



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

***“ESTUDIO ANALÍTICO PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO
DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES EN DIFERENTES
SISTEMAS BIOLÓGICOS.”***

Presenta:

María del Pilar Villafaña Navarrete

Directora:

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Co-director

Dr. Alán Alexander González Ibarra

Guanajuato, Gto. Noviembre 2025



Índice general

Índice general	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas.....	6
CAPÍTULO I.....	7
I. Introducción	7
2.0 Relevancia del estudio de hongos y levaduras como modelos biológicos	9
3.0 Metabolómica en el estudio de extractos vegetales.	12
4.0 Aminocompuestos en plantas	18
4.1 Importancia de las aminas primarias y secundarias biogénicas	18
4.2 Importancia biológica. Efecto de agentes fitoquímicos como moduladores de las vías asociadas con la carcinogénesis	20
4.3. Técnicas analíticas para la determinación de aminocompuestos.	25
4.4. Ventajas de detección específica de aminocompuestos.	31
CAPÍTULO II.....	34
1.0 Objetivo general	34
2.0 Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO III.....	35
III. Parte experimental.....	35
1.0 Equipo de laboratorio	35
2.0 Material de laboratorio	35
3.0 Reactivos.....	35
4.1 Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	36
4.2 Obtención de extractos de plantas medicinales	37
4.3 Evaluación de la actividad biológica sobre el crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	39
4.4 Aislamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
.....	40
4.5 Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre el Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD sólido.	40



4.6 Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD líquido.	41
4.7 Determinación del contenido de flavonoides libres en extractos vegetales.....	41
4.8 Determinación del contenido de fenoles libres en extractos vegetales.	42
4.9 Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales y levaduras mediante ABTS+	42
.....	42
4.10 Análisis metabolómico no dirigido de extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS/MS	42
4.11 Determinación de perfil de amino compuestos por HPLC-ESI-MS/MS en modalidad de adquisición de Precursor Ion Scan	45
CAPÍTULO IV.....	47
1.0 Resultados y discusión	47
1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales	47
1.2 Evaluación del efecto de extractos vegetales en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
1.3. Determinación de fenoles y flavonoides en <i>Selenicereus undatus</i> (Su) <i>Fragaria x ananassa</i> (Fr) y <i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd).....	56
1.4 Análisis metabolómico no dirigido de <i>Fragaria x ananassa</i> y <i>Selenicereus undatus</i> mediante HPLC-ESI-QTOF-MS/MS	58
1.5 Determinación de perfil de amino compuestos en extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS mediante el modo de adquisición de Precursor ion scan.....	72
7.0 Conclusiones.....	78
8.0 Bibliografía	81
9.0 Apéndice	97

Índice de figuras

Figura 1. Aislamiento y cultivo de hongos fitoparásitos de <i>Fusarium</i> en placa de Petri de PDA.	9
Figura 2. Flujo de trabajo de análisis en estudios metabolómicos no dirigidos. ...	16
Figura3. Representación de partes vegetativas de plantas medicinales implicadas en efectos terapéuticos contra diversos tipos de cáncer y sus vías objetivo.....	22
Figura 4. Preparación del sistema biológico para la evaluación de extractos vegetales.	36
Figura 5. Obtención de conidios de <i>Trichoderma atroviride</i>.	36
Figura 6. Conteo de conidios del aislado de <i>Trichoderma atroviride</i>	37
Figura 7. Procedimiento general para la obtención de los extractos utilizados en este estudio.	39
Figura 8. Aislamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio Extracto de Levadura, Papa, Dextrosa (YPD)	40
Figura 9. Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expuesta a extractos vegetales en medio YPD sólido.....	40
Figura 10. Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expuesta a extractos vegetales en medio YPD líquido.	41
Figura 11. Determinación de flavonoides en extractos vegetales.	41
Figura 12. Determinación de fenoles en extractos vegetales.	42
Figura 13. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales .	42
Figura 14. Análisis metabolómico no dirigido de extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS/MS	44
Figura 15. Derivatización de extractos vegetales con 1-methylpyridinium-3-succinylcarbamate (MPSC).....	45
Figura 16. Identificación de amino compuestos presentes en extractos vegetales, mediante la modalidad de Precursor Ion Scan	46
Figura 17. a) Aislamiento, b) Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> (48h) sin exposición a extractos vegetales y c) Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> (120h) sin exposición a extractos vegetales.....	47



Figura 18. a) <i>Kalanchoe daigremontiana</i> 20mg mL⁻¹ b) <i>Senna septemtrionalis</i> 5mg mL⁻¹ y c) <i>Tecoma stans</i> 0.5mg mL⁻¹	48
Figura 19. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Senna septemtrionalis</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.	48
Figura 20. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Casearia corymbusa</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.	49
Figura 21. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Tecoma stans</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.	49
Figura 22. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Fragaria*ananassa</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20 mg mL⁻¹	49
Figura 23. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20 mg mL⁻¹	50
Figura 24. Exposición de <i>Trichoderma atroviride</i> a extracto de <i>Selenicereus undatus</i> a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20 mg mL⁻¹	50
Figura 25. Inóculos de <i>S. cerevisiae</i> en medio YPD sin exposición a los extractos.	53
Figura 26. Inóculos de <i>S. cerevisiae</i> en medio YPD a la concentración de 500 µg L⁻¹ a) <i>K. daigremontiana</i>, b) <i>F. ananassa</i> y c) <i>S. undatus</i>	54
Figura 27. Inóculos de <i>S. cerevisiae</i> en medio YPD a la concentración de 100 µg L⁻¹ a) <i>K. daigremontiana</i>, b) <i>F. ananassa</i> y c) <i>S. undatus</i>	54
Figura 28. Resultados de DO600nm monitoreadas a las 1, 3, 6 y 24 horas de los inóculos de <i>S. cerevisiae</i> expuestas a los extractos de <i>K. daigremontiana</i> (Kd), <i>F. anannasa</i> (Fr) y <i>S. undatus</i> (Su) a una concentración de 500 µg L⁻¹	55
Figura 30. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de <i>Mimosa bahamensis</i>.	73
Figura 31. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de <i>Caesaria corymbusa</i>.	73
Figura 32. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de <i>Tecoma stans</i>.	74
Figura 34. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>.	75

Figura 35. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Selenicereus undatus*. 75

Figura 36. Análisis de componentes principales de los precursores encontrados en los extractos derivatizados y analizados por en la modalidad de Precursor Ion Scan donde le ion producto fue el 135 m/z 76

Índice de tablas

Tabla 1. Alteraciones de los niveles de aminoácidos en diferentes tipos de cáncer 23

Tabla 2. Métodos analíticos utilizados para la determinación de aminoácidos .. 32

Tabla 3. Efectos biológicos reportados en extractos de diferentes especies vegetales 37

Tabla 5. Resultados del efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*..... 51

Tabla 6. Determinación de fenoles y flavonoides en extractos vegetales 56

Tabla 7. Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida con extractos vegetales..... 57

Tabla 8. Resultados del análisis metabolómico no dirigido por HPLC-ESI-MS/MS de *Selenicereus undatus* (Su)..... 59

Tabla 9. Clasificación del perfil metabolómico de *Selenicereus undatus* (Su) de acuerdo a su actividad biológica 64

Tabla 10. Resultados del análisis metabolómico no dirigido por HPLC-ESI-MS/MS de *Fragaria x ananassa* (Fr)..... 66

Tabla 11. Clasificación del perfil metabolómico de *Fragaria x ananassa* (Fr) de acuerdo con su actividad biológica..... 70

Tabla 12: Parámetros analíticos para la determinación de fenoles y flavonoides 97

Tabla 13. Parámetros analíticos para la determinación de capacidad antioxidante. 98



CAPÍTULO I

I. Introducción

Desde tiempos ancestrales, las plantas medicinales han constituido una fuente esencial de remedios naturales para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades. En múltiples culturas alrededor del mundo, especialmente en aquellas con una rica tradición herbolaria, el conocimiento empírico sobre el uso de especies vegetales ha sido transmitido de generación en generación, formando parte integral del sistema de salud comunitario. Dentro de este contexto, la medicina tradicional mexicana (MTM) destaca como un legado cultural y terapéutico profundamente arraigado, que combina prácticas curativas y un vasto conocimiento botánico. México es considerado uno de los países más megadiversos del planeta, alberga una amplia variedad de plantas con propiedades medicinales documentadas tanto en registros históricos como en investigaciones científicas recientes. Se estima que existen más de 4500 especies vegetales con uso medicinal documentado, lo que representa aproximadamente el 15% de la flora nacional. Diversas instituciones, como el Instituto Nacional de Medicina Tradicional (IMTA) y la Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la Biodiversidad (CONABIO) han impulsado esfuerzos para sistematizar este conocimiento ancestral y promover su conservación y validación científica. Como se ha mencionado las plantas medicinales han sido empleadas por diversas civilizaciones para el tratamiento de enfermedades y el mantenimiento de la salud. Su uso está basado en la presencia de compuestos bioactivos (como alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas, taninos entre otros) que poseen propiedades farmacológicas. En estas últimas décadas, el estudio de las plantas medicinales ha despertado un renovado interés científico debido a la necesidad de descubrir nuevas moléculas con potencial terapéutico, especialmente ante la creciente resistencia a fármacos y los efectos adversos de tratamientos convencionales. Este enfoque ha llevado al desarrollo de productos fitoterapéuticos, extractos estandarizados y compuestos aislados que han sido integrados a modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, permitiendo evaluar su seguridad, eficacia y mecanismos de acción. El estudio de los efectos de plantas medicinales sobre sistemas biológicos requiere un enfoque multidisciplinario que combine la etnobotánica, la farmacología, la toxicología y la biotecnología. El avance de la genómica y la metabolómica ha abierto nuevas posibilidades para analizar con mayor profundidad las interacciones planta-organismo. Uno de los principales desafíos en la investigación de las plantas medicinales radica en la estandarización de los extractos, la variabilidad en la composición química dependiendo del ambiente de cultivo y la falta de protocolos experimentales uniformes. A pesar de ello, numerosos estudios han demostrado la validez de ciertos usos tradicionales a través de investigaciones controladas, lo que ha impulsado su inclusión en políticas de salud pública y programas de medicina complementaria.

En la actualidad a nivel mundial se conocen cerca de 250.000 especies vegetales, de las cuales alrededor del 10% han sido materia de estudio en el contexto de su posible actividad farmacológica. Se ha descrito que las propiedades fitoquímicas y los agentes bioactivos no solo depende de la especie de planta sino también de la parte morfológicas de la planta (flor, semilla, tallo, corteza, fruto, hoja y embrión)^{1,2}.

Los efectos biológicos más reportados para extractos vegetales han sido: antidiabético, antiosteoporótico, antimicrobiano, hepatoprotector, antiinflamatorio, antipalúdico, antienvjecimiento, inmunomodulador, antioxidante, antihipertensivo y anticancerígeno principalmente ^{3,4}. La evaluación biológica de los extractos vegetales se puede llevar a cabo en diferentes niveles:

1. Ensayos in vitro, que permiten explorar mecanismos moleculares y celulares mediante líneas celulares específicas o modelos organotípicos,
2. Ensayos in vivo, comúnmente realizados en modelos animales que permiten observar efectos sistémicos, evaluar la farmacocinética, toxicidad y respuesta inmunológica.
3. Estudios clínicos, aunque más limitados son esenciales para validar la eficacia y seguridad en humanos.

Por lo anterior es que es importante contar con sistemas de estudios adecuados para la evaluación de los efectos de los extractos de plantas. En este sentido, una propuesta ha sido la utilización de microorganismos como modelos biológicos en la evaluación de extractos de plantas medicinales como una estrategia científica eficiente, reproducible y ética para la identificación de compuestos bioactivos con potencial terapéutico. El uso de microorganismos permite una primera aproximación al efecto de los metabolitos secundarios de los extractos vegetales, particularmente en lo que respecta a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias y citotóxicas. A nivel internacional, el uso de microorganismos como modelos biológicos en estudios de extractos de plantas es uno de los enfoques más frecuentes y consolidados en farmacología, farmacognosia y microbiología aplicada. Lo anterior debido a factores como:

- **La simplicidad y rapidez experimental.** Los microorganismos (especialmente bacterias y levaduras) son modelos altamente eficientes para estudios preliminares debido a su rápido crecimiento facilidad de cultivo y requerimientos nutricionales mínimos. Esto permite evaluar en poco tiempo los efectos antimicrobianos, mutagénicos, antioxidantes o tóxicos de los extractos vegetales.
- **Alta reproducibilidad y bajo costo.** A diferencia de modelos animales o celulares más complejos, los sistemas microbianos presentan una alta consistencia entre réplicas experimentales y una notable reducción de costos logísticos y éticos lo cual es clave para la exploración inicial de bioactividad.
- **Modelos para actividad microbiana y mecanismos de acción.** Muchas especies bacterianas como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, son modelos estándar para probar extractos con posible acción antibiótica. También pueden emplearse mutantes o cepas específicas para investigar mecanismos moleculares de interacción (REF).

Indicadores de estrés oxidativo y actividad antioxidante. Microorganismos como *S. cerevisiae* permiten estudiar los efectos antioxidantes de extractos vegetales a través de indicadores intracelulares como ROS (especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés), peroxidación lipídica y daño al DNA.



Ensayos estandarizados globalmente. El uso de métodos como Kirby-Bauer, microdilución en caldo y ensayos de inhibición de crecimiento microbiano están estandarizados internacionalmente (CLSI, EUCAST), lo cual facilita la comparación entre estudios y validación interlaboratorio. Aunado a lo anterior, en México se han llevado a cabo estudios sobre la evaluación de extractos de plantas medicinales en sistemas microbiológicos, siendo las bacterias los sistemas más comúnmente utilizados en este tipo de estudios. Algunos de los extractos de plantas evaluados utilizando microorganismos fueron *Arganome mexicana*, *Kalanchoe diagamintiana*, *Capsicum annum*, *Cestrum nocturnum*, *Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* y *Chrysactinia mexicana*. A los cuales se les reportó principalmente actividad antibacteriana.

Por otro lado, aunque se ha descrito muy bien el uso de bacterias y levaduras y sus ventajas para evaluar el efecto de extractos de plantas medicinales en estos sistemas, poco se ha reportado la aplicación de sistemas microbiológicos fúngicos en este tipo de estudios.

2.0 Relevancia del estudio de hongos y levaduras como modelos biológicos

Los hongos tienen un papel muy importante como componentes del microbiota donde actúan como simbioses, endófitos, parásitos o saprófitos^{5,6}, pueden colonizar eucariotas superiores desde plantas hasta humanos⁷. Los hongos, generalmente, pueden ser microscópicos a macroscópicos e incluyen organismos unicelulares como levaduras y organismos multicelulares como los hongos filamentosos. Los hongos filamentosos desarrollan filamentos delgados de 2 a 10 μm (hifas) en intrincadas estructuras de red (figura 1).



Figura 1. Aislamiento y cultivo de hongos fitoparásitos de *Fusarium* en placa de Petri de PDA.

Los hongos, gracias a su crecimiento filamentoso y capacidad de secretar proteínas y metabolitos, son altamente eficaces en la producción natural y biotecnológica de compuestos. Estas propiedades los convierten en herramientas valiosas para industrias sostenibles, con aplicaciones en la producción de textiles, biocombustibles, materiales, alimentos, tratamiento de aguas y fármacos como antibióticos y estatinas^{89,10}. Respecto a las cuestiones ambientales relacionadas con la contaminación y los residuos tóxicos, los



hongos se caracterizan por su alta resiliencia en condiciones de estrés y una notable capacidad de adaptación a diferentes entornos por lo que han sido utilizados en procesos de biorremediación de compuestos farmacéuticos, residuos agrícolas o la degradación de diversos contaminantes¹¹. Una de aplicaciones más importantes es en la agricultura, ya que los hongos pueden participar en la mejora del crecimiento y en la protección de las plantas. Por ejemplo, los hongos micorrízicos establecen una asociación mutualista con las raíces de las plantas, mejorando la absorción de nutrientes por la planta al aumentar el área superficial del sistema radicular. Esta relación ayuda a los sistemas vegetales a acceder a nutrientes como el fósforo y nitrógeno, que no están fácilmente disponibles en el suelo. Por otro lado, los hongos endófitos colonizan el tejido vegetal¹²⁻¹⁴; y su compleja interacción entre los hongos endófitos-tejido vegetal implica la modulación del mecanismo de defensa de la planta en términos de inhibición de fitopatógenos y estimulación del crecimiento de las plantas incluso en condiciones de estrés bióticos y abiótico¹⁵. Las aplicaciones descritas tienen el potencial de mejorar el rendimiento de los cultivos, reducir el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos, evitar el uso de compuestos tóxicos y promover prácticas agrícolas sostenibles¹⁶. En los estudios recientes se ha reportado diferentes enfoques de estudio, para elucidar los componentes de extractos de plantas con el objetivo de poder relacionar los efectos biológicos encontrados en las investigaciones ya realizadas.

De lo anterior, un ejemplo es específico son los hongos del género *Trichoderma* los cuales se han establecido como modelos de estudio clave debido a su versatilidad fisiológica en procesos de biocontrol agrícola. Así mismo nivel industrial su producción de enzimas como quitinasas, celulasas y proteasas es de gran interés biotecnológico y farmacéutico. Por otro lado, en microbiología médica, se ha explorado su uso para la síntesis de compuestos antimicrobianos y nanopartículas, así como para estudios de respuesta fúngica al estrés o metabolitos secundarios. Estudios recientes han documentado el uso de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* y *T. viride* en la evaluación de extractos de plantas como *Azadirachta indica*, *Ocimum basilicum* y *Eucalyptus globulus*. En este sentido, la evaluación de extractos vegetales sobre hongos del género *Trichoderma* ha ido en aumento enfocándose principalmente en: i) la detección de efectos antifúngicos o inhibitorios sobre cepas específicas, ii) la evaluación de la compatibilidad en bioformulados y iii) la comprensión de mecanismos moleculares de resistencia o estrés oxidativo inducido por fitocompuestos. Por lo anterior es que en este proyecto de tesis se planteó el uso de hongos del género *Trichoderma* para llevar a cabo la evaluación del efecto de extractos de plantas medicinales.

Por otro lado, en el contexto de la microbiología industrial y la bioquímica, las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares del reino Fungi (principalmente filums *Ascomycota* y *Basidiomycota*), con capacidad de metabolizar azúcares y otros compuestos orgánicos mediante rutas fermentativas o respiratorias. Poseen un núcleo delimitado, organelos membranosos y pared celular conformada por glucanos, mananos y quitina, lo que les confiere resistencia mecánica y osmótica. Bioquímicamente, destacan por su versatilidad metabólica, utilizando diversas fuentes de carbono y nitrógeno para producir metabolitos primarios como etanol, glicerol, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios de relevancia biológica, además de tener la capacidad de producir biomasa rica en proteínas



y vitaminas. En microbiología industrial, especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Yarrowia lipolytica* funcionan como biocatalizadores en fermentaciones controladas, empleadas en la elaboración de alimentos, bebidas, aditivos nutricionales, bioetanol, enzimas industriales y metabolitos de alto valor agregado. El estudio bioquímico de sus rutas metabólicas permite optimizar el rendimiento, robustez y productividad en procesos industriales. Históricamente la importancia de las levaduras para la humanidad radica en su amplio uso en la producción de alimentos. Por ejemplo, para la producción de productos tradicionales japoneses como condimentos o bebidas alcohólicas *Aspergillus oryzae* es la especie predominante en los procesos de fermentación¹⁷. Sus esporas son mezcladas con arroz calentado, esta mezcla resultante se combina con soja, agua y levaduras para fermentar¹⁸. En este sentido las levaduras del género *Saccharomyces* son a nivel global las más ampliamente utilizadas en la elaboración de cerveza, pan, vino y kéfir¹⁹.

Las levaduras en especial las del género *Saccharomyces* han acompañado a la humanidad desde los orígenes de la producción de pan, cerveza y el vino. Sin embargo, su papel va mucho más allá de la producción de alimentos tradicionales. Actualmente, estos microorganismos son capaces de proveer nutrientes esenciales y compuestos con actividad biológica que pueden no solo satisfacer los requerimientos nutricionales esenciales y asimismo mejorar la salud del ser humano. En este sentido especies como *S. cerevisiae* y *S. boulardii* se emplean ampliamente en la elaboración de extractos nutricionales, suplementos dietéticos y probióticos debido a su alto contenido de proteínas, vitaminas del complejo B, minerales y enzimas digestivas, ingredientes funcionales clave en la alimentación moderna. Las levaduras sintetizan metabolitos secundarios como melatonina, serotonina y tirosol, compuestos con propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y moduladoras del sistema inmune. En forma de extractos deshidratados, también se utilizan como potenciadores naturales del sabor en caldos, salsas y alimentos procesados reemplazando aditivos sintéticos. Y en biotecnología industrial, su versatilidad se extiende a la producción de enzimas, pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas heterólogas utilizadas en fármacos, vacunas y suplementos. Entre los principales procesos de enriquecimiento de levaduras para consumo humano, destacan la bioacumulación de micronutrientes (como Fe, Zn o Se) durante el cultivo, la exposición a condiciones de estrés controlado (como presión elevada, limitación de oxígenos o variaciones de pH) y la adición de compuestos bioactivos en que estimulan las rutas metabólicas específicas. Estos procedimientos permiten modificar de forma dirigida la composición funcional de la biomasa sin comprometer su seguridad ni su viabilidad tecnológica siendo los objetivos principales mejorar el valor nutritivo de productos fermentados, promover la sostenibilidad mediante el aprovechamiento de residuos vegetales o subtratos simples y generar soluciones viables para la prevención de enfermedades a través de la dieta. Por ello, el uso estratégico de cepas de levadura enriquecidas representa una herramienta clave en la biotecnología alimentaria moderna, con impacto tanto en la salud pública como en la innovación del sector

agroalimentario. Un área poco explorada en los procesos de enriquecimiento de levaduras es el uso de extractos de plantas, una estrategia que podría favorecer no únicamente el crecimiento microbiano y perfil metabólico de las levaduras, sino también podría mejorar la capacidad de estos microorganismos para generar biomasa funcional, con aplicaciones en



alimentos, suplementos y productos nutraceuticos. Estudios recientes han demostrado que extractos plantas como *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* o *Pistacia lentiscus* pueden modular la viabilidad de las levaduras industriales e inducir la síntesis de metabolitos secundarios.

En este sentido, los estudios de la interacción entre levaduras y extractos vegetales constituyen una línea innovadora que combina biosprospección, salud y sostenibilidad. La generación de levaduras enriquecidas en metabolitos secundarios abre la puerta a nuevos productos fermentados funcionales, capaces de contribuir a la salud pública, al desarrollo de alimentos de nueva generación y al aprovechamiento biotecnológico de recursos naturales²⁰.

Con base en lo anterior es que en este proyecto de tesis se planteó como objetivo llevar a cabo el estudio sistemático del efecto biológico de extractos de plantas medicinales, utilizando como modelo biológico de estudio levaduras del género *Saccharomyces*. El contexto de esta propuesta de estudio se basó en la simplicidad de llevar a cabo el crecimiento y manejo de las levaduras y por el enfoque en la aplicación del conocimiento generado en procesos de enriquecimiento con especial interés en la síntesis de metabolitos de interés nutraceutico.

Uno de los aspectos importantes en el estudio de los extractos de plantas, es la caracterización química. Para tales efectos, se utilizan herramientas analíticas propias de la metabolómica.

3.0 Metabolómica en el estudio de extractos vegetales.

La metabolómica es el área de investigación emergente que se encarga del estudio cuantitativo y/o cualitativo del conjunto completo de metabolitos presentes en un organismo, tejido, célula o fluido biológico bajo condiciones específicas. Los metabolitos son pequeñas moléculas (<1.5kDa) generadas como intermediarios o productos finales de del metabolismo, e incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, nucleótidos, lípidos, polifenoles, por mencionar algunos²¹. A diferencia de la genómica y la proteómica, la metabolómica refleja de forma directa el fenotipo de bioquímico de un sistema, ya que integra la influencia combinada de la genética, la regulación proteica y los factores ambientales²². Para su estudio se emplean principalmente técnicas analíticas de separación como cromatografía de líquidos o de gases acopladas a espectrometría de masas (LC-MS, GC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN), junto con herramientas bioinformáticas y estadísticas multivariantes para interpretar grandes cantidades de datos.

Existen enfoques dirigidos y no dirigidos para estudiar el metaboloma. Los estudios de metabolómica dirigida se centran en la medición de un tipo específico de metabolitos. Mientras que, la metabolómica no dirigida, o "metabolómica global", utiliza un método de selección o búsqueda de sistemática (unbiased screening) de metabolitos sin basarse en hipótesis previas ni en criterios preseleccionados que puedan sesgar el resultado. En lugar de centrarse únicamente en un conjunto reducido de candidatos esperados o previamente reportados, explora todo el espectro posible de variables medibles dentro de la técnica utilizada, permitiendo descubrir asociaciones o moléculas que no se habrían considerado con un enfoque dirigido. La metabolómica no dirigida pretende identificar miles de



metabolitos en un solo experimento, lo que permite estudios exploratorios de metabolitos desconocidos²³. Los estudios metabolómicos no dirigidos se caracterizan por la medición

simultánea de una cantidad de metabolitos y, por consiguiente, la generación de gran cantidad de datos, caracterizada con una organización compleja, por lo que, existe la necesidad de herramientas bioinformáticas de alto rendimiento²⁴. En el contexto el estudio de la composición de las plantas medicinales la metabolómica ofrece un enfoque integral para: 1) determinar metabolitos primarios y secundarios responsables de propiedades farmacológicas, 2) diferenciar ecotipos, variedades o especies relacionadas según sus huellas metabolómicas lo que es clave para la autenticación y control de calidad de materias primas vegetales, 3) estudiar la influencia de factores ambientales y agronómicos que pueden modificar significativamente el contenido de metabolitos bioactivos, 4) vincular metabolitos con actividad biológica a través de la combinación de ensayos biológicos con análisis multivariantes con el fin de identificar los metabolitos responsables de una actividad específica y 5) ser la base de estudios de seguridad y estandarización mediante la detección de metabolitos potencialmente tóxicos o contaminantes además de contribuir al diseño de extractos estandarizados y reproducibles.

En los estudios metabolómicos se requiere de sensibilidad, reproducibilidad y cobertura analítica amplia, como se mencionó anteriormente, tres plataformas instrumentales son las más utilizadas en estudios metabolómicos, las cuales se describen brevemente a continuación²⁵.

1.- Resonancia magnética nuclear (RMN): Es una técnica espectroscópica rápida y altamente reproducible que se basa en la absorción y reemisión de energía de los núcleos atómicos debido a las variaciones del campo magnético externo. Dependiendo del núcleo atómico al que se dirige el campo magnético aplicado, se generan diferentes tipos de datos metabolómicos.²⁶ Sin embargo, en el análisis de muestras de origen biológico, el hidrógeno es el núcleo más frecuentemente analizado (RMN-1H), debido a su abundancia natural en muestras biológicas. Aunque menos frecuentes otros átomos como el carbono (RMN-13C) y el fósforo (RMN-31P) también son analizados por RMN, lo que proporciona información adicional sobre los tipos específicos de metabolitos²⁷. Los datos espectrales resultantes de la RMN no solo permiten cuantificar la concentración de metabolitos, sino que también proporcionan información sobre su estructura química. Las áreas de los picos espectrales generadas por cada molécula se utilizan como medida indirecta de la cantidad de metabolito en la muestra, mientras que el patrón de los picos espectrales informa sobre las propiedades físicas de la molécula, utilizada para identificar el tipo de metabolito²⁸.

2.- Espectrometría de masas (MS) acoplada a técnicas de separación cromatográfica (LC-MS y GC-MS).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que adquiere datos espectrales en forma de relación m/z e intensidad relativa de los compuestos medidos. Para que el espectrómetro pueda generar las señales para cada metabolito, es necesario que la muestra sea ionizada. Entonces, los compuestos ionizados resultantes de cada molécula generan diferentes patrones de picos que definen la huella de la molécula original²⁹.

En metabolómica, la MS suele ir precedida de un paso de separación, paso que reduce la complejidad del análisis biológico y permite la identificación en MS de diferentes conjuntos de moléculas. Las columnas de cromatografía líquida y de gases son las técnicas de separación más utilizadas³⁰, ya que se basan en la interacción de los diferentes metabolitos



con los materiales adsorbentes de los que se encuentran constituidos estas herramientas. Los metabolitos con diferentes propiedades químicas requerirán diferentes tiempos para pasar por la columna. El tiempo que requiere cada metabolito, llamado tiempo de retención, se utiliza junto con los valores de m/z para generar los dos ejes de los datos espectrales de LC-MS y GC-MS³¹. Siendo LC-MS la técnica más aplicada para el análisis de metabolitos (tanto polares como no polares³²).

En cuanto a las técnicas de MS, la ionización es uno de los factores más importantes en las determinaciones de metabolitos. Uno de los métodos de ionización más utilizados en estudios de metabolómica es la ionización por electrospray (ESI) debido a su alta compatibilidad con técnicas de separación líquida, como la cromatografía de alta o ultra alta resolución (HPLC/UHPLC). El principio de ESI se basa en la formación de microgotas cargadas a partir de una solución eluida, inducida por un campo eléctrico intenso, seguida de evaporación del disolvente y transferencia de carga a las moléculas analizadas. Este proceso de ionización suave minimiza la fragmentación *in-source*, lo que favorece la detección de iones moleculares $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ u otros aductos, preservando la integridad de metabolitos termolábiles. Una de las ventajas clave de ESI en el análisis de metabolitos es su amplio rango de polaridad y masa, que permite detectar desde compuestos muy polares (aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos) hasta metabolitos secundarios de polaridad intermedia (flavonoides, alcaloides, saponinas). Además, ESI es particularmente eficaz para compuestos presentes en bajas concentraciones gracias a su alta eficiencia de ionización, lo que mejora los límites de detección y cuantificación. El modo de ionización (positivo o negativo) se selecciona en función de la química de los analitos, ESI positivo favorece la detección de compuestos básicos o neutros que forman protonados/aductos con cationes (alcaloides, aminos, péptidos), ESI negativo es más adecuado para ácidos orgánicos, polifenoles y compuestos con grupos funcionales ácidos (ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados). En estudios de metabolómica de plantas medicinales, la posibilidad de alternar o combinar ambos modos (positivo y negativo) en un mismo análisis amplía la cobertura metabolómica, maximizando el número de metabolitos detectados y facilitando la comparación quimiométrica entre diferentes muestras. Adicionalmente, su compatibilidad con MS de alta resolución (HRMS) y MS/MS permite no solo la anotación de fórmulas moleculares con alta exactitud, sino también la elucidación estructural mediante fragmentación controlada (CID, HCD). Otro aspecto importante que abona al amplio uso de ESI es su capacidad para ionizar tanto moléculas pequeñas (<1000 amu), como para moléculas grandes como péptidos y proteínas. Por otro lado, una desventaja de usar ESI es que su eficiencia de ionización se ve afectada negativamente por la presencia de sales, por lo que los métodos de cromatografía se limitan al uso de tampones volátiles como el acetato de amonio formiato de amonio. Además, puede ocurrir supresión de iones cuando los metabolitos que coeluyen compiten por un número limitado de iones moleculares, y los metabolitos con baja afinidad por electrones o protones no son bien determinados^{33 34}. En MS los analizadores de masas constituyen el núcleo funcional de un espectrómetro de masas, ya que separan los iones según su relación masa/carga y determinan la resolución, precisión, sensibilidad y velocidad de análisis de un sistema. La elección adecuada del analizador es fundamental para abordar objetivos específicos en metabolómica, como el perfilado global, cuantificación de biomarcadores o elucidación estructural. Cada tipo de analizador tiene ventajas particulares que se alinean con diferentes requerimientos analíticos. Los analizadores de masas de configuración simple incluyen el cuadrupolo (Q),



la trampa de iones lineal (LIT), la trampa de iones cuadrupolar (QIT), el tiempo de vuelo (TOF), etc. Los analizadores de masas dispuestos en una configuración en tándem incluyen la trampa de iones de triple cuadrupolo (QTrap), el triple cuadrupolo (TQ), el cuadrupolo-TOF (Q-TOF) y el Orbitrap de trampa de iones lineal- cuadrupolo (LTQ-Orbitrap)³². La adecuada selección del analizador de masas es decisivo para que los estudios metabolómicos en plantas medicinales sean robustos y significativos. Mientras que el cuadrupolo es ideal para cuantificación dirigida y enfoques económicos, los analizadores de alta resolución como Orbitrap y TOF permiten una cobertura más amplia y una identificación confiable de metabolitos. Las configuraciones híbridas representan un punto ideal para diseñar protocolos que combinen sensibilidad, precisión y profundidad analítica en un solo instrumento, algo muy valioso cuando se trabaja con extractos complejos de plantas^{35 36,37}.

3.- Combinación de RMN y MS (Enfoques integrados).

La integración de datos de RMN y MS permite ampliar la cobertura no solo en cantidad sino también en calidad estructural y cuantitativa de los metabolitos analizados. Estos enfoques de fusión de datos están convirtiéndose en tendencia para estudios no dirigidos en diferentes sistemas biológicos. Para llevar a cabo este tipo de enfoque integrado se emplean técnicas multibloques como MB-PLS-DA, Consensus-PCA o modelos de machine learning para analizar conjuntos de datos combinados.

4.- Procesamiento y análisis de datos en estudios metabolómicos no dirigidos

En metabolómica no dirigida, el análisis de datos posteriores a la adquisición mediante LC-MS, GC-MS, CE-MS u otras plataformas sigue un procedimiento que abarca desde la extracción de características hasta la interpretación biológica, utilizando herramientas quimiométricas avanzadas. En la Fig 2 se presenta un esquema de flujo de trabajo de este tipo de estudios, donde la espectrometría de masas no se limita a la adquisición de datos crudos (raw data), sino depende de un proceso posterior riguroso que integra etapas de procesamiento, identificación, interpretación biológica y el uso de herramientas quimiométricas para la extracción de información relevante³⁸.

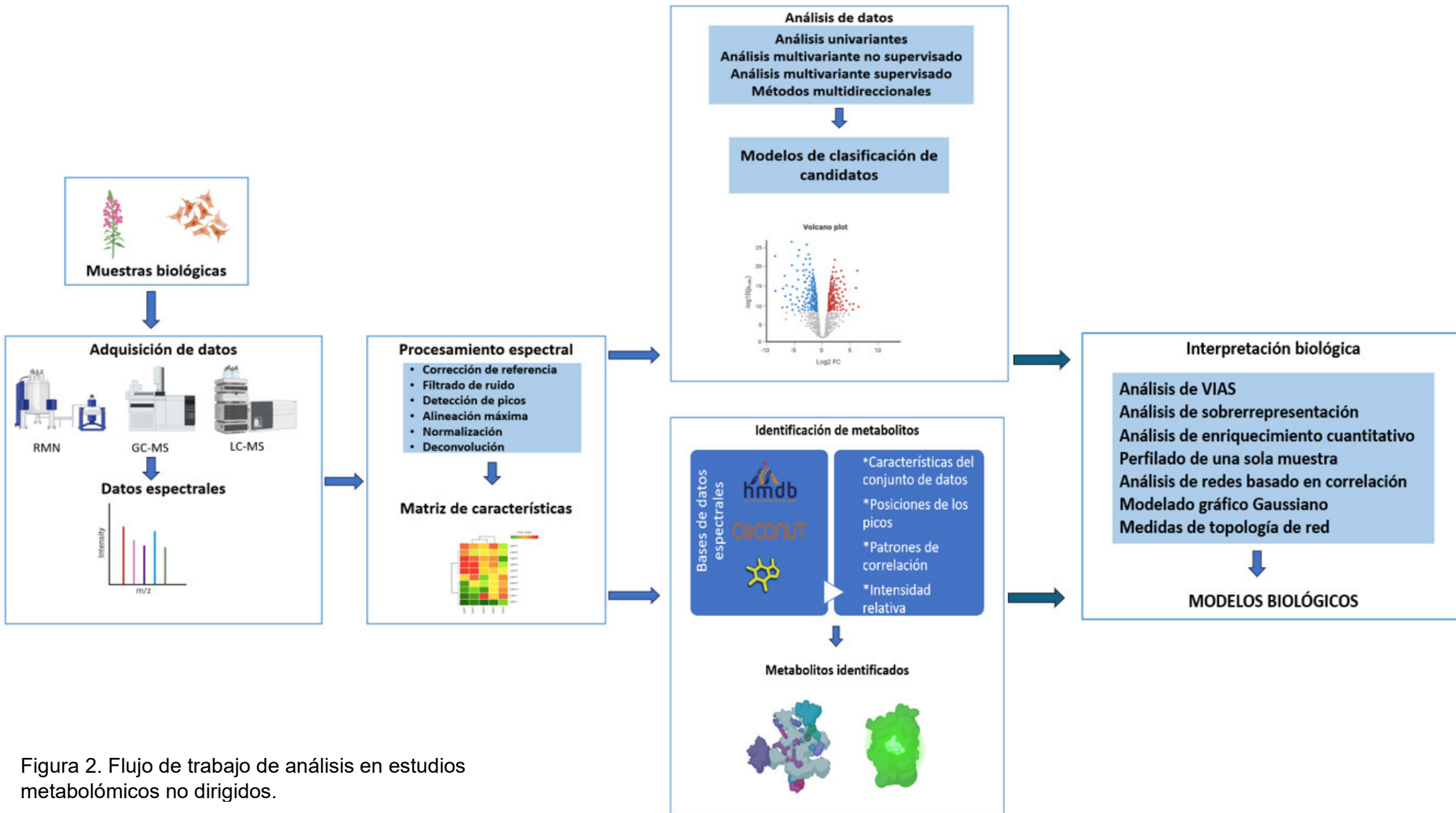


Figura 2. Flujo de trabajo de análisis en estudios metabolómicos no dirigidos.



Después de la adquisición los datos en formatos propios de cada equipo se convierten a formatos abiertos para permitir su uso en plataformas bioinformáticas abiertas (XCMS, Mzmine, MS-DIAL). Las principales etapas incluyen: detección de picos y deconvolución para separar señales superpuestas, alineamiento de tiempos de retención para corregir variaciones instrumentales entre corridas. Posteriormente se eliminan falsas señales y ruido de fondo y se normalizan las intensidades para corregir variaciones no biológicas derivadas de la preparación de muestras, inyección o respuesta instrumental. Los métodos comunes incluyen normalización por: estándares internos marcados isotópicamente, área total de iones (TIC) o cuantiles.³⁹⁻⁴¹

La etapa de la identificación de metabolitos se realiza comparando: i) masa y patrón isotópico con bases de datos de referencia (HMDB, METLIN, MassBank; GNPS, por mencionar algunas), ii) espectros de fragmentación MS/MS contra bibliotecas experimentales o *in silico* y iii) mediante el uso de estándares químicos auténticos para confirmar identidades y asignar niveles de confianza según el sistema MSI (Metabolomics Standards Initiative)^{42,43}. En estudios no dirigidos la anotación se realiza de manera jerárquica siguiendo las recomendaciones de la MSI, para lo cual se han descrito 4 niveles de identificación, Nivel 1: confirmación con estándar químico y espectro de referencia; Nivel 2: Anotación putativa basada en coincidencias con bibliotecas usando m/z patrón isotópico y fragmentación MS/MS; Nivel 3: Asignación a una clase química sin estructura definida; Nivel 4: Señal desconocida pero reproducible.

Posterior a la anotación e identificación, una vez obtenida la matriz de datos (muestras x variables), se aplican técnicas estadísticas y quimiométricas para explorar y modelar información: análisis exploratorio PCA (análisis de componentes principales) para visualizar tendencias, agrupamientos y valores atípicos sin suposición previa. Modelos supervisados: PLS-DA (análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales), OPLS-DA y Random Forest para discriminar grupos y seleccionar variables relevantes (VIP scores). Estadística univariante: ANOVA, t-test, correcciones por FDR para evaluar significancia de metabolitos individuales.^{44,45} En un estudio metabolómico no dirigido, el objetivo es obtener una visión global del perfil químico, detectando y comparando la mayor cantidad posible de metabolitos presentes en las muestras, sin un listado previo. Este enfoque como se ha mencionado es idóneo para: descubrir metabolitos desconocidos o no reportados, detectar patrones químicos asociados a diferencias biológicas, generar hipótesis sobre posibles biomarcadores o compuestos bioactivos. Sin embargo, el análisis no dirigido presenta ciertas limitaciones: mayor incertidumbre en la identificación (especialmente en compuestos sin estándar comercial), cuantificación relativa, no absoluta, alta carga de datos con riesgo de falsos positivos si no se valida posteriormente. Por ello, es recomendable que los hallazgos relevantes de un análisis no dirigido se confirmen y cuantifiquen mediante un estudio dirigido. En este sentido, las ventajas de realizar un estudio metabolómico dirigido son: i) la validación de biomarcadores propuestos, se confirma la identidad mediante comparación con estándares de referencia (Nivel 1 MSI), ii) se asegura la reproducibilidad de la detección en distintas condiciones experimentales, iii) Cuantificación absoluta, el estudio dirigido permite usar curvas de calibración y cuando es posible, estándares internos marcados isotópicamente obteniendo valores precisos en concentraciones, iv) Cobertura focalizada y mayor sensibilidad, al optimizar las condiciones instrumentales para metabolitos específicos, lográndose un límite de detección más bajo y mejor precisión y iv) Relevancia biológica y farmacológica, la cuantificación precisa permite correlacionar la concentración de metabolitos con actividades biológicas o farmacológicas, facilitando la interpretación funcional.

Para el caso de las plantas los metabolitos de estudio prioritario han sido aquellos con: a) relevancia biológica, b) correlación estadística con las variables de interés (como



bioactividad, respuesta al ambiente) y c) con el posible valor como biomarcadores de autenticidad, calidad o efecto farmacológico. Algunos de los estudios dirigidos en plantas se han enfocado en metabolitos con actividades biológicas antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, analgésicas, antimicrobianas, principalmente. En este sentido las ontologías de metabolitos más estudiadas son los polifenoles, flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas, glucósidos, azúcares y amino compuestos. La importancia del estudio de amino compuestos (principalmente aminoácidos) en plantas se describe a continuación.

4.0 Aminocompuestos en plantas

4.1 Importancia de las aminas primarias y secundarias biogénicas

Los aminoácidos aromáticos, se derivan del precursor *chorismato*, que es un intermedio de la vía del shikimato. Esta vía se encuentra en plantas, arqueas, bacterias, hongos, algas y apicomplejos. En las plantas, la vía está localizada en los plastidios y comienza con la condensación de fosfoenol. Las reacciones subsiguientes resultan en la producción de shikimato 3-fosfato, que experimenta una transferencia de grupo enolpiruvato con fosfoenolpiruvato, catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato 3-fosfato sintetasa (EPSPS), para dar lugar a 5-enolpiruvil-shikimato 3-fosfato. El producto es luego desfosforilado por la chorismato sintasa para producir chorismato, que eventualmente se convierte en los aminoácidos aromáticos a través de múltiples reacciones catalizadas por enzimas⁴⁶. El herbicida glifosato tiene como objetivo la EPSPS. El glifosato es un análogo aminofosfónico de la glicina con una alta especificidad por EPSPS. Se ha propuesto que los efectos herbicidas sistémicos del glifosato no solo están asociados con la inhibición de los aminoácidos aromáticos, sino también con la desregulación del metabolismo del carbono, lo que puede atribuirse a la acumulación de shikimato^{47,48}.

La vía de biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada resulta en la producción de isoleucina (Ile), leucina (Leu) y valina (Val) en plantas, arqueas, bacterias y hongos. En las plantas, la vía está localizada en los plastidios, con el piruvato como precursor común [Fig. 2(A)]. Aunque su producción sigue diferentes puntos de ramificación, involucra cuatro pasos enzimáticos conservados catalizados por acetolactato sintasa/acetohidroxiácido sintasa (ALS/AHAS), cetoácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa y aminotransferasa de cadena ramificada. Específicamente, la biosíntesis de Leu y Val comienza con una reacción de condensación catalizada por ALS/AHAS que involucra la descarboxilación de dos moléculas de piruvato para producir 2-acetolactato. Posteriormente, la cetoácido reducto isomerasa produce 2,3-dihidroxi-3-metilbutanoato, que se deshidrata a 3-metil-2-oxobutanoato por la dihidroxiácido deshidratasa. Desde allí, la valina (Val) se sintetiza a través de la aminotransferasa de cadena ramificada. La biosíntesis de leucina (Leu) se ramifica y requiere otros pasos catalizados por enzimas para producir 4-metil-2-oxopentanoato antes de la reacción final catalizada por la aminotransferasa de cadena ramificada. La producción de isoleucina (Ile) requiere un segundo precursor, 2-oxobutanoato, que se forma a partir de la desaminación de treonina (Thr) por treonin



amoniaco-liasa, también conocida como treonina desaminasa. El piruvato y el 2-oxobutanoato se convierten luego en 2-aceto-2-hidroxi-butanoato a través de ALS/AHAS, tras lo cual cetoácido reductoisomerasa produce 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato. En la penúltima etapa, la dihidroxiácido deshidratasa produce 2-oxo-3-metilvalerato, que se convierte en Ile por la aminotransferasa de cadena ramificada. La vía está regulada alostéricamente mediante la inhibición cooperativa de ALS/AHAS por los tres aminoácidos de cadena ramificada.^{49,50}

Existen varios inhibidores de ALS/AHAS como las sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil (tio)benzoatos y sulfonilaminocarbonil-triazolinonas. Estos herbicidas bloquean la entrada al sitio activo de ALS/AHAS, resultando en una inhibición no competitiva o no competitiva.^{49,51}

En las plantas, la vía de síntesis de glutamina (Gln) (está localizada tanto en los plastidios como en el citosol y está involucrada no solo en la producción de aminoácidos, sino también en la asimilación de amoníaco libre tóxico^{52,53}. Esta desintoxicación comienza con la conversión de glutamato (Glu) a Gln a través de una reacción de condensación, utilizando ATP y amoníaco, catalizada por la glutamina sintetasa (GS). La glutamina oxoglutarato aminotransferasa, utiliza ya sea NADPH o ferredoxina como cofactor para catalizar la conversión de Gln y el intermedio del ciclo del ácido tricarboxílico, 2-oxoglutarato, de nuevo a Glu.⁵³

Existen varios inhibidores de GS descritos en la literatura^{52,54}. El más comúnmente utilizado es el compuesto racémico glufosinato-amonio (glufosinato), siendo solo el isómero L un inhibidor competitivo de GS. L-Fosfinotricina (equivalente al isómero activo de glufosinato) se deriva del tripeptido microbianamente producido L-alanil-L-alanil-fosfinotricina, denominado bialafos, que se activa tras la hidrólisis después de ser absorbido por la planta y por tanto se le denomina un "proherbicida". La fitotoxicidad sistémica de glufosinato se ha atribuido tanto a la inhibición de la producción de Gln como a la acumulación de concentraciones tóxicas de amoníaco⁵⁵. Otros inhibidores bien caracterizados de GS incluyen metionina sulfoximina y tabtoxina-β-lactama, aunque se han reportado preocupaciones sobre la toxicidad fuera del objetivo y la falta de fitotoxicidad sistémica, respectivamente⁵⁴. Se acepta generalmente que el mecanismo de acción es similar entre estos inhibidores, donde, al unirse a GS, se fosforilan de manera dependiente de ATP. Esto resulta en una unión no covalente pero muy fuerte de los inhibidores modificados al sitio activo, lo que bloquea la unión de Glu^{52,56-58}.

El ácido aminooxiacético es un inhibidor no selectivo de transaminasas, incluyendo quinurenina transaminasa, GABA transaminasa y aspartato transaminasa. Se ha de mostrado que la presencia de ácido aminooxiacético conduce a una depleción de ATP, lo cual probablemente se debe a la inhibición de la aspartato transaminasa, un componente esencial para llevar a cabo el ciclo malato-aspartato a través de las membranas mitocondriales. Este ciclo es el principal medio para transportar NADH desde el citoplasma hasta las mitocondrias para su oxidación⁵⁹.

Hesperetina (HT) y hesperidina (HD), son dos flavanonas cítricas, un subtipo de flavonoides. Se ha encontrado que estos flavonoides ejercen acciones anti-



gluconeogénicas mediante la inhibición de otras enzimas gluconeogénicas. se ha demostrado que HT y HD tienen un efecto inhibitorio contra estas enzimas, pero con diferentes potencias⁶⁰⁻⁶². HD exhibe un mejor efecto inhibitorio hacia ALT (alanina aminotransferasa). Mientras que HT es un inhibidor más efectivo contra AST (aspartato aminotransferasa). Por lo tanto, HT y HD afectan negativamente la secreción de insulina inhibiendo el metabolismo de alanina y aspartato (y por ende, glutamato)⁶³⁻⁶⁵.

La gabaculina es un inhibidor irreversible de las aminotransferasas de ácido amínico ligadas al fosfato de piridoxal, como la aminotransferasa de aminobutirato, aminotransferasa de β -alanina-piruvato y ornitina oxoácido aminotransferasa⁶⁶⁻⁶⁹.

Estudios más recientes han mostrado que la gabaculina inhibe la L-alanina aminotransferasa, la L-aspartato aminotransferasa y la D-aminoácido aminotransferasa, con una correlación con el intercambio enzimático de protones de su sustrato normal⁷⁰⁻⁷².

4.2 Importancia biológica. Efecto de agentes fitoquímicos como moduladores de las vías asociadas con la carcinogénesis

En los últimos años y con la necesidad de encontrar una cura totalmente efectiva para combatir el cáncer se ha estudiado el efecto anticancerígeno de productos fitoquímicos en diferentes sistemas biológicos, demostrando que algunas de estas plantas contienen metabolitos capaces de inhibir proteínas activadoras relacionadas con células cancerosas, vías de señalización y enzimas como la enzima topoisomerasa, ciclooxigenasa, MMP, MAPK/ERK, TNK, Akt, citoquinas, Bcl-2, PI3K, quinasas CDK4, CDK2, CDC2, objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR), o activando el mecanismo de reparación del ADN, lo que sugiere una buena alternativa de tratamiento contra esta enfermedad, tal y como se muestra en la Figura 2^{1,73,74}.

En secciones anteriores se ha abordado la importancia biológica de los fitometabolitos debido a las diferentes actividades biológicas que presentan. En este punto se abordará el papel biológico de los extractos vegetales, en la búsqueda de soluciones contra el desarrollo de la carcinogénesis, desde la perspectiva de la importancia de los amino compuestos para la homeostasis del organismo.

El cáncer es el crecimiento y la propagación descontrolados de células anormales asociados con una desregulación de la apoptosis. Según la Organización Mundial de la Salud, cada año se diagnostican más de 10 millones de nuevos casos de cáncer con una tendencia estadística en aumento, por lo que múltiples disciplinas científicas ponen como su objetivo combatir esta enfermedad. El esquema del trabajo colaborativo e integrador que se muestra en la Figura 3 reconociendo la importancia de la medicina botánica y en el desarrollo de agentes anticancerígenos.

A pesar de importantes avances ya logrados en farmacología basada en plantas, el desarrollo de los fármacos anticancerígenos efectivos, selectivos seguros y económicamente viables sigue siendo un desafío. En cuanto a los avances, hoy en día se conocen productos fitoquímicos capaces de inhibir la incidencia del cáncer causada por los agentes tales como las radiaciones, virus, productos químicos y la contaminación ambiental.



Entre los diferentes virus implicados en proceso cancerígeno, se pueden mencionar, el virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), varios tipos de virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I). Químicamente, estos agentes son conformados por moléculas de ácidos nucleicos y en conjunto son los causantes del 15% de los casos reportados de cáncer. El fundamento de su mecanismo de acción se sustenta en que estos agentes microscópicos pueden transformar células normales en células cancerosas después de muchos años de latencia de a infección⁷⁵.

Se ha demostrado que existen una amplia gama de fitoquímicos bioactivos que combaten infecciones virales, tales como: los polifenoles, alcaloides, flavonoides, quinonas, terpenos, proantocianidinas, ligninas, taninos, polisacáridos, esteroides, tiosulfonatos y cumarinas.

El mecanismo de acción de estas fitomoléculas antivirales puede explicarse, mediante el bloqueo de la unión del virus con la célula receptora, evitando así el crecimiento y reproducción del virus, otra vía de acción corresponde a la inhibición de enzimas tales como la transcriptasa inversa, que evita la replicación del material genético, mientras que mediante la inhibición de las N-glicohidrolasas se evita que los agentes virulentos penetren la célula⁷⁶.

La radiación ionizante (RI) puede tener efectos directos e indirectos. Directamente, la RI puede interactuar con el ADN y provocar roturas y lesiones en la cadena de ADN. Un efecto indirecto se caracteriza por la generación de especies de radicales libres como los ROS, debido al estrés provocado en organelos como el retículo endoplásmico y la mitocondria o la radiolisis del agua, etc. Las especies oxidativas generadas bajo la radiación pueden interactuar con las macromoléculas biológicas como el ADN, ARN, proteínas y lípidos de membrana, provocando disfunción, desregulación de vías de señalización, entrecruzamiento del ADN, anomalías cromosómicas⁷⁷, cuando tales eventos se vuelven irreversibles, pueden ser los predecesores del inicio de un proceso de carcinogénesis⁷⁸.

El cuerpo humano puede neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante enzimas desintoxicantes como el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el glutatión peroxidasa (GP) y la glutatión reductasa (GR). Este sistema de defensa también incluye antioxidantes de alto peso molecular como la albúmina y la ferritina; y antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión (GSH) y el ácido úrico. Estos sistemas de defensa pueden fallar o ser insuficientes cuando ocurre la excesiva producción de ROS conduciendo al daño oxidativo. Existen fitoquímicos como los polifenoles que son conocidos por su actividad antioxidante ya que sus grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos crean un ambiente rico en electrones que atrapa las ROS impidiéndoles reaccionar con centros nucleofílicos en proteínas celulares y ADN conduce al desarrollo de cáncer, El tabaco, las aflatoxinas son algunos de los carcinógenos que provocan el desarrollo del cáncer por este mecanismo.

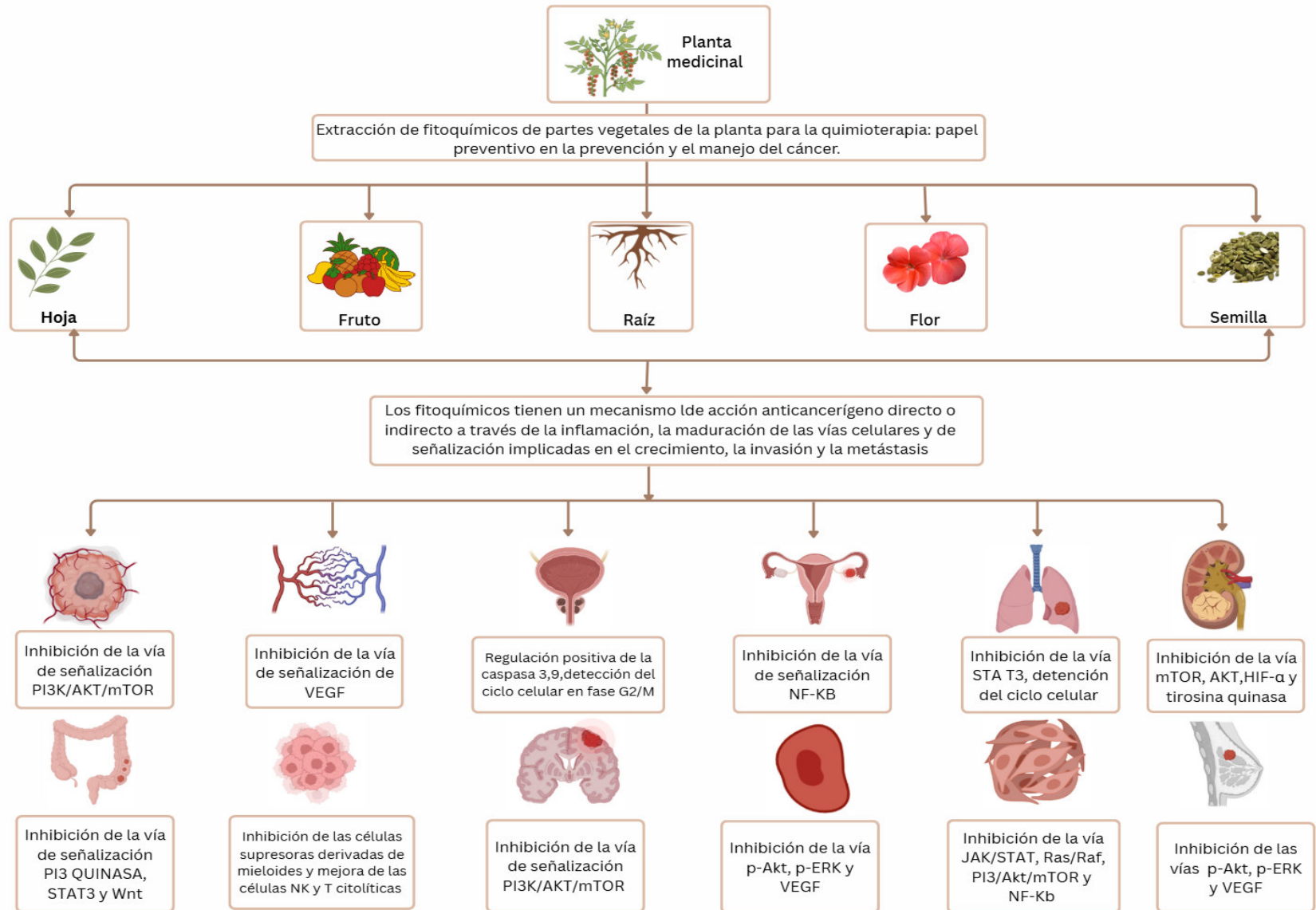


Figura3. Representación de partes vegetativas de plantas medicinales implicadas en efectos terapéuticos contra diversos tipos de cáncer y sus vías objetivo.



Los carcinógenos químicos pueden activarse mediante el metabolismo de fase I o desintoxicarse mediante enzimas de fase I del metabolismo de xenobióticos. Por lo tanto, la modulación de la actividad de las enzimas de fase I o II mediante fitoquímicos puede ser protectora o perjudicial dependiendo de la naturaleza del carcinógeno químico y del tipo de modulación, es decir, inducción o inhibición de la activación y desintoxicación del carcinógeno. La inducción a menudo se logra mediante la activación de la expresión de la enzima. La inhibición, por otro lado, a menudo se debe a la inhibición directa de la actividad metabólica de la enzima y ocasionalmente, a la inhibición de su expresión genética. Se ha demostrado que varios fitoquímicos como los polifenoles, glucosinatos, flavonas, flavonoles, etc. Inducen o inhiben enzimas fase I o fase II en el metabolismo de xenobióticos. Se sabe que la activación del proceso de la proliferación y diseminación del cáncer es debido a la capacidad de las células cancerígenas de generar su propio sistema de abastecimiento de nutrientes mediante la angiogénesis ^{79,80}.

Las metaloproteasas de matriz son enzimas líticas que degradan la membrana basal de las células epiteliales. Al coordinarse lo hacen por medio de tres aminoácidos que pueden variar entre histidina, glutamato, aspartato, lisina y arginina ⁸¹. Este grupo de proteínas son cruciales para la angiogénesis y el potencial metastásico de un tumor. Incluye colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-7) y elastasas (MMP-12). Se ha informado que compuestos fitoquímicos como el galato de epigallocatequina (EGCG) inhiben la actividad de MMP-2 y MMP-9. ⁸²

Estudios recientes han indicado que los aminoácidos cumplen propósitos esenciales de equilibrio redox, la regulación energética, son cruciales en la biosíntesis de proteínas y en el mantenimiento de la homeostasis. Esta amplia gama de actividades metabólicas ha despertado el interés en el entendimiento del papel de aminoácidos en el desarrollo del cáncer. En la tabla 1 se muestra las alteraciones de los aminoácidos reportados en diferentes tipos de cáncer. ⁸³

Tabla 1. Alteraciones de los niveles de aminoácidos en diferentes tipos de cáncer

Tipo de cáncer	AA en aumento	AA en disminución
Colorrectal	----	Lys, Ala, Asp, Gly, His, Leu/Ile, Met, Sarc, Thr, Tyr, Val, Asn, Gln, Cit, Phe, Try, Trp.
Pulmonar	Pro, Ile, Phe, Leu, Ser, Gly, Orn, Ala, Tyr, Met, Lys.	His, Trp, Cit, Gln, Asn.
Mama	Thr, Pro, Ser, Gly, Ala, Orn, Arg.	Gln, Trp, His, Phe, Tyr, Gly, Asp.
Linfoma	Phe, Orn.	Thr, Ser, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Tyr, Lys, His, Arg.
Esofágico	Leu.	Thr, Ser, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Gly, Ala, Val, Tyr, Lys, His, Arg, Phe, Orn.
Sarcoma metastásico	Ser, Leu.	Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Gly, Ala, Val, Try, Phe, Orn, Lys, His, Arg.
Osteosarcoma	Glu, Gln, Val, Tyr, Lys.	Thr, Pro, Gly, Ala, Leu, Phe, Orn, His, Arg.



Sarcoma de tejidos blandos de The, Ser, Glu, Gln, Gly, Ala, Val, Asp, Asn, Pro, Tyr, His, Leu, Orn, Lys, Arg.

Al hablar de rutas biosintéticas y bioenergéticas podemos encontrar la contribución de los aminoácidos (AA) a través de la síntesis de la Acetil-CoA, la lipogénesis, mediada por el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Además, la síntesis de los nucleótidos se puede llevar a cabo gracias al proceso biosintético de purinas y pirimidinas.

La glicina, la glutamina y el aspartato sirven como donantes de carbono para las nucleobases y la glicina, serina y metionina, en forma de formiato proporcionan unidades de carbono a través del ciclo de la metionina- folato⁸⁴⁻⁸⁷.

Sin embargo, durante los procesos biosintéticos y bioenergéticos los aminoácidos pueden producir derivados que favorecen el crecimiento del cáncer, un ejemplo de esto son las poliaminas derivadas de la arginina, que alteran la expresión genética ya que modulan la estructura global de la cromatina y la proliferación de células cancerosas. Otro ejemplo es la quinurenina producida a partir de triptófano, ya que induce inmunosupresión al unirse y activar el receptor del factor de transcripción de hidrocarburos de arilos (AhR). Esto afecta la capacidad de las células dendríticas inmunotolerantes y de las células T reguladoras para atacar y eliminar las células cancerosas⁸⁸⁻⁹³.

La proliferación de células cancerosas provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar las macromoléculas y, en última instancia, provocar la muerte celular. Para contrarrestar, las células cancerosas dependen de la síntesis de glutatión a partir de glutamato, glicina y cisteína para mediar en el equilibrio redox⁹⁴⁻⁹⁶.

Durante el ciclo del folato también se produce una cantidad significativa de NADPH utilizando principalmente unidades de carbono derivadas de serina⁹⁷. Los aminoácidos también son fundamentales en la mediación de la regulación epigenética y la modificación postranscripcional^{98,99}. Por ejemplo, la metilación del ADN y de las histonas está regulada por niveles equilibrados de metabolitos en el ciclo de la metionina, que a su vez se encuentra influenciado por la serina y la glicina.

De manera similar, los eventos de acetilación de histonas que promueven la expresión genética y la progresión del cáncer requieren acetil-CoA, que puede derivarse de los aminoácidos de cadena ramificada y la lisina. La acetil-CoA derivada de aminoácidos también es relevante para la acetilación de proteínas que puede favorecer el crecimiento tumoral^{98,100,101}.

Las transaminasas son una clase importante de enzimas en el contexto de procesos cancerígenos. Al facilitar la interconversión de aminoácidos, las transaminasas permiten la explotación de las diversas funciones de los aminoácidos de fuentes irregulares. El aspartato transaminasa, es esencial para el equilibrio redox y el crecimiento de las células de cáncer de páncreas. En el cáncer colorrectal, los niveles de fosfoserina aminotransferasa 1, se han visto implicados en un mal pronóstico. La alta demanda de aminoácidos esenciales (AAE) para favorecer el crecimiento de las células cancerosas conduce a una



regulación positiva de los transportadores de AAE para satisfacer estos requisitos, una característica común de muchos cánceres.

Por todo lo expuesto en la relación al papel de aminoácidos en carcinogénesis y en la progresión de estas enfermedades, el interés se enfoca en la búsqueda de productos fitoquímicos-inhibidores de la síntesis de aminoácidos¹⁰²⁻¹⁰⁶.

Diversos estudios aseguran, que la absorción, el efecto biológico, el metabolismo y la excreción de fitoquímicos, dependen en gran medida de las características fisicoquímicas de los compuestos y de su susceptibilidad a la transformación al involucrarse con el ambiente bioquímico del organismo con el que interactúan. Esta interacción se ve reflejada en la variación de los niveles expresados de los diversos componentes bioquímicos de los organismos en cuestión. Al hablar de amino compuestos, diversas fuentes afirman, que los polifenoles, influyen en contenido de estos compuestos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

4.3. Técnicas analíticas para la determinación de aminocompuestos.

Para demostrar la actividad de los diferentes extractos vegetales en términos de inhibición de la síntesis de aminoácidos, se requiere contar con un procedimiento confiable que permita cuantificar estos compuestos en microorganismos y comparar los niveles de estas biomoléculas entre los organismos expuestos al extracto de la planta y los no sometidos ha dicho estrés.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una poderosa herramienta que permite la separación de mezclas complejas en AA libres¹¹⁰. En comparación con otros métodos analíticos, presenta ventajas en términos de tiempos de análisis más cortos, mayor resolución, mayor sensibilidad y reproducible. En la tabla 2 se puede observar las diferentes técnicas analíticas que se han utilizado para la determinación de aminoácidos. Esta técnica analítica se ha combinado con numerosos métodos de detección y ha experimentado un número cada vez mayor de nuevas fases estacionarias específicas y selectivas que han mejorado la sensibilidad y especificidad en la determinación de AA¹¹⁰.

Las técnicas cromatográficas más utilizadas para separar y cuantificar aminoácidos incluyen la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía en fase reversa¹¹¹. Para la cromatografía de intercambio iónico se emplea una columna de intercambio catiónico. La separación aprovecha de los aminoácidos su propiedad zwitterionica, dada por la presencia de los grupos amino y carboxilo¹¹².

Algunas metodologías reportadas para la determinación de aminoácidos por cromatografía de fase reversa emplean el uso de una columna de octadecilsilano (C18) y un gradiente a base de acetonitrilo y metanol, sin embargo, los aminoácidos no se resuelven en su totalidad mediante esta técnica y sólo los aminoácidos hidrófobos como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina se separan con algún grado de éxito. En consecuencia, los aminoácidos deben derivatizarse antes de esta cromatografía. La derivatización química tiene diferentes funciones: i) hacer que los aminoácidos sean más hidrófobos, ii) permitir la detección mediante absorbancia o fluorescencia. iii) mejorar la eficiencia de ionización iv) proporciona estabilidad química y v) mejora el rendimiento de separación por HPLC.



En la actualidad, para la determinación cromatográfica de aminocompuestos existe una variedad de metodologías que mejoran la sensibilidad de estas moléculas, como lo es el uso de ortoftalaldehído (OPA)¹¹³, cloroformiato de 9-fluoremetilo (FMOC-Cl)¹¹⁴, 5-(dimetilamino)-cloruro de naftaleno-1-sulfonilo (Dansyl-Cl), 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)¹¹⁵ y 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (AQC)¹¹⁶.

Sin embargo, aunque la sensibilidad analítica de los aminoácidos es mayor, el tiempo analítico aún sigue siendo un reto. En los últimos años se ha desarrollado otro derivatizante; 3 aminopiridil-N-hidroxisuccinimidilo (APDS)¹¹⁷ que ha permitido la separación e identificación de al menos 105 aminocompuestos en un corto tiempo, representando una buena alternativa para la resolución de muestras fisiológicas. Debido a la introducción de un grupo aminopiridilo que aumenta la hidrofobicidad de los derivados, facilitando su retención y separación mediante HPLC de fase inversa. aumenta la hidrofobicidad de los derivados, facilitando su retención y separación mediante HPLC de fase inversa.

Se ha comprobado que la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, (GS-MS) son una alternativa, útil y adecuada para el análisis de aminoácidos. Para la utilización de esta técnica con este objetivo, se tiene la necesidad de un proceso de derivatización las técnicas más actuales describen una reacción de sililación de los grupos amino y carboxilo utilizando bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)¹¹⁸. La sililación es un procedimiento de derivatización adecuado para una gran cantidad de moléculas polares, basada en la sustitución de los átomos de hidrógeno activos de los grupos OH, NH, SH, por un grupo sililo. La consiguiente reducción de interacción dipolo-dipolo de las moléculas objetivo da como resultado su transformación en moléculas de baja polaridad, mayor volatilidad y alta estabilidad térmica, lo que las hace adecuadas para ser analizadas por GC-MS con una notable mejora en la resolución. Otra alternativa de derivatización es el uso del metil-N-(terc-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA)¹¹⁹. Este derivatizante produce derivados de dimetil-terc-butilsililo (TBDMS), que se caracterizan por un mayor peso molecular en comparación con los derivados de trimetilsililo (TMS) producidos por el BSTFA, como consecuencia de la elución de estos derivados de TBDMS son considerablemente más estables¹²⁰

El análisis de aminoácidos es un procedimiento complejo de varios pasos y puede producir resultados variables incluso dentro de un mismo lote determinado de muestras. El uso de estándares internos y externos es importante para reducir la variabilidad de los datos.

Los estándares internos se agregan a las muestras y se analizan junto con los compuestos de interés. Los estándares internos deben ser compuestos que estén disponibles en forma pura y que sean estables en las condiciones a las que serán sometidos, además, también deben separarse cromatográficamente de todos los demás compuestos y deben ser detectables utilizando el método de detección elegido. Funcionan como control de calidad para la adición de tampones y reactivos, la inyección y la eficiencia de la derivatización. Algunos ejemplos de estándares internos utilizados en el análisis de aminoácidos incluyen norleucina, norvalina y ácido α -aminobutírico¹²¹⁻¹²³.



En el análisis de AA libres, los estándares utilizados para la calibración/ cuantificación suelen ser mezclas comerciales de AA de conocida composición. Dado que el estándar externo debe ser un AA puro, es probable que la matriz difiera de la de algunas muestras, particularmente de los alimentos y muestras biológicas. En consecuencia, no es apropiado corregir los datos de composición de aminoácidos para las recuperaciones de aminoácidos en el patrón externo. A diferencia de los estándares internos, los estándares externos proporcionan una idea de la competencia de todo el proceso del análisis de aminoácidos¹²⁴.

Algunos de los principales factores que contribuyen a la variabilidad en el análisis de aminoácidos es que no existe una metodología universal para su determinación y debido a esto se han considerado diferentes medidas analíticas para contrarrestar esta variabilidad, entre las alternativas que se sugieren, el uso de material libre de aminoácidos contaminantes, mediante una estrategia de limpieza eficiente.

La mala homogeneidad de las muestras es un factor importante que contribuye a una alta variación analítica. Por lo general, de la muestra a granel se toma una submuestra que es tratada dependiendo de las necesidades y naturaleza de la muestra, es decir, se pueden someter a secado, liofilizado, mezcla para la unión de todas las fases y/o la molienda para obtener partículas más finas y pequeñas.

El pesaje de la muestra es el siguiente paso que debe ser vigilado para evitar y contrarrestar la variabilidad analítica, los instrumentos utilizados para esta actividad deben ser calibrados constantemente interna y externamente¹²⁵.

Las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de pesarse, para evitar la absorción de agua de la atmosfera. Para muestras líquidas cualquier pipeta que se utilice debe calibrarse periódicamente y el grado de la variabilidad de dosificación¹²⁶. Todas estas estrategias que han sido explicadas serán aplicadas para garantizar la calidad de los resultados en la evaluación del efecto inhibitorio de aminoácidos libres.

Existe otra vertiente que no es el objetivo de esta investigación pero que es importante considerar y son las estrategias para la determinación de aminoácidos totales, que de manera general comprende el monitoreo del *pH* debido a que, este parámetro debe garantizar la ionización de los diferentes aminoácidos hidrolizados, si es que la determinación se hará mediante intercambio iónico, otra consideración que se debe hacer es la adición de los estándares internos al inicio del procedimiento, lo que permite la corrección de la pérdida física durante la hidrólisis. La recuperación del estándar interno se puede utilizar para corregir los datos de composición de aminoácidos en busca de pérdidas físicas, únicamente si las recuperaciones son casi completas (es decir, pérdidas <10%). Los estándares externos deben ser proteínas puras (evitando las glicoproteínas, ya que presentan una variación en el contenido de oligosacáridos) y ser recuperados casi en su totalidad¹²⁶.

El análisis de aminoácidos se puede realizar en alimentos de origen vegetal/animal, en microorganismos, tejidos de plantas y animales o en fluidos biológicos como sangre, orina, contenido gástrico, saliva, etc. El análisis de estos compuestos puede ser dirigido a aminoácidos contenidos en proteínas, aminoácidos libres o totales. Dependiendo del



objetivo, tratamiento de muestra varia. Para la determinación de aminoácidos libres es necesaria la extracción de la muestra sin causar la degradación de proteínas. En el tratamiento de las muestras se debe considerar su naturaleza física, con el fin de mantener la integridad fisicoquímica de los aminoácidos. En las muestras líquidas es importante la eliminación de agua, para evitar reacciones químicas como degradación enzimática, no enzimática, procesos de oxidación y desnaturalización de proteínas que provoquen la pérdida de la calidad de la muestra. Por lo que se opta por el uso de centrifugación, para separar la fase celular de la fase acuosa que lo contiene, evitando la ruptura celular y posteriormente la aplicación de la técnica de liofilización para garantizar la eliminación del agua¹²⁶. Posteriormente se debe proceder con el lisado celular que puede llevarse a cabo mediante el uso de la fuerza centrífuga, otra alternativa para la lisis mecánica puede ser el uso de energía ultrasónica, posteriormente se debe agregar un agente precipitante que ayude a la eliminación de proteínas y un agente que disminuya los compuestos celulares de carácter polar¹²⁷. En el caso de las muestras sólidas, deben pasar por un proceso de trituración hasta obtener un polvo fino, para posteriormente continuar con la precipitación de proteínas y limpieza de la muestra.

Para la determinación de los aminoácidos totales es necesario liberar los aminoácidos que conforman proteínas por lo que se sugiere realizar la hidrólisis de estas moléculas. El método estándar de hidrólisis es la incubación de la muestra en un ambiente libre de oxígeno, condiciones ácidas fuertes y a una temperatura constante que circunde entre los 110°C durante 18 a 24 horas¹²⁸⁻¹³¹.

La mayoría de los aminoácidos son relativamente estables; sin embargo, la cisteína, la metionina y el triptófano pueden oxidarse, mientras que la lisina puede reaccionar con otros compuestos presentes en la muestra, por lo que es recomendable almacenar las muestras a bajas temperaturas y en la oscuridad¹²⁶

permite la separación de mezclas complejas en AA libres¹¹⁰. En comparación con otros métodos analíticos, presenta ventajas en términos de tiempos de análisis más cortos, mayor resolución, mayor sensibilidad y reproducible. En la tabla 2 se puede observar las diferentes técnicas analíticas que se han utilizado para la determinación de aminoácidos. Esta técnica analítica se ha combinado con numerosos métodos de detección y ha experimentado un número cada vez mayor de nuevas fases estacionarias específicas y selectivas que han mejorado la sensibilidad y especificidad en la determinación de AA¹¹⁰.

Las técnicas cromatográficas más utilizadas para separar y cuantificar aminoácidos incluyen la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía en fase reversa¹¹¹. Para la cromatografía de intercambio iónico se emplea una columna de intercambio catiónico. La separación aprovecha de los aminoácidos su propiedad zwitteriónica, dada por la presencia de los grupos amino y carboxilo¹¹².

Algunas metodologías reportadas para la determinación de aminoácidos por cromatografía de fase reversa emplean el uso de una columna de octadecilsilano (C18) y un gradiente a base de acetonitrilo y metanol, sin embargo, los aminoácidos no se resuelven en su totalidad mediante esta técnica y sólo los aminoácidos hidrófobos como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina se separan con algún grado de éxito. En consecuencia, los



aminoácidos deben derivatizarse antes de esta cromatografía. La derivatización química tiene diferentes funciones: i) hacer que los aminoácidos sean más hidrófobos, ii) permitir la detección mediante absorbancia o fluorescencia. iii) mejorar la eficiencia de ionización iv) proporciona estabilidad química y v) mejora el rendimiento de separación por HPLC. En la actualidad, para la determinación cromatográfica de aminocompuestos existe una variedad de metodologías que mejoran la sensibilidad de estas moléculas, como lo es el uso de ortoftalaldehído (OPA)¹¹³, cloroformiato de 9-fluoremetilo (FMOC-Cl)¹¹⁴, 5-(dimetilamino)-cloruro de naftaleno-1-sulfonilo (Dansyl-Cl), 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)¹¹⁵ y 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (AQC)¹¹⁶

Sin embargo, aunque la sensibilidad analítica de los aminoácidos es mayor, el tiempo analítico aún sigue siendo un reto. En los últimos años se ha desarrollado otro derivatizante; 3 aminopiridil-N-hidroxisuccinimidilo (APDS)¹¹⁷ que ha permitido la separación e identificación de al menos 105 aminocompuestos en un corto tiempo, representando una buena alternativa para la resolución de muestras fisiológicas. Debido a la introducción de un grupo aminopiridilo que aumenta la hidrofobicidad de los derivados, facilitando su retención y separación mediante HPLC de fase inversa, aumenta la hidrofobicidad de los derivados, facilitando su retención y separación mediante HPLC de fase inversa.

Se ha comprobado que la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, (GS-MS) son una alternativa, útil y adecuada para el análisis de aminoácidos. Para la utilización de esta técnica con este objetivo, se tiene la necesidad de un proceso de derivatización las técnicas más actuales describen una reacción de sililación de los grupos amino y carboxilo utilizando bis(trimetilsilil)trifluorocetamida (BSTFA)¹¹⁸. La sililación es un procedimiento de derivatización adecuado para una gran cantidad de moléculas polares, basada en la sustitución de los átomos de hidrógeno activos de los grupos OH, NH, SH, por un grupo sililo. La consiguiente reducción de interacción dipolo-dipolo de las moléculas objetivo da como resultado su transformación en moléculas de baja polaridad, mayor volatilidad y alta estabilidad térmica, lo que las hace adecuadas para ser analizadas por GC-MS con una notable mejora en la resolución. Otra alternativa de derivatización es el uso del metil-N-(terc-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA)¹¹⁹. Este derivatizante produce derivados de dimetil-terc-butilsililo (TBDMS), que se caracterizan por un mayor peso molecular en comparación con los derivados de trimetilsililo (TMS) producidos por el BSTFA, como consecuencia de la elución de estos derivados de TBDMS son considerablemente más estables¹²⁰

El análisis de aminoácidos es un procedimiento complejo de varios pasos y puede producir resultados variables incluso dentro de un mismo lote determinado de muestras. El uso de estándares internos y externos es importante para reducir la variabilidad de los datos.

Los estándares internos se agregan a las muestras y se analizan junto con los compuestos de interés. Los estándares internos deben ser compuestos que estén disponibles en forma pura y que sean estables en las condiciones a las que serán sometidos, además, también deben separarse cromatográficamente de todos los demás compuestos y deben ser detectables utilizando el método de detección elegido. Funcionan como control de calidad para la adición de tampones y reactivos, la inyección y la eficiencia de la derivatización.



Algunos ejemplos de estándares internos utilizados en el análisis de aminoácidos incluyen norleucina, norvalina y ácido α -aminobutírico¹²¹⁻¹²³. En el análisis de AA libres, los estándares utilizados para la calibración/ cuantificación suelen ser mezclas comerciales de AA de conocida composición. Dado que el estándar externo debe ser un AA puro, es probable que la matriz difiera de la de algunas muestras, particularmente de los alimentos y muestras biológicas. En consecuencia, no es apropiado corregir los datos de composición de aminoácidos para las recuperaciones de aminoácidos en el patrón externo. A diferencia de los estándares internos, los estándares externos proporcionan una idea de la competencia de todo el proceso del análisis de aminoácidos¹²⁴.

Algunos de los principales factores que contribuyen a la variabilidad en el análisis de aminoácidos es que no existe una metodología universal para su determinación y debido a esto se han considerado diferentes medidas analíticas para contrarrestar esta variabilidad, entre las alternativas que se sugieren, el uso de material libre de aminoácidos contaminantes, mediante una estrategia de limpieza eficiente.

La mala homogeneidad de las muestras es un factor importante que contribuye a una alta variación analítica. Por lo general, de la muestra a granel se toma una submuestra que es tratada dependiendo de las necesidades y naturaleza de la muestra, es decir, se pueden someter a secado, liofilizado, mezcla para la unión de todas las fases y/o la molienda para obtener partículas más finas y pequeñas.

El pesaje de la muestra es el siguiente paso que debe ser vigilado para evitar y contrarrestar la variabilidad analítica, los instrumentos utilizados para esta actividad deben ser calibrados constantemente interna y externamente¹²⁵.

Las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de pesarse, para evitar la absorción de agua de la atmosfera. Para muestras líquidas cualquier pipeta que se utilice debe calibrarse periódicamente y el grado de la variabilidad de dosificación¹²⁶. Todas estas estrategias que han sido explicadas serán aplicadas para garantizar la calidad de los resultados en la evaluación del efecto inhibitorio de aminoácidos libres.

Existe otra vertiente que no es el objetivo de esta investigación pero que es importante considerar y son las estrategias para la determinación de aminoácidos totales, que de manera general comprende el monitoreo del *pH* debido a que, este parámetro debe garantizar la ionización de los diferentes aminoácidos hidrolizados, si es que la determinación se hará mediante intercambio iónico, otra consideración que se debe hacer es la adición de los estándares internos al inicio del procedimiento, lo que permite la corrección de la pérdida física durante la hidrólisis. La recuperación del estándar interno se puede utilizar para corregir los datos de composición de aminoácidos en busca de pérdidas físicas, únicamente si las recuperaciones son casi completas (es decir, pérdidas <10%). Los estándares externos deben ser proteínas puras (evitando las glicoproteínas, ya que presentan una variación en el contenido de oligosacáridos) y ser recuperados casi en su totalidad.¹²⁶



4.4. Ventajas de detección específica de aminocompuestos.

Un perfil de aminocompuestos en una muestra biológica se puede utilizar para el diagnóstico temprano de diversas enfermedades. Ya que estas biomoléculas son precursores de numerosos biomarcadores, por ejemplo, tirosina y prolina para 3-nitrotirosina y trans-hidroxiprolina, respectivamente. Su presencia en el aire exhalado puede

indicar estrés nitrosativo en los pulmones^{132,133}. En el plasma de niños autistas, se observan niveles significativamente más bajos de AA como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina y cisteína que en muestras de control¹³⁴. De igual manera, en el caso de la resistencia a la insulina, se identificaron algunos trastornos del perfil de AA¹³⁵. Se han determinado los niveles de fenilalanina, leucina, valina, citrulina y metionina para el diagnóstico de fenilcetonuria, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, citrulinemia y homocistinuria, respectivamente¹³⁶⁻¹³⁸. El error innato del metabolismo puede determinarse a partir del perfil de aminoácidos^{139,140}. Además, en el caso de enzimopatías (fenilcetonuria y enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce) y trastornos del transporte de AA (cistinuria), el perfil de AA marcado puede ayudar a evaluar el estado nutricional de los seres humanos, el cumplimiento dietético, la función renal, el daño tisular y los problemas de neuropatía^{141,142}. Un uso interesante del perfil de AA es su correlación con el dolor. Los AA también parecen transmitir señales de dolor y podrían estar involucrados en este síndrome¹⁴³. Hasta hace poco, estos problemas de salud se atribuían únicamente a la composición de L-aminoácidos. Estudios recientes han demostrado que los d-aminoácidos (D-AA) están presentes en los organismos en mayor cantidad y cantidad de lo que se creía anteriormente. Los D-AA cumplen ciertas funciones biológicas en el organismo¹⁴⁴ y se consideran nuevos compuestos bioactivos y biomarcadores¹⁴⁵.

Se han realizado investigaciones que demuestran que el transportador de aminoácidos tipo L 1 se asocia con la quimiorresistencia en el cáncer de mama mediante la promoción del metabolismo de aminoácidos¹⁴⁶. Además, en el caso de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, se observaron alteraciones en las concentraciones plasmáticas de aminoácidos y sus derivados. Por lo tanto, el análisis de los perfiles de AA es una herramienta importante para el estudio de la regulación y la desregulación metabólica.


Tabla 2. Métodos analíticos utilizados para la determinación de aminoácidos ¹²⁰

Cromatografía de líquidos		
MÉTODO	TIPO DE MUESTRA	Aminoácidos detectados
LC-MS/MS	Plasma, orina y LCR	α Aminobutirato, β -Ala, β -Ami, Cit, Cys, Eth, etc
LC-MS/MS	Suero	HCY (homocisteína)
LC-MS/MS	Suero	Val, Ile, Leu, Tyr, Phe
LC-MS/MS	Plasma	Ala, β -ala, Gly, His, Leu, Hyd, etc
LC-MS/MS	Plasma	1-Methyl his, 4-Hydroxy, Pro, Ala, Arg, Cy, His, etc.
LC-MS/MS	Suero-plasma humano y orina	D-Ala, D-Arg, D-Asp, D-Gln, D-His, D-Ile, D-Leu, D-Lys, etc.
LC-MS/MS	Suero humano	D-Arg, D-Ala, D-Ile, D-His, D-Glu, D-Tyr, D-Met, D-Phe, etc.
LC-MS/MS	Plasma humano	D-Ser
LC-MS/MS	Cerebro de rata	D-Ser, D-Ala, D-Pro, D-Val, D-Thr, D-Leu, D-Ile, D-Met
LC-MS/MS	Miel	Ala, Arg, Asn, Asp, Gln y Glu.
LC-ESI-MS/MS	Extractos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ala, Cys, Asp, Glu, Phe y Gly.
HILIC-MS/MS	Extractos celulares de <i>Pichia pastoris</i>	Asp, Leu, Tyr, Gln, Phe, etc
UPLC-MS/MS	Tejido muscular, arterial y muestras de sangre venosa femoral	Asp, Glu, Ser, Gly, Asn, Gln, etc.
UHPLC-MS	Sangre	Cit, Orn, Arg, Phe, Tyr, Glu.
UHPLC-MS/MS	Sangre	Ser, Cys, Gly, Gln, Thr, Ala, etc
UPLC-ESI-MS/MS	Suero humano	Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Leu, etc
UPLC-ESI-MS/MS	Extractos vegetales y miel	His, Arg, Asn, Gln, Ser, Asp.
UPLC-qTOF-MS	Orina humana	Phe, Trp, Leu, Ile, Met, Val, etc.
UPLC-MS/MS	Extracto celular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arg, Glu, Cit, Ser, Asp, Gly.
Cromatografía de gases		
MÉTODO	TIPO DE MUESTRA	Aminoácidos detectados
GC-MS	Plasma humano	Gly, Ala, Val, Leu, Trp, etc.
GC-MS	Fluido cerebroespinal	L-Ala, Gly, Sar, L-Val, L-Leu, L-Isoleu, etc.
GC-MS	Sangre completa	Val, Leu, Ile, Met, Phe.
GC-MS	Extracto celular de E.coli	Glu, Met, Ala, Gly, Phe, etc.
GC-MS	Papa	Ala, β -ala, Asp, Glu, Gly.
GC-MS	Tejido vegetal	Gly, Ala, Val, Leu, Ile, etc.
GC-MS	Tabaco	Ala, Gly, Val, Leu, Ile, etc.



A partir de la revisión bibliográfica, para este trabajo de tesis se planteó llevar a cabo la evaluación del efecto de extractos de plantas *Senna septemtrionalis*¹⁴⁷, *Amphipterygium adstringens*¹⁴⁸ (*Cuachalalate*), *Cuphea aequipetala*¹⁴⁹ (*Hierba del golpe*), *Bombax ceiba*¹⁵⁰, *Eryngium carlinae*¹⁵¹ (*Hierba del Sapo*), *Mimosa bahamensis*¹⁵², *Laelia anceps*¹⁵³, *Asclepias curassavica*¹⁵⁴, *Hibiscus sabdariffa*¹⁵⁵, *Gymnopodium floribundum*¹⁵⁶, *Stanhopea*¹⁵⁷, *Casearia corymbosa*¹⁵⁸, *Tecoma stans*¹⁵⁹, *Cyrtopodium macrobulbon*¹⁵³, *Catasetum barbatum*¹⁶⁰, *Magnolia grandiflora*¹⁶¹ y *Kalanchoe daigremontiana*¹⁶². Proporcionadas por el departamento de Farmacia de la DCNE de la Universidad de Guanajuato. Algunos de los extractos ya han sido sujetos a estudios de metabolómica no dirigida utilizando la técnica de GC-MS para identificar posibles metabolitos que se relacionen con el efecto biológico evaluado.

Como novedad del trabajo se ha propuesto usar los sistemas microbiológicos *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride* y *Saccharomyces cerevisiae* para evaluar: 1) los efectos de estos extractos y 2) la factibilidad del uso de microorganismos para pruebas de actividad biológica. Otro punto de novedad del trabajo es la integración de los resultados de actividad biológica con los metabolitos identificados en los extractos en estudios de metabolómica no dirigida por LC-MS. Así mismo se planteó llevar a cabo una estrategia utilizando la técnica de LC-MS-TQ en la modalidad de *Precursor ion Scan* para identificar diferencias en el perfil de amino compuestos de los extractos de las plantas evaluadas.



CAPÍTULO II

1.0 Objetivo general

Desarrollar y optimizar procedimientos analíticos para la evaluación del efecto de extractos de plantas medicinales utilizando microorganismos como sistemas de estudio.

2.0 Objetivos específicos

1. Evaluación de la factibilidad del uso de los sistemas microbiológicos *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride* y *Saccharomyces cerevisiae* para evaluar los efectos de estos extractos.
2. Integración de los resultados de actividad biológica con los metabolitos identificados en los extractos en estudios de metabolómica no dirigida por LC-MS.
3. Identificar diferencias en el perfil de amino compuestos de los extractos de las plantas evaluadas utilizando la técnica de LC-MS-TQ en la modalidad de Precursor ion Scan.



CAPÍTULO III

III. Parte experimental

1.0 Equipo de laboratorio

- Autoclave Modelo YX-18LM, 23.2 psi, 162°C
- Balanza de precisión ME303 Mettler Toledo
- Campana de Flujo Laminar ICB, Modelo CFF101921, 110 W, 110 V y 60 Hz
- Incubadora VEVOR, modelo XHC-25, 5°C a 60°C
- Liofilizadora modelo 10-269 de Labconco y frasco Fast-Freeze 600 mL Labconco
- Parrilla AccuBlock Digital Dry Baths D1200 Labnet
- Purificador de agua destilada Martes Flex/cole parmer instrument Co. Modelo 60648
- SpeedVac eppendorf AG, Modelo 22331 Hamburg, 120 V, 3.4 A, 60 Hz y 370 W
- Vortex 16700 mixer (Thermovne)

2.0 Material de laboratorio

- Asa de Drigalsky
- Cajas Petri 60x15mm
- Embudos de vidrio
- Espátulas
- Filtros de jeringa de PTFE de 25 mm de diámetro y 22 µm de tamaño de poro
- Frasco IsoLab con tapa de rosca (500 y 1000 mL)
- Gradillas plásticas
- Horador metálico
- Jeringas estériles de 3 mL
- Micropipetas (1000, 100 y 10 µl)
- Mortero con pistilo
- Papel filtro MN 615, 22s
- Probeta de 10 mL
- Puntas de plástico para micropipeta de (1000, 100 y 10 µl)
- Tubos Eppendorf (1.5, 2.0 y 5.0 mL)
- Tubos Falcón (15 y 50 mL)

3.0 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol al 70%
- Extracto de papa
- Goma gellan
- Sacarosa

4.1 Crecimiento de *Trichoderma atroviride*.

Con base en la composición de POTATO DEXTROSE AGAR (PDA) ENUMERATION OF YEASTS AND MOLDS 1 INTENDED USE, n.d.¹⁶³, se realizaron las siguientes modificaciones: con 1000 mL de agua se realizó una infusión de 200g de papa a una temperatura de 100°C por 15 min, la cual fue filtrada. A continuación, en condiciones de calentamiento y agitación, fueron adicionados 700mL de agua destilada, 20 g de sacarosa y poco a poco 20 g del gelificante hasta observar la disolución de los componentes tal como se ilustra en la figura 4. El medio preparado fue esterilizado a 23.2 psi durante 15 min. En un ambiente estéril se realizó el llenado de las cajas Petri con el PDA modificado, cuidando que agar formara una película con un grosor no mayor a 0.5 cm. Finalmente el medio de cultivo fue refrigerado al menos 24h.

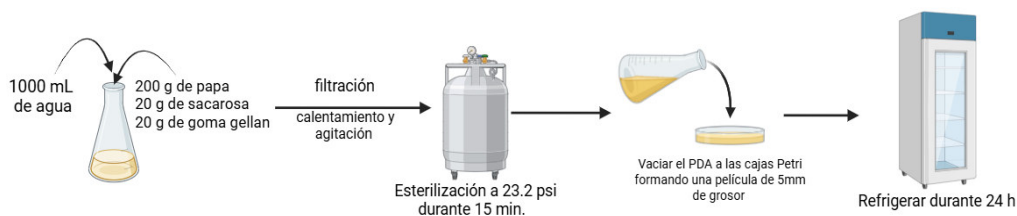


Figura 4. Preparación del sistema biológico para la evaluación de extractos vegetales.

En las cajas Petri con el medio PDA modificado, se inocularon con un asa de Drigalsky 20 μ L de un stock de *Trichoderma atroviride*. Los inóculos fueron incubados, a 28°C, durante 72h, posterior al tiempo de incubación, los conidios desarrollados fueron obtenidos, utilizando 1mL de agua destilada estéril barriendo delicadamente la superficie de la caja con el asa de Drigalsky y recolectando con micropipeta para su conservación en glicerol estéril al 20%, manteniéndose a 4 °C hasta su uso. El procedimiento general se presenta en la Figura 5.

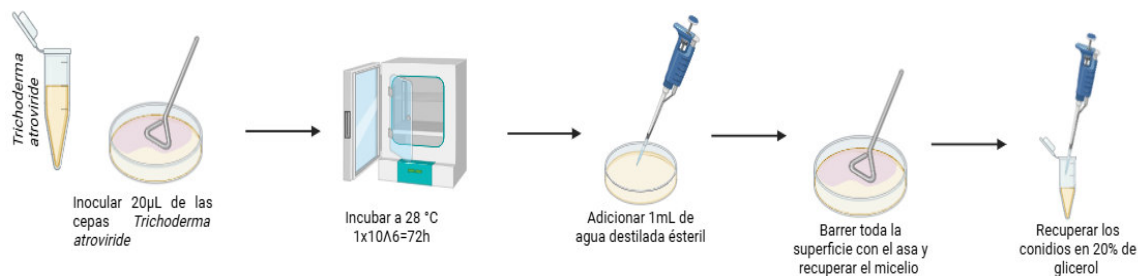


Figura 5. Obtención de conidios de *Trichoderma atroviride*.



Para el conteo de los conidios obtenidos de *Trichoderma atroviride*, el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad, utilizando una cámara de Neubauer. Se cargaron 10 μL del aislado en glicerol. La cámara fue observada al microscopio con el objetivo 40x y se logró determinar la densidad celular, tal como se muestra en la figura 6. Después de conocer la concentración inicial de conidios a las 72h de incubación y fundamentado en (Su et al., 2012) el aislado fue ajustado para obtener una concentración 1×10^6 conidios/mL.

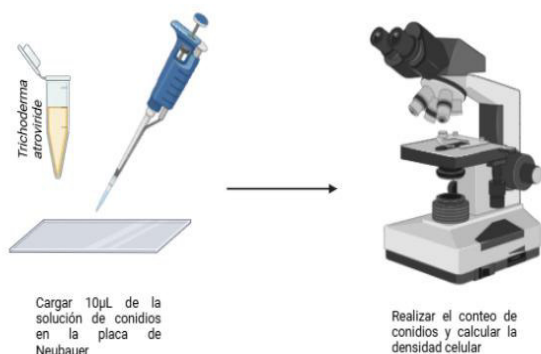


Figura 6. Conteo de conidios del aislado de *Trichoderma atroviride*

4.2 Obtención de extractos de plantas medicinales

Se probaron 13 extractos de plantas medicinales, la mayoría de ellos fueron proporcionados por el Departamento de farmacia (1-12) y solo uno se obtuvo en el Departamento de Química (13). En la tabla 3 se presentan los nombres de las plantas correspondientes a los extractos utilizados y los efectos biológicos que se han reportado para cada uno de ellos.

Tabla 3. Efectos biológicos reportados en extractos de diferentes especies vegetales		
Especie	Efecto biológico reportado	Protocolo de Extracción
<i>Senna septemtrionalis</i> (Ss)	Diurético, antiinflamatorio, laxante, vermífugo, expectorante y fungicida ¹⁴⁷ .	Pesar 240g de las partes aéreas secas, pulverizar y macerar con 1.5 L etanol 70% durante 10 días. Secar al vacío ¹⁴⁷ .
<i>Mimosa bahamensis</i> (Mb)	Efecto biológico contra quemaduras, heridas superficiales de la piel, disentería y dolores de cabeza y antihelmíntico ^{152,164}	Pesar 75 g de hojas frescas triturar y , macerar con acetona: agua (70:30) + ácido ascórbico (1 g/L) durante 24 h, filtrar y evaporar liofilizar y almacenar a 4°C hasta su uso ¹⁶⁴ .



<i>Casearia corymbosa</i> (Cc)	Efectos antiinflamatorio, antisifilítico, carminativo, antitusivo y anticancerígeno ¹⁵⁸ .	Pesar 1.327 kg de biomasa de la corteza del tallo de la planta, secar, moler y macerar con 4 L de metanol 80% a temperatura ambiente durante 24 h ¹⁵⁸ .
<i>Tecoma stans</i> (Ts)	Efecto hipoglucemiante ¹⁵⁹ .	Tricturar las hojas secas y extraer con agua (relación 1:10, p/v) a 95 °C durante 30 minutos, filtrar y evaporar a presión reducida. homogenizar y almacenar a -20 °C bajo atmósfera de nitrógeno ¹⁵⁹ .
<i>Fragaria x ananassa</i> (Fr)	Efecto antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, antidiabético, previene la obesidad y la aparición de enfermedades cardiovasculares ^{165,166} .	Almacenar 10 g de frutos a -20°C extraer con 20 mL de metano 80% asistida por ultrasonido durante 30 minutos, centrifugar y obtener el sobrenadante, finalmente preservar a 4°C ¹⁶⁶ .
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd)	Posee propiedades hemostáticas, cicatrizantes y antiinflamatorias. Tiene efectos antimicrobianos, antifúngicos, analgésicos, antihipertensivos y antidiabéticos ^{167,168} .	Lavar, cortar y secar las hojas de <i>Kalanchoe</i> , triturar y homogenizar y mezclar con agua destilada en una proporción de 1:0.5, y filtrar a través de 4 capas de gasa. y utilizar el extracto resultante ¹⁶⁷ .
<i>Selenicereus undatus</i> (Su)	Efecto anticancerígeno, antioxidante, antimicrobiano, antidiabético, antiinflamatorio, radioprotector, analgésico, hipoglucemiante, hipolipemiante y diurético ^{167,168} .	A 25 g de muestra en polvo del fruto seco añadir 100 mL de metanol y mantener en agitación continua durante siete días, filtrar y finalmente, evaporar a temperatura ambiente ¹⁷⁰ .

De manera general el proceso de obtención de todos los extractos utilizados en este estudio se presenta en la Figura 7. Este proceso se adoptó a partir de diversos estudios reportados en la bibliografía, los cuales se presentan en la Tabla 3. Se comenzó con la maceración de aproximadamente 30 g biomasa en 60 mL de etanol al 70 %, durante al menos 48 h a 4°C, el termino de este tiempo, el contenido vegetal se sometió a un proceso de evaporación del



solvente a una temperatura de 40°C y fue retirado del instrumento de evaporación hasta observar un extracto libre de etanol. El sólido obtenido se preserva a 4°C, hasta su uso.

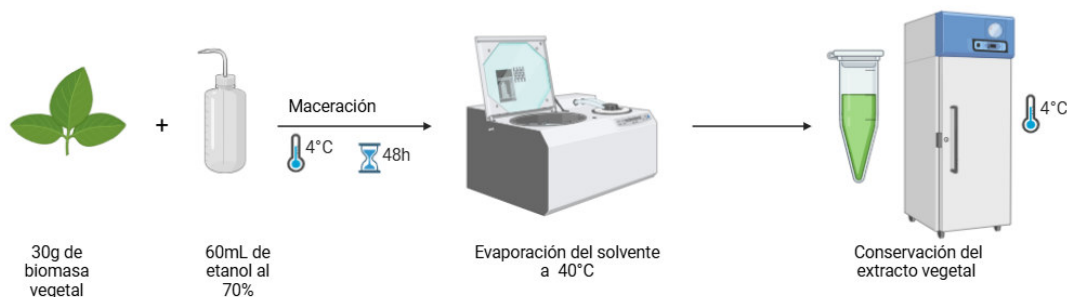


Figura 7. Procedimiento general para la obtención de los extractos utilizados en este estudio.

4.3 Evaluación de la actividad biológica sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*.

Fueron evaluadas 3 diferentes concentraciones de cada extracto vegetal (0.5, 5.0 y 20 mg L⁻¹). Se adaptó la metodología propuesta por Cizeikiene y colaboradores para la evaluación del efecto biológico de los extractos. En un ambiente estéril las placas Petri fueron inoculadas con 100 µL de la *Trichoderma atroviride* (1×10^5 conidios · mL⁻¹), a continuación, con ayuda un horadador se realizó una perforación (1.0 cm de diámetro y 0.4 cm de altura) en el centro de la placa (volumen aproximado 300 µL), al terminar se adicionaron a cada pocillo 250 µL de cada extracto vegetal en sus diferentes concentraciones, posteriormente cada sistema microbiológico fue incubado a 28°C durante 48h¹⁶⁹. Finalmente, el efecto antimicrobiano se evaluó con la medición del diámetro del halo formado por *Trichoderma atroviride*.

4.4 Aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la evaluación del efecto de Fr, Su y Kd en *Saccharomyces cerevisiae* se comenzó con el aislamiento de la levadura, utilizando un ejemplar comercial el cual, tras un proceso de crecimiento de 24h ver figura 14, en agar YPD líquido, fue inoculado en agar YPD sólido e incubado, observando después de 48 h un crecimiento característico, el cual sirvió para conseguir el aislamiento definitivo, con colonias características de la levadura.

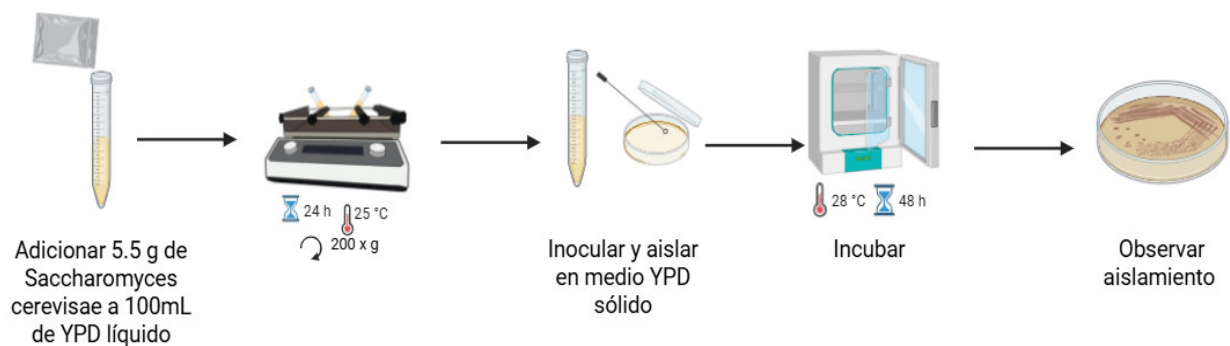


Figura 8. Aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio Extracto de Levadura, Papa, Dextrosa (YPD)

4.5 Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre el Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD sólido.

Para la evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a extractos vegetales. Se elaboraron cajas de medio sólido de YPD al cual se le agrego de una forma cuidadosa y antes de solidificar el extracto vegetal de interés (Fr, Su y Kd) en concentraciones 100 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, posteriormente cuando estas placas solidificaron, fueron divididas para adicionar por sección la especie fúngica, en seguida, fueron incubadas a 28°C por 48h, finalmente se observó el crecimiento microbiano para cada análisis

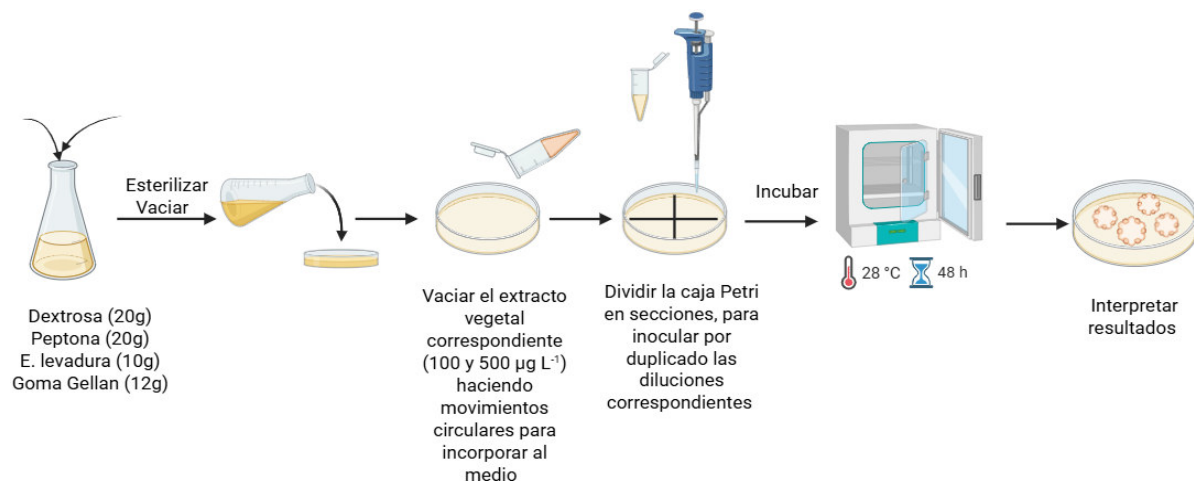


Figura 9. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a extractos vegetales en medio YPD sólido



4.6 Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD líquido.

El análisis del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a extractos vegetales (Fr, Su y Kd), se realizó para evaluar la cinética de crecimiento mediante espectrometría UV. Esto se logró al adicionar el extracto vegetal de interés en medio líquido de YPD y posteriormente adicionar 153 μL de levadura, esta preparación fue sometida a agitación constante y a temperatura ambiente durante 24h, haciendo lecturas, a la 1, 3 6 y 24h

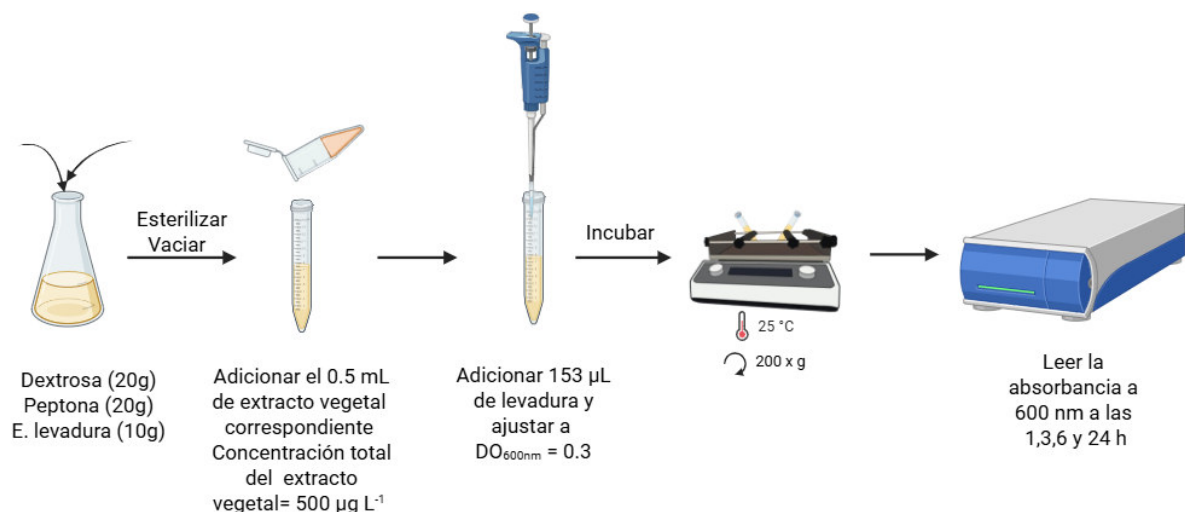


Figura 10. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a extractos vegetales en medio YPD líquido.

4.7 Determinación del contenido de flavonoides libres en extractos vegetales

La determinación de flavonoides se realizó en 3 de los 17 extractos analizados. Estos extractos fueron elegidos debido al comportamiento en la inhibición de *Trichoderma*: Fr y Su, fueron algunos de los extractos que presentaron mayor inhibición microbiana y Kd de acuerdo con los análisis microbiológicos fue el de menor efecto antimicrobiano. El análisis de determinación de flavonoides se realizó con base a la literatura¹⁷⁰ mediante espectrometría UV.

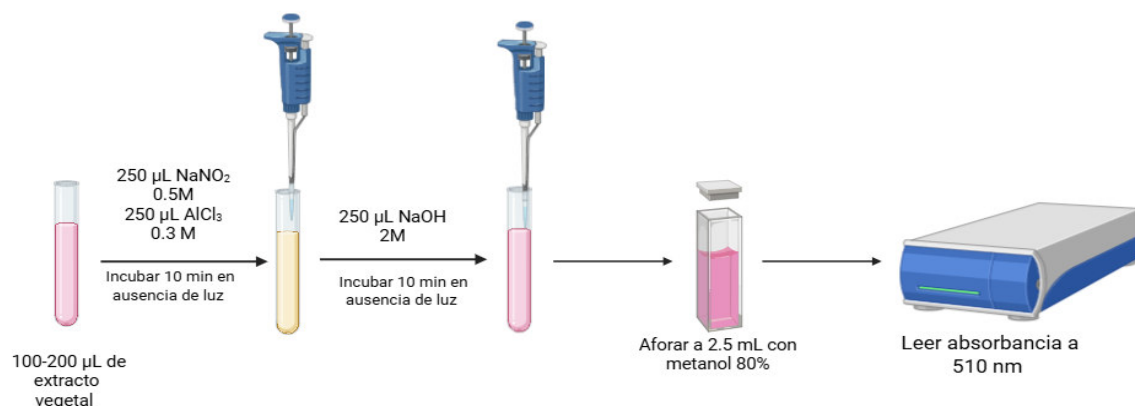


Figura 11. Determinación de flavonoides en extractos vegetales.



4.8 Determinación del contenido de fenoles libres en extractos vegetales.

La determinación de fenoles se realizó en los extractos Fr, Su y Kd, la metodología basada en el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu¹⁷¹ y su detección fue mediante espectrometría UV.

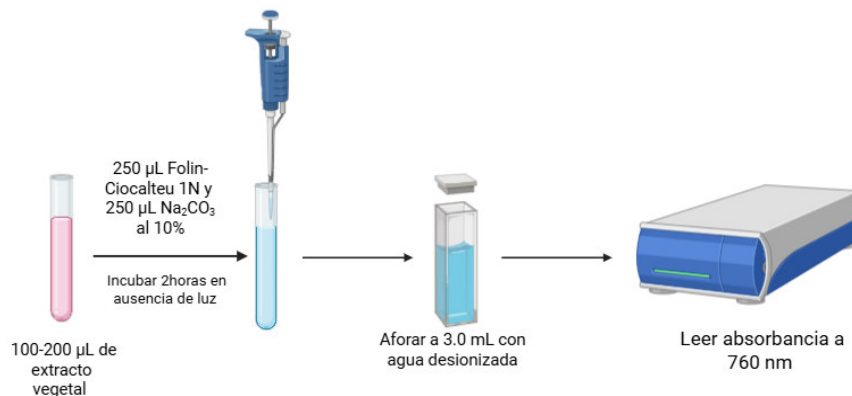


Figura 12. Determinación de fenoles en extractos vegetales.

4.9 Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales y levaduras mediante ABTS+

La determinación de la capacidad antioxidante de Fr, Su y Kd se realizó con base a la literatura, por espectrometría UV y el uso de ABTS.¹⁷²

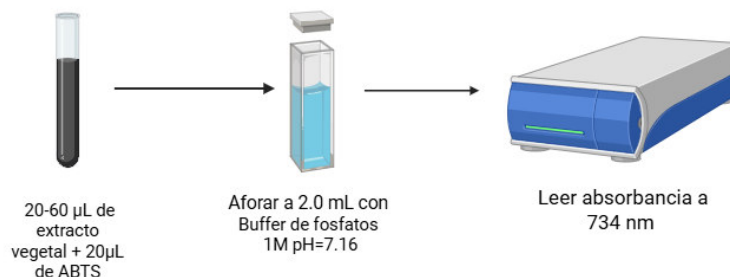


Figura 13. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales.

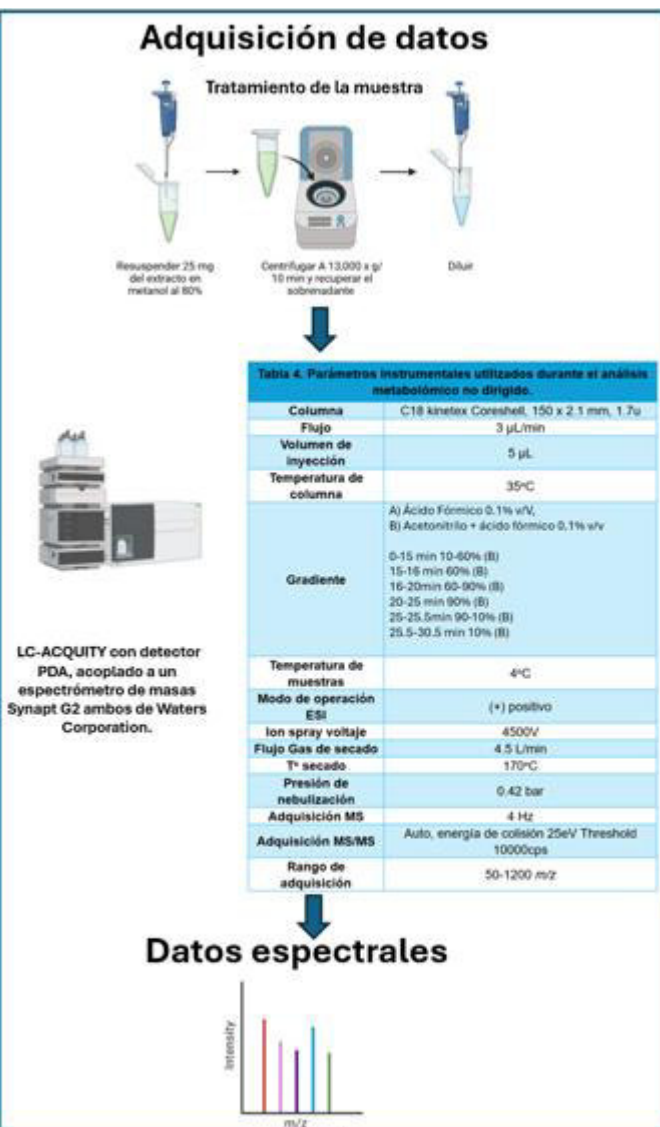
4.10 Análisis metabolómico no dirigido de extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS/MS

Para el análisis metabolómico no dirigido, para la comparación de los perfiles metabólicos e identificación de posibles inhibidores de transaminasas en los extractos de *S. undatus* y *F. ananassa*, seleccionados por su alta inhibición del crecimiento de *Trichoderma atroviride*, se realizó una cromatografía líquida con un detector UV-Vis, acoplada a espectrometría de masas, se usó una columna C18 Kinetex-Coreshell(150x2.1mm-1.7µ) y un gradiente en fases de acetonitrilo, en modo ESI (energía de colisión 25eV, rango 50-1200m/z).

Para la identificación de compuestos con MS-DIAL se consideró: la señal/ruido $\geq$ 5, una intensidad $>10^6$ cps, MS/MS, un fold change >5 , $p<0.05$, mientras que para la asignación



de fórmulas/estructuras con MS-FINDER, se consideró: la masa-exacta, el patrón-isotópico, la fragmentación y el error-masa <5 ppm.



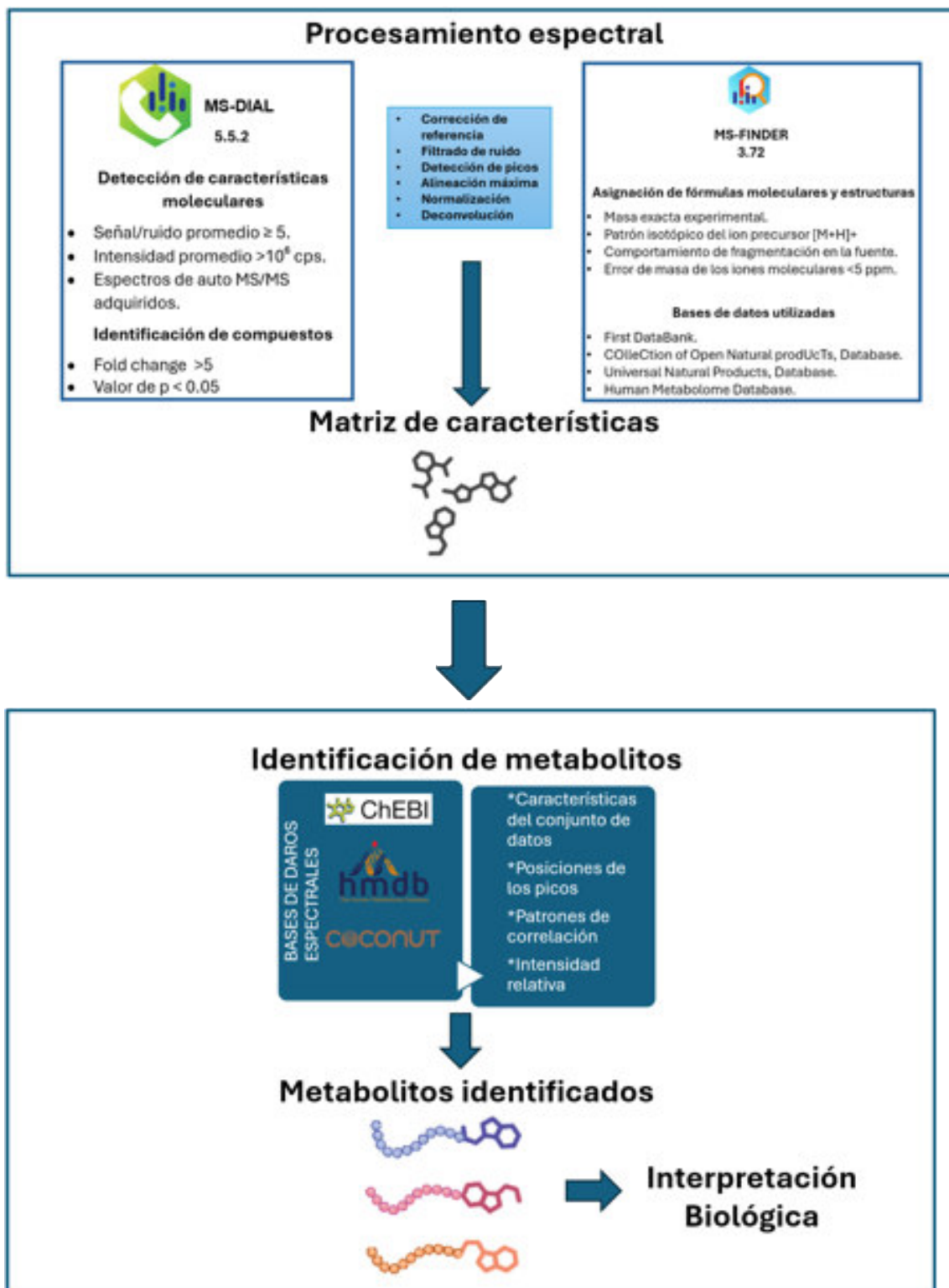


Figura 14. Análisis metabolómico no dirigido de extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS/MS



4.11 Determinación de perfil de amino compuestos por HPLC-ESI-MS/MS en modalidad de adquisición de Precursor Ion Scan

Se realizó la derivatización de los extractos de plantas que mostraron mayor y menor inhibición del crecimiento de *Trichoderma atroviride* (*Senna septemtrionalis* (Ss), *Mimosa bahamensis* (Mb), *Casearia corymbosa* (Cc), *Tecoma stans* (Ts), *Kalanchoe daigremontiana* (Kd) y *Selenicereus undatus* (Su). Los extractos secos fueron reconstituidos en 200 μL de un buffer de boratos (200 mM, pH 8.5), a los cuales se les añadió 300 μL de diclorometano para su limpieza. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 x g durante 10 minutos. Del sobrenadante, se tomó una alícuota de 30 μL para la derivatización. En este proceso, se añadieron 15 μL de derivatizante 1-methylpyridinium-3-succinylcarbamate (MPSC, este reactivo fue sintetizado en el Departamento de Biología Molecular de la UMCS en Lublin, Polonia), ajustando el volumen total a 600 μL con el mismo buffer de borato. La mezcla se calentó a 60 °C por 20 minutos, ver figura 8. Después, las muestras se filtraron y se inyectó una alícuota de 2 μL en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (130Å, 1.7 μm , 2.1 mm X 150 mm). Las fases móviles consistieron en formiato de amonio (200 mM) y acetonitrilo. El flujo se mantuvo a 0.3 mL min⁻¹, y la temperatura del termostato de la columna se fijó a 40 °C. El programa de gradiente fue el siguiente: aumento del 2% al 6% de la fase B en los primeros 0.10 minutos, manteniendo el 6% hasta los 2 minutos, incremento del 6% al 13% entre los 2 y 5 minutos, sosteniendo el 13% desde 5 hasta 6 minutos, aumento del 13% al 30% entre los 6 y 8 minutos, seguido de un aumento del 30% al 60% entre los 8.0 y 8.10 minutos, manteniendo el 60% desde 8.10 hasta 9.10 minutos, y finalmente, regresando al 2% entre 9.10 y 9.20 minutos. La columna se equilibró con el 2% de la fase B durante 5 minutos antes de cada inyección. (figura 14)

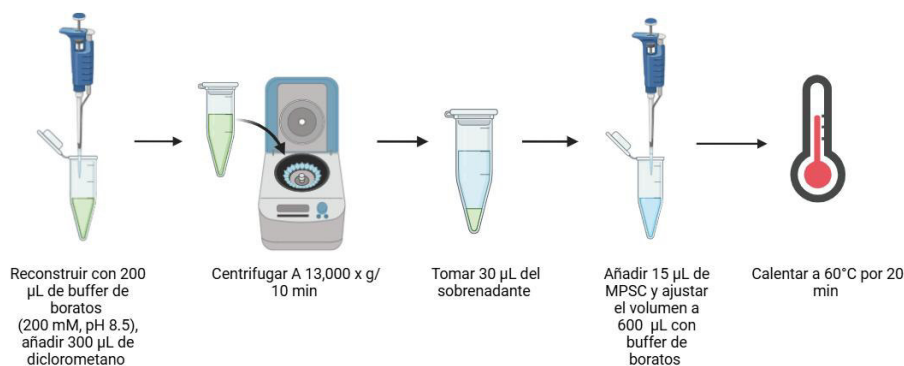


Figura 15. Derivatización de extractos vegetales con 1-methylpyridinium-3-succinylcarbamate (MPSC)

El análisis se realizó con un cromatógrafo de líquidos Nexera XR (Shimadzu), acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu modelo 8030, con una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo positivo. Los parámetros fueron: voltaje de spray de 4500 V, flujo de gas nebulizador de 1.5 L/min (N₂), flujo de gas seco de 15 L/min (N₂), y temperatura de la línea de desolvación de 250 °C. Las muestras fueron analizadas en la

modalidad de *Precursor Ion Scan*, ver figura 9, para identificar amino compuestos presentes en los extractos. Los parámetros de adquisición de datos fueron: rango de 150 a 1000 m/z , y el ion diagnóstico fue 135.1 m/z , correspondiente al fragmento del derivatizante tras su fragmentación, que es común para todos los compuestos derivatizados. (Ver figura 10). El derivatizante utilizado es un derivado de la sal de piridonio, que contiene una carga positiva, mejorando así su ionización en ESI.

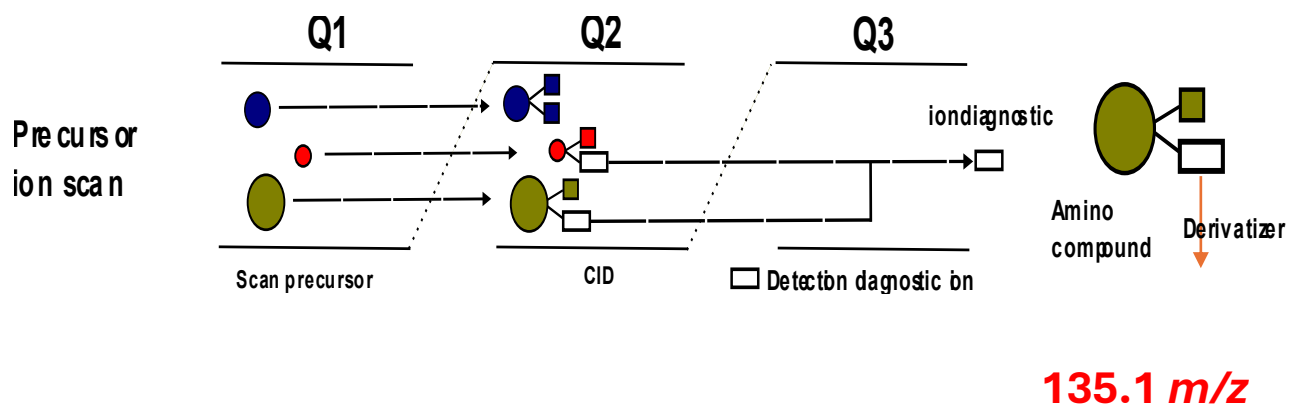


Figura 16. Identificación de amino compuestos presentes en extractos vegetales, mediante la modalidad de Precursor Ion Scan



CAPÍTULO IV

1.0 Resultados y discusión

1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales

Tal como se describió en la sección experimental, previo a realizar la evaluación del efecto de los extractos sobre el crecimiento, se llevó a cabo un aislamiento de *Trichoderma atroviride* que de acuerdo con la literatura tuvo un crecimiento usual, es decir, inicialmente (48 h) se presentaron colonias de apariencia costrosa, glaucas/amarillentas que con el paso del tiempo (120 h) fueron tornándose de color verde oscuro, con secciones amarillentas opacas y la esporulación fue uniforme¹⁷³ (figura 17).



Figura 17. a) Aislamiento, b) Crecimiento de *Trichoderma atroviride* (48h) sin exposición a extractos vegetales y c) Crecimiento de *Trichoderma atroviride* (120h) sin exposición a extractos vegetales.

Después de las 120 horas de crecimiento y obtener el número de conidios adecuados $1 \times 10^5 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, se llevó a cabo la evaluación de los extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*. Los resultados se reportaron en función del tamaño del diámetro (en mm) del halo que se formó para cada extracto. Este halo representa una zona donde el crecimiento microbiano es inhibido, por lo que, su presencia es indicativa de la actividad antimicrobiana del extracto. Para cada extracto se hicieron pruebas a tres diferentes concentraciones, 0.5, 5 y 20 mg mL⁻¹. Únicamente para el caso del extracto de *Kalanchoe daigremontiana* que se obtuvo en el Departamento de Química (Kd, No. 13), se probó a las concentraciones de 40 y 60 mg mL⁻¹ debido a que no presentaba inhibición del crecimiento a menor concentración; cada prueba se realizó por triplicado. Al mismo tiempo se incubaron controles para descartar la posible contaminación de los extractos y comprobar la correcta esterilización de los extractos por medio de los filtros. En la figura 18 se presentan las placas de los controles de los extractos *Kalanchoe daigremontiana*, *Senna septemtrionalis* y *Tecoma stans*, a la concentración de 20mg mL⁻¹, 5mg mL⁻¹ y 0.5mg mL⁻¹ respectivamente sin inocular. Donde se observa nulo crecimiento microbiano lo que garantizó la adecuada esterilización de los extractos.

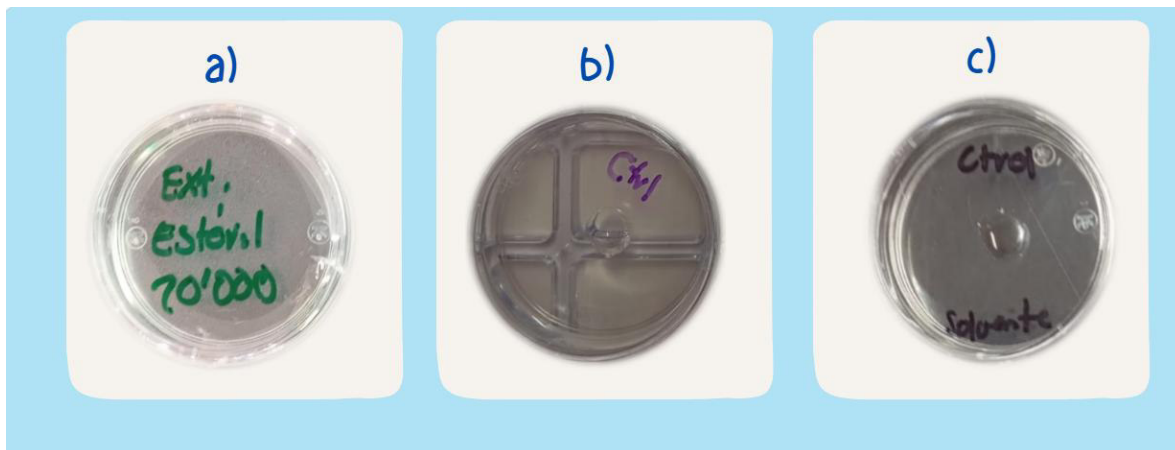


Figura 18. a) *Kalanchoe daigremontiana* 20mg mL⁻¹ b) *Senna septemtrionalis* 5mg mL⁻¹ y c) *Tecoma stans* 0.5mg mL⁻¹

Posterior al periodo de incubación (120 horas) de los conidios con los extractos a diferente concentración, se llevó a cabo la evaluación de la presencia de halo de inhibición y la medición del diámetro de este. Los extractos que a simple vista en casi todas mostraron un efecto en la inhibición del crecimiento fueron los correspondientes a *Casearia corymbosa* (Cc, No.7), *Tecoma stans* (Ts, No.9), *Fragaria x ananassa* (Fr, No.10), *Kalanchoe daigremontiana* (Kd, No. 11) y *Selenicereus undatus* (Su, No. 12), los cuales se presentan en las Figuras 19-24 por otro lado, uno de extractos que menos efecto de inhibición se observó a simple vista fue el correspondiente a *Senna septemtrionalis* (Ss, No. 1), Figura 19.

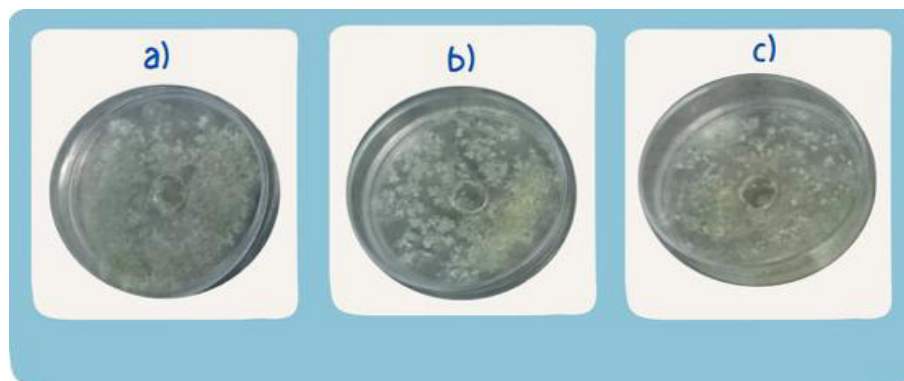


Figura 19. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de *Senna septemtrionalis* a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.

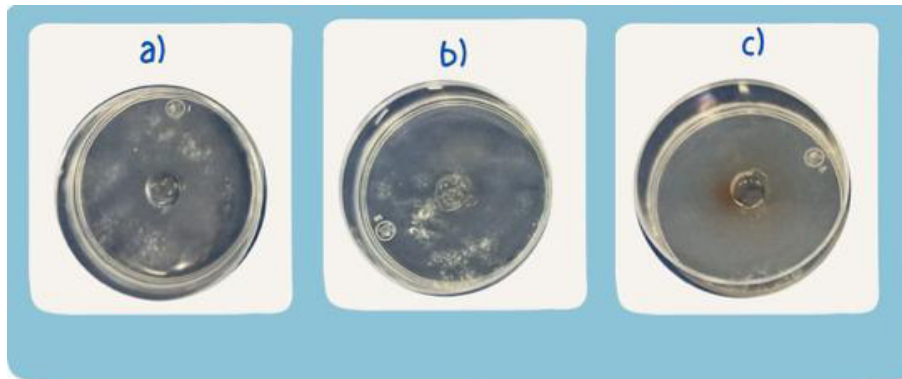


Figura 20. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de ***Casearia corymbusa*** a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.



Figura 21. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de ***Tecoma stans*** a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20mgmL⁻¹.

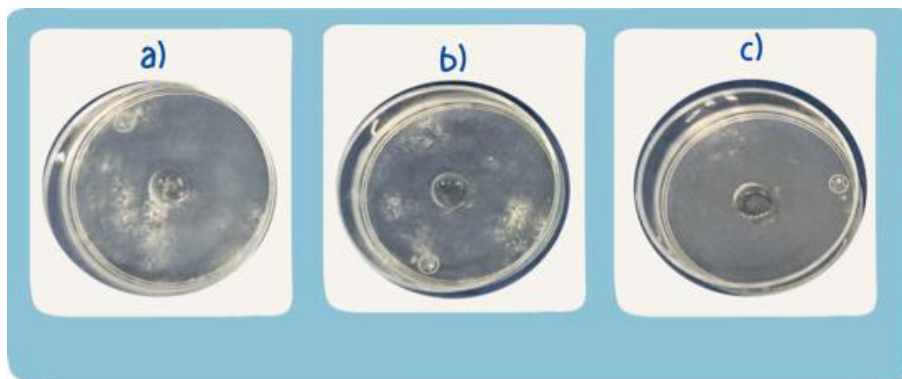


Figura 22. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de ***Fragaria x ananassa*** a las concentraciones de: a) 0.5 mg mL⁻¹, b) 5 mg mL⁻¹ y c) 20 mg mL⁻¹

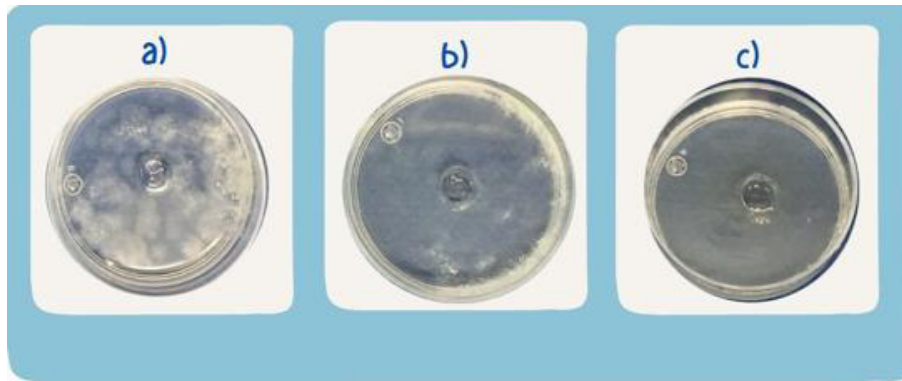


Figura 23. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de ***Kalanchoe daigremontiana*** a las concentraciones de: a) 0.5 mg ml⁻¹, b) 5 mg ml⁻¹ y c) 20 mg ml⁻¹

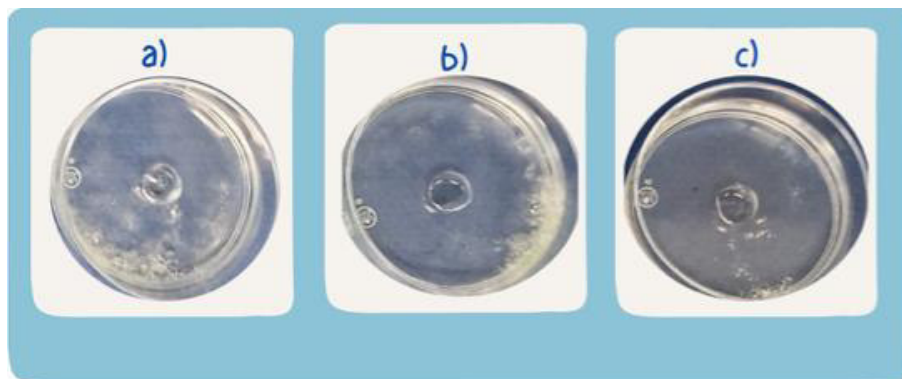


Figura 24. Exposición de *Trichoderma atroviride* a extracto de ***Selenicereus undatus*** a las concentraciones de: a) 0.5 mg ml⁻¹, b) 5 mg ml⁻¹ y c) 20 mg ml⁻¹

En la tabla 5 se presentan los valores promedio de las mediciones de los halos que se formaron por la exposición a los extractos, expresadas en milímetros (mm) junto con los respectivos valores de desviación estándar.

En estos resultados se observa que para los extractos 1 y 13 (correspondientes *S.septemtrionalis* y *K. daigremontiana* respectivamente) a la concentración de 0.5 mg ml⁻¹ no se presentó inhibición del crecimiento, siendo en general los que menor inhibición presentaron. Por otro lado, para identificar las especies vegetales que presentaron mayor inhibición del crecimiento, a partir de los valores obtenidos de los halos formados, se calculó el promedio para cada concentración evaluada y en función a este se identificaron aquellas especies con mayor inhibición (los cuales se marcaron con *).


Tabla 5. Resultados del efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*

No.	Especie utilizada para la generación del extracto	Concentración del extracto, mg mL ⁻¹		
		20	5	0.5
		Diámetro halo, mm (promedio ± DE, n=3)		
1	<i>Senna septemtrionalis</i> (Ss)	4.0 ± 0.15	2.3 ± 0.1	N
2	<i>Cuphea aequipetala</i> (Ca)	8.5 ± 0.34	5.5 ± 0.22	3.0 ± 0.12
3	<i>Ceiba</i> (Ce)	4.0 ± 0.17	3.0 ± 0.13	3.0 ± 0.19
4	<i>Eryngium carlinae</i> (Ec)	5.5 ± 0.21	4.5 ± 0.17	4.0 ± 0.15
5	<i>Mimosa bahamensis</i> (Mb)	9.3 ± 0.37*	9.0 ± 0.36*	8.0 ± 0.32*
6	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (Hs)	10.5 ± 0.44*	9.3 ± 0.39*	4.0 ± 0.17
7	<i>Gymnopodium floribundum</i> (Gf)	8.6 ± 0.33	8.5 ± 0.42*	8.0 ± 0.38*
8	<i>Casearia corymbosa</i> (Cc)	10.5 ± 0.42*	10.0 ± 0.40*	5.0 ± 0.20*
9	<i>Tecoma stans</i> (Ts)	10.0 ± 0.42*	10.0 ± 0.42*	7.5 ± 0.31*
10	<i>Fragaria x ananassa</i> (Fr)	12.0 ± 0.46*	8.0 ± 0.30*	7.7 ± 0.21*
11	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd) ^a	12.5 ± 0.5*	10.5 ± 0.42*	3.0 ± 0.17
12	<i>Selenicereus undatus</i> (Su)	11.0 ± 0.47*	10.0 ± 0.53*	7.0 ± 0.29*
13	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd) ^b	3.0 ± 0.20 (1)	3.0 ± 0.11 (2)	N

(1): 40 mg mL⁻¹, (2): 60 mg mL⁻¹, N: no hubo inhibición.

* valores mayores al promedio de cada concentración.

^a extracto proporcionado por el Depto. de Farmacia, ^b extracto obtenido en el Depto. de Química.

Trichoderma atroviride es un hongo benéfico ampliamente utilizado como agente de biocontrol contra patógenos vegetales como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*. Su acción incluye competencia, antibiosis y micoparasitismo. Si un extracto vegetal inhibe su crecimiento puede interferir con su efectividad en campo o en formulaciones comerciales. Muchos agricultores combinan biocontroles (como *Trichoderma*) con extractos vegetales bio plaguicidas o bio fertilizantes. Si un extracto inhibe a *T. atroviride*, podría reducir su efectividad en productos multicomponente afectando rendimiento y eficacia del tratamiento. Estudiar la interacción permite diseñar mezclas seguras entre extractos y agentes microbiano. Puede optimizarse el uso conjunto en agricultura regenerativa.

Se pueden formular productos que controlen patógenos fúngicos sin afectar *Trichoderma*, ideal para el manejo integral de plagas (MIP). Usar los resultados como base para una



herramienta de tamízate de compatibilidad biológica que ayude a: fabricantes de bioinsumos, laboratorios de control de calidad, agricultores que mezclan bioinsumos en campo. Algunos extractos podrían estimular el crecimiento o actividad enzimática de *Trichoderma* podría diseñar bio-estimulantes duales (extracto + hongo)

Para la concentración de 0.5 mg mL^{-1} , el promedio de tamaño del halo generado fue de 4.5 mm, en este sentido, 6 extractos (Mb (5), Gf (7), Cc (8), Ts (9), Fr (10) y Su (12)) produjeron un halo de tamaño superior al valor promedio. Para 5.0 mg mL^{-1} , todos los extractos inhibieron el crecimiento de *Trichoderma atroviride*; el valor promedio del diámetro del halo fue de 7.6 mm, siendo 8 extractos (del 5 al 12) los que registraron un diámetro mayor. Por último, para la concentración de 20 mg mL^{-1} , al igual que para 5.0 mg mL^{-1} , todos los extractos registraron formación del halo, siendo el valor promedio de 8.9 mm; para esta concentración, únicamente 7 de los extractos (Mb (5), Hs (6), Cc (8), Ts (9), Fr (10), Kd (11) y Su (12)) generaron halos con diámetro superior al valor promedio. Cabe destacar que únicamente los extractos Mb(5), Gf(7), Cc(8), Ts(9), Fr(10) y Su(12) fueron los que presentaron la formación del halo con un diámetro superior al promedio para todas las concentraciones evaluadas (los cuales se marcaron en rojo).

La relevancia de los resultados radica principalmente en el hecho que no existe suficiente evidencia experimental para los extractos evaluados sobre su efecto en el crecimiento de hongos del género *Trichoderma*. Como se ha descrito *Trichoderma spp.*, es ampliamente utilizado como agente de biocontrol contra patógenos vegetales principalmente de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*¹⁷⁴. Su acción incluye procesos de competencia, antibiosis y micoparasitismo, por lo que si un extracto vegetal inhibe el crecimiento de *T. atroviride* podría reducir su efectividad en productos multicomponente, afectando rendimiento y eficacia del tratamiento. Es una práctica común en la agricultura el combinar biocontroladores con extractos vegetales, bioplaguicidas o biofertilizantes. En este sentido, existe evidencia de estudios sobre la formulación de biofungicidas compatibles, en donde se ha evaluado el efecto de extractos vegetales y fungicidas comerciales sobre el crecimiento de varias especies del género *Trichoderma*. El conocimiento generado de estos estudios ha permitido diseñar biofungicidas combinados donde el hongo benéfico no es afectado negativamente preservando su efecto biocontrolador, permitiendo combinaciones seguras^{175,176}. A la par, se ha reportado que algunos extractos podrían estimular el crecimiento de microorganismos benéficos para los cultivos, lo que podría aplicarse en el diseño de bioestimulantes duales (extracto-microorganismo) que mejoren la defensa y desarrollo vegetal, lo que abre la puerta a soluciones biotecnológicas más eficaces, sostenibles y personalizadas en la agricultura moderna¹⁷⁴. En resumen, llevar a cabo el estudio de la interacción microorganismo-extractos vegetales, puede contribuir en: 1) el diseño de tratamientos integrados (bioinsumos compatibles); 2) Desarrollo de bioestimulantes duales (sinergia microorganismos-extracto); 3) Diagnósticos de incompatibilidad previas a su aplicación en el campo (evitar pérdidas de eficacia por mezclas inadecuadas); y 4) Generación de líneas resistentes o tolerantes de microorganismos biocontroladores (como especies del género *Trichoderma*).

En este sentido de acuerdo con los resultados uno de los extractos que presentó mayor inhibición fue el correspondiente a *Fragaria x ananassa* (fresa). Esta fruta es de cultivo y consumo común en México, por lo que el hecho de que se registre inhibición de crecimiento de *Trichoderma atroviride*, y de acuerdo a lo anterior podría ser factible su uso en el diseño



de herramientas agronómicas para utilizar líneas de especies del género *Trichoderma* más resistentes al cultivo de fresa, o diseñar sistemas de liberación inteligente como lo es la microencapsulación para mantener viabilidad y efectividad del hongo.

A partir de estos resultados, se seleccionaron los extractos de mayor (*Fragaria x ananassa* (Fr, No.10) y *Selenicereus undatus* (Su, No.12)) y menor inhibición del crecimiento (*Kalanchoe daigremontiana* (Kd, No. 13)) para evaluar su efecto sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 Evaluación del efecto de extractos vegetales en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tal como se describió en la sección experimental, la primera prueba del efecto de los extractos seleccionados (Fr, No.10; Su, No.12; y Kd, No. 13), se llevó a cabo en placas de medio YPD, preparadas con los extractos a dos concentraciones 100 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, en dos diluciones 10^{-2} y 10^{-3} a partir de un cultivo en medio líquido con densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0.3.

En las figuras 26 y 27, se presentan las placas inoculadas para cada extracto, y se observa que en las diferentes condiciones de crecimiento, la levadura presentó colonias de lisas y húmedas de color blanco/crema que de acuerdo con la literatura¹⁷⁷ es la morfología normal de este microorganismo figura 25. No se observó diferencias de crecimiento entre los inóculos crecidos en presencia de los extractos a las dos concentraciones seleccionadas respecto a las levaduras crecidas en las condiciones control, esto en función de la posible inhibición de crecimiento considerando los resultados para *Trichoderma*. Lo que sugiere que estos extractos en las concentraciones evaluadas son buenos candidatos para continuar con estudios de procesos de enriquecimiento de levaduras.

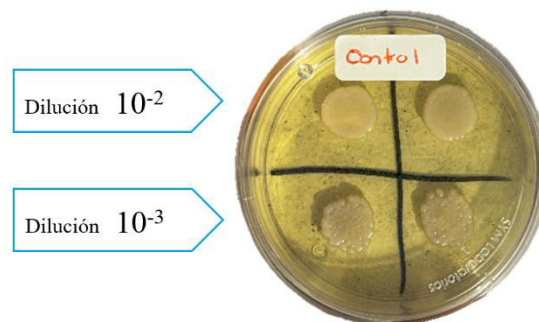


Figura 25. Inóculos de *S. cerevisiae* en medio YPD sin exposición a los extractos.

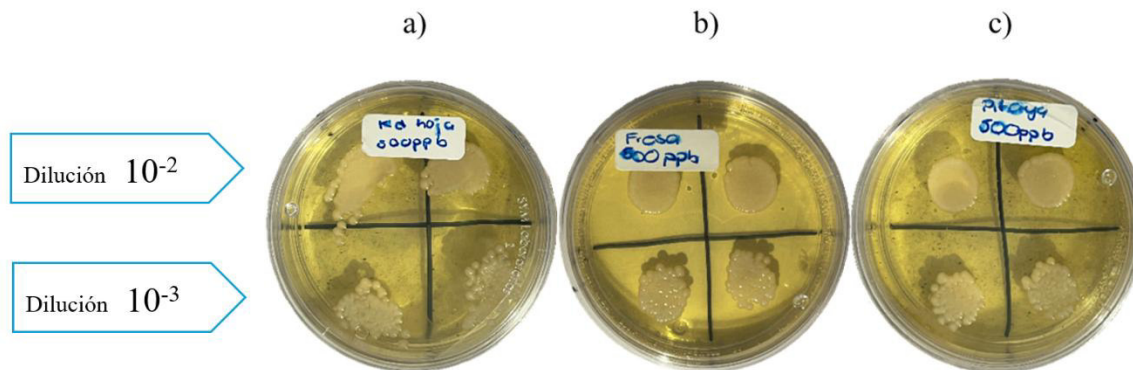


Figura 26. Inóculos de *S. cerevisiae* en medio YPD a la concentración de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a) *K. daigremontiana*, b) *F. ananassa* y c) *S. undatus*

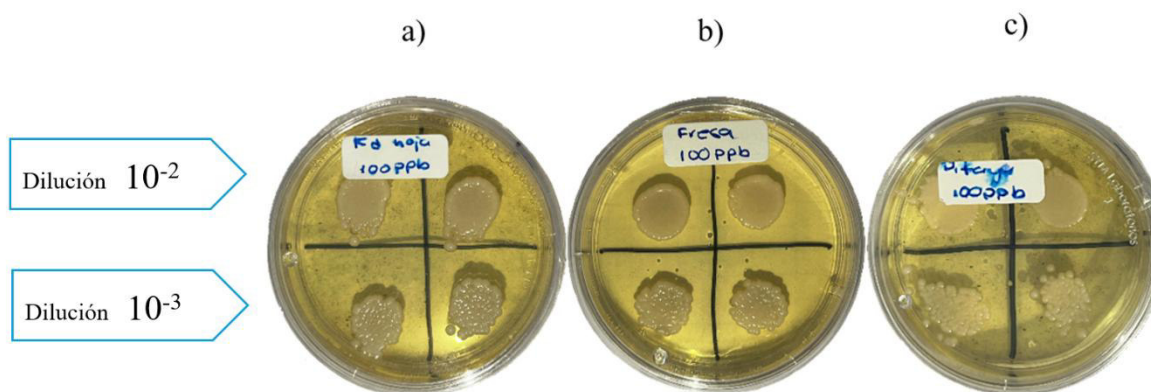


Figura 27. Inóculos de *S. cerevisiae* en medio YPD a la concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a) *K. daigremontiana*, b) *F. ananassa* y c) *S. undatus*

A partir de los resultados en los experimentos de la evaluación del crecimiento en medio sólido, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de *S. cerevisiae* en medio líquido YPD. Para estos ensayos se seleccionó la concentración de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para los tres extractos. Tal como se describió en la sección experimental, se determinó la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en los tiempos de 1, 3, 6 y 24 h. En la figura 28 se presentan los promedios de los valores densidad óptica con sus respectivas desviaciones estándar.

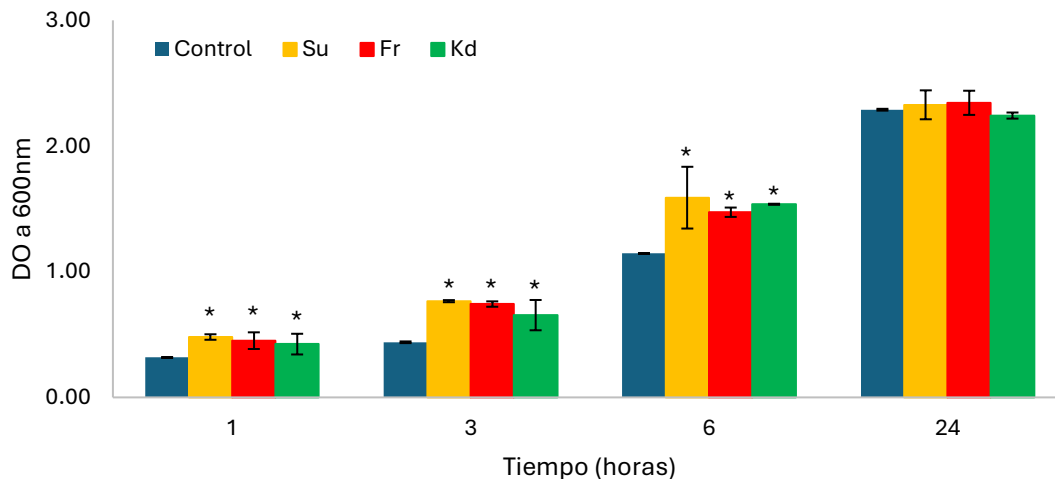


Figura 28. Resultados de DO_{600nm} monitoreadas a las 1, 3, 6 y 24 horas de los inóculos de *S. cerevisiae* expuestas a los extractos de *K. daigremontiana* (Kd), *F. x ananassa* (Fr) y *S. undatus* (Su) a una concentración de 500 µg L⁻¹.

A partir de los resultados se realizó una prueba t por pares para comparar los valores promedios de la densidad óptica de cada medio de cultivo con extracto con respecto al control, el nivel de significancia fue $p < 0.05$. En la figura 30 se puede observar que para las primeras 6 horas de exposición la densidad óptica obtenida para los tres extractos fue significativamente mayor comparada con la obtenida en el grupo control, lo que sugiere que durante este tiempo (fase logarítmica de crecimiento) los extractos favorecen el crecimiento de esta especie de levadura cuando están a la concentración de 500 µg L⁻¹. Estos resultados son importantes en el contexto del estudio de procesos de enriquecimiento enfocados en el aumento de la producción de biomasa de las levaduras. Por otro lado, los valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de exposición (fase estacionaria) a los extractos, no muestran diferencias significativas entre las condiciones con los extractos y el control.

Como ya se ha mencionado anteriormente en la sección de Introducción, las levaduras del género *Saccharomyces*, tienen gran importancia económica en el área alimenticia y de la salud, debido a su uso en la elaboración múltiples productos alimenticios y suplementos dietéticos. El amplio uso de estos microorganismos radica en su alto contenido de nutrientes esenciales y/o benéficos para la salud del ser humano (vitaminas, aminoácidos, minerales, proteínas), así como de componentes que contribuyen a dar estabilidad, color, sabor o textura a productos alimenticios (enzimas, pigmentos, ácidos orgánicos, compuestos antioxidantes). Por lo anterior, es que la incorporación de procesos de biofortificación en la obtención de levaduras ha ido ganando interés. El uso de extractos de plantas o la adición de compuestos bioactivos es una buena alternativa para estimular la síntesis de metabolitos secundarios que mejoran características de las levaduras, como aumento en la producción del biomasa o mejora de la capacidad antioxidante (mediante la producción o acumulación de compuestos bioactivos como flavonoides, terpenos, fenoles, etc). Estos extractos no solo influyen en el crecimiento microbiano y su perfil metabólico, sino que también potencian la capacidad de las levaduras para generar biomasa funcional, con aplicaciones en



alimentos, suplementos y nutraceuticos. Considerando lo anterior y con base en los resultados de crecimiento en medio líquido de *S. cerevisiae* expuesta a los tres extractos seleccionados, pareció interesante llevar a cabo la determinación mediante métodos espectrofotométricos del contenido de flavonoides y compuestos fenólicos libres, además de la capacidad antioxidante para cada extracto. Así mismo, se planteó llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de las levaduras después de 24 horas de ser expuestas a los extractos.

1.3. Determinación de fenoles y flavonoides en *Selenicereus undatus* (Su) *Fragaria x ananassa* (Fr) y *Kalanchoe daigremontiana* (Kd).

Los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante, flavonoides y fenoles fenoles libres de los extractos Fr, No.10; Su, No.12; y Kd, No. 13 se presentan en las tablas 6 y 7. Los datos mostrados corresponden al promedio de tres réplicas independientes, reportados con su respectiva desviación estándar. Los valores encontrados muestran que el extracto de *S. undatus* fue en el que se determinó la mayor AOx (7. 25 mg Eq. ácido gálico g^{-1}) así como el mayor contenido de flavonoides (128.58 mg g^{-1}) y fenoles libres (30.90 mg Eq. ácido gálico g^{-1}). Seguido por *F. x ananassa* (2.91 mg Eq. ácido gálico g^{-1} , 22.94 mg g^{-1} y 12.63 mg Eq. ácido gálico g^{-1}), siendo el extracto de *K. daigremontiana* con los menores valores determinados (2.045mg Eq. ácido gálico g^{-1} (AOX), 2.03 mg g^{-1} (flavonoides libres) y 0.08 mg Eq. ácido gálico g^{-1} (fenoles libres).

Tabla 6. Determinación de fenoles y flavonoides en extractos vegetales

Muestra	Flavonoides (mg g^{-1})	Fenoles (eq. Ácido gálico g^{-1})
<i>Selenicereus undatus</i> (Su)	128 $\pm$ 4.4	30.9 $\pm$ 0.53
<i>Fragaria x ananassa</i> (Fr)	22.9 $\pm$ 2.07	12.6 $\pm$ 0.41
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd)	2.03 $\pm$ 0.11	0.08 $\pm$ 0.01

Los resultados de la determinación de capacidad antioxidante en *S. cerevisiae* después de 24 horas de exposición a los extractos, se representan en la tabla 7. Los datos mostrados corresponden al promedio de tres réplicas independientes, reportados con su respectiva desviación estándar.



Tabla 7. Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida con extractos vegetales.

Muestra	Tipo de muestra	Capacidad antioxidante (mg Eq. ácido gálico g ⁻¹)
<i>Selenicereus undatus</i> (Su)	Extracto vegetal	7254 ± 185
	Extracto de levadura enriquecido	26.5 ± 6.62*
<i>Fragaria x ananassa</i> (Fr)	Extracto vegetal	2906 ± 387
	Extracto de levadura enriquecido	39.8 ± 2.76*
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Kd)	Extracto vegetal	2,049 ± 145
	Extracto de levadura enriquecido	31.5 ± 2.93*
Control	Extracto de levadura	18.2 ± 0.23*

Los valores obtenidos del ensayo de enriquecimiento de esta especie fúngica con extractos vegetales fueron procesados mediante una prueba t por pares para comparar los valores promedios de AOX en cada tratamiento con respecto al control, en esta comparación se logró ver el aumento significativo ($p < 0.05$) de la capacidad antioxidante en las muestras enriquecidas respecto al control. Siendo la levadura expuesta al extracto de *Fragaria x ananassa* la que mayor actividad antioxidante demostró después de 24 horas de exposición (lo que coincide con los resultados del DO obtenidos), seguido de las levaduras expuestas a Kd y Su. Por otro lado, otro punto interesante de estos resultados radica en que se hubiera esperado que el extracto Su (el cual presentó la mayor AOX de los tres extractos evaluados), fuera el que le confiriera mayor capacidad antioxidante a *S. cerevisiae*, sin embargo, fue el que menor aumento de AOX presente en los tres extractos. En este contexto, se ha sugerido que las levaduras no solo pueden incorporar (bioacumular) compuestos externos con actividad antioxidante, sino que también pueden activamente responder a estímulos generando su propia defensa antioxidante (endógena); ambos casos contribuyen al aumento de la capacidad antioxidante. Lo que se podría reflejar sobre la mejora de: el crecimiento celular, la viabilidad, el metabolismo basal de la levadura. En este sentido y de acuerdo con los resultados, utilizar extractos de fresa (posiblemente subproductos, residuos o biomasa vegetal) para enriquecer levaduras podría representar una estrategia sostenible (circular) con valor añadido. Al generar biomasa microbiana enriquecida, se puede escalar a producción de ingredientes funcionales a menor costo y menor dependencia de materias primas vegetales puros.

A partir de los resultados en las pruebas de crecimiento para *Trichoderma* y *Saccharomyces*, se llevó a cabo el estudio metabolómico mediante HPLC-ESI-MS/MS. Los resultados se presentan en la siguiente sección.



1.4 Análisis metabolómico no dirigido de *Fragaria x ananassa* y *Selenicereus undatus* mediante HPLC-ESI-QTOF-MS/MS

A partir de los resultados del crecimiento de *Trichoderma* y *Saccharomyces*, se llevó a cabo el análisis metabolómico no dirigido mediante HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Para lo cual únicamente fueron elegidos los extractos en los que se registró mayor inhibición de crecimiento de *Trichoderma atroviride* y una mejora en la biomasa de *S. cerevisiae*, con base en esto, se seleccionaron los extractos de *Fragaria x ananassa* y *Selenicereus undatus* para llevar a cabo el análisis. El objetivo de realizar el análisis metabolómico no dirigido fue la construcción de un perfil general a nivel ontológico de posibles compuestos presentes en los extractos que se pudieran relacionar con los efectos de inhibición de crecimiento de hongos del género *Trichoderma* y de aquellos cuya presencia se relacionara con la mejora del crecimiento en la fase estacionaria de levaduras del género *Saccharomyces*, así como con el aumento de la capacidad antioxidante. Los resultados se presentan en las Tablas 8 y 10 para *Selenicereus undatus* y *Fragaria x ananassa* respectivamente.

Para *Selenicereus undatus* (Su) (tabla 8), se obtuvieron 46 características moleculares que cumplieron los con criterios de relación señal/ruido, intensidad, fold change y significancia que se describen en la figura 11. Posteriormente se asignaron fórmulas y estructuras con base en los espectros de MS/MS, seleccionando aquellas con más alto score y error de masa menor a 5 ppm. Finalmente, las estructuras resultantes fueron clasificadas en 17 ontologías diferentes: alcaloides (3); alcoholes grasos (1); aminocompuestos (3); análogos de nucleósidos y nucleótidos (1); antraceno (1); compuestos glicosídicos (2); derivados del benceno (6); derivados del colesterol (1); derivados del furano (1); ésteres (5); flavonoides (8); polifenoles (3); quinolinas (1); saponinas (1); taninos (1); terpenos/sesquiterpenos (6); tocoferoles (1) y xilenos (1).

**Tabla 8. Resultados del análisis metabolómico no dirigido por HPLC-ESI-MS/MS de *Selenicereus undatus* (Su)**

No	Nombre de la estructura propuesta	Fórmula	Masa Teórica	Masa Experimental	Error de masa (ppm)	TR (min)	Ontología
1	5-[3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine- 2,4-dione	$C_{11}H_{16}N_2O_6$	273.1081	273.1080	0.4138	0.938	Análogos de nucleósidos y nucleótidos
2	N-(2-[[1-carbamoyl-2-(thiophen-2-yl)ethyl]carbamoyl]-1-(furan-2-carbonyl)piperidin-4-yl)-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide	$C_{22}H_{24}N_6O_5S_2$	517.1322	517.1323	-0.1276	1.062	N-acilpiperidinas
3	Gossypetin	$C_{15}H_{10}O_8$	319.0448	319.0457	-2.6830	1.102	Flavonoles
4	3,3',4',5,5',8-Hexahydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_8$	319.0448	319.0457	-2.6830	1.102	Flavonoles
5	6,13,14-trihydroxy-7-methoxy-2,9-dioxatetracyclo[6.6.2.0 ^{4,16} .0 ^{11,15}]hexadeca-1(15),4,6,11,13-pentaene-3,10-dione	$C_{15}H_{10}O_8$	319.0448	319.0457	-2.6830	1.102	Taninos hidrolizables
6	4-{2-[4-(phosphonooxy)naphthalen-1-yl]diazene-1-yl}benzene-1-sulfonic acid	$C_{16}H_{13}N_2O_7PS$	409.0254	409.0258	-1.0195	1.142	Naftalenos
7	2-[[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4a,8a-dihydro-4H-chromen-3-yl]oxy]-3,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-4-yl acetate	$C_{24}H_{26}O_{13}$	523.1446	523.144	1.1794	1.142	Compuestos O-glicosílicos
8	{6-[[4,8-dihydroxy-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl]oxy]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl}methyl 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoate	$C_{24}H_{26}O_{13}$	523.1446	523.144	1.1794	1.142	Glicósidos fenólicos
9	Tricornoside C;(-)-Tricornoside C	$C_{24}H_{26}O_{13}$	523.1446	523.144	1.1794	1.142	Xantonas



10	2-{7-[(ethylcarbamoyl)amino]-1-hydroxy-4a,8-dimethyl-decahydronaphthalen-2-yl}-N-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]propanamide	$C_{24}H_{44}N_4O_4$	453.3435	453.3434	0.2912	1.27	Sesquiterpenoides Eudesmano, isoeudesmano o cicloeudesmano
11	{2-[5,7-dihydroxy-2-(3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl]-4-hydroxy-6-methyl-5-oxooxan-3-yl}oxidanesulfonic acid	$C_{22}H_{20}O_{12}S$	509.0748	509.0756	-1.5263	1.678	Flavonoides C- glicósidos
12	N-(6-{[4-(thiophen-2-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-hexahydrofuro[3,2-b]furan-3-yl)cyclopropanecarboxamide	$C_{18}H_{20}N_4O_3S$	373.1329	373.1327	0.5012	1.763	Furofuranos
13	8-[[4-[2-furanyl(oxo)methyl]-1-piperazinyl]methyl]-1,3-dimethyl-7-propylpurine-2,6-dione	$C_{20}H_{26}N_6O_4$	415.2088	415.2098	-2.3362	2.543	Xantinas
14	3-(2-methoxyethyl)-1-[[5-({6-oxo-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-dien-11-yl)methyl}-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl)methyl]thiourea	$C_{24}H_{37}N_5O_2S$	460.2741	460.2737	0.8082	2.543	Citisina y derivados
15	8-ethyl-5-hydroxy-1-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methoxyphenyl]-9-(N'-methylcarbamimidamido)nonan-3-yl acetate	$C_{23}H_{39}N_3O_6$	454.2912	454.2917	-1.1843	4.206	Metoxifenoles
16	2-({4-[(1-[(tert-butoxy)carbonyl]pyrrolidin-2-yl)formamido)methyl]cyclohexyl}formamido)-3-methylbutanoic acid	$C_{23}H_{39}N_3O_6$	454.2912	454.2917	-1.1843	4.206	Ácidos N-acil-alfa amino
17	2-[(3,5-dimethylphenyl)amino]-4,5-dihydroxy-N-(prop-2-yn-1-yl)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1,3-benzothiazole-7-carboxamide	$C_{19}H_{23}N_3O_3S$	374.1533	374.1534	-0.2993	4.521	m-Xilenos
18	Bargustanine	$C_{29}H_{34}N_2O_7$	523.2439	523.2438	0.1491	9.511	Bencilisoquinolinas
19	3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-N-[2-(4-methoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]propanamide	$C_{29}H_{34}N_2O_7$	523.2439	523.2438	0.1491	9.511	Metoxifenoles
20	Artorigidusin	$C_{22}H_{26}O_6$	387.1802	387.1805	-0.7361	12.216	Pirancromenos



21	3-formyl-2a-hydroxy-6,7b-dimethyl-1H,2H,2aH,4aH,5H,6H,7H,7aH,7bH-cyclobuta[e]inden-2-yl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate	$C_{22}H_{26}O_6$	387.1802	387.1805	-0.7361	12.216	Ésteres alquílicos del ácido p-hidroxibenzoico
22	(R)-(+)-6'-hydroxy-7'-methoxybergamottin	$C_{22}H_{26}O_6$	387.1802	387.1805	-0.7361	12.216	Psoralenos
23	3-[(2,6-dimethyl-1,2,4a,5,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)(hydroxy)methylidene]-5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]pyrrolidine-2,4-dione	$C_{24}H_{27}NO_4$	394.2013	394.2022	-2.3211	12.216	Bencenoides 1-hidroxi-2-sin-sustituir
24	3-[7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-8a-methyl-1,2,3,5,8,8a-hexahydroindolizin-6-yl]phenyl acetate	$C_{24}H_{27}NO_4$	394.2013	394.2022	-2.3211	12.216	Estilbenos
25	ethyl 5-hydroxy-4-[(3-methylpiperidin-1-yl)methyl]-2-phenyl-1-benzofuran-3-carboxylate	$C_{24}H_{27}NO_4$	394.2013	394.2022	-2.3211	12.216	Flavonoides 2-arilbenzofurano
26	CNP0431532	$C_{24}H_{27}NO_4$	394.2013	394.2022	-2.3211	12.216	Flavonoides aurona
27	4-[(1S,4S,8S,9R)-1,5,9-trimethyl-11,14,15,16-tetraoxatetracyclo[10.3.1.04,13.08,13]hexadecan-10-yl]thiomorpholine	$C_{19}H_{31}NO_4S$	370.2047	370.2048	-0.3917	14.035	Artemisininas
28	2-[3-[(5-butyl-1,2-oxazol-3-yl)methyl]piperidin-4-yl]-N-(1,3-thiazol-2-yl)acetamide	$C_{18}H_{26}N_4O_2S$	363.1849	363.1849	0.0633	14.168	Araquilaminas
29	benzyl({4-[5'-(prop-1-yn-1-yl)-[2,2'-bithiophene]-5-carbonyl]-1,2,3,4,4a,9a-hexahydroanthracen-1-yl)methyl)amine	$C_{34}H_{31}NOS_2$	534.1920	534.1918	0.3388	16.551	Ácidos y derivados de ácidos antrasenocarboxílicos
30	8-methyl-2-oxo-4-phenyl-2H-chromen-7-yl 2-[[{(benzyloxy)carbonyl]amino}-3-phenylpropanoate	$C_{33}H_{27}NO_6$	534.1911	534.1918	-1.2842	16.551	Neoflavonas
31	3-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-4-oxo-6-propyl-4H-chromen-7-yl N,N-diphenylcarbamate	$C_{33}H_{27}NO_6$	534.1911	534.1918	-1.2842	16.551	Isoflavonas
32	6-[(propan-2-yl)amino]hexan-2-yl 2-methyl-6-[(4-methylhex-4-en-1-yl)amino]hept-2-enoate	$C_{24}H_{46}N_2O_2$	395.3632	395.3641	-2.2637	18.556	Ésteres de ácidos grasos
33	2-[(4-tert-butylphenyl)methylidene]-7-[(diethylamino)methyl]-6-hydroxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-one	$C_{24}H_{29}NO_3$	380.2220	380.222	0.0526	18.595	Flavonoides aurona
34	3-(2-furanyl)-N-[3-(2-furanyl)-4-methylpentyl]-4-phenylbutanamide	$C_{24}H_{29}NO_3$	380.2220	380.222	0.0526	18.595	N-acil aminas



35	N-(2-methoxy-2-{4-[(4-methylpent-3-en-1-yl)oxy]phenyl}ethyl)-3-phenylprop-2-enamide	$C_{24}H_{29}NO_3$	380.2220	380.222	0.0526	18.595	Benciléteres
36	hexacosyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate	$C_{35}H_{60}O_3$	529.4615	529.4615	0.0416	20.75	Ésteres del ácido cumárico
37	1-[2,5-dimethyl-5-(2-methylbutan-2-yl)oxolan-2-yl]-3a,3b,6,6,9a-pentamethyl- hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl acetate	$C_{35}H_{60}O_3$	529.4615	529.4615	0.0416	20.75	Saponinas triterpénicas
38	11-cis-retinyl tetradecanoate	$C_{34}H_{56}O_2$	497.4353	497.4352	0.2151	20.828	Monoésteres de cera
39	Cyclohomonervilol acetate	$C_{34}H_{56}O_2$	497.4353	497.4352	0.2151	20.828	Cicloartanol y derivados
40	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12b,13,14,14a,14b-icosahydricen-3-yl butanoate	$C_{34}H_{56}O_2$	497.4353	497.4352	0.2151	20.828	Triterpenoides
41	4,4,6a,6b,8a,14b-hexamethyl-11-methylidene-docosahydricen-3-yl 3-methylbutanoate	$C_{34}H_{56}O_2$	497.4353	497.4352	0.2151	20.828	Ésteres de ácidos grasos
42	1-[(1-hydroxydodecyl)peroxy]dodecan-1-ol	$C_{24}H_{50}O_4$	403.3782	403.379	-2.0155	20.977	Alcoholes grasos
43	[9a,11a-dimethyl-1-(6-methylheptan-2-yl)-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl]oxidanefulfonic acid	$C_{27}H_{48}O_4S$	469.3346	469.3343	0.6520	23.586	Colesterol y derivados
44	5-hydroxy-7-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-one	$C_{28}H_{46}O_3$	431.3520	431.3528	-1.9195	23.875	Lactonas diterpénicas
45	[2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydrochromen-6-yl] acetate	$C_{28}H_{46}O_3$	431.3520	431.3528	-1.9195	23.875	Diterpenoides
46	6-hydroxy-2,7-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydrochromene-8-carbaldehyde	$C_{28}H_{46}O_3$	431.3520	431.3528	-1.9195	23.875	Tocoferoles



A partir de las ontologías obtenidas, se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica de las estructuras asignadas que pudieran estar relacionadas con los efectos observados en *Trichoderma* y *Sacchamoryces*. En la tabla 9, se muestran las estructuras obtenidas del análisis metabolómico que de acuerdo con la bibliografía presentan la actividad biológica parecida a lo observado con los sistemas biológicos evaluados en este trabajo. Se logró clasificar 8 estructuras con actividad antioxidante los cuales pertenecen a las ontologías: flavonoides¹⁷⁸ (4), derivados del benceno¹⁷⁹ (22), ésteres¹⁸⁰ (36), terpenos y triterpenos^{181,182} (37,39 y 45) y tocoferoles¹⁸³ (46). También se determinaron 8 estructuras químicas con actividad antifúngica, pertenecientes a las ontologías: alcaloides¹⁸⁴ (13), derivados del benceno¹⁸⁵ (6 y 35), derivados del colesterol¹⁸⁶ (43), derivados del furano¹⁸⁷ (12), ésteres/parabenos¹⁸⁸ (21), flavonoides¹⁸⁹ (11), polifenoles¹⁹⁰ (15) y sesquiterpenos¹⁹¹ (10). Así mismo, se seleccionó una estructura química que de acuerdo con lo reportado puede promover el crecimiento microbiano la ontología involucrada en esta actividad fue: triterpenos¹⁹² (40). De igual manera se clasificaron los compuestos que de acuerdo con la literatura, pueden presentar más de una actividad biológica de interés para esta investigación. En el primer caso, donde los compuestos pueden tener actividad fúngica y antioxidante, se logró agrupar las siguientes ontologías, aminoácidos¹⁹³⁻¹⁹⁵ (2,16 y 28), derivados del benceno^{191,196} (23), flavonoides^{197,198} (25, 26 y 33), diterpenos^{197,198} (44) y xilenos¹⁹⁹ (17). En el caso de compuestos que son de promotores del crecimiento microbiano y tienen actividad antifúngica se encontró la ontología de los flavonoides^{178,200-202} con 2 compuestos químicos (3 y 4). Y finalmente un compuesto más de esta ontología, además de tener reportada una actividad biológica como promotor del crecimiento, posee actividad antifúngica (11).

**Tabla 9. Clasificación del perfil metabolómico de *Selenicereus undatus* (Su) de acuerdo a su actividad biológica**

Actividad antioxidante ¹⁷⁸⁻¹⁸³	
4	3,3',4',5,5',8-Hexahydroxyflavone
22	(R)-(+)-6'-hydroxy-7'-methoxybergamottin
36	hexacosyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate
37	1-[2,5-dimethyl-5-(2-methylbutan-2-yl)oxolan-2-yl]-3a,3b,6,6,9a-pentamethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl acetate
39	Cyclohomonervilol acetate
45	[2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydrochromen-6-yl] acetate
46	6-hydroxy-2,7-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydrochromene-8-carbaldehyde
Actividad antifúngica ¹⁸⁴⁻¹⁹¹	
6	4-{2-[4-(phosphonoxy)naphthalen-1-yl]diazene-1-yl}benzene-1-sulfonic acid
10	2-{7-[(ethylcarbamoyl)amino]-1-hydroxy-4a,8-dimethyl-decahydronaphthalen-2-yl}-N-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]propanamide
11	{2-[5,7-dihydroxy-2-(3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl]-4-hydroxy-6-methyl-5-oxooxan-3-yl}oxidanesulfonic acid
12	N-(6-{[4-(thiophen-2-yl)pyrimidin-2-yl]amino}-hexahydrofuro[3,2-b]furan-3-yl)cyclopropanecarboxamide
13	8-[[4-[2-furanyl(oxo)methyl]-1-piperazinyl]methyl]-1,3-dimethyl-7-propylpurine-2,6-dione
15	8-ethyl-5-hydroxy-1-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methoxyphenyl]-9-(N'-methylcarbamimidamido) nonan-3-yl acetate
21	3-formyl-2a-hydroxy-6,7b-dimethyl-1H,2H,2aH,4aH,5H,6H,7H,7aH,7bH-cyclobuta[e]inden- 2-yl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate
35	N-(2-methoxy-2-{4-[(4-methylpent-3-en-1-yl)oxy]phenyl}ethyl)-3-phenylprop- 2-enamide
43	[9a,11a-dimethyl-1-(6-methylheptan-2-yl)-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren- 7-yl] oxidanesulfonic acid
Promotores del crecimiento microbiano	
40	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12b,13,14,14a,14b-icosahydricen-3-yl butanoate
Actividad antifúngica/antioxidante ^{191,193-199}	
2	N-(2-{[1-carbamoyl-2-(thiophen-2-yl)ethyl]carbamoyl}-1-(furan-2-carbonyl)piperidin-4-yl)-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide
16	2-({4-[(1-[(tert-butoxy)carbonyl]pyrrolidin-2-yl)formamido)methyl]cyclohexyl}formamido)-3-methylbutanoic acid
17	2-[(3,5-dimethylphenyl)amino]-4,5-dihydroxy-N-(prop-2-yn-1-yl)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1,3-benzothiazole-7-carboxamide
23	3-[(2,6-dimethyl-1,2,4a,5,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)(hydroxy)methylidene]- 5-[(4-hydroxyphenyl)methyl]pyrrolidine-2,4-dione



25	ethyl 5-hydroxy-4-[(3-methylpiperidin-1-yl)methyl]-2-phenyl-1-benzofuran-3-carboxylate
26	2-[(2-ethoxyphenyl)methylidene]-6-hydroxy-7-[(2-methylpiperidin-1-yl)methyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-one
28	2-{3-[(5-butyl-1,2-oxazol-3-yl)methyl]piperidin-4-yl}-N-(1,3-thiazol-2-yl)acetamide
33	2-[(4-tert-butylphenyl)methylidene]-7-[(diethylamino)methyl]-6-hydroxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-one
44	5-hydroxy-7-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-one
Promotores del crecimiento microbiano/ Actividad antioxidante ^{178,200,201}	
3	Gossypetin
4	3,3',4',5,5',8-Hexahydroxyflavone
Promotores del crecimiento microbiano/ Actividad antifúngica ^{200,202}	
11	{2-[5,7-dihydroxy-2-(3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-6-yl]-4-hydroxy-6-methyl-5-oxooxan-3-yl}oxidanesulfonic acid

Para *Fragaria x ananassa* (Fr) (tabla 10), se obtuvieron 36 características moleculares que cumplieron los criterios de relación señal/ruido, intensidad, fold change y significancia que se describen en la figura 11. Posteriormente se asignaron fórmulas y estructuras con base en los espectros de MS/MS, seleccionando aquellas con más alto score y y error de masa menor a 5 ppm.



Tabla 10. Resultados del análisis metabolómico no dirigido por HPLC-ESI-MS/MS de *Fragaria x ananassa* (Fr)

No	Nombre de la estructura propuesta	Formula	Masa Teórica	Masa Experimental	Diferencia de masa (ppm)	RT	Ontología
1	N-[2-[[5-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-[[[(1R,2S,3R,4R)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-6-methylpyrimidin-2-yl]amino]ethyl]methanesulfonamide	$C_{21}H_{28}N_6O_5S_2$	509.1635	509.1642	-1.3080	0.996	Benzotiazoles
2	Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.1129	433.113	-0.1778	1.031	Isoflavonoides O-glicósidos
3	16-azatetracyclo[7.6.1.02,7.010,15]hexadeca-2,4,6,10,12,14-hexaene-1-carboxamide	$C_{16}H_{14}N_2O$	251.1179	251.1179	-0.0398	1.031	Dibenzocicloheptenos
4	1-Methyl 2-galloylgalactarate	$C_{14}H_{16}O_{12}$	377.0715	377.0714	0.1379	1.031	Derivados del ácido glucurónico
5	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-4H-chromen-4-one	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.1129	433.113	-0.1778	1.031	Flavonoid C-glicósidos
6	3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy]-4H-chromen-4-one	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.1129	433.113	-0.1778	1.031	Flavonoid-7-O-glicósidos
7	N-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-6-oxo-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-diene-11-carbothioamide	$C_{18}H_{17}N_5O_2S$	368.1176	368.1169	1.8228	1.11	Citisina y derivados
8	7-[[ethyl-[(4-oxo-1H-quinazolin-2-yl)methyl]amino]methyl]-5-thiazolo[3,2-a]pyrimidinone	$C_{18}H_{17}N_5O_2S$	368.1176	368.1169	1.8228	1.11	Quinazolininas
9	1-(5-ethyl-7-hydroxy-6-methylhept-3-en-2-yl)-9a,11a-dimethyl-hexadecahydro-1H cyclopenta[a]phenanthrene-2,3,3b,5,6,7-hexol	$C_{29}H_{50}O_7$	511.3629	511.3626	0.6453	1.615	Estigmastanos y derivados
10	13-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-12,14-dioxo-1,13-diazatetracyclo[8.6.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}]hexadeca-2(7),3,5,8-tetraene-16-carboxamide	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	404.1241	404.1244	-0.7498	2.477	Amidas de alfa aminoácidos
11	8-[[4-[2-furanyl(oxo)methyl]-1-piperazinyl]methyl]-1,3-dimethyl-7-propylpurine-2,6-dione	$C_{20}H_{26}N_6O_4$	415.2088	415.2098	-2.3362	2.554	Xantinas



12	N-[[10-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]acridin-9-ylidene]amino]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-amine	$C_{23}H_{28}N_6S$	421.2169	421.2161	1.8779	2.554	Acridinas
13	[3,4-bis(acetyloxy)-5-acetamido-6-(2-nitrophenoxy)oxan-2-yl]methyl acetate	$C_{20}H_{24}N_2O_{11}$	469.1453	469.1452	0.1833	2.954	N-acil-alfa-hexosaminas
14	8-ethyl-5-hydroxy-1-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methoxyphenyl]-9-(N'-methylcarbamimidamido)nonan-3-yl acetate	$C_{23}H_{39}N_3O_6$	454.2912	454.2917	-1.1843	4.195	Metoxifenoles
15	1-{4-[(2-[(tert-butoxy)carbonyl]amino)-3-methylbutanamido]methyl}cyclohexanecarbonylpyrrolidine-2-carboxylic acid	$C_{23}H_{39}N_3O_6$	454.2912	454.2917	-1.1843	4.195	N-acil-alfa aminoácidos
16	1-{6-[(4-[(benzyl(methyl)amino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-1 azabicyclo[2.2.2]octane-3-carbonyl}piperidine-4-carboxamide	$C_{26}H_{37}N_7O_2$	480.3082	480.3083	-0.3123	4.774	N-acilpiperidinas
17	3-oxo-2-(3-phenylprop-2-en-1-ylidene)-2,3-dihydro-1-benzofuran-6-yl 2,2-dimethylpropanoate	$C_{22}H_{20}O_4$	349.1434	349.1429	1.5352	5.398	Benzofuranos
18	(2-[[3-(heptadec-6-enoyloxy)-2-hydroxypropyl phosphonato]oxy]ethyl)trimethylazanium	$C_{26}H_{52}NO_7P$	522.3554	522.3557	-0.5456	5.908	1-acil-sn-glicero-3-fosfocolinas
19	Bargustanine	$C_{29}H_{34}N_2O_7$	523.2439	523.2438	0.1491	9.501	Bencilisoquinolinas
20	4-[(2-aminopyridin-4-yl)methyl]-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-5-hydroxy-7-(8-hydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-5-yl)heptan-3-one	$C_{29}H_{34}N_2O_7$	523.2439	523.2438	0.1491	9.501	Curcuminoides
21	N-(2-methoxyethyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-2-(4-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-3-yl)acetamide	$C_{29}H_{38}N_4O_3$	491.3017	491.3026	-1.8970	9.501	Quinolizinas
22	N-cyclohexyl-5-{2-[(morpholin-4-yl)methyl]phenyl}-6-oxo-7,11diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-diene-11-carboxamide	$C_{29}H_{38}N_4O_3$	491.3017	491.3026	-1.8970	9.501	Citisina y derivados



23	N-{8-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-[1-oxo-1-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)propan-2-yl]-decahydronaphthalen-2-yl}pyrazine-2-carboxamide	$C_{29}H_{38}N_4O_3$	491.3017	491.3026	-1.8970	9.501	Eudesmanos, isoeudesmanos o ciclo-eudesmanos sesquiterpenoides
24	5-(3-{3,15-diazatetracyclo[7.7.1.0 ^{2,7} .0 ^{10,15}]heptadec-7-en-3-yl}-3-oxopropyl)-3-(2-phenylethyl)imidazolidine-2,4-dione	$C_{29}H_{38}N_4O_3$	491.3017	491.3026	-1.8970	9.501	Aloperina y alcaloides relacionados
25	Artorigidusin	$C_{22}H_{26}O_6$	387.1802	387.1805	-0.7361	12.249	Piranocromenos
26	3-formyl-2a-hydroxy-6,7b-dimethyl-1H,2H,2aH,4aH,5H,6H,7H,7aH,7bH-cyclobuta[e]inden-2-yl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate	$C_{22}H_{26}O_6$	387.1802	387.1805	-0.7361	12.249	p-hidroxibenzoico ácido alquil ésteres
27	4-[(1S,4S,8S,9R)-1,5,9-trimethyl-11,14,15,16-tetraoxatetracyclo[10.3.1.04,13.08,13]hexadecan-10-yl]thiomorpholine	$C_{19}H_{31}NO_4S$	370.2047	370.2048	-0.3917	14.082	Artemisininas
28	Marmeline	$C_{22}H_{25}NO_3$	352.1907	352.1912	-1.3629	18.106	Amidas del ácido cinámico
29	1-[2,5-dimethyl-5-(2-methylbutan-2-yl)oxolan-2-yl]-3a,3b,6,6,9a-pentamethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl acetate	$C_{35}H_{60}O_3$	529.4615	529.4615	0.0416	20.665	Saponinas triterpenoides
30	hexacosyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate	$C_{35}H_{60}O_3$	529.4615	529.4615	0.0416	20.665	Ésteres del ácido cumárico
31	1-[(1-hydroxydodecyl)peroxy]dodecan-1-ol	$C_{24}H_{50}O_4$	403.3782	403.379	-2.0155	20.995	Alcoholes grasos
32	1,1'-(1,4-Dihydro-4-nonyl-3,5-pyridinediyl)bis [1-decanone]	$C_{34}H_{61}NO_2$	516.4775	516.4775	0.0136	21.039	Dihidropiridinas
33	N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]hexacosanamide	$C_{34}H_{61}NO_2$	516.4775	516.4775	0.0136	21.039	1-hidroxi-2-bencenoides no sustituido
34	8-(2-hexylcyclopropyl)-N-[8-(2-hexylcyclopropyl)octanoyl]octanamide	$C_{34}H_{63}NO_2$	518.4932	518.4929	0.4957	21.947	N-acil aminas
35	[9a,11a-dimethyl-1-(6-methylheptan-2-yl)-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl]oxidanesulfonic acid	$C_{27}H_{48}O_4S$	469.3346	469.3343	0.6520	23.586	Colesterol y derivados



Finalmente, las estructuras resultantes fueron clasificadas en 17 ontologías diferentes: alcaloides (5); alcoholes grasos (1); aminocompuestos (5); derivados del benceno (4); derivados del colesterol (2); derivados del furano (1); ésteres (2); flavonoides (3); fosfolípidos (1); piridinas (1); polifenoles (3); quinolinas (1); quinazolininas (1); quinolizinas (1); terpenos (3) y tiazoles (1). En la tabla 11, se muestran las estructuras obtenidas del análisis metabolómico que de acuerdo con la bibliografía presentan la actividad biológica observada en los sistemas biológicos evaluados. Se logró clasificar 4 estructuras con actividad antioxidante, las ontologías respectivas fueron: aminocompuestos²⁰³ (7 y 15), ésteres²⁰⁴ (4) y flavonoides²⁰⁵ (2). También se determinaron 17 estructuras químicas con actividad antifúngica, pertenecientes a las siguientes ontologías: alcaloides^{184,206,207} (11 y 28); aminocompuestos^{206,207} (10,16 y 34); derivados del benceno²⁰⁶ (3 y 33); derivados del colesterol²⁰⁸ (9 y 35); polifenoles²¹¹ (14); quinazolininas²⁰⁶ (8); quinolinas²⁰⁹ (20); quinolizinas²⁰⁶ (22); terpenos²⁰⁸ (23 y 29). De igual manera se clasificaron los compuestos que de acuerdo con la literatura, pueden presentar más de una actividad biológica de interés para esta investigación. En el primer caso, donde los compuestos pueden tener actividad fúngica y antioxidante, se logró agrupar las siguientes ontologías: derivado del benceno²¹⁰ (26), piridinas²¹⁰ (20) y tiazoles²¹¹ (1). Y finalmente en el caso de compuestos que son de promotores del crecimiento microbiano, con actividad antioxidante y antifúngica se encontró la ontología: flavonoides²¹²⁻²¹⁴ (5 y 6).

**Tabla 11. Clasificación del perfil metabolómico de *Fragaria x ananassa* (Fr) de acuerdo con su actividad biológica.**

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^{203-205,215}	
2	Genistin
4	1-Methyl 2-galloylgalactarate
7	N-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-6-oxo-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-diene-11-carbothioamide
15	1-{4-[(2-[(tert-butoxy)carbonyl]amino)-3-methylbutanamido)methyl]cyclohexanecarbonyl}pyrrolidine-2-carboxylic acid
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA ^{184,206-210,216}	
3	16-azatetracyclo[7.6.1.0 ^{2,7} ,7.0 ^{10,15}]hexadeca-2,4,6,10,12,14-hexaene-1-carboxamide
8	7-[[ethyl-[(4-oxo-1H-quinazolin-2-yl)methyl]amino]methyl]-5-thiazolo[3,2-a] pyrimidinone
9	1-(5-ethyl-7-hydroxy-6-methylhept-3-en-2-yl)-9a,11a-dimethyl-hexadecahydro-1H cyclopenta[a]phenanthrene-2,3,3b,5,6,7-hexol
10	13-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-12,14-dioxo-1,13-diazatetracyclo[8.6.0.0 ^{2,7} ,0 ^{11,15}] hexadeca-2(7),3,5,8-tetraene-16-carboxamide
11	8-[[4-[2-furanyl(oxo)methyl]-1-piperazinyl]methyl]-1,3-dimethyl-7-propylpurine-2,6-dione
14	8-ethyl-5-hydroxy-1-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methoxyphenyl]-9-(N'-methylcarbamidamido) nonan-3-yl acetate
16	1-{6-[(4-[(benzyl(methyl)amino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]-1 azabicyclo[2.2.2]octane-3-carbonyl}piperidine-4-carboxamide
19	Bargustanine
21	N-(2-methoxyethyl)-N-[(octahydro-1H-quinolizin-1-yl)methyl]-2-(4-oxo-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-3-yl)acetamide
22	N-cyclohexyl-5-{2-[(morpholin-4-yl)methyl]phenyl}-6-oxo-7,11diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-diene-11-carboxamide
23	N-{8-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-[1-oxo-1-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)propan-2-yl]-decahydronaphthalen-2-yl}pyrazine-2-carboxamide
24	5-(3-{3,15-diazatetracyclo[7.7.1.0 ^{2,7} ,0 ^{10,15}] heptadec-7-en-3-yl}-3-oxopropyl)-3-(2-phenylethyl)imidazolidine-2,4-dione
28	Marmeline
29	"1-[2,5-dimethyl-5-(2-methylbutan-2-yl)oxolan-2-yl]-3a,3b,6,6,9a-pentamethyl-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl acetate
33	N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]hexacosanamide
34	8-(2-hexylcyclopropyl)-N-[8-(2-hexylcyclopropyl)octanoyl]octanamide
35	[9a,11a-dimethyl-1-(6-methylheptan-2-yl)-hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-7-yl] oxidanesulfonic acid
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE/ ANTIFÚNGICA ^{210,217}	
1	N-[2-[[5-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-[(1R,2S,3R,4R)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amino]-6-methylpyrimidin-2-yl]amino]ethyl]methanesulfonamide
12	N-[[10-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]acridin-9-ylidene]amino]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-amine
20	4-[(2-aminopyridin-4-yl)methyl]-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-5-hydroxy-7-(8-hydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-5-yl)heptan-3-one



25	Artorigidusin
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE/ ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA/ACTIVIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO²¹²⁻²¹⁴	
5	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-4H-chromen-4-one
6	3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy]-4H-chromen-4-one

A partir de estos resultados se formuló como perspectiva la realización de estudios metabolómicos dirigidos en los extractos vegetales enfocados en la confirmación /determinación de los compuestos presentes en las Tablas 9 y 11 a los cuales se les relacionó con los efectos biológicos observados para *Trichoderma* y *Saccharomyces*. Así mismo, en el grupo de trabajo se tiene como antecedente y línea de investigación el estudio del metabolismo del nitrógeno en diferentes sistemas biológicos, mediante el desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de amino compuestos.

En este sentido se tiene como antecedente la síntesis de un nuevo derivatizante (1-methylpyridinium-3-succinylcarbamate UMCS- UG) para la determinación de amino compuestos mediante HPLC-ESI-MS/MS. El derivatizante utilizado es un derivado de la sal de piridonio, que contiene una carga positiva, mejorando así su ionización en ESI. Para este proyecto pareció interesante llevar a cabo un análisis en la modalidad Precursor ion scan. El ion diagnóstico fue 135.1 m/z, correspondiente al fragmento del derivatizante tras su fragmentación, que es común para todos los compuestos derivatizados (amino compuestos principalmente). Con base en lo anterior, después de haber evaluado el efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*, se seleccionaron algunos de los extractos con mayor y menor inhibición del crecimiento para llevar a cabo un estudio metabolómico en un nivel intermedio entre dirigido y no dirigido con el fin de diferenciar el perfil de amino compuestos presentes en los extractos seleccionados y evaluar si es posible que el perfil de amino compuestos pueda relacionarse con los efectos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

1.5 Determinación de perfil de amino compuestos en extractos vegetales mediante HPLC-ESI-MS mediante el modo de adquisición de Precursor ion scan.

Tal como se describió en la para sección experimental los extractos seleccionados para llevar a cabo este análisis fueron: *Senna septemtrionalis* (Ss), *Mimosa bahamensis* (Mb), *Casearia corymbosa* (Cc), *Tecoma stans* (Ts), *Kalanchoe daigremontiana* (Kd) y *Selenicereus undatus* (Su). En las figuras (29-35), se presentan los cromatogramas obtenidos para cada extracto derivatizado en el modo de adquisición Precursor ion scan utilizando el ion 135 m/z como ion producto (diagnóstico).

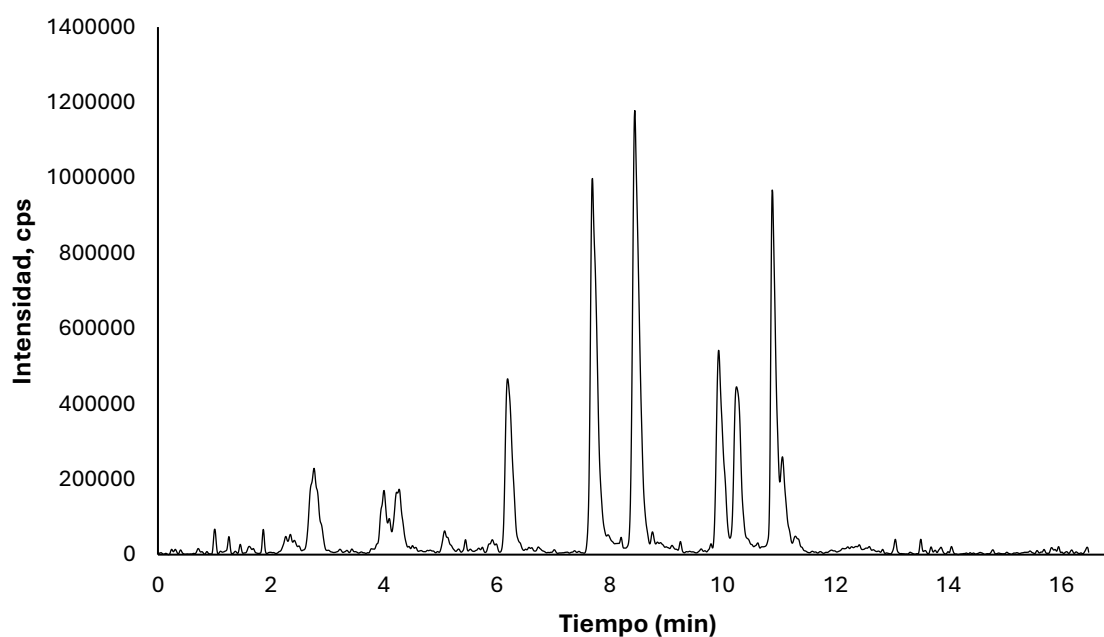


Figura 29. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Senna septemtrionalis*.

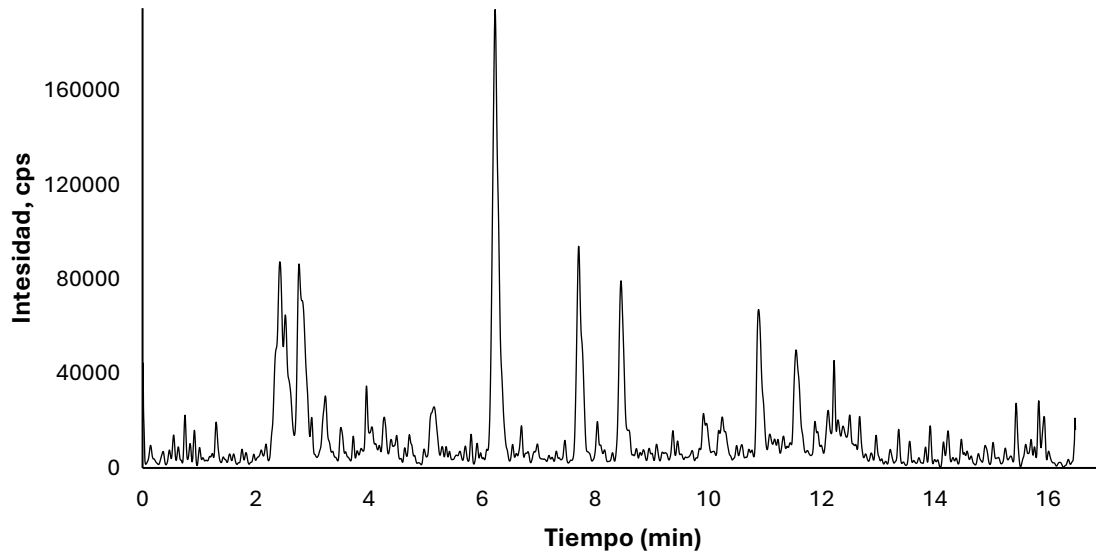


Figura 30. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Mimosa bahamensis*.

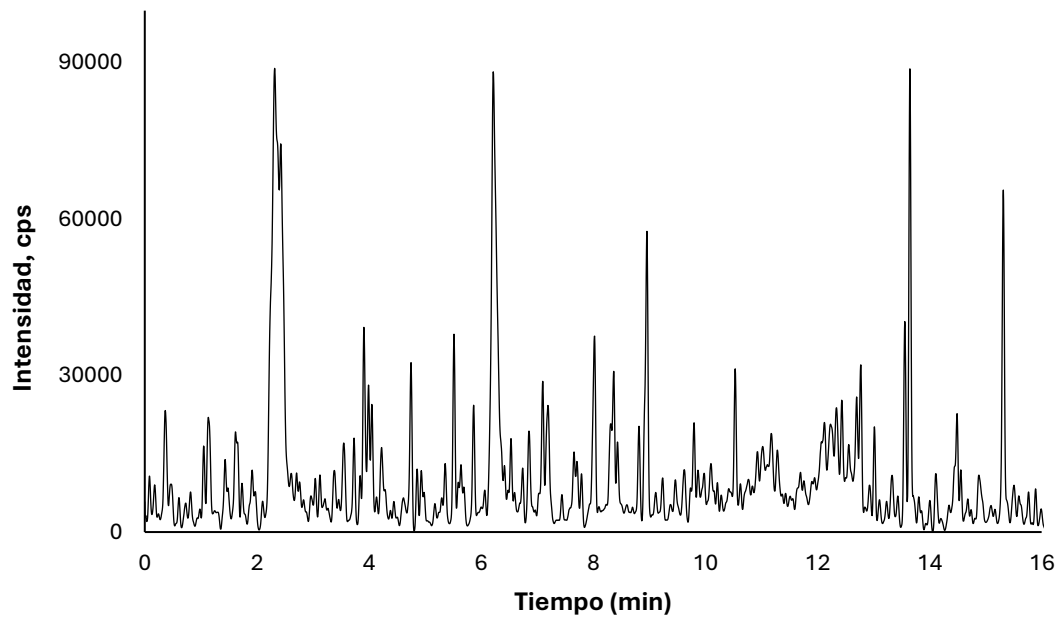


Figura 31. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Caesaria corymbosa*.

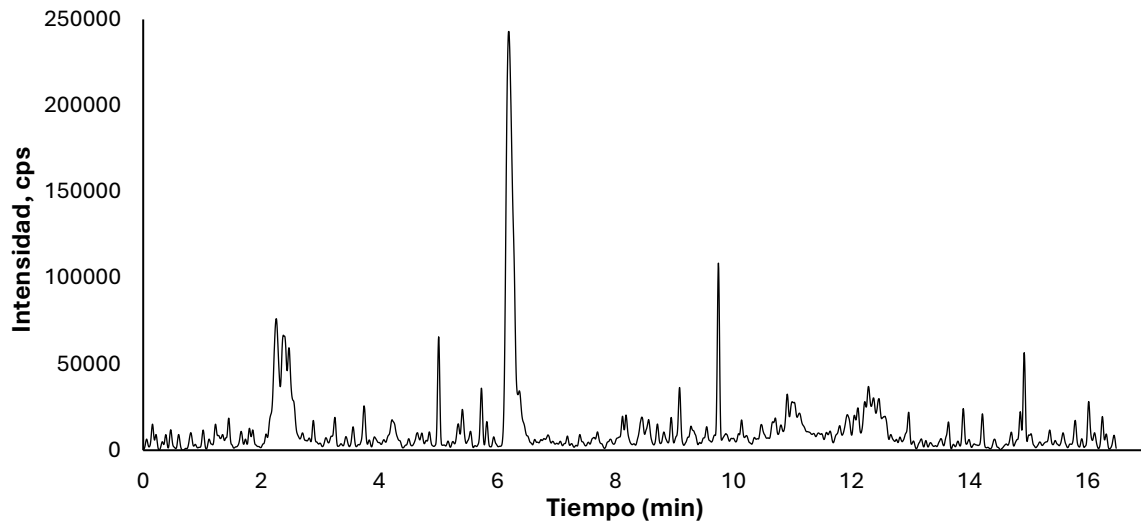


Figura 32. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Tecoma stans*.

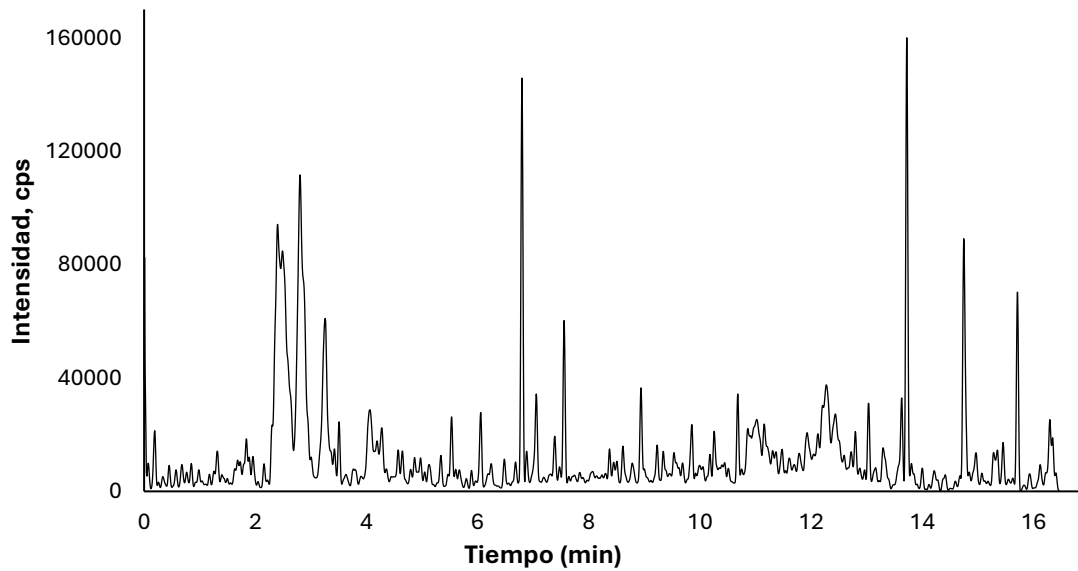


Figura 33. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de *Fragaria x ananassa*.

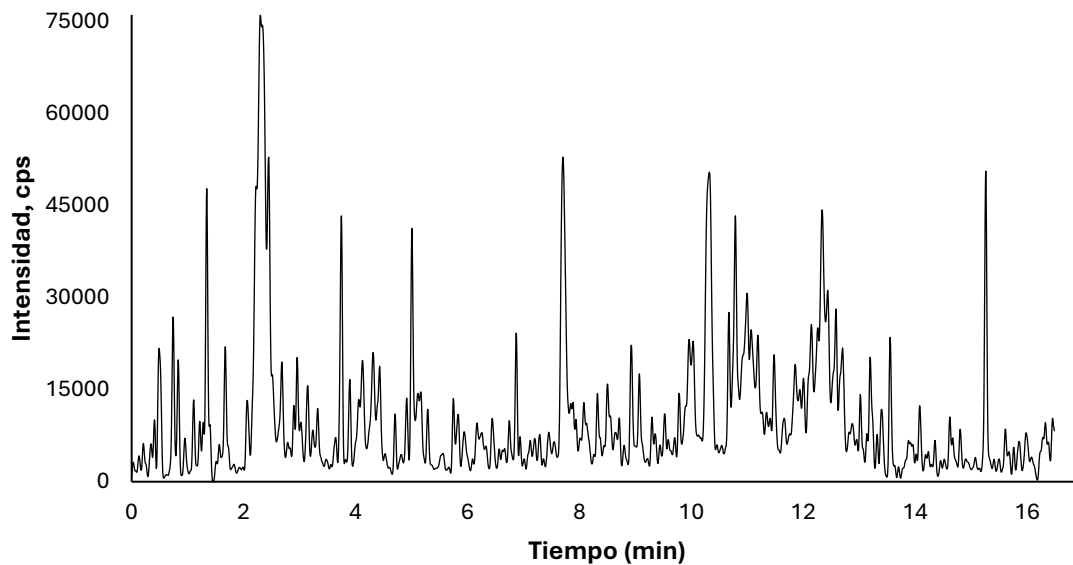


Figura 34. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de ***Kalanchoe daigremontiana***.

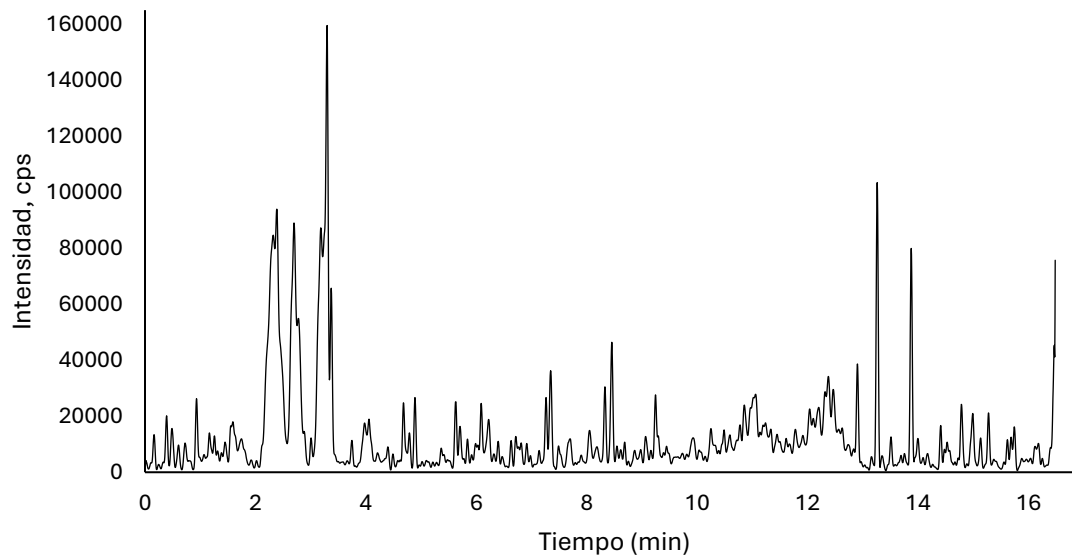


Figura 35. Cromatograma correspondiente a la muestra del extracto de ***Selenicereus undatus***.

Para obtener la lista de iones precursores y poder hacer comparaciones del perfil de posibles amino compuestos entre extractos, los datos obtenidos fueron procesados en el programa MS-DIAL. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) de los iones precursores que presentaron un valor de $p < 0.05$ en todos los extractos analizados. En la figura 36 se presenta el PCA generado a partir de los iones precursores registrados para los extractos analizados, en donde los dos primeros componentes representan el 77% de la varianza total de los datos monitoreado. En la gráfica de los “Scores” se presenta la distribución de los extractos analizados, mientras que en la gráfica de los loadings se presenta la distribución de los iones precursores encontrados.

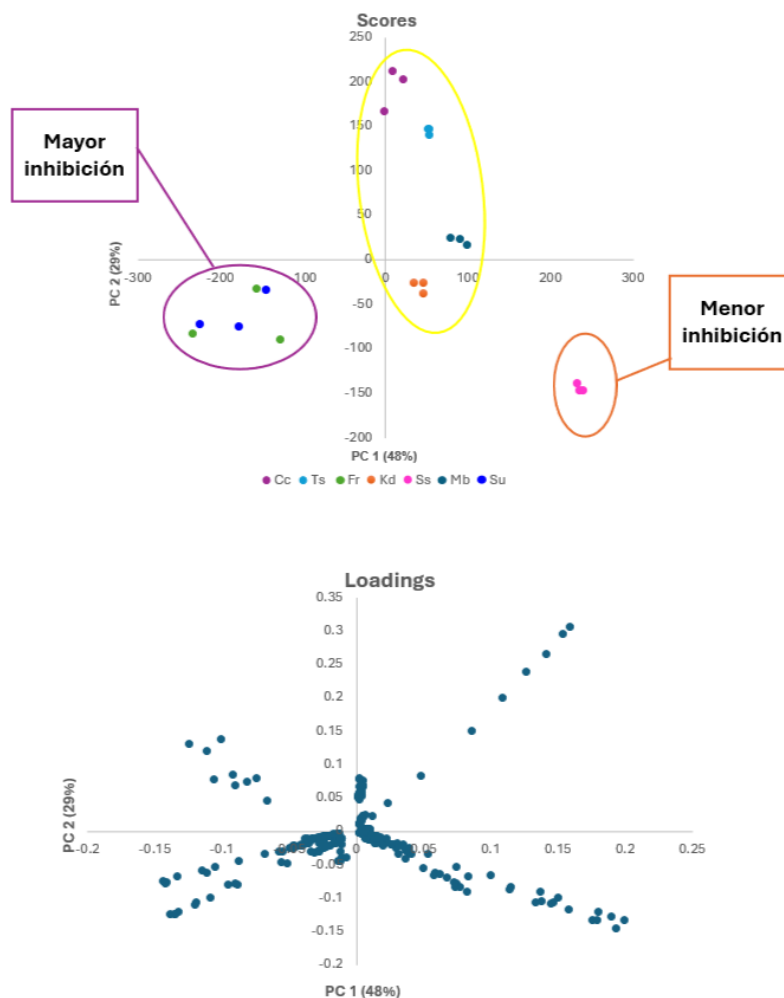


Figura 36. Análisis de componentes principales de los precursores encontrados en los extractos derivatizados y analizados por en la modalidad de Precursor Ion Scan donde le ion producto fue el 135 m/z



En cuanto a la distribución del perfil de precursores respecto a la distribución de los extractos en función de la inhibición del crecimiento de *Trichoderma atroviride*, se observan tres zonas: 1) marcada en verde que corresponde a la agrupación de los extractos que generaron mayor inhibición de crecimiento (Fr y Su), 2) marcada en amarillo la correspondiente a la agrupación de los extractos con inhibición media (9,15,16 y23) la marcada en naranja, la que corresponde a los extractos con menor inhibición del crecimiento (Ss). La distribución de los extractos en las zonas descritas de acuerdo con el efecto que registraron sobre *Trichoderma atroviride* corresponde a los valores de los diámetros de los halos registrados en la tabla 5. La importancia de evaluar el perfil de amino compuestos de extractos de plantas que presentan un efecto antifúngico se basa en los reportes de la presencia análogos de aminoácidos proteogénicos como parte de sus mecanismos de defensa, tal es el caso de la Canavanina, el cual es un compuesto análogo estructural de arginina que se incorpora erróneamente en proteínas fúngicas, produciendo proteínas disfuncionales; otro ejemplo es la Azetidina-2-carboxílica, el cual es un análogo de prolina del cual se ha reportado alteración en el plegamiento proteico y por último la mimosina, derivada de tirosina, cuyos principales efectos reportados son quelación de hierro y bloqueo del ciclo celular.

Aunque muchos estudios se enfocan en los polifenoles como principales agentes antifúngicos en extractos vegetales, los amino compuestos también pueden desempeñar un rol importante, especialmente en plantas leguminosas (*Canavalia ensiformis*, *Mimosa spp.*, *Leucaena*, etc.) que acumulan aminoácidos no proteicos con actividad biológica. Una de las posibles aplicaciones del usar extractos de plantas para modular el crecimiento de microorganismos si el extracto contiene amino compuestos (como los análogos de aminoácidos anteriormente mencionados) es en el desarrollo de biofungicidas selectivos.

El perfil de amino compuestos de un extracto vegetal no solo es una característica bioquímica pasiva, sino que puede ser determinante en su capacidad antifúngica. Evaluarlo permite, entender los mecanismos de inhibición microbiana, prevenir efectos indeseados sobre microorganismos benéficos (como levaduras probióticas) y potenciar aplicaciones biotecnológicas mediante el diseño de extractos selectivos o enriquecimientos funcionales.

Es este sentido se tiene como perspectiva continuar con el desarrollo de procedimientos analíticos que nos permitan llevar a cabo la determinación cuantitativa de amino compuestos mediante HPLC-ESI-MS/MS en modalidad MRM.



7.0 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas del desarrollo del proyecto de tesis se presentan a continuación:

- El presente estudio permitió demostrar la viabilidad del uso de hongos del género *Trichoderma* (*T. atroviride*) y de levaduras del género *Saccharomyces* como modelos biológicos adecuados para evaluar el efecto de extractos de plantas medicinales.
- Para el caso de *Trichoderma atroviride*, se evaluó el efecto de 13 extractos a las concentraciones de 0.5, 5.0 y 20 mg ml⁻¹, sobre el crecimiento del hongo. 11 extractos presentaron inhibición del crecimiento en las tres concentraciones evaluadas, mientras que solo 2 (Ss y Kd) obtuvieron inhibición en dos concentraciones. Los extractos que más inhibieron el crecimiento del hongo fueron *Fragaria x ananassa* (Fr, No.10) y *Selenicereus undatus* (Su, No.12)).
- A partir de los resultados del efecto de los 13 extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*, fueron seleccionados 3: *Fragaria x ananassa* (Fr, No.10), *Selenicereus undatus* (Su, No.12)) y (*Kalanchoe daigremontiana* (Kd, No. 13)) para evaluar su efecto en las concentraciones 100 y 500 µg L⁻¹ sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados en medio sólido no mostraron diferencias a simple vista sobre el crecimiento de las levaduras en ninguna de las concentraciones evaluadas para los tres extractos respecto al tratamiento control. Por otro lado, las pruebas en medio líquido mostraron que a la concentración de 500 µg L⁻¹ para los tres extractos la densidad óptica en las 6 primeras horas de crecimiento aumentó significativamente respecto al control, lo que sugiere que los extractos *Fragaria x ananassa* (Fr, No.10), *Selenicereus undatus* (Su, No.12)) y (*Kalanchoe daigremontiana* (Kd, No. 13)) podrían favorecer el crecimiento de las levaduras durante la fase estacionaria. Así mismo, también se observó un aumento de la capacidad antioxidante de las levaduras después de 24 horas de exposición a los extractos comparado con el tratamiento control, siendo las levaduras expuestas a () las que mayor capacidad antioxidante reportaron.
- Con el fin de poder relacionar los efectos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride* y *Saccharomyces cerevisiae* que se reportaron, se llevó a cabo un análisis metabólico no dirigido mediante HPLC-ESI-QTOF-MS/MS.

Para el extracto de *Selenicereus undatus* se lograron relacionar:

- a) 8 estructuras con actividad antioxidante pertenecientes a las ontologías de flavonoides¹⁷⁸ (4) derivados del benceno¹⁷⁹ (22), ésteres¹⁸⁰ (36), terpenos y triterpenos^{181,182} (37,39 y 45) y tocoferoles¹⁸³ (46);
- b) 8 estructuras con actividad antifúngica, pertenecientes a las ontologías, alcaloides¹⁸⁴ (13), derivados del benceno¹⁸⁵ (6 y 35), derivados del



colesterol¹⁸⁶ (43), derivados del furano¹⁸⁷ (12), ésteres/parabenos¹⁸⁸ (21), flavonoides¹⁸⁹ (11), polifenoles¹⁹⁰ (15) y sesquiterpenos¹⁹¹ (10).

- c) 1 estructura que se ha reportado puede promover el crecimiento microbiano la ontología involucrada en esta actividad fue: triterpenos¹⁹² (1).
- d) Se clasificaron los compuestos que, de acuerdo con la literatura, pueden presentar más de una actividad biológica de interés para esta investigación. En el primer caso, donde los compuestos pueden tener actividad fúngica y antioxidante, se logró agrupar las siguientes ontologías, aminoácidos¹⁹³⁻¹⁹⁵ (2,16 y 28), derivados del benceno^{191,196} (23), flavonoides^{197,198} (25,26 y 33), diterpenos^{197,198} (44) y xilenos¹⁹⁹ (17). En el caso de compuestos que son de promotores del crecimiento microbiano y tienen actividad antifúngica se encontró la ontología de los flavonoides^{178,200-202} con 2 posibles estructuras (3 y 4).

Para el extracto de *Fragaria x ananassa* se lograron relacionar:

- a) Se logró clasificar 4 estructuras con actividad antioxidante, las ontologías respectivas fueron: aminocompuestos²⁰³ (7 y 15), ésteres²⁰⁴ (4) y flavonoides²⁰⁵ (2).
 - b) Se determinaron 17 estructuras químicas con actividad antifúngica, pertenecientes a las ontologías: alcaloides^{184,206,207} (11 y 28); aminoácidos^{206,207} (10,16 y 34); derivados del benceno²⁰⁶ (3 y 33); derivados del colesterol²⁰⁸ (9 y 35); polifenoles²¹¹ (14); quinazolininas²⁰⁶ (8); quinolininas²⁰⁹ (20); quinolizinas²⁰⁶ (22); terpenos²⁰⁸ (23 y 29).
 - c) Se clasificaron los compuestos que, de acuerdo con la literatura, pueden presentar más de una actividad biológica de interés para esta investigación. En el primer caso, donde los compuestos pueden tener actividad fúngica y antioxidante, se logró agrupar las siguientes ontologías: derivados: derivado del benceno²¹⁰ (26), piridinas²¹⁰ (20) y tiazoles²¹¹ (1).
 - d) Y finalmente en el caso de compuestos que son de promotores del crecimiento microbiano, con actividad antioxidante y antifúngica se encontró la ontología: flavonoides²¹²⁻²¹⁴ (5 y 6).
- Después de haber evaluado el efecto de los extractos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*, se seleccionaron algunos de los extractos con mayor y menor inhibición del crecimiento para llevar a cabo un estudio metabólico en un nivel intermedio entre dirigido y no dirigido con el fin de diferenciar el perfil de amino compuestos presentes en los extractos seleccionados y evaluar si es posible que el perfil de amino compuestos pueda relacionarse con los efectos sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*. El PCA generado a partir de los iones precursores encontrados para los extractos analizados, los dos primeros componentes representan el 77% de la varianza total de los datos monitoreado. En la gráfica de



los "Scores" se presenta la distribución de los extractos analizados, mientras que en la gráfica de los loadings se presenta la distribución de los iones precursores encontrados. En cuanto a la distribución del perfil de precursores respecto a la distribución de los extractos en función de la inhibición del crecimiento de *Trichoderma atroviride*, se observan tres zonas: 1) mayor inhibición de crecimiento (Fr y Su), 2) inhibición media (Cc, Ts, Kd, Mb) y 3) menor inhibición del crecimiento (Ss). La distribución de los extractos en las zonas descritas de acuerdo con el efecto que registraron sobre *Trichoderma atroviride* corresponde a los valores de los diámetros de los halos registrados.

- El perfil de amino compuestos de un extracto vegetal no solo es una característica bioquímica pasiva, sino que puede ser determinante en su capacidad antifúngica. Evaluarlo permite, entender los mecanismos de inhibición microbiana, prevenir efectos indeseados sobre microorganismos benéficos (como levaduras probióticas) y potenciar aplicaciones biotecnológicas mediante el diseño racional de extractos selectivos o enriquecimientos funcionales.



8.0 Bibliografía

1. Iqbal, J. *et al.* Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* vol. 7 1129–1150 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.016> (2017).
2. Ijaz, S. *et al.* Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 103 1643–1651 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.113> (2018).
3. Majolo, F., de Oliveira Becker Delwing, L. K., Marmitt, D. J., Bustamante-Filho, I. C. & Goetttert, M. I. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochem Lett* 31, 196–207 (2019).
4. Mousavi, S. M. *et al.* A Review on Health Benefits of *Malva sylvestris* L. Nutritional Compounds for Metabolites, Antioxidants, and Anti-Inflammatory, Anticancer, and Antimicrobial Applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2021 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2021/5548404> (2021).
5. Wösten, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 59 65–70 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.010> (2019).
6. Bonfante, P., Venice, F. & Lanfranco, L. The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. *Current Opinion in Microbiology* vol. 49 18–25 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.004> (2019).
7. Nash, A. K. *et al.* The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153 (2017).
8. Jones, M., Huynh, T., Dekiwadia, C., Daver, F. & John, S. Mycelium composites: A review of engineering characteristics and growth kinetics. *Journal of Bionanoscience* vol. 11 241–257 Preprint at <https://doi.org/10.1166/jbns.2017.1440> (2017).
9. Poorniammal, R., Prabhu, S., Dufossé, L. & Kannan, J. Safety evaluation of fungal pigments for food applications. *Journal of Fungi* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jof7090692> (2021).
10. Pombeiro-Sponchiado, S. R., Sousa, G. S., Andrade, J. C. R., Lisboa, H. F. & Gonçalves, R. C. R. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications. in *Melanin* (InTech, 2017). doi:10.5772/67375.
11. Kim, J. S., Yoon, S. J., Park, Y. J., Kim, S. Y. & Ryu, C. M. Crossing the kingdom border: Human diseases caused by plant pathogens. *Environmental Microbiology* vol. 22 2485–2495 Preprint at <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15028> (2020).
12. *The Symbionts Forming Arbuscular Mycorrhizas.*



13. Şesan, T. E. et al. Approaches to the study of mycorrhizas in Romania. in *Symbiosis* vol. 52 75–85 (2010).
14. Eugenia, Ş. T. & Florin, O. ŞESAN TATIANA EUGENIA , OANCEA FLORIN TRICHODERMA VIRIDE PERS.-EXPERIMENTAL MODEL FOR BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INVESTIGATIONS OF MYCROMYCETA WITH IMPORTANCE IN OBTAINING PLANT PROTECTION BIOPRODUCTS. *J. Plant Develop* vol. 17 (2010).
15. Galindo-Solís, J. M. & Fernández, F. J. Endophytic Fungal Terpenoids: Natural Role and Bioactivities. *Microorganisms* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020339> (2022).
16. Stajich, J. E. Fungal Genomes and Insights into the Evolution of the Kingdom. *Microbiol Spectr* 5, (2017).
17. Machida, M., Yamada, O. & Gomi, K. Genomics of aspergillus oryzae: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research* vol. 15 173–183 Preprint at <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020> (2008).
18. Kitamoto, K. *Molecular Biology of the Koji Molds*. (2002).
19. Dupont, J. et al. Fungi as a Source of Food. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec> (2017) doi:10.1128/microbiolspec.
20. Daniel, J., María del Pilar, V.-N. & David Jeremías, M.-T. *Systematic Study for the Evaluation of the Biological Effect of Natural Products on Microorganisms Estudio Sistemático Para La Evaluación Del Efecto Biológico de Productos Naturales En Microorganismos*.
21. Ludwig, K. R. & Hummon, A. B. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. *Molecular BioSystems* vol. 13 648–664 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c6mb00656f> (2017).
22. N Ovat I O N, I. N., Patti, G. J., Yanes, O. & Siuzdak, G. *Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY* vol. 13 www.nature.com/reviews/molcellbio (2012).
23. Liu, X. & Locasale, J. W. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 42 274–284 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004> (2017).
24. Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H. & Fukusaki, E. Current metabolomics: Technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol. 116 9–16 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004> (2013).
25. Fuhrer, T. & Zamboni, N. High-throughput discovery metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 31 73–78 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.08.006> (2015).



26. Bothwell, J. H. F. & Griffin, J. L. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological Reviews* vol. 86 493–510 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x> (2011).
27. Reo, N. V. NMR-based metabolomics. in *Drug and Chemical Toxicology* vol. 25 375–382 (2002).
28. Ward, J. L., Baker, J. M. & Beale, M. H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS Journal* vol. 274 1126–1131 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05675.x> (2007).
29. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* vol. 44 210–230 Preprint at <https://doi.org/10.1080/05704920902717872> (2009).
30. Theodoridis, G., Gika, H. G. & Wilson, I. D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrometry Reviews* vol. 30 884–906 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mas.20306> (2011).
31. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. & Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* 1, (2012).
32. Defossez, E., Bourquin, J., von Reuss, S., Rasman, S. & Glauser, G. Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* vol. 42 131–143 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mas.21715> (2023).
33. Tian, H. *et al.* Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid-resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27, 2071–2080 (2013).
34. Nagana Gowda, G. A. & Djukovic, D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: Opportunities and challenges. *Methods in Molecular Biology* 1198, 3–12 (2014).
35. *INJECTION TOFAS FOR ANALYZING BIOMOLECULES.*
36. Domon, B. & Aebersold, R. *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. <http://science.sciencemag.org/>.
37. *Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer.*
38. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023> (2015).



39. Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R. & Siuzdak, G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78, 779–787 (2006).
40. Xi, Y. & Rocke, D. M. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics* 9, (2008).
41. Zhang, Z. M., Chen, S. & Liang, Y. Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst* 135, 1138–1146 (2010).
42. Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T. R. & Neumann, S. CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal Chem* 84, 283–289 (2012).
43. Alonso, A. *et al.* AStream: An R package for annotating LC/MS metabolomic data. *Bioinformatics* 27, 1339–1340 (2011).
44. Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. *Principal Component Analysis*.
45. Bro, R. & Smilde, A. K. Principal component analysis. *Analytical Methods* vol. 6 2812–2831 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j> (2014).
46. Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. Downloaded from *Www.Annualreviews.Org* by University of Sussex on 07/18/12. For Personal Use Only. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol* vol. 50 www.annualreviews.org (1999).
47. Schö, E. *et al.* Interaction of the Herbicide Glyphosate with Its Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase in Atomic Detail. www.rcsb.org.
48. Orcaray, L., Zulet, A., Zabalza, A. & Royuela, M. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *J Plant Physiol* 169, 27–33 (2012).
49. Binder, S. Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 8, e0137 (2010).
50. Mifflin, B. J. & Cave, P. R. The Control of Leucine, Isoleucine, and Valine Biosynthesis in a Range of Higher Plants. *Journal of Experimental Botany* vol. 23 <http://jxb.oxfordjournals.org/> (1972).
51. Vats, S. Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. in 153–192 (2015). doi:10.1007/978-3-319-09132-7_3.
52. Patrick, G. J. *et al.* Mechanistic Basis for ATP-Dependent Inhibition of Glutamine Synthetase by Tabtoxinine- β -lactam. *Biochemistry* 57, 117–135 (2018).
53. Forde, B. G. & Lea, P. J. Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling. in *Journal of Experimental Botany* vol. 58 2339–2358 (2007).



54. Maughan, S. C. & Cobbett, C. S. Methionine sulfoximine, an alternative selection for the bar marker in plants. *J Biotechnol* 102, 125–128 (2003).
55. Cobb, A. H. . & Reade, J. P. H. . *Herbicides and Plant Physiology*. (Wiley-Blackwell, 2010).
56. Manderscheid, R. & Wild, A. Studies on the Mechanism of Inhibition by Phosphinothricin of Glutamine Synthetase Isolated from *Triticum aestivum* L. *J Plant Physiol* 123, 135–142 (1986).
57. Synthetase, G., Ronzio, R. A. & Ma1eister, A. *PHOSPHORYLATION OF METHIONINE SULFOXIMINE*.
58. Unno, H. *et al.* Atomic structure of plant glutamine synthetase: A key enzyme for plant productivity. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29287–29296 (2006).
59. Duarte, J. M. N., Schuck, P. F., Wenk, G. L. & Ferreira, G. C. Metabolic disturbances in diseases with neurological involvement. *Aging and Disease* vol. 5 238–255 Preprint at <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500238> (2014).
60. Miler, M. *et al.* Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats. *Exp Gerontol* 84, 49–60 (2016).
61. Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R. & Iranshahi, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research* vol. 29 323–331 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ptr.5256> (2015).
62. Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R. & Iranshahi, M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sciences* vol. 124 64–74 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.030> (2015).
63. Constantin, R. P. *et al.* Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis. *Fitoterapia* 92, 148–162 (2014).
64. Olaleye, M. T., Amobonye, A. E., Komolafe, K. & Akinmoladun, A. C. Protective effects of *Parinari curatellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. *Saudi J Biol Sci* 21, 486–492 (2014).
65. 19b.
66. Zuclich, J. *et al.*) M. Sharnoff. *Journal of the American Chemical Society* vol. 79 (1964).
67. Rando, G.--R. R. & Bangerter, F. W. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS THE IN VIVO INHIBITION OF GABA-TIUNSAVINASE*. vol. 76 (1977).



68. Churchich, J. E., Kim, D. S. & Schnackerz, K. D. *Rotational Dynamics of 4-Aminobutyrate Aminotransferase*. vol. 160.
69. Banauch, A. et al. *Hoppe-Seyler's. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem* vol. 29 (1975).
70. Soper, T. S. & Manning, J. M. Inactivation of pyridoxal phosphate enzymes by gabaculine. Correlation with enzymic exchange of β -protons. *Journal of Biological Chemistry* 257, 13930–13936 (1982).
71. Kaneko, M., Fujimoto, S., Kikugawa, M. & Tamaki, N. *Irreversible Inhibition of D-3-Aminoisobutyrate~Pyruvate Aminotransferase by Gabaculine*. vol. 276 (1990).
72. Soper, T. S. & Manning, J. M. Different modes of action of inhibitors of bacterial D-amino acid transaminase. A target enzyme for the design of new antibacterial agents. *Journal of Biological Chemistry* 256, 4263–4268 (1981).
73. Afrin, S. et al. Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology Advances* vol. 38 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.011> (2020).
74. Singh, S., Awasthi, M., Pandey, V. P. & Dwivedi, U. N. Natural Products as Anticancerous Therapeutic Molecules with Special Reference to Enzymatic Targets Topoisomerase, COX, LOX and Aromatase. *Curr Protein Pept Sci* 19, (2018).
75. Boccardo, E. & Villa, L. L. *Viral Origins of Human Cancer. Current Medicinal Chemistry* vol. 14 (2007).
76. Kapoor, R., Sharma, B. & Kanwar, S. S. Antiviral Phytochemicals: An Overview. *Biochemistry & Physiology: Open Access* 06, (2017).
77. Jit, B. P. et al. Phytochemicals: Potential therapeutic modulators of radiation induced Signaling pathways. *Antioxidants* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox11010049> (2022).
78. Gulfishan, M. et al. Mechanism of action of anticancer herbal medicines. in *Anticancer Plants: Mechanisms and Molecular Interactions* vol. 4 337–360 (Springer Singapore, 2018).
79. Liu, Z. & Hu, M. Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* vol. 3 389–406 Preprint at <https://doi.org/10.1517/17425255.3.3.389> (2007).
80. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. & Queipo-Ortuño, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* vol. 24 1415–1422 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001> (2013).



81. Maryam, A. *et al.* Alantolactone induces apoptosis, promotes STAT3 glutathionylation and enhances chemosensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells to doxorubicin via oxidative stress. *Sci Rep* 7, (2017).
82. Wang, X., Wang, C. & Bond-Lamberty, B. Quantifying and reducing the differences in forest CO₂-fluxes estimated by eddy covariance, biometric and chamber methods: A global synthesis. *Agric For Meteorol* 247, 93–103 (2017).
83. Yang, Y., He, Y., Jin, Y., Wu, G. & Wu, Z. Amino Acids in Endoplasmic Reticulum Stress and Redox Signaling. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1332 35–49 (Springer, 2021).
84. Shuvalov, O. *et al.* *One-Carbon Metabolism and Nucleotide Biosynthesis as Attractive Targets for Anticancer Therapy*. www.impactjournals.com/oncotarget.
85. Zhang, Y., Morar, M. & Ealick, S. E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 65 3699–3724 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8295-8> (2008).
86. Locasale, J. W. Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer* vol. 13 572–583 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc3557> (2013).
87. Lu, S., Chen, G. L., Ren, C., Kwabi-Addo, B. & Epner, D. E. Methionine restriction selectively targets thymidylate synthase in prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66, 791–800 (2003).
88. Greene, L. I. *et al.* A role for tryptophan-2,3-dioxygenase in CD8 T-cell suppression and evidence of tryptophan catabolism in breast cancer patient plasma. *Molecular Cancer Research* 17, 131–139 (2019).
89. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206–1212 (2003).
90. Pegg, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* vol. 61 880–894 Preprint at <https://doi.org/10.1002/iub.230> (2009).
91. Nguyen, N. T. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19961–19966 (2010).
92. Opitz, C. A. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203 (2011).
93. DiNatale, B. C. *et al.* Kynurenine acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences* 115, 89–97 (2010).



94. Vaughn, A. E. & Deshmukh, M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10, 1477–1483 (2008).
95. Chung, W. J. *et al.* Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *Journal of Neuroscience* 25, 7101–7110 (2005).
96. Lo, M., Ling, V., Wang, Y. Z. & Gout, P. W. The xc- cystine/glutamate antiporter: A mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer* 99, 464–472 (2008).
97. Fan, J. *et al.* Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 510, 298–302 (2014).
98. Maddocks, O. D. K. *et al.* Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 544, 372–376 (2017).
99. Ulanovskaya, O. A., Zuhl, A. M. & Cravatt, B. F. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nat Chem Biol* 9, 300–306 (2013).
100. Son, S. M. *et al.* Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metab* 29, 192–201.e7 (2019).
101. Wu, Z. *et al.* TPO-Induced Metabolic Reprogramming Drives Liver Metastasis of Colorectal Cancer CD110+ Tumor-Initiating Cells. *Cell Stem Cell* 17, 47–59 (2015).
102. Gupta, N. *et al.* Upregulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1741, 215–223 (2005).
103. De Marchi, T. *et al.* Phosphoserine aminotransferase 1 is associated to poor outcome on tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Sci Rep* 7, (2017).
104. Son, J. *et al.* Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 101–105 (2013).
105. Gupta, N. *et al.* Up-regulation of the amino acid transporter ATB0,+ (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 100, 8–13 (2006).
106. Karunakaran, S. *et al.* Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *Biochemical Journal* 414, 343–355 (2008).
107. Santhiravel, S. *et al.* The Impact of Plant Phytochemicals on the Gut Microbiota of Humans for a Balanced Life. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23158124> (2022).
108. Dillard, C. J. & Bruce German, J. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* vol. 80 1744–1756 Preprint at



[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W) (2000).

109. Acamovic, T. & Brooker, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 64, 403–412 (2005).
110. Tsai, T. H., Wang, M. & Ransom, H. W. Preprocessing and analysis of LC-MS-based proteomic data. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1362 63–76 (Humana Press Inc., 2016).
111. Okame, R., Nakahara, K. & Murakami, N. Plasma Amino acid profiles at various reproductive stages in female rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 815–821 (2015).
112. Singh, C., Sharma, C. S. & Kamble, P. R. AMINO ACID ANALYSIS USING ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: A REVIEW. *International Journal of Pharmacognosy* 1, 756–82 (2014).
113. Hess, S. A universal HPLC-MS method to determine the stereochemistry of common and unusual amino acids. *Methods in Molecular Biology* 828, 63–75 (2012).
114. De Puit, M., Ismail, M. & Xu, X. LCMS Analysis of Fingerprints, the Amino Acid Profile of 20 Donors. *J Forensic Sci* 59, 364–370 (2014).
115. Miyoshi, Y. *et al.* Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 966, 187–192 (2014).
116. Sharma, G. *et al.* Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory. *Amino Acids* 46, 1253–1263 (2014).
117. Shimbo, K., Oonuki, T., Yahashi, A., Hirayama, K. & Miyano, H. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 1483–1492 (2009).
118. de Paiva, M. J. N., Menezes, H. C., Christo, P. P., Resende, R. R. & Cardeal, Z. de L. An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 931, 97–102 (2013).
119. Huang, X. & Regnier, F. E. Differential metabolomics using stable isotope labeling and two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 80, 107–114 (2008).



120. Xu, W., Zhong, C., Zou, C., Wang, B. & Zhang, N. Analytical methods for amino acid determination in organisms. *Amino Acids* vol. 52 1071–1088 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02884-7> (2020).
121. Sarwar, G. & Botting, H. G. Review Evaluation of Liquid Chromatographic Analysis of Nutritionally Important Amino Acids in Food and Physiological Samples. *Journal of Chromatography* vol. 615 (1993).
122. Davies, M. G. & Thomas, A. J. An Investigation of Hydrolytic Techniques for the Amino Acid Analysis of Foodstuffs. *J. Sci. FdAgric* vol. 24 (1973).
123. Malmer, M. F. & Schroeder, L. A. Amino Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography with Methanesulfonic Acid Hydrolysis and 94luorenylmethylchloroformate Derivatization. (1990).
124. Rutherford, S. M. & Gilani, G. S. Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science* Preprint at <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1109s58> (2009).
125. *Amino Acids in Animal Nutrition Second Edition*.
126. Rutherford, S. M. & Gilani, G. S. Amino acid analysis. *Current Protocols in Protein Science* Preprint at <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1109s58> (2009).
127. Ohishi, K., Kasai, M., Shimada, A. & Hatae, K. Effect of acetic acid added to cooking water on the dissolution of proteins and activation of protease in rice. *J Agric Food Chem* 51, 4054–4059 (2003).
128. 3D.
129. 588 CHARACTERIZATION OF PURIFIED PROTEINS.
130. Moughan, P. J. & Rutherford, S. M. A New Method for Determining Digestible Reactive Lysine in Foods †. (1996).
131. Darragh, A. J. & Moughan, P. J. The Effect of Hydrolysis Time on Amino Acid Analysis. <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/88/3/888/5657518>.
132. Conventz, A. et al. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860, 78–85 (2007).
133. Göen, T., Müller-Lux, A., Dewes, P., Musiol, A. & Kraus, T. Sensitive and accurate analyses of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826, 261–266 (2005).



134. ElBaz, F. M., Zaki, M. M., Youssef, A. M., ElDorry, G. F. & Elalfy, D. Y. Study of plasma amino acid levels in children with autism: An Egyptian sample. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 15, 181–186 (2014).
135. Harder, U., Koletzko, B. & Peissner, W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 495–504 (2011).
136. Qu, Y. et al. Quantitative Amino Acid Analysis Using a Beckman System Gold HPLC 126AA Analyzer q. *Clinica Chimica Acta* vol. 312 www.elsevier.com/locate/clinchim (2001).
137. Schulze, A. et al. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. www.aappublications.org/news (2003).
138. Chen, X. et al. A novel quantification method for analysis of twenty natural amino acids in human serum based on N-phosphorylation labeling using reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 836, 61–71 (2014).
139. Roux, A., Lison, D., Junot, C. & Heilier, J. F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry* vol. 44 119–135 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016> (2011).
140. Held, P. K., White, L. & Pasquali, M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ® reagents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 2695–2703 (2011).
141. Li, G. et al. Determination of trace amino acids in human serum by a selective and sensitive pre-column derivatization method using HPLC-FLD-MS/MS and derivatization optimization by response surface methodology. *Amino Acids* 40, 1185–1193 (2011).
142. Le, A., Ng, A., Kwan, T., Cusmano-Ozog, K. & Cowan, T. M. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 944, 166–174 (2014).
143. Larson, A. A., Giovengo, S. L., Russell, I. J. & Michalek, J. E. Changes in the Concentrations of Amino Acids in the Cerebrospinal Fluid That Correlate with Pain in Patients with Fibromyalgia: Implications for Nitric Oxide Pathways. www.elsevier.nl/locate/pain.
144. Müller, C., Fonseca, J. R., Rock, T. M., Krauss-Etschmann, S. & Schmitt-Kopplin, P. Enantioseparation and selective detection of D-amino acids by ultra-high-performance



- liquid chromatography/mass spectrometry in analysis of complex biological samples. *J Chromatogr A* 1324, 109–114 (2014).
145. Hamase, K. *et al.* Analysis of Small Amounts of D-Amino Acids and the Study of Their Physiological Functions in Mammals. *ANALYTICAL SCIENCES* vol. 25 (2009).
 146. Sato, M. *et al.* L-type amino acid transporter 1 is associated with chemoresistance in breast cancer via the promotion of amino acid metabolism. *Sci Rep* 11, (2021).
 147. Alonso-Castro, A. J. *et al.* Diuretic activity and neuropharmacological effects of an ethanol extract from *Senna septemtrionalis* (Viv.)H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae). *J Ethnopharmacol* 239, (2019).
 148. Sotelo-Barrera, M. *et al.* *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl (Anacardiaceae): An Endemic Plant with Relevant Pharmacological Properties. *Plants* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/plants11131766> (2022).
 149. Uscanga-Palomeque, A. C. *et al.* Inhibitory effect of *cuphea aequipetala* extracts on murine B16F10 melanoma in vitro and in vivo. *Biomed Res Int* 2019, (2019).
 150. Vieira, T. O., Said, A., Aboutabl, E., Azzam, M. & Creczynski-Pasa, T. B. Antioxidant activity of methanolic extract of *Bombax ceiba*. *Redox Report* 14, 41–46 (2009).
 151. Cárdenas-Valdovinos, J. G., García-Ruiz, I., Angoa-Pérez, M. V. & Mena-Violante, H. G. Ethnobotany, Biological Activities and Phytochemical Compounds of Some Species of the Genus *Eryngium* (Apiaceae), from the Central-Western Region of Mexico. *Molecules* vol. 28 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules28104094> (2023).
 152. Camargo-Ricalde, S. L., Greter, R., Martínez-Bernal, A., García-García, V. & Barrios-del-Rosal, S. Useful species of the genus *Mimosa* (Fabaceae-Mimosoideae) in Mexico. *Bot Sci* 33–44 (2001) doi:10.17129/botsci.1634.
 153. Yáñez-Barrientos, E. *et al.* Antinociceptive effects of *Laelia anceps* Lindl. and *Cyrtopodium macrobulbon* (Lex.) G.A. Romero & Carnevali, and comparative evaluation of their metabolomic profiles. *J Ethnopharmacol* 291, (2022).
 154. Alonso-Castro, A. J. *et al.* Pharmacological activities of *Asclepias curassavica* L. (Apocynaceae) aerial parts. *J Ethnopharmacol* 281, (2021).
 155. Hapsari, B. W., Manikharda & Setyaningsih, W. Methodologies in the analysis of phenolic compounds in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition, biological activity, and beneficial effects on human health. *Horticulturae* vol. 7 1–36 Preprint at <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020035> (2021).
 156. Ortiz-Ocampo, G. I. *et al.* Variability in polyphenol content, biological and anthelmintic activity of methanol:water extracts from the leaves of *Gymnopodium floribundum* Rolfe. *Rev Mex Cienc Pecu* 12, 1168–1187 (2021).



157. Diiggal, S. C. *ORCHIDS IN HUMAN AFFAIRS (A Review)*.
158. Vila-Luna, M. L., Moo-Puc, R. E., Torres-Tapia, L. W. & Peraza-Sánchez, S. R. Cytotoxic activity of casearborin c isolated from casearia corymbosa. *J Mex Chem Soc* 62, 24–28 (2018).
159. Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C. & Herrera-Arellano, A. Antidiabetic activities of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. *J Ethnopharmacol* 124, 284–288 (2009).
160. Shimizu, M. et al. *Anti-Inflammatory Constituents of Topically Applied Crude Drugs.III." Constituents and Anti-Inflammatory Effect of Paraguayan Crude Drug"Tamanda Cuna"(Catasetum Barbatum LINDLE)2*. *Chem.Pharm.Bull* vol. 36 (1988).
161. Lee, Y. D. Use of Magnolia (Magnolia grandiflora) Seeds in Medicine, and Possible Mechanisms of Action. in *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* 727–732 (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-375688-6.10086-6.
162. Stefanowicz-Hajduk, J. et al. An In Vitro Anticancer, Antioxidant, and Phytochemical Study on Water Extract of Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet and H. Perrier. *Molecules* 27, (2022).
163. *POTATO DEXTROSE AGAR (PDA) ENUMERATION OF YEASTS AND MOLDS 1 INTENDED USE*. www.biokar-diagnostics.com.
164. Castañeda-Ramírez, G. S. et al. An in vitro approach to evaluate the nutraceutical value of plant foliage against Haemonchus contortus. *Parasitol Res* 117, 3979–3991 (2018).
165. Giampieri, F. et al. The potential impact of strawberry on human health. *Natural Product Research* vol. 27 448–455 Preprint at <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706294> (2013).
166. Diamanti, J., Capocasa, F., Battino, M. & Mezzetti, B. Evaluation of F. x ananassa intra-specific and inter-specific back-crosses to generate new genetic material with increased fruit nutritional quality. *J Berry Res* 1, 103–114 (2010).
167. Khilare, P. U., Mane, S. T. & Bais, S. K. *A Review on Uses of Selenicereus Undatus, Santalum, Curcuma Longa*. *International Journal of Pharmacy and Herbal Technology* vol. 2 www.ijprdjornal.com.
168. Yang, Z. Y. et al. Selenicereus undatus (Dragon Fruit) Phytochemicals for Managing Three Human Pathogenic Bacteria: An In Vitro and In Silico Approach. *Metabolites* 14, (2024).
169. Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. & Bartkiene, E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* 31, 539–545 (2013).



170. Sultana, S. *et al.* Investigating Flavonoids by HPTLC Analysis Using Aluminium Chloride as Derivatization Reagent. *Molecules* 29, (2024).
171. Pérez, M., Dominguez-López, I. & Lamuela-Raventós, R. M. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 71 17543–17553 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022> (2023).
172. Munteanu, I. G. & Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22073380> (2021).
173. Brotman, Y., Kapuganti, J. G. & Viterbo, A. Trichoderma. *Current Biology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.042> (2010).
174. Degani, O., Rabinovitz, O., Becher, P., Gordani, A. & Chen, A. Trichoderma longibrachiatum and Trichoderma asperellum Confer Growth Promotion and Protection against Late Wilt Disease in the Field. *Journal of Fungi* 7, 444 (2021).
175. Dethoup, T., Klaram, R., Pankaew, T. & Jantasorn, A. Impact of fungicides and plant extracts on biocontrol agents and side-effects of Trichoderma spp. on rice growth. *Eur J Plant Pathol* 164, 567–582 (2022).
176. Harish, S., Saravanakumar, D., Radjacommare, R., Ebenezar, E. G. & Seetharaman, K. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. *BioControl* 53, 555–567 (2008).
177. Walsh, T. H., Hayden, R. T. & Larone, D. H. *Larone's AAGUIDEETOO IDENTIFICATION*.
178. Arafah, A. *et al.* Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone) Prevents 5-Fluorouracil-Induced Cardiotoxicity. *ACS Omega* 7, 4514–4524 (2022).
179. Adorisio, S. *et al.* Biological effects of bergamot and its potential therapeutic use as an anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer agent. *Pharmaceutical Biology* vol. 61 639–646 Preprint at <https://doi.org/10.1080/13880209.2023.2197010> (2023).
180. Sova, M. *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives*. *Reviews in Medicinal Chemistry* vol. 12 (2012).
181. Salazar, J. R., Loza-Mejía, M. A. & Soto-Cabrera, D. Chemistry, biological activities and in silico bioprospection of sterols and triterpenes from Mexican columnar Cactaceae. *Molecules* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules25071649> (2020).
182. Fu, X. *et al.* Dendrobium and its active ingredients: Emerging role in liver protection. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 157 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114043> (2023).



183. El-Sayed, R., Mohamed, K. S. & Fadda, A. A. *Synthesis and Evaluation of Some Chromene Derivatives as Antioxidant with Surface Activity*.
184. Thawabteh, A. *et al.* The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins11110656> (2019).
185. Ilyina, S. O. *et al.* Naphthalene-Containing Epoxy Resin: Phase Structure, Rheology, and Thermophysical Properties. *Polymers (Basel)* 16, (2024).
186. Dembitsky, V. M., Savidov, N., Poroikov, V. V., Glorizova, T. A. & Imbs, A. B. Naturally occurring aromatic steroids and their biological activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 102 4663–4674 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8968-7> (2018).
187. Alizadeh, M. *et al.* Recent updates on anti-inflammatory and antimicrobial effects of furan natural derivatives. *Journal of Inflammation Research* vol. 13 451–463 Preprint at <https://doi.org/10.2147/JIR.S262132> (2020).
188. Nan, A. Miscellaneous Drugs, Materials, Medical Devices and Techniques. in *Side Effects of Drugs Annual* vol. 37 603–619 (Elsevier, 2015).
189. Aboody, M. S. Al & Mickymaray, S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045> (2020).
190. Khanzada, B. *et al.* Profiling of antifungal activities and in silico studies of natural polyphenols from some plants. *Molecules* 26, (2021).
191. Li, H. Y. *et al.* Antibacterial and Antifungal Sesquiterpenoids: Chemistry, Resource, and Activity. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12091271> (2022).
192. You, C. *et al.* Plant triterpenoids regulate endophyte community to promote medicinal plant schisandra sphenanthera growth and metabolites accumulation. *Journal of Fungi* 7, (2021).
193. Zhang, H. Z., Zhao, Z. L. & Zhou, C. H. Recent advance in oxazole-based medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* vol. 144 444–492 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.044> (2018).
194. Petrou, A., Fesatidou, M. & Geronikaki, A. Thiazole ring—a biologically active scaffold. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26113166> (2021).
195. Li Petri, G. *et al.* Pyrrolidine in Drug Discovery: A Versatile Scaffold for Novel Biologically Active Compounds. *Topics in Current Chemistry* vol. 379 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s41061-021-00347-5> (2021).
196. Servili, M. *et al.* Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox3010001> (2014).



197. Miao, Y. H. *et al.* Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives. *RSC Adv* 9, 27510–27540 (2019).
198. Xu, H. *et al.* Design, Synthesis and Antifungal Activity of Benzofuran and Its Analogues. *Chin J Chem* 37, 1245–1250 (2019).
199. Keri, R. S., Patil, M. R., Patil, S. A. & Budagupi, S. A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* vol. 89 207–251 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.059> (2015).
200. Wang, L. *et al.* Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x> (2022).
201. Naidoo, K. & Khathi, A. The Potential Role of Gossypetin in the Treatment of Diabetes Mellitus and Its Associated Complications: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms242417609> (2023).
202. Sawarkar, H. S., Singh, M., Shrivastav, B. & Bakal, R. L. 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as an Antimicrobial: An Update. *J Pharm Res Int* 232–257 (2021) doi:10.9734/jpri/2021/v33i62a35203.
203. Godlewska-żytkiewicz, B. *et al.* Biologically active compounds of plants: Structure-related antioxidant, microbiological and cytotoxic activity of selected carboxylic acids. *Materials* vol. 13 1–37 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ma13194454> (2020).
204. Huang, L. *et al.* Phthalic acid esters: Natural sources and biological activities. *Toxins* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins13070495> (2021).
205. Weng, L., Zhang, F., Wang, R., Ma, W. & Song, Y. A review on protective role of genistein against oxidative stress in diabetes and related complications. *Chemico-Biological Interactions* vol. 310 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.031> (2019).
206. Kumar, V., Bhatt, V. & Kumar, N. Amides From Plants: Structures and Biological Importance. in *Studies in Natural Products Chemistry* vol. 56 287–333 (Elsevier B.V., 2018).
207. Caruano, J., Muccioli, G. G. & Robiette, R. Biologically active γ -lactams: synthesis and natural sources. *Organic and Biomolecular Chemistry* vol. 14 10134–10156 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c6ob01349j> (2016).
208. *Chemicals and Reagents*.
209. Zhao, Y. Q. *et al.* Application of Quinoline Ring in Structural Modification of Natural Products. *Molecules* vol. 28 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules28186478> (2023).



210. Yadeta, A. T. Chemical structures, biological activities, and medicinal potentials of amine compounds detected from Aloe species. *Frontiers in Chemistry* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1363066> (2024).
211. Petrou, A., Fesatidou, M. & Geronikaki, A. Thiazole ring—a biologically active scaffold. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26113166> (2021).
212. Wang, L. *et al.* Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x> (2022).
213. IJPSR-2019-RE-27851.
214. Jin, Y. S. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.048> (2019).
215. Agili, F. A. Biological Applications of Thiourea Derivatives: Detailed Review. *Chemistry (Switzerland)* vol. 6 435–468 Preprint at <https://doi.org/10.3390/chemistry6030025> (2024).
216. Gomes, A. R., Varela, C. L., Pires, A. S., Tavares-da-Silva, E. J. & Roleira, F. M. F. Synthetic and natural guanidine derivatives as antitumor and antimicrobial agents: A review. *Bioorganic Chemistry* vol. 138 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106600> (2023).
217. Costa, M., Dias, T. A., Brito, A. & Proença, F. Biological importance of structurally diversified chromenes. *European Journal of Medicinal Chemistry* vol. 123 487–507 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.057> (2016).

9.0 Apéndice

Tabla 12: Parámetros analíticos para la determinación de fenoles y flavonoides



Determinación	Rango de calibración	Función de calibración	R ²
Flavonoides	1.2 - 60 µg L ⁻¹	Abs = 0.0081c – 0.0033	0.999
Fenoles	0.8 – 5.8 mg L ⁻¹	Abs = 0.0994c + 0.0633	0.997

Tabla 13. Parámetros analíticos para la determinación de capacidad antioxidante.

Rango de calibración	Función de calibración	R ²
0.1 - 0.6 mg L ⁻¹	Abs = 0.6334c + 0.0034	0.