propiedades fungicidas y fungiestáticas de los extractos en fitopatógenos de interés agroalimentario (*Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides* y *Penicillium digitatum*), alcanzando una inhibición del crecimiento micelial del 100% en concentraciones de 18 mg/mL. Destacan los extractos etanólicos de cáscara y frutos, así como hexánico de semilla con los menores valores de concentración mínima inhibitoria del 95% (CMI₉₅) de las cepas utilizadas.

10. REFERENCIAS

- Abbaszadeh S.; Sharifzadeh A.; Shokri H.; Khosravi A.R.; Abbaszadeh A.** 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Medic* 24:e51-e56.
- Ainsworth E. A.; Gillespie K.,** 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2:875-878.
- Alves-Alcântara M.; Brito-Polari I.; De Lima, R.L.; De Albuquerque-Meireles B., Alcântara de Lima A.E.; Da Silva-Junior J.C.; De Andrade-Vieira È., Albuquerque-Dos Santos N.; Tribuzy de Magalhães-Cordeiro A.M.** 2019. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chem.* 275:489-496.
- Apak R.; Özyürek M.; Güçlü K.; Çapanoğlu, E.** 2016. Antioxidant activity/capacity measurement: I. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* 64:997-1027.
- Arvaniti O.; Samaras Y.; Gatidou G.; Thomaidis N. S.; Stasinakis A. S.** 2019. Review on fresh and dried figs: chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Res Int.* 119:244-267
- Azmir J.; Zaidul I.S.M.; Rahman M.M.; Sharif K.M.; Sahena A.M; Jahurul M.H.A; Norulaini K.; Omar A.K.M.** 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 117: 426-436.
- Bakuradze T.; Tausend A.; Jens G.; Groh I.A.M.; Berry D.; Tur J.A., Marko D.; Richling E.** 2019. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radical Res.* 53:1045-1055.
- Bhat N.N.; Mahiya-Farooqa; Paddera B. A.; Shaha M.D.; Dara M.S.; Nabia A.; Banoa A.; Rasoola R. S.; Sana-Surma,** 2018. Microsatellite mining in the genus *Colletotrichum*. *Gene Rep.* 13:84-93.
- Britton G.; Khachik F.** 2009. Carotenoid content in foods. En: *Carotenoids. Nutrition and Health.* Britton G.; Pfander H., Eds. Birkhäuser Verlag Basel.
- Cerón-Carrillo T.; Munguía-Pérez R.; García S.; Santiesteban-López N. A.** 2014. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*). *Rev Iberoamericana Ci* 1:214-221
- Chang C.; Yang M.; Wen H.m.; Chern J.C.** 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10:178-182.

- Chaturvedi, Y.; Nagar, R.** 2001. Levels of β -carotene and effects of processing on selected fruits and vegetables of the arid zone of India. *Plant Food Hum. Nutr.* 56:127-132.
- Chavarrías M,** 2006. Antimicrobianos naturales y conservación de alimentos. Consultado 07 noviembre 2019. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2006/10/19/25370.php>.
- Chávez-Quintal P.; González-Flores T.; Rodríguez-Buenfil I.; Gallegos-Tintoré S.** 2011. Antifungal activity in ethanolic extracts of *Carica papaya* L. cv. Maradol leaves and seeds. *Indian J. Microbiol.* 51:54-60.
- Coronado H. M.; Vega y León S.; Gutiérrez T. R.; Vázquez F. M.; Radilla V. C.;** 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev. Chil. Nutr.* 42:206-212.
- Craft N.E.; Soares J.H.** 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvent. *J. Agric. Food Chem.* 40:431-434.
- Daglia M.** 2011. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech* 23:174-181.
- Dantas de Menezes H.; Tonani L.; Bachmann L.; Wainwright M.; Úbida L.; Braga G.; Von Zeska K.M.,** 2016. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 164:1-12.
- Fernández-Agulló A.; Pereira E., Freire; P. Valentão M.S.; Andrader P.B.; González-Álvarez J.; Pereira J.A.;** 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind. Crop Prod.* 42:126-132.
- González-Jiménez F.E.; Hernández-Espinosa N.; Cooper-Bribiesca B.; Núñez-Bretón L.C.; Reyes-Reyes M.** 2015. Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud.* 18:16-21.
- He, Y.; Bin W.; Wanping C.; Russell J. C.; Jingren H.; Fusheng C.** 2018. Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Biotechnol. Adv.* 36:739-783.
- Hernández A. R.; Terrazas T.** 2006. Anatomía foliar y del pecíolo de especies del género *hus* s. str. (Anacardiaceae). *Bol Soc Bot Méx* 78:95-10.
- Hu K.; Liu Y.; Oleinick A.; Mirkin M.V.; Huang W.; Amatore C.** 2020. Nanoelectrodes for intracellular measurements of reactive oxygen and nitrogen species in single living cells. *Curr. Opin. Electrochem,* 22:44-50.

Isik E.; Sahin S; Demira C.; Turkben

C. 2011. Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. *J Food Comp Anal.* 24:944-949.

Jasso de Rodríguez, D.; Rodríguez-García, R.; Hernández-Castillo, F.D.; Aguilar-González, C.N.; Sáenz-Galindo, A; Villareal-Quintanikka, J.A.; Moreno-Zuccolotto, L.E. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan desert plants against postharvest fruit fungi. *Ind. Crop. Prod.* 34:960-966.

Juárez Z.; Hernández L. R.; Bacha H; Sánchez-Jrreola E.; Bach H. 2015. Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. xolocotziana and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Ind Crop Prod* 74:178-182.

Khaneghah A.M.; Bagher H.; Seyed M.; Limbo S. 2018. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food Bioprod Process.* 111:1-19.

Kossah R; Zhang H.; Chen W. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control* 22:128-132.

Kuskoski E.M.; Agustín G.; Asuero G.; Troncoso A.M; Manchini-Filho J.; Fett R.; 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25(4): 726-732

Langi, P.; Kiokias, S.; Varzakas, T.; Proestos, C. 2018. Carotenoids. From plants to food and feed industries. En: *Microbial carotenoids: methods and protocols. Methods in Molecular Biology* Vol. 1852. Barreiro, C. y Barredo, J.L., Eds. Springer Science-Business Media.

Lattanzio, V.; Lattanzio, V.M.T.; Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research.* Imperato, F. Ed.

Lim S; An-Hong C.; Misung K.; Eun-Ji J.; Taesun S.; Sang G.L.; Nam-Gil K.; Hyeung-Rak K. 2019. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. *Food Chem.* 278:178-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.058>.

Lima N.; Cursino L.; Lima A.; Souza J.; Oliveira A.; Marinhova J.; Nunez C. 2017. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Deguelia duckeana*. *Rev Bras Farmacogn.* 28:697-702. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.08.004>.

Mathé C.; Barre A.; Jourda C., Dunand C.; 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch of Bioch and Biophy* 500: 58–65

Mangels A.R.; Holden J.M.; Beecher G.; Forman M.R.; Lanza E. 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. *J. Am. Diet. Assoc.* 93:284:296.

- Manimala, M.R.A.; Murugesan, R.** 2014. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. *J. Appl Nat Sci.* 6:649-653.
- Mayer-Miebach E.; Spieß W.E.L.,** 2003. Influence of cold storage and blanching on the carotenoid content of Kintoki carrots. *J Food Eng.* 56: 211-213.
- McCune y Grace,** 2002. Data Transformation. Chapter 9, 67-70. Extraído de <https://www.umass.edu/landeco/teaching/multivariate/readings/McCune.and.Grace.2002.chapter9.pdf>
- Miller N.J.; Sampson J.; Vandeias L.P.; Bramley P.M.; Rice-Evans, C.A.** 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 384:240-242.
- Mitjavila M.T; Moreno J.J.,** 2012. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem Pharmacol.* 84:1113-1122.
- Nestler R.B.; Derby J.V.; DeWitt J.B.** 1949. Vitamin A and carotene content of some wildlife foods. *J. Wildl. Manage.* 13:271-274.
- Nguyen, D.M.C.; Seo, D.J.; Lee, H.B.; Kim, I.S.; Kim, K.Y.; Park, R.D.; Jung, W.J.** 2013. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microb Pathog.* 56:8-15.
- OMS Organización Mundial de la Salud,** 2015. Consultado 08 de Junio, 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Olmedilla-Alonso, B.** 2017. Carotenoids: content in foods, in diet and bioavailability. COST Action Eurocaroten (CA15136) Scientific Newsletter 2:1-9.
- Panche A.N.; Diwan A.D.; Chandra S.R.** 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5:e47. doi:10.1017/jns.2016.41.
- Paziani M.H.; Tonani L.; Dantas de Menezes H.; Bachmann L.; Wainwright M.; Úbida-Leite B.G.; Von Zeska-Kress M.R.,** 2019. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. *Photodiagn Photodyn.* 25:197-203.
- Quintana-Camargo M.; Guzmán-Rodríguez L-F.; Pichardo-González J.M.; Reyes-Guerra J.A.** 2016. Evaluación de calidad de semilla de agrillo (*Rhus trilobata*) del municipio de Arandas, Jalisco, México. *Rev. Cien. Nat. Agro.* 3,6:43-47.
- Rashid T.S.; Kakakhan A.H.; Sijam K.** 2018. Antifungal effects of *Rhus coriaria* L. fruit extracts against tomato anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Ind Crop Prod* 113:391-397.

- Rayne S.; Mazza G.** 2007. Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review. *Plant Foods Hum Nutr.* 62:165-175.
- Razali M.; Didaskalou C.; Kim J.F.; Babaei M.; Drioli E. M.; Lee Y.; Szekely G.** 2017. Exploring and exploiting the effect of solvent treatment in membrane separations. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:11279-11289.
- Ribeiro E.A.; Genofre G.C.; McNamara J.C.,** 2001. Identification and quantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (crustacea, decapoda). *Mar. Fresh Physiol. Behav.* 34:105-116.
- Rodríguez-Assaf L.A.; Pedrozo L.P.; Nally M.C.; Pesce V.M.; Toro M.E.; Castellanos de Figueroa L.I.; Vázquez F.** 2018. Use of yeasts from different environments for the control of *Penicillium expansum* on table grapes at storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 320:108520 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108520>.
- Ruiz, V.E.; Cerioni, L.; Zampini, I.C.; Cuello, S.; Isla, M.I.; Hilal, M.; Rapisarda, V.A.** 2017. UV-B radiation of lemons enhances antifungal activity of flavedo extracts against *Penicillium digitatum*. *LWT* 85:96-103.
- Said Al Amri F.; Amzad-Hossain M,** 2018. Comparison of total phenols, flavonoids and antioxidant potential of local and imported ripe bananas. *Egypt J Basic App. Sci.* 5:245-251. doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.09.002
- Seabra de Oliveiraa N.; Silva-Jlmeida M.R.; Maciel-Pontesa F.M.; Pegrucci-Barcelos M.; Tomich de Paula-Da Silva C.H.; Campos J.M; Soares-Cruz R.A.; Da Silva-Hage-Melim L.I.** 2019. Antioxidant effect of flavonoids present in *Euterpe oleracea* Martius and neurodegenerative diseases: A literature review. *Cent Nerv Sys Agents Med Chem.* 19:75-99.
- Stahl W.; Sies H.** 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Asp. Med.* 24:345-351.
- Stevanato R.; Fabris S.; Momo F.** 2004. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.* 52:6287-6293.
- Stratil P.; Klejdus B.; Kubaa V.** 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables. Evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54:607-616.
- Suárez, Q. M. L.; I. Mendoza B.; J. L. Monroy R.; J. de la Cruz M. O.; Angulo G.; González R.** 2013. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos en papaya cv. Maradol (*Carica papaya* L.). *Rev Iberoam Tec Post.* 14:115-124.

Tabart, J. C.; Kevers, J.; Pincenmail

J. O.; Defraigne J.; Dommes 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113:1226-1233.

Tadolini B.; Juliano C.; Piu, L.; Franconi, F.; Cabrini, L. 2000. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 33:105-114.

Wang D.; Wang L.; Feng-zue Z.; Ji-Ye Z.; Chen-Xia D.; Zou L.; Masayoshi S.; Li-te L. 2008. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chem.* 107:1421-1428.

Wang S.; Zheng Y.; Xiang F.; Li S.; Yang G. 2016. Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. *J. Food Drug Anal.* 24:881-887.

Wu T.; McCallum J.; Wang S.; Liu R.; Zhu H.; Rong T. 2013. Evaluation of antioxidant activities and chemical characterisation of staghorn sumac fruit (*Rhus hirta* L.). *Food Chem.* 138:1333-1340.

Xin Z.; OuYanga Q.; Wanb C.; Chea J.; Lia L.; Chen J.; Tao N. 2019. Isolation of antofine from *Cynanchum atratum* Bunge (Asclepiadaceae) and its antifungal activity against *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biol Tec.* 157:110961.

Yeum, K.J.; Aldini, G.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I. 2009. Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. En: Carotenoids. Nutrition and Health. Birkhäuser Verlag Basel.

Yuan B.; Danaoa M.; Strattona J.e.; Weiera S.A.; Wellera C. L.; Lu M. 2018. High pressure processing (HPP) of aronia berry purée: Effects on physicochemical properties, microbial counts, bioactive compounds, and antioxidant capacities. *Inn. Food Sci Eme Tech.* 47:249-255.

Zapata L.M.; Gerard L.; Davies C.; Schwab, M. C. 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia Docencia y Tecnología* 18:175-193.

Zhu C.; Leie M.; Andargied M.; Zenga J.; Lid J. 2019. Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. *Physiol Mol Plant P.* 107:46-50.

Złotek U.; Mikulska S.; Nagajek M.; Świeca M. 2016. Effect of different solvents and number of extraction steps on polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi J. Biol. Sci.* 23:628-633.

Zuorro A.; Iannone A.; Lavecchia R. 2019. Water-organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers' spent grain. *Processes* 7:126.