

# Polyphenols extraction from creosote bush, tarbush, and soursop using ultrasound-microwave and their effect against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*

## Extracción de polifenoles de gobernadora, hojaseén, y guanábana utilizando ultrasonido-microondas y su efecto contra *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*

**Francisco Castillo-Reyes**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Saltillo. Carretera Saltillo-Zacatecas km 8.5, No. 9515, Col. Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315; **Erik De León-Juárez**, **Sendar D. Nery-Flores**, **Adriana Carolina Flores-Gallegos**, **Lizeth G. Campos-Muzquiz**, **Juan A. Ascacio-Valdés**, **Raúl Rodríguez-Herrera\***, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo. Blvd. Carranza y Ing. José Cárdenas V. s/n. Col. República Oriente. CP. 25280, Saltillo.

\* Corresponding author: raul.rodriguez@uadec.edu.mx

Received: June 27, 2022.

Accepted: August 19, 2022.

Castillo-Reyes F, De León-Juárez E, Nery-Flores SD, Flores-Gallegos AC, Campos-Muzquiz LG, Ascacio-Valdés JA and Rodríguez-Herrera R. 2022. Polyphenols extraction from creosote bush, tarbush, and soursop using ultrasound-microwave and their effect against *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 349-376.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-7>

First DOI publication: August 30, 2022.

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2022.

**Abstract.** Crops are affected by different pathogens that cause damage to the plant and production losses. Quarantine restrictions may also occur due to the presence of a pathogen. In

**Resumen.** Los cultivos agrícolas se ven afectados por diferentes patógenos que ocasionan daños a la planta, pérdidas en la producción, además se pueden presentar restricciones cuarentenarias por la presencia de algún patógeno. Para el control de fitopatógenos en el mayor de los casos, se emplean productos químicos sintéticos, sin embargo, algunos de estos productos se han asociado a riegos a la salud humana o al ambiente. Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas más sustentables de control de estos patógenos. Esta investigación se realizó bajo los siguientes objetivos: extraer polifenoles de hojas de gobernadora, hojaseén y guanábana, utilizando: diferentes relaciones masa/volumen (m/v), diferentes concentraciones de etanol, simultáneamente ultrasonido-microondas y determinar el efecto de estos polifenoles contra *Alternaria*

most cases, synthetic chemical products are used to control phytopathogens. However, some of these products have been associated with risks to human health or the environment. Therefore, it is necessary to search for more sustainable alternatives to control these pathogens. This research was carried out under the following objectives: 1. To extract polyphenols from Creosote bush, Tarbush and Soursop leaves using: different mass/volume ratios (m/v), different concentrations of ethanol, simultaneous ultrasound-microwave and 2. To determine the effect of these polyphenols against *Fusarium solani* and *Alternaria alternata*. Polyphenols were obtained from Creosote bush, Tarbush and Soursop leaves by combining ultrasound-microwave, and using different mass-volume ratios and ethanol percentages. The group of polyphenols (CD) obtained with a mass/volume (m/v) ratio of 1:8 and 70% ethanol from Creosote bush leaves and the group of polyphenols (CA) obtained with a m/v ratio 1:16 and 70% ethanol from Tarbush leaves were the most effective against *Fusarium solani*, inhibiting 90.4 and 60.67%, respectively. For *Alternaria alternata*, no differences were found in the mycelial inhibition by the different groups of evaluated polyphenols, with inhibition values between 50-60% in comparison to the negative control (without polyphenols). In the profile of CD polyphenols group obtained from Creosote bush, different polyphenolic compounds reported to have antimicrobial activity were found, among which the following stand out: epirosmanol, rosmadiol, apigenin, catechin, and procyanidin C1. Polyphenolic compounds isolated from Creosote bush, Tarbush, and Soursop leaves using environmentally friendly methods (ultrasound-microwave) and solvents (water and ethanol) showed antifungal activity against *F. solani* and *A. alternata*.

*alternata* y *Fusarium solani*. Se obtuvieron polifenoles de hojas de gobernadora, hojasén y guanábana mediante combinación de ultrasonido-microondas, y usando diferentes relaciones masa-volumen y porcentajes de etanol. Además, se observó que el grupo de polifenoles obtenido con la relación masa/volumen (m/v) 1:8 y etanol al 70% (CD) a partir de hojas de Gobernadora y el grupo de polifenoles obtenido con la relación m/v 1:16 y etanol al 70% (CA) a partir de hojas de hojasén fueron las más efectivos contra *Fusarium solani* inhibiendo 90.4 y 60.67%, respectivamente. En *Alternaria alternata* no se encontraron diferencias en el efecto de la inhibición por los diferentes grupos de polifenoles evaluados, y se mostraron valores de inhibición entre 50-60% en comparación con el testigo negativo (sin polifenoles). En el perfil de grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se encontraron diversos compuestos polifenolicos reportados por tener actividad antimicrobiana entre los que destacan: epirosmanol, rosmadiol apigenina, catequina, procianidina C1. Los compuestos polifenolicos aislados de gobernadora, hojasén y guanábana utilizando métodos (ultrasonido-microondas) y disolventes (agua y etanol) amigables con el ambiente presentan actividad antifúngica contra *F. solani* y *A. alternata*.

**Palabras clave:** Inhibición micelial, microondas-ultrasonido, etanol, agua, amigables con él ambiente.

*Alternaria alternata* y *Fusarium solani* son hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas económicas en la agricultura y reducen la disponibilidad de alimentos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2019; Martínez-de la Parte *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* se caracteriza por una infección acelerada (Mata-Santoyo *et al.*, 2018). Cuando la temperatura

**Keywords:** Mycelial inhibition, Ultrasound-Microwave, Ethanol, Water, Environment friendly.

*Alternaria alternata* and *Fusarium solani* are phytopathogenic fungi that cause great economic losses to agricultural producers and reduce food availability (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2019; Martínez-de la Parte *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* is characterized by causing an accelerated infection (Mata-Santoyo *et al.*, 2018). With a temperature between 28 and 30 °C and relative humidity greater than 80%, the infection can begin or worsen in approximately 4 hours (Castrillo *et al.*, 2021). The spores of *A. alternata* are dispersed mainly by wind or rain splash, and these spores can overwinter among crop residues until conditions are favorable for germination (Abbas *et al.*, 2021). *Fusarium solani* mainly attacks plants in the base of the stem and root areas (Martínez-Martínez *et al.*, 2020), causing wilting, yellowing of the leaves and growth delay (Martínez-Solórzano *et al.*, 2020). Under conditions of high humidity and temperatures over 20 °C in the soil, a severe attack of *F. solani* can make the plants brittle. This pathogen survives in the soil among crop debris and live plants, and agricultural machinery can play an important role in its spread (Reyes-Tena *et al.*, 2019). These phytopathogenic fungi are controlled mainly through the use of synthetic chemical fungicides, which, although effective, can lead fungi to generate resistance to their active compounds, which would pose new risks to human health and the environment (Abdel-Monaim *et al.*, 2011; Mantecón, 2015). This has driven the search for more environmentally friendly alternatives such as antifungal compounds of plant origin.

Plants synthesize phytochemicals, such as phytoanticipins and phytoalexins, that play an important role on plant growth and reproduction,

esta entre 28-30 °C y la humedad relativa mayor a 80%, esta infección puede comenzar o agravarse en un tiempo aproximado de 4 h (Castrillo *et al.*, 2021). La diseminación de las esporas de *A. alternata* ocurre principalmente por el viento o por salpicaduras de lluvia, y estas esporas pueden sobrevivir el invierno en residuos de cultivos, hasta que las condiciones son favorables para germinar (Abbas *et al.*, 2021). Por otro lado, *Fusarium solani* ataca principalmente a las plantas en la zona de la base del tallo y raíz (Martínez-Martínez *et al.*, 2020), lo que ocasiona marchitez y amarillamiento de las hojas, y hace que se retrase el crecimiento (Martínez-Solórzano *et al.*, 2020). Bajo condiciones de alta humedad y temperatura de más de 20 °C en el suelo, las plantas se vuelven quebradizas, cuando el ataque de *F. solani* llega a ser severo. Este patógeno sobrevive en el suelo en restos del cultivo y en plantas vivas, y la maquinaria agrícola puede jugar un papel importante en su propagación (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Para el control de estos hongos fitopatógenos se utilizan principalmente fungicidas químicos sintéticos, los cuales, aunque son efectivos, pueden propiciar la generación de resistencia de los hongos hacia el compuesto activo, riesgos para la salud humana y para el ambiente (Abdel-Monaim *et al.*, 2011; Mantecón, 2015). Por lo tanto, se han buscado alternativas más amigables con el ambiente, especialmente compuestos de origen vegetal.

Las plantas sintetizan fitoquímicos entre ellos fitoanticipinas o fitoalexinas, las cuales desempeñan un papel importante en el crecimiento y reproducción de las plantas, de modo que atraen polinizadores y como protección frente a depredadores. Así mismo, contribuyen a las características morfológicas y sensoriales de las plantas y subproductos (Takshak y Agrawal, 2019; Singh y Chandrawat, 2017). El grupo fitoquímico que más se ha estudiado son los compuestos fenólicos (Andrade-Andrade

attracting pollinators and protecting against predators. They also contribute to the morphological and sensory characteristics of plants and plant by-products (Takshak and Agrawal, 2019; Singh and Chandrawat, 2017). The phytochemical group that has been most studied is that of phenolic compounds (Andrade-Andrade *et al.*, 2018), which can inhibit the germination of spores and the growth of fungi (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020; Joaquín-Ramos *et al.*, 2020; Oufensou *et al.*, 2020). These compounds are synthesized through the shikimate, polyketide and mevalonate pathways, and are characterized by the presence of one or more hydroxyl groups (-OH) attached to a 6-carbon aromatic ring (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Polyphenols derived from phenylalanine or benzoic acid have one or more phenol groups (Mutha *et al.*, 2021). One of the characteristics of these compounds is their antioxidant activity or ability to counteract free radicals by chelating metal ions that are involved in their production. In addition, these compounds have ability to donate a hydrogen anion (an unpaired electron) and relocate it within the aromatic structure (García *et al.*, 2019). Among polyphenols, flavonoids comprise some of the most important compounds. They are subdivided into Flavonols, Flavones, Catechins, Flavanones, Anthocyanidins, and Isoflavones (Mutha *et al.*, 2021).

The biological activity (antimicrobial, antiviral, anticancer, etc.) attributed to polyphenols has given rise to a large number of studies focused on extracting them from various plant sources (Zhang *et al.*, 2022). However, the biological potential of polyphenols is limited by their low solubility and stability against environmental factors such as light, high temperatures (>50 °C) and changes in pH (Costa *et al.*, 2021). Generally, the extraction of these compounds is carried out through conventional techniques such as Soxhlet,

*et al.*, 2018) que tienen capacidad para inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de hongos (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020; Joaquín-Ramos *et al.*, 2020; Oufensou *et al.*, 2020). Estos compuestos son sintetizados por las vías shikimato, policétido y mevalonato, y se caracterizan por la presencia de uno o varios grupos hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático de 6 carbonos (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Los polifenoles cuentan con uno o más grupos fenoles al derivar de la fenilalanina u ácido benzoico (Mutha *et al.*, 2021). Una de las características de estos compuestos es su propiedad antioxidante o capacidad para contrarrestar radicales libres, mediante quelado de iones de metales que intervienen en su producción, y a su capacidad para donar un anión de hidrógeno, un electrón no apareado, y reubicarlo dentro de la estructura aromática (García *et al.*, 2019). Dentro de la clasificación de los polifenoles, destacan los flavonoides, los cuales se subdividen en Flavonoles, Flavonas, Catequinas, Flavanonas, Antocianidinas e Isoflavonas (Mutha *et al.*, 2021).

Las actividades biológicas (antimicrobianas, antiviral, anticancerígena, etc.) atribuidas a los polifenoles, han dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción a partir de diversas fuentes vegetales (Zhang *et al.*, 2022). Por otra parte, el potencial biológico de los polifenoles se encuentra limitado por su baja solubilidad y estabilidad frente a factores ambientales tales como: luz, temperaturas elevadas (>50 °C) y a cambios de pH (Costa *et al.*, 2021). Generalmente, la extracción de estos compuestos se realiza a través de técnicas convencionales tales como Soxhlet, percolación, maceraciones, infusiones, etc., las cuales están asociadas a un alto consumo de solventes orgánicos, algunos de los cuales poco amigables para el medio ambiente, y cuyos remanentes limitan la aplicación industrial de los extractos, además estas técnicas convencionales requieren tiempos

percolation, maceration, infusions, etc. These techniques are associated with a high consumption of organic solvents, some of which are unfriendly to the environment, which limits the industrial extraction of those compounds. Furthermore, conventional techniques require long extraction times, involving high energy consumption (Soto-García *et al.*, 2016) as well as considerable time and effort (Chemat *et al.*, 2019). In recent decades, alternative techniques have been proposed for the extraction of polyphenols, including the use of microwaves, by which electromagnetic radiation is used to heat vegetal material, which increases the permeability of cell membranes (Bocker and Silva, 2022). Another alternative technique is ultrasound which, through cavitation, increases the mass transfer and speed of chemical reactions, promoting cell lysis and the separation of cell debris by the cohesive forces of solvent molecules (Chemat *et al.*, 2017). The extraction of polyphenols has been carried out by ultrasound or microwave (Chemat *et al.*, 2019), either one or the other (Chemat *et al.*, 2017), or sequentially (Valdés *et al.*, 2021). However, there are few studies where these processes have been used simultaneously for the extraction of polyphenols. The present study had the following objectives: 1. To extract polyphenols from the leaves of Creosote bush (*Larrea tridentata*), Tarbush (*Flourensia cernua*) and Soursop (*Annona muricata*) through the simultaneous use of ultrasound and microwaves, with different m/v ratios and water and ethanol as solvents, and 2. To determine how much these polyphenols inhibit the mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Leaves of soursop (*Annona muricata*), Creosote bush (*Larrea tridentata*),

largos de extracción, implicando un alto consumo energético (Soto-García *et al.*, 2016), y suelen ser laboriosas (Chemat *et al.*, 2019). En las últimas décadas se han propuesto técnicas alternativas para la extracción de polifenoles, dentro de las que destacan el uso de microondas, donde se emplean radiaciones electromagnéticas para generar calor dentro del material vegetal, haciendo más permeables las membranas celulares (Bocker y Silva, 2022) y el ultrasonido que gracias a la cavitación, permite el incremento de transferencia de masa y velocidad de las reacciones químicas, lo que genera lisis celular y separación de los restos celulares por las fuerzas de cohesión del líquido (Chemat *et al.*, 2017). La extracción de polifenoles se ha realizado por ultrasonido o microondas (Chemat *et al.*, 2019), ya sea utilizando uno u otro proceso (Chemat *et al.*, 2017), o bien de forma secuencial (Valdés *et al.*, 2021), sin embargo, son pocos los estudios donde se usan estos procesos simultáneamente para la extracción de polifenoles. Bajo esta perspectiva, el presente estudio tuvo como objetivos: 1. Extraer polifenoles de hojas de gobernadora, hojasén y guanábana, utilizando simultáneamente ultrasonido-microondas, diferentes relaciones m/v y agua y etanol como disolventes y 2. Determinar la inhibición de crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* por estos polifenoles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Hojas de guanábana (*Annona muricata*), gobernadora (*Larrea tridentata*), y hojasén (*Flourensia cernua*) se usaron para la extracción de polifenoles. Las hojas de guanábana de la marca “Frutas Nayarit” se adquirieron en un local de Saltillo Coahuila, México, mientras que las hojas de gobernadora y hojasén se recolectaron en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista,

and Tarbush (*Flourensia cernua*) were used for the extraction of polyphenols. Soursop leaves from “Frutas Nayarit” were purchased at a store in Saltillo, Coahuila, Mexico, while the leaves of Creosote bush and Tarbush were collected at the Experimental Station of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University (UAAAN) in Buenavista, Coahuila, Mexico. Healthy leaves were then selected, discarding those that had damage or malformations, likewise, all contaminants found in the samples were also discarded. The selected leaves were then dehydrated for 3 days at room temperature and for 24 h in a desiccator (NWT-5, Northwest Technology®, Italy). Subsequently, the dry material was ground into powder in a Biobase mill (MD-120) and then sieved using an 850 µm mesh, number 20 (W.S. TAYLER®) (Valdez-Guerrero *et al.*, 2021).

**Preparation of extracts and extraction of phytochemicals.** The extracts were prepared using distilled water and mixtures of ethanol/distilled water (70/30 and 30/70). Different ratios (m/v) between mass (plant material) and volume ((quantity and concentration of the solvent) were used). Specifically, m/v ratios of 1:8, 1:12 and 1:16 were used, following the method of Valdez-Guerrero *et al.* (2021) with minor modifications. The five (CA, CB, CC, CD and CE) solutions produced from each plant material under these conditions (Table 1) were placed in a glass reactor (1 L) and ultrasound and microwave processes were simultaneously applied using an Ultrasonic equipment (Microwave Cooperative Workstation XO-SM 400) with the following parameters: Ultrasonic (Power Radio - 20, Ultrasonic on Relay - 10, Ultrasonic off Relay -3, Amplitude off Relay - 25 and Set Time - 20) and Microwave (Power Radio - 800, Display power - 0, Set Temp - 70°C and Holding Time - 5). Subsequently, the extract was filtered to remove the bagasse.

Coahuila, México, posteriormente, se seleccionaron las hojas sanas, eliminando aquellas que tenían daños o malformaciones, así mismo, se desecharon los contaminantes en las muestras. Después, las hojas fueron deshidratadas por 3 días a temperatura ambiente y 24 h en un desecador (NWT-5, Northwest Technology®, Italy). A continuación, la materia prima fue molida en un molino Biobase, modelo MD-120, y el material vegetal en forma de polvo se tamizó utilizando mallas de 850 µm, número 20 (W.S. TAYLER®) (Valdez-Guerrero *et al.*, 2021).

**Preparación de extractos y extracción de fitoquímicos.** Para la obtención de los extractos, se empleó agua destilada y mezclas de etanol/agua destilada (70/30 y 30/70), además se emplearon diferentes relaciones (m/v) masa (material vegetal) volumen (cantidad y concentración del solvente), específicamente se usaron las relaciones (m/v), 1:8, 1:12 y 1:16 acorde a la metodología de Valdez-Guerrero *et al.* (2021), con modificaciones menores. Las cinco (CA, CB, CC, CD y CE) soluciones producidas de cada material vegetal bajo estas condiciones (Cuadro 1) se colocaron en un reactor de vidrio (1 L) y simultáneamente se aplicaron los procesos ultrasonido y microondas en un equipo Ultrasonic Microwave Cooperative Workstation XO-SM 400, bajo los siguientes parámetros: Ultrasonic (Power Radio - 20, Ultrasonic on Relay - 10, Ultrasonic off Relay -3, Amplitude off Relay - 25 y Set Time - 20) y Microwave (Power Radio - 800, Display power - 0, Set Temp - 70°C y Holding Time - 5). Posteriormente, el extracto se filtró para remover el bagazo.

**Purificación y fraccionado de polifenoles.** La metodología de Valdez-Guerrero *et al.* (2021) se empleó para la separación cromatográfica de los extractos. Primeramente, los extractos se filtraron usando papel Whatman No. 41, después, se separaron mediante cromatografía en columna de

**Table 1. Mass/volume ratios (m/v) and ethanol gradients. The conditions used to obtain polyphenols by ultrasound-microwave.****Cuadro 1. Relaciones masa/ volumen (m/v) y gradientes de etanol como condiciones utilizadas para la obtención de polifenoles por ultrasonido-microondas.**

Factor	Extraction condition				
	CA <sup>z</sup>	CB	CC	CD	CE
Vegetal material	62.5g	62.5g	125g	125g	83.33
Solvent	EtOH 70%	distilled H <sub>2</sub> O	distilled H <sub>2</sub> O	EtOH 70%	EtOH 30%
m/v ratio	1:16	1:16	1:8	1:8	1:12

<sup>z</sup>In the rest of the document these solutions will be referred to as the group of polyphenols. / <sup>z</sup>En el resto del documento se referirán como grupo de polifenoles.

### Purification and fractionation of polyphenols.

The method of Valdez-Guerrero *et al.* (2021) was used for the chromatographic separation of the extracts. The extracts were first filtered using Whatman No. 41 paper, then separated by ion exchange column chromatography, using 200g of amberlite (Amberlite XAD16N) as stationary phase and water and 96% ethanol as mobile phase. The sample was then decanted in the column, with Amberlite® (XAD 16N) resin (previously activated with methanol for 10 minutes) as stationary phase, and water (to remove water-soluble compounds) and ethanol (to recover the polyphenolic content) as eluents. The column was protected from light due to the photosensitivity of the compounds under study. The aqueous fraction was discarded when its color became clear. The ethanolic fraction was collected in an amber container. Once the ethanolic fraction was obtained, it was distributed into heat-resistant glass plates, which were left to dry at room temperature (25-30 °C) in the dark for 3 days. The dry extract was collected from the plates in an amber-colored bottle for later analysis. The chemical compounds found in each dry extract were identified as polyphenols associated with one of the five (CA, CB, CC, CD and CE) solutions of each plant material (Table 1).

intercambio iónico, usando como fase estacionaria 200g de amberlita (Amberlite XAD16N) y como fase móvil agua y etanol 96%. Luego se decantó la muestra en la columna empacada con la resina Amberlita® XAD 16N (previamente activada con metanol durante 10 minutos) como fase estacionaria y agua (para eliminar compuestos hidrosolubles) y etanol (para recuperar el contenido polifenólico) como eluentes. Cabe mencionar que la columna fue resguardada de la luz para prevenir la fotosensibilidad de los compuestos de interés. La fracción acuosa se desechó una vez que su coloración fue clara, mientras que la fracción etanólica se colectó en un envase ámbar. Una vez obtenida la fracción etanólica, ésta se repartió en refractarios de vidrio, los cuales se secaron a temperatura ambiente (25-30 °C), sin exponer a la luz durante 3 días. Finalmente se colectó el extracto seco de las cajas, en un frasco ámbar para su posterior análisis. A partir de este paso, los compuestos químicos de cada extracto seco se identificarán como grupo de polifenoles obtenido con alguna de las cinco (CA, CB, CC, CD y CE) soluciones de cada material vegetal (Cuadro 1).

### Determinación de polifenoles hidrolizables.

Los extractos en polvo se diluyeron en agua a un

#### **Determination of hydrolysable polyphenols.**

Powder extracts were diluted in water to a volume of 400  $\mu$ L. After adding 400  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent, the solution was left to stand for 5 min. Afterward, 400  $\mu$ L of 0.01 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added and the solution was allowed to react for 5 min. Then, 2.5 mL of distilled water were added and the solution was read at 790 nm in a UV-Vis Spectrophotometer ( Biomate) (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Determination of condensed polyphenols.** 500  $\mu$ L of sample were added to a tube, followed by 3 mL of 10% HCl-butanol. The resultant solution was stirred well. Subsequently, 100  $\mu$ L of the ferric reagent were added to the solution, stirring the mixture vigorously. The tubes were transferred to a water bath and boiled for one hour, making sure that the tubes were perfectly closed. Afterward, the samples were allowed to cool to room temperature (25-30 °C) and were then read at 460 nm in a UV-Vis Spectrophotometer (Biomate) (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Identification of polyphenols.** First, 10 mg of each powder extract were weighed and dissolved in 1 mL of methanol, sonicated for 5 min at room temperature and filtered through 0.45  $\mu$ m membranes. The samples were then placed in vials and put in an HPLC equipment (Varian Prostar 330 with UV-visible diode array detector) coupled to a mass detector (Varian 500-Ms). The chromatographic analysis was conducted using a flow rate of 0.2 mL/min, a Denali C18 reversed-phase column (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3 $\mu$ m, Grace, Albany, OR USA), and a mass detection limit of 100 to 2000 m/z. All experiments were performed in negative-ion mode [M-H]. Nitrogen was used as nebulizer gas and helium as buffer gas. The ion source had the following parameters: spray

volumen de 400  $\mu$ L. Posteriormente, se le agregaron 400  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, dejándose reposar por 5 min. Después, se le añadieron 400  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01 M, dejándose reaccionar por 5 min. Por último, se le agregaron 2.5 mL de agua destilada y se leyó la solución a 790 nm en el Espectrofotómetro UV-Vis marca Biomate (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Determinación de polifenoles condensados.** En un tubo se añadieron 500  $\mu$ L de muestra, después se le agregaron 3 mL de HCl-butanol al 10%, agitando muy bien la solución. Posteriormente, se le incorporaron a la solución, 100  $\mu$ L del reactivo férrico, agitando vigorosamente la mezcla. Los tubos se trasladaron a un baño para someterlos a ebullición durante una hora, asegurándose que los tubos estuvieran perfectamente cerrados. Después, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25-30 °C), y finalmente se leyeron a 460 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis marca Biomate (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

**Identificación de polifenoles.** Primeramente, se pesaron 10 mg de cada extracto en polvo y se les disolvió en 1 mL de metanol, luego se sonicó por 5 min a temperatura ambiente, para posteriormente filtrar a través de membranas de 0.45  $\mu$ m y depositar la muestra en viales para luego colocarlas en un equipo HPLC (marca Varian Prostar, modelo 330 con detector UV-visible de arreglo de diodos), acoplado a un detector de masas (marca Varian, modelo 500-Ms). Se empleó un flujo de 0.2 mL/min, una columna Denali C18 fase reversa (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3 $\mu$ m, Grace, Albany, OR USA), así como un límite de detección de masas de 100 a 2000 m/z. Todos los experimentos fueron realizados en el modo negativo y [M-H] se empleó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. La fuente de iones tuvo los siguientes parámetros: vol-



voltage (5.0 kV), capillary voltage (90.0 V), and temperature (350 °C). The data was collected and processed using the M.S. Workstation software (V.6.9). The samples were first analyzed in full scan mode at a mass-to-charge ratio (m/z) in the range of 50–2000. Tandem mass spectrometry analysis (MS/MS) was performed on a series of selected precursor ions. The obtained compounds were compared using a bioactive compound database (WorkStation database version 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, USA).

**Isolation of phytopathogenic fungi.** The phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Alternaria alternata* were isolated from diseased plants (yellowing, curling of the leaves, scabs, stem and fruit rot). Five-millimeter pieces of plant material were cut from the diseased plants. The pieces were disinfected with NaClO (2%) for 1 min, then immersed twice in sterile distilled water for 1 min and placed in Petri dishes with PDA medium (Difco™), which were incubated at 28±2 °C for 7 days. After the germination of monosporic cultures, fungi with characteristics of *A. alternata* and *F. solani* were purified by hyphal tip (Morales *et al.*, 2007). The taxonomic identification of the species was based on observations of the growth of the fungal colonies in the culture medium to determine their pigmentation, shape and growth speed, as well as the formation of sporodochia, the number of septa in the conidia, the presence of chlamydo spores, and the shape of conidia (micro and macroconidia). The specific identification was done with a compound microscope (10x, 40x and 100x), observing slides with morphological structures and taxonomic characteristics typical of the species, according to the taxonomic keys of Simmons (2007) for *A. alternata*, and of Leslie and Summerell (2006) for *Fusarium solani*.

taje de pulverización (5,0 kV), voltaje capilar (90,0 V), y temperatura (350 °C). Los datos fueron recolectados y procesados usando el M.S. Workstation software (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de exploración completa adquirida en el rango m/z 50–2000. Los análisis MS/MS se realizaron en una serie de iones precursores seleccionados. Por último, los compuestos se compararon utilizando una base de datos de compuestos bioactivos (base de datos WorkStation versión 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, EE. UU.).

**Aislamiento de hongos fitopatógenos.** Los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Alternaria alternata* se aislaron de plantas enfermas (amarillamiento, encorvamiento de las hojas, roñas, pudrición en tallo y fruto). Del material enfermo, se cortaron trozos de 5 mm de material vegetal, posteriormente se desinfectó con NaClO al 2% por 1 min, después se sumergió en agua destilada estéril por 1 min dos veces, para finalmente colocarlos en cajas Petri con medio PDA (Difco™), las cuales se incubaron a 28±2 °C durante 7 días. Después de la germinación de cultivos monospóricos, los hongos con características de *A. alternata* y *F. solani* fueron purificados por medio de punta de hifa (Morales *et al.*, 2007). Para la determinación taxonómica de las especies, se realizó observaciones del crecimiento de las colonias fúngicas en el medio de cultivo para determinar la pigmentación, la forma y la velocidad del crecimiento de las colonias, la formación de esporodocios y el número de septos en los conidios; la presencia de clamidosporas y la forma de conidias (micro y macroconidios). La identificación específica se realizó bajo microscopio compuesto (10x, 40X y 100x) al observar laminillas con estructuras morfológicas y criterios taxonómicos propios de la especie, empleando las claves taxonómicas de Simmons (2007) para *A.*

**Preliminary determination of the polyphenol concentration.** A preliminary test was carried out to determine the inhibitory effect of the concentration (6000, 8000 and 10000 ppm) of two groups of polyphenols (CD = m/v (1:8) and EtOH-70%, and CE= m/v (1:12) and EtOH-30%) from *Larrea tridentata* on the mycelial growth of *Fusarium solani*, compared to the following three controls: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive); 3) fungicide [Tecto<sup>R</sup> 60 at 1% ] (positive). The evaluation was carried out under a completely randomized design with three replications, using 100 x 20 mm Petri dishes with PDA agar (Difco<sup>TM</sup>). Five hundred microliters of each concentration of each group of polyphenols (CD and CE) suspended in 70% ethanol were added separately to each dish, including the three control treatments. The polyphenols were spread over the entire surface of the agar with the help of a glass rod adapted to the size of the Petri dish. They were left to stand for 30 min, during which time the polyphenols were absorbed into the agar. A 0.5 cm diameter disk with *F. solani* mycelium was then placed inside each Petri dish (Berlanga-Padilla *et al.*, 2011). The dishes were sealed and incubated at 25 °C until the mycelium of the negative control completely covered the dish. At that time, the colony diameter of each treatment (9 treatments) was measured. The arrangement of the Petri dishes in the incubator allowed for a completely randomized experimental design. Colony diameter values were converted into inhibition percentages (ICM), proportional to control 1, using the following mathematical expression (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017):

$$\text{ICM (\%)} = [(dTa - dt)/dTa] \times 100$$

Where dTa and dt represent the diameter of the mycelial growth of control 1 and of each of the other treatments, respectively.

*alternata*, y de Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium solani*.

**Determinación preliminar de la concentración de polifenoles.** Se realizó un ensayo preliminar para determinar el efecto de la concentración (6000, 8000 y 10000 ppm) de dos grupos de polifenoles (CD = m/v (1:8) y EtOH-70%, y CE= m/v (1:12) y EtOH-30%) de *Larrea tridentata*, sobre la inhibición micelial de *Fusarium solani* vs tres testigos, 1) sin polifenoles (negativo), 2) EtOH 70% (positivo) y 3) fungicida [Tecto<sup>R</sup> 60 al 1%] (positivo). La evaluación se realizó bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones, utilizando cajas Petri de 100 x 20 mm con agar PDA (Difco<sup>TM</sup>). A cada caja se le agregó por separado, 500 µL de cada concentración especificada de cada grupo de polifenoles (CD y CE) suspendidos en etanol al 70%, y se incluyeron los tres tratamientos testigo. Los polifenoles se extendieron por toda la superficie del agar con la ayuda de una varilla de vidrio adaptada al tamaño de la caja Petri. Se dejó en reposo durante 30 min, tiempo en el cual los polifenoles se absorbieron en el agar, y en seguida se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro con micelio de *F. solani* (Berlanga-Padilla *et al.*, 2011). Las cajas se sellaron e incubaron a 25 °C, hasta que el micelio creciendo con el testigo negativo, cubrió totalmente la caja. En ese momento se midió el diámetro de la colonia de cada tratamiento (9 tratamientos). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar. Dicho diámetro fue convertido a porcentaje de inhibición (ICM), en relación con el testigo 1 por la siguiente expresión matemática (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017):

$$\text{ICM (\%)} = [(dTa - dt)/dTa] \times 100$$

Donde dTa y dt representan el diámetro del crecimiento micelial del testigo 1 y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente.

Based on the results of the preliminary assay, the concentration of 8000 ppm was selected to evaluate the groups of polyphenols (CA, CB, CC, CD and CE) obtained from Tarbush, Creosote bush and Soursop. Sowing and temperature conditions were similar to those used in the preliminary study. All groups of polyphenols were evaluated against *F. solani* and *A. alternata*. The controls for *Fusarium* were: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive); 3) fungicide [TectoR 60 at 1%] (positive). The controls for *Alternaria* were: 1) without polyphenols (negative); 2) EtOH 70% (positive). The response variable was mycelial growth, converted to inhibition percentage using the formula indicated above (ICM).

**Statistical analysis.** The data resulting from all the bioassays were analyzed using an analysis of variance. The significance was determined with a probability of  $p < 0.05$ . When necessary, the means of the treatments were compared using the Tukey test. All statistical analyses were performed using SAS software (version 9.0).

## RESULTS AND DISCUSSION

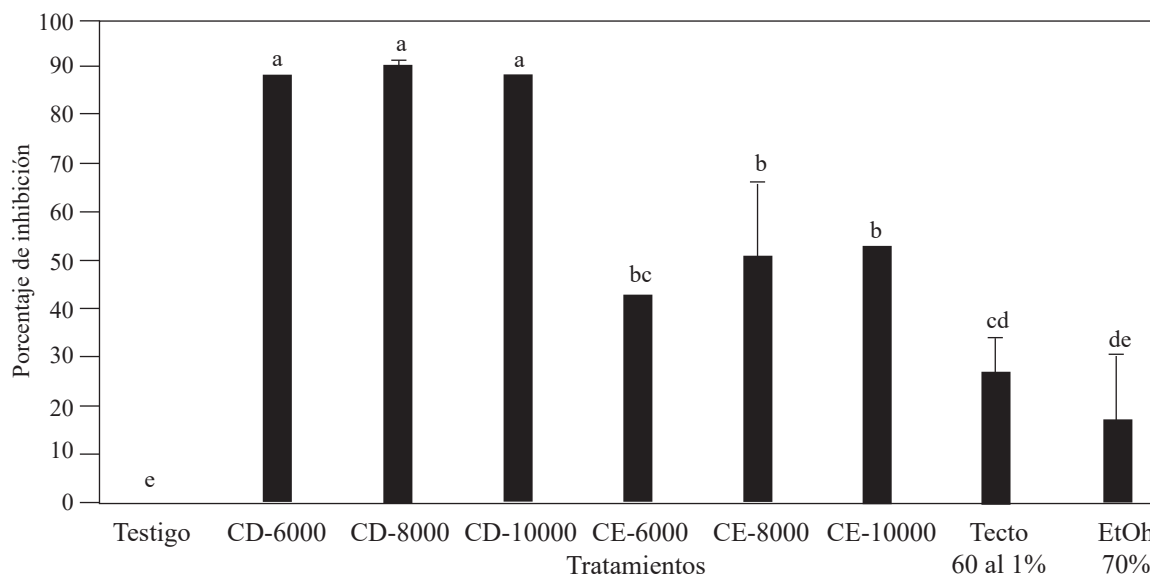
**Preliminary determination of the polyphenol concentration.** The analysis of variance showed no differences ( $P < 0.00001$ ) in mycelial inhibition between the concentrations of each of the two groups of polyphenols (CD and CE) obtained from Creosote bush. However, the inhibition of mycelial growth did show differences between the two groups of polyphenols and between these groups and the negative control (Figure 1) ( $P < 0.00001$ ). The mycelial inhibition was greater in *Fusarium solani* when using the CD polyphenol group (obtained with a ratio of m/v 1:8 and 70% ethanol). With the CD polyphenol group, the range

Después de analizar en el ensayo preliminar el efecto de concentración, se seleccionó la concentración de 8000 ppm para evaluar los grupos de polifenoles (CA, CB, CC, CD y CE) obtenidos de hojaseñ, gobernadora y guanábana. Las condiciones de siembra y de temperatura fueron similares a las empleadas en el estudio preliminar. Todos los grupos de polifenoles fueron evaluados contra *F. solani* y *A. alternata*; y se usaron como testigos para *Fusarium* 1) sin polifenoles (negativo), 2) EtOH 70% (positivo) y 3) fungicida [Tecto<sup>R</sup> 60 al 1%] (positivo). Mientras que para *Alternaria* como testigo se empleó: 1) sin polifenoles (negativo) y 2) EtOH 70% (positivo). La variable de respuesta fue crecimiento micelial, convertido a porcentaje de inhibición de igual manera por la fórmula señalada anteriormente (ICM).

**Análisis estadísticos.** Los datos resultantes de todos los bioensayos fueron analizados utilizando el análisis de varianza, y la significancia se determinó con una probabilidad de ( $p < 0.05$ ), cuando fue necesario, las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software SAS (versión 9.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Determinación preliminar de la concentración de polifenoles.** El análisis de varianza no mostró diferencias ( $P < 0.00001$ ) en la inhibición micelial entre las concentraciones dentro de cada uno de los dos grupos de polifenoles (CD y CE) obtenidos de gobernadora. Sin embargo, si se observó que la inhibición del crecimiento micelial fue diferente entre los dos grupos de polifenoles y entre estos grupos y el testigo negativo (Figura 1) ( $P < 0.00001$ ). Se apreció que la inhibición micelial de *Fusarium*



**Figure 1.** Growth inhibition percentage against *Fusarium solani* by different concentrations (ppm) of polyphenols from Creosote bush (*Larrea tridentata*) obtained with different m/v ratios and ethanol concentrations and using ultrasound-microwaves. Groups of CD polyphenols obtained with the m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%, and CE polyphenols obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 1.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por diferente concentración (ppm) de polifenoles de gobernadora (*Larrea tridentata*) obtenidos con diferentes relaciones m/v y concentraciones de etanol, y usando ultrasonido-microondas. Grupos de polifenoles CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70% y CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

of mycelial inhibition varied between 88 and 90%. In contrast, the group of polyphenols obtained with an m/v ratio of 1:12 and 30% ethanol only inhibited between 43 and 50% of mycelial growth, while the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1% inhibited only 27% of *F. solani* mycelial growth.

The results show that the polyphenols obtained from Creosote bush leaves by ultrasound-microwave have biological activity against the fungus *F. solani*. Four groups were formed based on the percentage of mycelial growth inhibition: a group formed by the negative control (without polyphenols), another formed by the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1%, and another two formed by the polyphenolic groups CD and CE. This coincides with what was reported by Peñuelas-Rubio *et al.* (2017), who mention that

*solani* fue mayor cuando se usó el grupo de polifenoles CD (obtenido con una relación de m/v 1:8 y etanol al 70%), el rango de afectación en la respuesta del crecimiento micelial con el grupo de polifenoles CD varió entre 88 - 90 %. En contraste el grupo de polifenoles obtenidos con la relación m/v de 1:12 y etanol al 30% solo inhibió el crecimiento micelial entre 43-50%, mientras que el testigo positivo (Tecto 60® (tiabendazol) al 1%) solo inhibió el crecimiento micelial de *F. solani* en 27%.

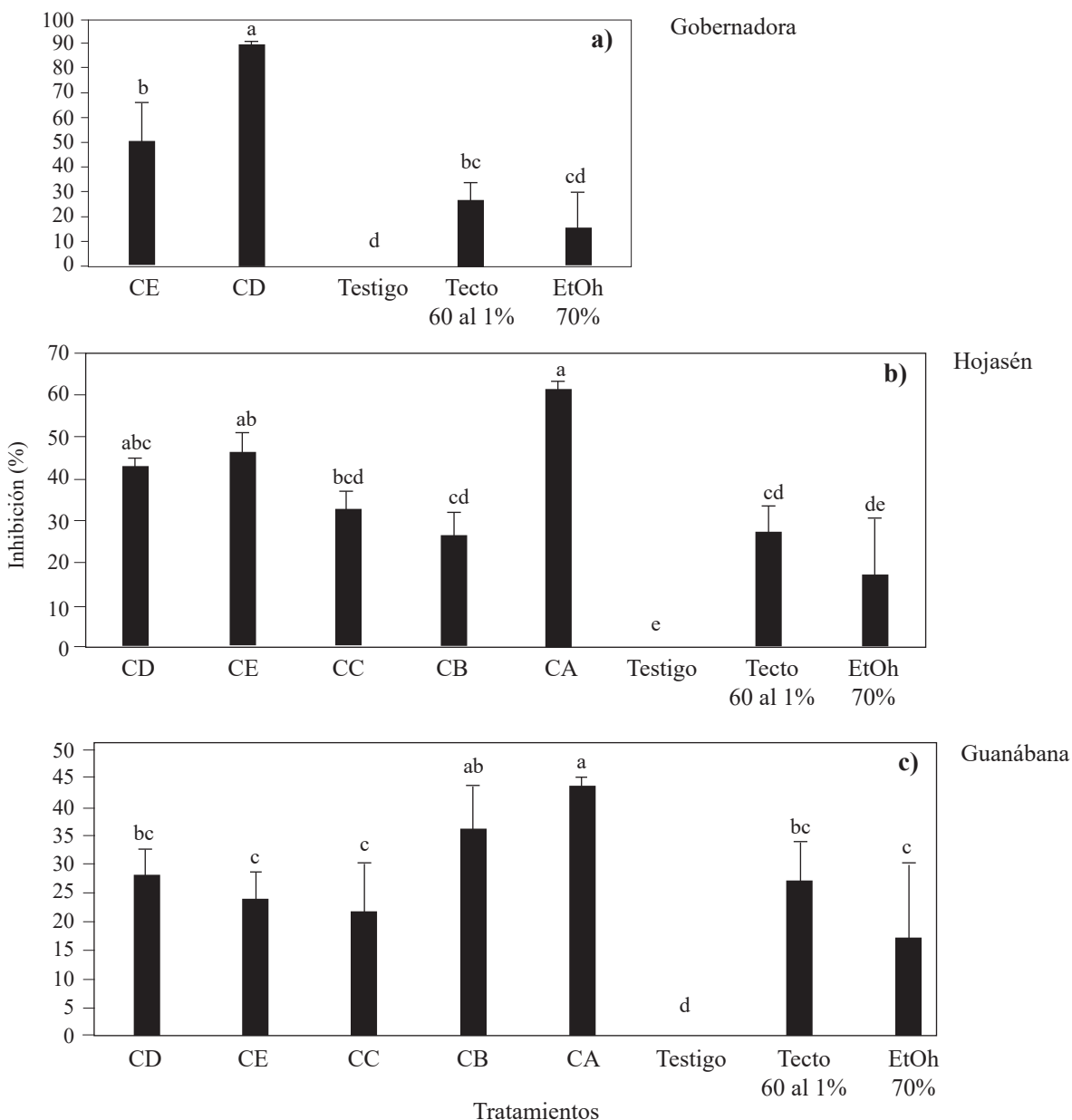
Los resultados muestran que hay actividad biológica de los polifenoles obtenidos de hojas de gobernadora por ultrasonido-microondas contra el hongo *F. solani*, donde por el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se formaron 4 grupos: un grupo formado por el testigo negativo (sin polifenoles), otro integrado por el testigo positivo (Tecto 60®

the inhibitory effect of fungal growth by extracts of *L. tridentata* can be attributed to the fact that the phenolic substances present in the extracts react with fungal enzymes, rendering them catalytically inactive. Farag *et al.* (2011) suggest that extracts with high amounts of polyphenols prevent the development of *F. oxysporum* due to the reduction of lipid peroxidation levels. In the present study, fungal growth inhibition was observed to be greater with the CD polyphenol group than with the CE group, which could be due to the presence of different polyphenolic compounds in each extract (Oufensou *et al.*, 2020).

**Inhibition of *Fusarium* and *Alternaria* by polyphenols from Creosote bush, Tarbush and Soursop.** In the case of *Fusarium*, the analysis of variance showed differences in mycelial growth inhibition against *F. solani* between the two groups of polyphenols (CD and CE) obtained from Creosote bush (*L. tridentata*) and the controls (negative and positive; tecto-60® and ethanol-70%) (Figure 2a). It was observed that at 8000 ppm the polyphenols obtained with the 1:8 m/v ratio and 70% ethanol (CD), inhibited mycelial growth by 90%, while the polyphenols obtained with the 1:12 m/v ratio and ethanol 30%, and the positive control (Tecto 60® (thiabendazole) at 1%) only inhibited mycelial growth by 50% and 27%, respectively. The results of this study coincide with those reported by Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) who mention that extracts at 500 ppm and obtained by the Soxhlet system and 70% ethanol, inhibited *F. oxysporum* by 98%, however, in the present work 8000 ppm of polyphenols were needed to inhibit mycelial growth by 90%, when the polyphenols were extracted with EtOH-70% and 50% when EtOH-30% was used. In this study, polyphenols were extracted in 20 minutes using simultaneously ultrasound-microwave, while extraction using

(tiabendazol) al 1%), y otro por los grupos polifenólicos CD y CE, lo cual coincide con lo reportado con Peñuelas-Rubio *et al.* (2017), quienes mencionan que el efecto inhibitorio del crecimiento fúngico por los extractos de *L. tridentata*, puede atribuirse a que las sustancias fenólicas presentes en los extractos, reaccionan con las enzimas fúngicas, volviéndolas catalíticamente inactivas. Farag *et al.* (2011), sugieren que los extractos con altas cantidades de polifenoles previenen el desarrollo de *F. oxysporum* debido a la reducción de los niveles de peroxidación lipídica. Por otra parte, en el presente estudio se apreció la inhibición en el crecimiento fúngico fue mayor con el grupo de polifenoles CD que cuando se usó el grupo CE, esto puede ser debido a la presencia de diferentes compuestos polifenólicos en cada extracto (Oufensou *et al.*, 2020).

**Inhibición de *Fusarium* y *Alternaria* por polifenoles de gobernadora, hojasén y guanábana.** Para *Fusarium*, el análisis de varianza mostró diferencias en la inhibición micelial de *F. solani* entre los dos grupos de polifenoles (CD y CE) obtenidos de gobernadora (*L. tridentata*) vs testigos (negativo y positivo (tecto-60® y etanol-70%)) (Figura 2a). Se apreció que a 8000 ppm los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:8 y etanol 70% (CD), inhibieron el crecimiento micelial en 90 %, mientras que los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:12 y etanol 30%, y el testigo positivo (Tecto 60® (tiabendazol) al 1%) solo inhibieron el crecimiento micelial en 50% y 27 %, respectivamente. Los resultados de este estudio coinciden con los reportados por Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) quienes mencionan que extractos a 500 ppm y obtenidos por el sistema Soxhlet y etanol 70%, inhibieron *F. oxysporum* en un 98%, sin embargo, en el presente trabajo se necesitaron 8000 ppm de polifenoles para inhibir el crecimiento micelial en 90%, cuando los polifenoles se extrajeron con EtOH-70% y



**Figure 2.** Mycelial growth inhibition against *Fusarium solani* by different groups of polyphenols from a) Creosote bush (*Larrea tridentata*), b) Tarbush (*Flourensia cernua*) and c) Soursop (*Annona muricata*) obtained by ultrasound-microwave, at a concentration of 8000 ppm, compared to controls (negative and positive; tecto- 60® and ethanol-70%). Polyphenol group CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenol group CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; polyphenol group CC obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%; polyphenol group CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%; polyphenol group CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter within the same graph are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 2.** Inhibición micelial de *Fusarium solani* por diferentes grupos de polifenoles de a) gobernadora (*Larrea tridentata*), b) hojasén (*Flourensia cernua*) y c) guanábana (*Annona muricata*) a 8000 ppm obtenidos por ultrasonido-microondas vs testigos (negativo y positivo (tecto-60® y etanol-70%). Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra dentro de una misma grafica no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Soxhlet takes at least 36 hours (Sepúlveda-Rincón *et al.*, 2016).

In the case of Tarbush (*F. cernua*), the analysis of variance showed significant differences in mycelial growth inhibition against *F. solani* between the different groups of polyphenols and the negative control (Figure 2b). The polyphenol groups (CA, CC, CD and CE) inhibited a greater proportion of mycelial growth than the positive control (tecto-60®). The groups of polyphenols extracted using ethanol as solvent (CA, CD and CE) had a greater inhibitory effect on mycelial growth, followed by the groups of polyphenols obtained using water (CB and CC). The inhibition efficiency of the polyphenolic groups extracted with ethanol was proportional to the m/v ratio, that is, polyphenols with a higher m/v ratio were associated with greater fungal growth inhibition. The inhibition percentage of the groups of polyphenols extracted with water was similar to that of the positive control (Tecto-60®). The group of polyphenols that had a greater inhibitory effect (60%) was the one obtained with 70% ethanol and an m/v ratio of 1:16 (CA), followed by the groups of polyphenols CE and CD, with 46.5 and 42.8%, respectively. The inhibition percentage of the polyphenols obtained with water (CC and CB) was very similar to the inhibition percentage associated with the positive control (Tecto-60®), 32 and 26%, respectively.

There are few studies on the effect of extracts of *F. cernua* against *F. solani*. Most studies have used *F. oxysporum*. The mycelial inhibition percentage of the polyphenolic groups of *F. cernua* studied here was greater than that reported by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003), who did not find any inhibitory effect against *F. oxysporum* with any of the extract concentrations that they studied (4000, 8000, 12000, 16000 and 20000 ppm). This can be explained by the method (Soxhlet extraction) and

50% cuando se usó EtOH-30%. En este estudio los polifenoles se extrajeron en 20 minutos usando simultáneamente ultrasonido-microondas, mientras que la extracción empleando Soxhlet tarda al menos 36 horas (Sepúlveda-Rincón *et al.*, 2016).

Respecto a hojaseñ (*F. cernua*), el análisis de varianza mostró diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* entre los diferentes grupos de polifenoles vs el testigo negativo (Figura 2b). Los grupos de polifenoles (CA, CC, CD y CE) inhibieron en una mayor proporción que el testigo positivo (tecto-60®). Se apreció que los grupos de polifenoles extraídos usando etanol como disolvente (CA, CD y CE) tuvieron mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial, seguidos por los grupos de polifenoles obtenidos empleando agua (CB y CC). Así mismo, se observó que la eficiencia en la inhibición por los grupos polifenólicos extraídos con etanol, es proporcional a la relación m/v, es decir, los polifenoles con mayor relación m/v promueven más la inhibición fúngica. Mientras que los grupos de polifenoles extraídos con agua inhibieron de manera similar al testigo positivo (Tecto-60®). En este sentido el grupo de polifenoles que más afectó la inhibición fue el obtenido con etanol al 70% en la relación m/v 1:16 (CA) con un valor superior a 60% de inhibición, seguido de los grupos de polifenoles CE y CD con 46.5 y 42.8%, respectivamente. Los polifenoles obtenidos empleando agua (CC y CB) presentaron un porcentaje de inhibición muy similar al testigo positivo (Tecto-60®), con valores de 32% y 26 %, respectivamente.

Son escasos los estudios que involucran los extractos de *F. cernua* contra *F. solani* y en su mayoría se ha trabajado con *F. oxysporum*. Por otra parte, el porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial observado con los grupos polifenólicos de *F. cernua* en este estudio, son mayores a lo reportado por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003),

solvent (methanol) used by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003). They used a 10-day-long extraction method that turned out to be less efficient and effective than ultrasound-microwave technology, which achieves extraction in 20 minutes and with a more controlled and efficient mass transfer. There are reports of complete inhibition of *Fusarium* growth using extracts from tarbush, however, these results were against *F. oxysporum* (Peñuelas *et al.*, 2017).

Concerning the polyphenolic groups from soursop (*A. muricata*), the analysis of variance showed that, at 8000 ppm, there were significant differences among treatments (Figure 2c). The groups of polyphenols CA and CB showed a greater inhibitory effect against fungal growth, even greater than the positive controls (Tecto-60® and 70% ethanol). In addition, the polyphenols obtained with an m/v ratio of 1:16 had a greater inhibitory effect against *F. solani*, regardless of whether they were obtained with ethanol or water. The CA group of polyphenolic compounds showed the greatest inhibitory effect (43.7%) against the mycelial growth of *F. solani*. This group of polyphenols was obtained with an m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%. The CA group was followed by the groups of polyphenolic compounds CB and CD, with 36 and 27% of inhibition, respectively. The CE and CC polyphenol groups caused a lower percentage of inhibition than the positive control (Tecto-60®), 23 and 21%, respectively. Although soursop polyphenols showed a higher inhibitory effect against *F. solani* than the positive control (Tecto-60®), the growth of this fungus was not inhibited by more than 50% at a concentration of 8000 ppm. Thus, the fungicidal potential of these polyphenols should be tested at higher concentrations (Figure 2c). It was not possible to find reports about the antifungal properties of polyphenols obtained from soursop against

quienes no encontraron ningún efecto inhibitorio del crecimiento de *F. oxysporum* en ninguna de las concentraciones de 4,000, 8,000, 12,000, 16,000 y 20,000 ppm del extracto. Esto puede ser explicado por el método (extracción Soxhlet) y disolvente (metanol) empleados por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003), quienes utilizaron un sistema de extracción con una duración de 10 días, el cual resulta ser menos eficiente y efectivo que la tecnología de ultrasonido-microondas, que logra la extracción en 20 minutos y con una transferencia de masa más controlada y eficiente. Hay reportes de inhibición completa de *Fusarium* utilizando extractos de hojásén, sin embargo, estos reportes son contra *F. oxysporum* (Peñuelas *et al.*, 2017).

Para los grupos polifenólicos de guanábana (*A. muricata*) a 8000 ppm, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2c). Se apreció que los grupos de polifenoles CA y CB presentaron una mayor inhibición del crecimiento fúngico, el cual fue aún mayor que los testigos positivos (Tecto-60® y etanol 70%). Además, se observó una mayor inhibición de *F. solani* con los polifenoles obtenidos con la relación m/v 1:16 sin importar si se obtuvo con etanol o agua. En este sentido, el grupo de compuestos polifenólicos CA promovió la mayor inhibición (43.7%) del crecimiento micelial de *F. solani*, dicho grupo de polifenoles fue obtenido por la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, este efecto fue seguido por los grupos de compuestos polifenólicos CB y CD, con 36 y 27% de inhibición, respectivamente. Los grupos de polifenoles CE y CC, causaron un porcentaje de inhibición inferior al testigo positivo (Tecto-60®), 23% y 21 %, respectivamente. Aunque, los polifenoles de guanábana mostraron un efecto inhibitorio contra *F. solani* superior al testigo positivo (Tecto-60®), no se inhibió más del 50% el crecimiento de este hongo a la concentración de 8000 ppm, por lo que su potencial fungicida podría determinarse a

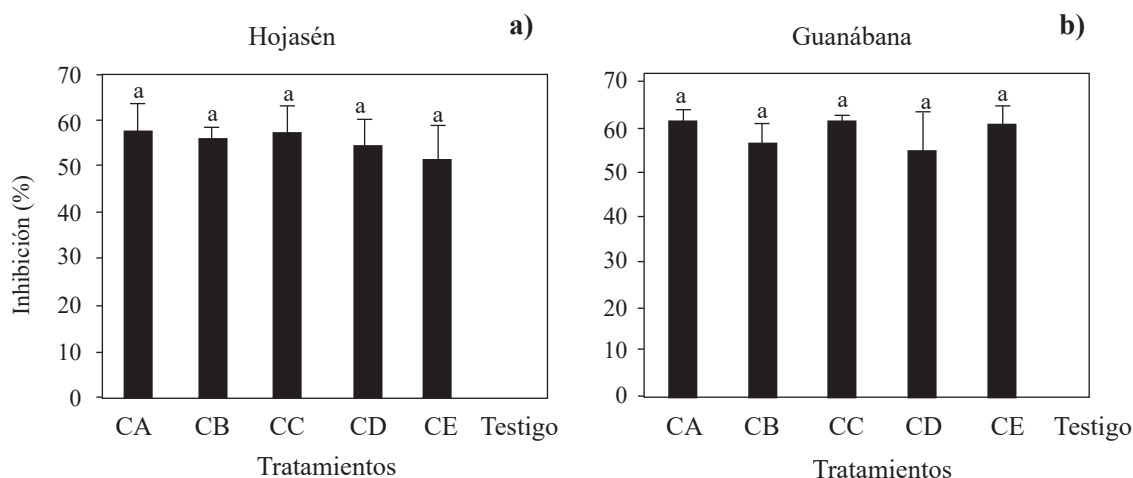


*Fusarium solani*, so the results obtained in the present study cannot be compared.

Against *Alternaria alternata*, the five groups of polyphenols obtained from Tarbush (*F. cernua*) and Soursop (*A. muricata*) were evaluated. The analysis of variance showed significant differences between these groups of polyphenols and the negative control (Figure 3a and 3b). The groups of polyphenols obtained from Tarbush and soursop inhibited between 51 and 58% of the mycelial growth of *A. alternata*, in contrast to the negative control. The results of this assay were lower than those reported by Guerrero et al. (2007), who mentioned that extracts from tarbush leaves inhibited 81.6-82.0% of the mycelial growth of *A. alternata*. However, these authors used solvents such as methanol: chloroform (1:1) and hexane, respectively, the latter being polar and alkaline in

mayores concentraciones (Figura 2c). No fue posible encontrar reportes acerca de las propiedades antifúngicas de polifenoles obtenidos de guanábana contra *Fusarium solani*, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo no se pueden comparar.

Para *Alternaria alternata* se aplicaron los cinco grupos de polifenoles obtenidos de hojásén (*F. cernua*) y de guanábana (*A. muricata*). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre estos grupos de polifenoles vs el testigo negativo (Figura 3 a y 3b). Es decir, los grupos de polifenoles obtenidos a partir de hojásén y de guanábana, afectaron el crecimiento micelial con valores entre 51 y 58% de inhibición, en contraste al testigo negativo. Los resultados de este ensayo fueron inferiores a los reportados por Guerrero et al. (2007), quienes mencionaron que los extractos de hojásén causaron un 81.6-82.0% de inhibición del crecimiento



**Figure 3.** Mycelial inhibition against *Alternaria alternata* by 5 groups of polyphenolic compounds obtained by ultrasound-microwave from a) Tarbush (*Flourensia cernua*) and b) Soursop at 8000 ppm. Groups of polyphenols CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenols CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; polyphenols CC obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%, polyphenols CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%; polyphenols CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%. Columns with the same letter within the same graph are not different according to Tukey's multiple range test.

**Figura 3.** Inhibición micelial de *Alternaria alternata* por 5 grupos de compuestos polifenólicos a 8000 ppm de a) hojásén (*Flourensia cernua*) y b) guanábana obtenidos por ultrasonido-microondas. Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%. Columnas con la misma letra dentro de la misma gráfica, no son diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

nature, characteristics that make it a very efficient solvent but also highly flammable, harmful to the environment and damaging to the health of those who breathe or are in direct contact with it (Pan *et al.*, 2017). The same occurs with chloroform, whose C-Cl bond is useful for the polarization and synthesis of organic molecules, and with methanol, which has the ability to remove water from solutions, during synthesis or separation processes (Sridhar *et al.*, 2011; Ashurst and Nappe, 2022). These three compounds are outstanding alternatives for extraction, but their harmful effects on human health and the environment are much greater than those of ethanol and water, which are used in the present study. The latter are cheap, efficient in the extraction of compounds and do not pose a threat to human or the environment. Moreover, ethanol can be produced by fermentation, and is highly volatile (Baümler *et al.*, 2016). Guerrero *et al.* (2007) reported an inhibition percentage of 80.3% at 2000 ppm using ethanol as extraction solvent. The differences between these results and those obtained in the present study can be explained by the method used to obtain the extracts, the number of molecules with fungicidal activity, the affinity of the polyphenols with the solvent used, the polarity and type of solvent used, the temperature of the extraction process, and the forms of recovery (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

All the polyphenolic groups of soursop (*A. muricata*) obtained by ultrasound-microwave showed an inhibitory effect between 55 and 61% against the mycelial growth of *A. alternata*, compared to the negative control (Figure 3b). To date, no reports have been found about the antifungal properties of polyphenols obtained from soursop against *A. alternata*. The *in vitro* fungal inhibition values observed in the present study are promising (Vitola and Pérez, 2016).

In general terms, it can be said that the simultaneous use of ultrasound and microwave

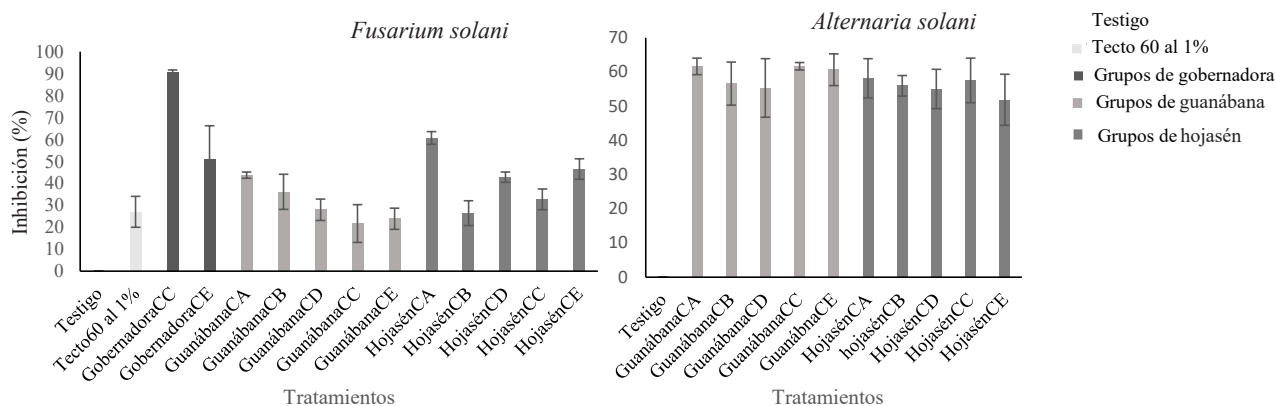
micelial de *A. alternata*, sin embargo, estos autores utilizaron solventes como metanol: cloroformo (1:1) y hexano, respectivamente, este último siendo de naturaleza polar y alcalina, características que lo convierten en un solvente muy eficiente, sin embargo también es altamente inflamable, dañino para el ambiente y tiene efectos sobre la salud de quien respire o esté en contacto directo con este compuesto (Pan *et al.*, 2017), esto mismo ocurre con el cloroformo, siendo útil su enlace C-Cl para la polarización y síntesis de moléculas orgánicas y con el metanol, gracias a su capacidad de remover agua de las soluciones en síntesis o en procesos de separación (Sridhar *et al.*, 2011; Ashurst y Nappe, 2022), siendo los tres compuestos, opciones destacables para la extracción, sin embargo sus inconvenientes a la salud y el ambiente no son comparables con las del etanol y agua, usados en este trabajo, debido a que son baratos, son eficientes en la extracción de compuestos, no representa un daño a las personas o al ambiente, además, el etanol puede ser producido por fermentación, y es altamente volátil (Baümler *et al.*, 2016). Guerrero *et al.* (2007), también reportan una inhibición de 80.3% a 2,000 ppm, utilizando etanol como disolvente de extracción. Las diferencias de estos resultados con los obtenidos en el presente estudio, pueden ser explicadas por la metodología de obtención de los extractos, cantidad de moléculas con actividad fungicida, afinidad de los polifenoles con el disolvente empleado, polaridad y tipo de disolvente empleado, temperatura en el proceso de obtención, y formas de recuperación (Gómez-Martínez *et al.*, 2020).

Con todos los grupos polifenólicos de guanábana (*A. muricata*) obtenidos mediante ultrasonido-microondas se apreció una inhibición (entre 55 y 61%) del crecimiento micelial de *A. alternata* en comparación al testigo negativo (Figura 3b). A la fecha, no se encontraron reportes acerca de las propiedades antifúngicas de polifenoles obtenidos de guanábana contra *A. alternata*. Los valores de

was an efficient extraction method to obtain compounds with antifungal properties, at least against the pathogens *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. The inhibition percentage of these compounds against the mycelial growth of both pathogenic fungi exceeded 50% at 8000 ppm, compared to the negative control. Sixteen percent of the groups of polyphenols evaluated had an inhibitory effect greater than or equal to 50% against *F. solani*, while 90.9% of the groups of polyphenols had an inhibitory effect greater than or equal to 50% against *A. alternata* (Figure 4). This means that, at 8000 ppm, only 3 groups of polyphenols (CD, CE and CA) have polyphenolic compounds with mycelial inhibition capacity (between 50-90%) against *F. solani*, these being those obtained from *L. tridentata* and *F. cernua* with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70% as solvent (CD) and 1:12/EtOH-30% (CE) for the first plant species, and 1:16/

inhibición fúngica *in vitro* observados en este estudio son prometedores (Vitola y Pérez, 2016).

En términos generales, se puede mencionar que la metodología de extracción empleando simultáneamente ultrasonido-microondas es eficiente para obtener compuestos con propiedades antifúngicas al menos para los patógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*, ya que la inhibición del crecimiento micelial a 8000 ppm superó el 50% en ambos fitopatógenos en contraste al testigo negativo, en este caso, el 16% de los grupos de polifenoles evaluados presentaron una tasa de inhibición superior o igual a 50% en *F. solani*, y un 90.9% de los grupos de polifenoles presentaron una tasa de inhibición superior o igual a 50% en *A. alternata* (Figura 4). Lo anterior, significa que solo 3 grupos de polifenoles (CD, CE y CA) a 8000 ppm tienen compuestos polifenólicos con capacidad de inhibición micelial (entre 50-90%) en *F. solani*, siendo estos



**Figure 4.** Antifungal activity of various groups of polyphenolic compounds (at 8000 ppm) obtained with different m/v ratios and proportions of ethanol against *Fusarium solani* and *Alternaria alternata*. Group of polyphenols CA obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-70%; polyphenols CB obtained with m/v ratio of 1:16 and EtOH-0%; CC polyphenols obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-0%; polyphenols CD obtained with m/v ratio of 1:8 and EtOH-70%, polyphenols CE obtained with m/v ratio of 1:12 and EtOH-30%.

**Figura 4.** Actividad antifúngica de diversos grupos de compuestos polifenólicos a 8000 ppm obtenidos con diferentes relaciones m/v y porcentaje de etanol contra *Fusarium solani* y *Alternaria alternata*. Grupos de polifenoles CA obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-70%, CB obtenido con la relación m/v (1:16) y EtOH-0%, CC obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-0%, CD obtenido con la relación m/v (1:8) y EtOH-70%, CE obtenido con la relación m/v (1:12) y EtOH-30%.

EtOH-70% (CA) for the latter one. In the three groups of polyphenols (CA, CD, and CE), ethanol was used as solvent at 70, 70 and 30% respectively. The differences in fungal inhibition might be associated with the amount of plant material used. In the case of the Creosote bush, the most efficient polyphenolic groups were those where ethanol was used at a higher concentration (70%) together with the largest amount of plant biomass (125 g L<sup>-1</sup>). In the case of Tarbush, the inhibitory efficiency was inversely proportional to the plant biomass used; the lower the biomass (62.5 g L<sup>-1</sup>), the higher the inhibitory effect (Figure 2). The mycelial growth of *A. alternata* was inhibited by all the groups of polyphenols evaluated, regardless of the m/v ratio and the type of solvent (Figure 4).

The different m/v ratios and solvent concentrations used in the extraction allowed obtaining different amounts of total polyphenols (condensed and water-soluble), expressed in mg per gram of plant material. Figure 5 shows that

los obtenidos de *L. tridentata* y *F. cernua* con la relación m/v y disolvente de 1:8 / EtOH-70% (CD) y 1:12 / EtOH-30% (CE) para la primera especie vegetal, y 1:16 / EtOH-70% (CA) para la segunda. Se puede observar que en los tres grupos de polifenoles (CA, CD, y CE) fue usado el etanol como disolvente en 70, 70 y 30 %, respectivamente, sin embargo, las diferencias en la inhibición fúngica pudieran estar asociadas a la cantidad de material vegetal utilizado, ya que en el caso de la gobernadora, los grupos polifenolicos más eficientes fueron aquellos donde se usó el etanol a mayor concentración (70%), y la mayor cantidad de biomasa vegetal (125 g L<sup>-1</sup>), y respecto a hojásén, se observó que la mayor eficiencia ocurre inversamente a la biomasa vegetal utilizada, menor biomasa (62.5 g L<sup>-1</sup>), mayor efecto inhibitorio (Figura 2). Por otro lado, también se observa que el crecimiento micelial de *A. alternata* es inhibido por todos los grupos de polifenoles evaluados, sin importar la relación m/v y el tipo de disolvente (Figura 4).

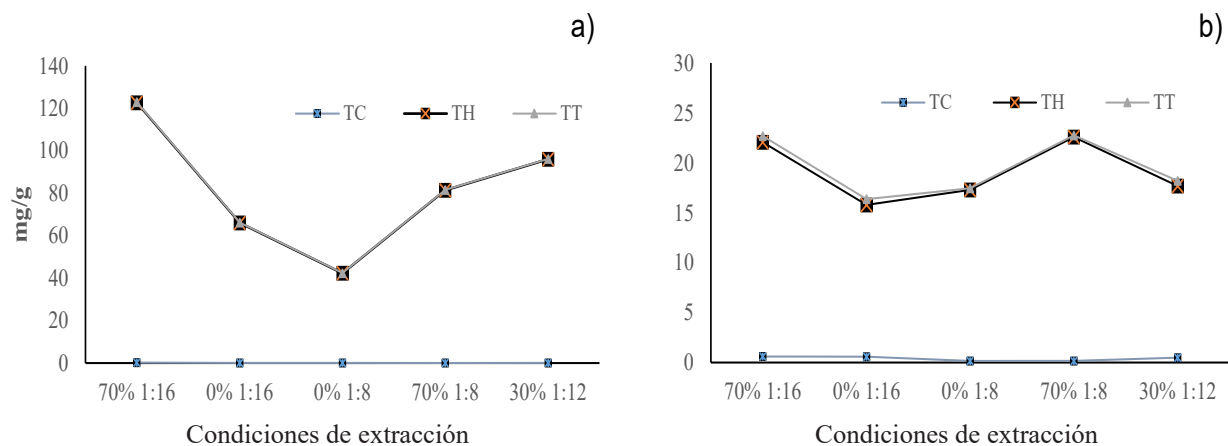


Figure 5. Concentration of total polyphenols (condensed and water-soluble) obtained with different m/v ratios and ethanol proportions; a) Creosote bush polyphenols, b) Tarbush polyphenols.

Figura 5. Concentración de polifenoles totales (condensados e hidrosolubles) obtenidos con las diferentes relaciones m/v y porcentaje de etanol; a) Polifenoles de gobernadora, b) Polifenoles de hojásén.

a m/v ratio of 1:16 and EtOH-70% (CA) made it possible to recover the highest proportion of both types of polyphenols in both plant species. However, the groups of Creosote bush polyphenols that had the greatest inhibitory effect against the mycelial growth of *F. solani* were those obtained with 1:8/EtOH-70% (CD) and 1:12/EtOH -30% (CE). When Tarbush was used, the greatest inhibitory effect coincided with one of the groups that had the highest amount of polyphenols (CA). All the polyphenol groups had a similar inhibitory effect against the mycelial growth of *A. alternata*. Therefore, the m/v ratio and the solvent proportion did not affect the mycelial inhibition percentage.

The inhibitory activity against mycelial growth may be caused by the polyphenolic compounds present in each group rather than by the amount of hydrolysable or condensed polyphenols. The differences in the profile of polyphenolic compounds of each group (Tables 2 and 3) are given by the m/v ratio, the affinity of polyphenols for the solvent used, the polarity and type of solvent used, the temperature during the production process, and the forms of recovery (Gómez-Martínez *et al.*, 2020). A greater number of polyphenolic compounds was observed in the group of CD polyphenols than in the CE group obtained from Creosote bush. Some compounds found in the CD group, such as epirosmanol, have been reported to have an antimicrobial or antioxidant effect. Epirosmanol results from the oxidation of carnosic acid and has a high antioxidant capacity. The CD group also has molecules with not only highly antioxidant activity but also antimicrobial activity such as rosmadiol (Quintana *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2011). The CD polyphenol group includes apigenin, a compound that has been described as one of the most abundant flavonoids. There is a positive relationship between the consumption of this flavonoid and a decrease in mortality due to stomach cancer. It also has

Las diferentes relaciones m/v y concentraciones de los disolventes empleados en la extracción permitieron obtener cantidad diferentes de polifenoles totales (condensados e hidrosolubles) en mg por gramo de material vegetal. En la Figura 5 se observa que con la relación m/v 1:16 /EtOH-70% (CA) se logró recuperar la mayor proporción de ambos tipos de polifenoles, en ambas especies vegetales. Sin embargo, los grupos de polifenoles de gobernadora que tuvieron el más alto grado de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* fueron aquellos obtenidos con las relaciones m/v 1:8/EtOH-70% (CD) y 1:12/ EtOH-30% (CE). Mientras que cuando se usó hojásén, la más alta inhibición coincide con uno de los grupos que presento mayor cantidad de polifenoles (CA). Por otro lado, todos los grupos de polifenoles mostraron similar nivel de inhibición en el crecimiento micelial de *A. alternata*, por lo tanto, no importo la relación m/v y disolvente en el grado de inhibición micelial.

La actividad inhibitoria del crecimiento micelial pude estar dada más por los compuestos polifenólicos presentes en cada grupo que por las cantidades de polifenoles hidrolizables o condensados, la diferencia en el perfil de compuestos polifenólicos encontrados en cada grupo (Cuadros 2 y 3) están dados por la relación m/v, afinidad de los polifenoles con el disolvente empleado, polaridad y tipo de disolvente empleado, temperatura en el proceso de obtención, y formas de recuperación (Gómez-Martínez *et al.*, 2020). En el grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se observaron mayor número de compuestos polifenólicos, que en el grupo CE; algunos compuestos que están en el grupo CD se han reportado que tienen efecto antimicrobiano o antioxidante como el epirosmanol, el cual es el resultado de la oxidación del ácido carnósico y que posee una alta capacidad antioxidante, además de la detección de moléculas con actividades no solo altamente antioxidantes sino

**Table 2. Compounds identified in Creosote bush powders according to the mass volume ratio.**  
**Cuadro 2. Compuestos identificados según la relación de masa volumen para polvos de Gobernadora.**

T.R (min)	Masa (m/z)	Compuestos		Familia
		Grupo CD (70% 1:8)	Grupo CE (30% 1:12)	
39.23	346.9		5- heptadecil resorcinol	Alquiflenoles
34.09	504.8	Peonidin 3-O-(6-acetil-glucósido)		Antocianinas
27.6	288.8	Catequina		Catequina
33.42	304.9		Epigallocatequina	Catequina
22.61	304.8	<b>Galocatequina</b>		Catequina
25.7	304.9		<b>(+) Galocatequina</b>	Catequinas
35.08	302.8	Taxifolina o dihidroquercetina		Dihidroflavonol
44.21	268.8	Apigenina		Flavones
30.45	592.9		Apigenina 6,8- di glucósido	Flavones
27.97	592.8	Luteolin 7- rutinoside		Flavones
22.64	284.9		Luteolina	Flavones
24.2	284.9		Scutellarina	Flavones
34.37	<b>608.9</b>		<b>Quercetina 3-O glucósido 7-O rhamnoside</b>	Flavonoles
32.05	<b>608.8</b>	<b>Quercetina 3-O-glucósido 7-O-rhamnoside</b>		Flavonoles
35.82	770.7	Quercetina 3-O-glucosyl- ramnosil-galactósido		Flavonoles
32.28	<b>754.9</b>		<b>Quercetina 3-O-ramnosil glucósido</b>	Flavonoles
30.17	<b>754.8</b>	<b>Quercetina 3-O-ramnosil- glucósido</b>		Flavonoles
49.52	300.9	<b>NDGA</b>		Lignanosis
51.69	301		<b>NDGA</b>	Lignanosis
28.05	542.8		Ácido 3,4- feruloiquínico	Ácido metoxicinámico
48.16	<b>298.9</b>	<b>Hispidulina</b>		Methoxiflavones
48.46	<b>298.9</b>		<b>Hispidulina</b>	Methoxiflavones
40.95	<b>314.8</b>	<b>Nepetin</b>		Methoxiflavones
43.03	<b>314.8</b>		<b>Nepetin</b>	Methoxiflavones
29.46	370.8	Sinensetina		Methoxiflavones
27.59	<b>328.9</b>		<b>3,7- Dimetil quercetina</b>	Methoxiflavones
44.96	<b>328.8</b>	<b>3,7- Dimetil quercetina</b>		Methoxiflavones
52.48	283		<b>Metil galadin</b>	Methoxiflavones
50.31	282.9	<b>Metil galadin</b>		Methoxiflavones
38.28	<b>330.8</b>	<b>Ácido carnósico</b>		Diterpeno fenólico
40.39	<b>330.8</b>		<b>Ácido carnósico</b>	Diterpeno fenólico
42.39	344.7	Epirosmanol		Diterpeno fenólico
41.58	344.8	Rosmadial		Diterpeno fenólico
28.74	862.7	Procianidina C1		Trímeros de protoantocianidinas

En negritas compuestos similares encontrados en cada grupo obtenido con unas condiciones de extracción diferente. / In bold, similar compounds found in each group obtained with different extraction conditions.

**Table 3. Compounds identified according to the mass-volume ratio for powdered senna.**  
**Cuadro 3. Compuestos identificados según la relación de masa volumen para polvos de hojásén.**

T.R (min)	MASA (m/z)	Compuestos		FAMILIA
		Grupo CA (70% 1:16)	Grupo CB (0% 1:16)	
	242.8		Dihidroquercetina	Dihidroflavonoles
44.19	268.7	Apigenina		Flavones
28.19	<b>592.8</b>		<b>Apigenina 6,8 glucósido</b>	Flavones
28.06	<b>592.8</b>	<b>Apigenina 6,8 glucósido</b>		Flavones
29.9	<b>562.8</b>	<b>Apigenina glucósido- arabinósido</b>		Flavones
29.92	<b>562.8</b>		<b>Apigenina glucósido- arabinósido</b>	Flavones
40.66	676.7	Metoxiflavona		Flavones
44.97	298.7	Quercetina		Flavonol
34.74	<b>514.7</b>	<b>Ácido 1,3- dicafeoilquinico</b>		Ácido hidroxicinámico
35.79	<b>514.7</b>		<b>Ácido 1,3- dicafeoilquinico</b>	Ácido hidroxicinámico
18.51	<b>352.8</b>	<b>Ácido 1-cafeoilquinico</b>		Ácido hidroxicinámico
24.16	<b>352.8</b>		<b>Ácido 1-cafeoilquinico</b>	Ácido hidroxicinámico
24.66	<b>352.7</b>	<b>Ácido 3-cafeoilquinico</b>		Ácido hidroxicinámico
25	<b>352.8</b>		<b>Ácido 3- cafeoilquinico</b>	Ácido hidroxicinámico
47.11	358.7	Ácido rosmarínico		Ácido hidroxicinámico
26.88	<b>310.8</b>	<b>Cafeoil ácido tartárico</b>		Ácido hidroxicinámico
26.56	<b>310.8</b>		<b>Cafeoil ácido tartárico</b>	Ácido hidroxicinámico
35.74	514.7	Ácido 1,5- dicafeoilquinico		Ácido hidroxicinámico
39.59	312.7	Cirsimaritina		Methoxiflavona
45.72	314.7	Nepetin		Methoxiflavona
32.01	<b>370.9</b>	<b>Tangeretina</b>		Methoxiflavona
31.8	<b>370.9</b>		<b>Tangeretina</b>	Methoxiflavona
42.59	344.7	Rosmanol		terpenos fenólicos

En negritas compuestos similares encontrados en cada grupo obtenido con diferentes condiciones de extracción. / In bold, similar compounds found in each group obtained with different extraction conditions.

antiviral and antibacterial activity (Álvarez and Orallo, 2003). Catechins have a high antioxidant potential, with the ability to cross-link many proteins, which gives them antimicrobial activity, possibly by damaging microbial cytoplasmic lipids and proteins (Rahardiyan, 2019). The antifungal activity of catechin against phytopathogenic fungi has been mentioned in other studies (Istúriz *et al.*, 2019). It has also been reported that procyanidin C1 can inhibit microbial growth through the inhibition of extracellular enzymes, deprivation of essential microbial substrates, disintegration of the

que también antimicrobianas como el rosmadiol (Quintana *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2011). También en el grupo de polifenoles CD se encontró apigenina, un compuesto el cual ha sido descrito como uno de los flavonoides más abundantes que poseen una relación positiva entre su consumo y la baja en la mortalidad debido al cáncer de estómago y a que tiene además una actividad antiviral y antibacterial (Álvarez y Orallo, 2003), mientras que, catequina presentan un alto potencial antioxidante y tiene capacidad de entrecruzarse con muchas proteínas, lo que le confiere actividad antimicrobiana,

bacterial outer membrane and negatively affecting microbial metabolism (Dasiman *et al.*, 2022). The CA and CB polyphenol groups obtained from Tarbush were compared. In addition to containing apigenin, the CA group also has rosmarinic acid, which can destroy bacterial cells and proteins and inhibit the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATP-ase in cells (Zhang *et al.*, 2021). The CA group of polyphenols also contains nepetin, which can decrease the virulence of various pathogens by binding to caseinolytic protein peptidase P (ClpP) and to Ser-22 and Gln-47 amino acids of the CLpP protein. (Shisong *et al.*, 2022). Another CA compound is quercetin, a flavonoid approved by the FDA with antimicrobial capabilities. It damages cell membranes, modifies membrane permeability, inhibits both nucleic acid and protein synthesis, reduces the expression of virulence factors, induces mitochondrial dysfunction, and prevents biofilm formation (Nguyen *et al.*, 2022). The activity of quercetin against phytopathogenic fungi such as *Penicillium expansum* has been reported elsewhere (Sanzani *et al.*, 2009). The antifungal activity of polyphenolic compounds has been of interest due to their low toxicity and ephemeral persistence in the environment, proving useful applications for organic agriculture (López *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONS

In the present study, it was possible to extract rapidly (20 minutes) polyphenolic compounds from Creosote bush, Tarbush and soursop leaves by simultaneously using environmentally friendly methods (ultrasound-microwave) and solvents (water and ethanol). Different polyphenolic

posiblemente dañando los lípidos y proteínas citoplasmáticos microbianos (Rahardiyan, 2019). Además, se ha mencionado la actividad antifúngica de la catequina contra hongos fitopatógenos (Istúriz *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha reportado que procianidina C1 tiene capacidad de inhibir el crecimiento microbiano a través de la inhibición de enzimas extracelulares, privación de sustratos microbianos esenciales, desintegración de la membrana externa bacteriana y afectar negativamente el metabolismo microbiano (Dasiman *et al.*, 2022). En la comparación de los grupos de polifenoles CA y CB obtenidos de hojaseén, el grupo CA además de contener apigenina también cuenta con ácido rosmarínico el cual tiene capacidad de destruir células y proteínas bacterianas e inhibir la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATP-asa en las células (Zhang *et al.*, 2021). El grupo de polifenoles CA también contiene nepetin, el cual puede disminuir la virulencia de diversos patógenos al unirse a la proteína caseinolítica peptidasa P (ClpP), mediante la unión de este polifenol a los aminoácidos Ser-22 y Gln-47 de la proteína CLpP (Shisong *et al.*, 2022) y quercetina, el cual es un flavonoide aprobado por la FDA con que cuenta con capacidades antimicrobianas al dañar la membrana celular, modificar la permeabilidad de la membrana, inhibir tanto síntesis de ácidos nucleicos como de proteínas, reducir la expresión de factores de virulencia, inducir disfunción mitocondrial y prevenir la formación de biopelículas (Nguyen *et al.*, 2022). Se ha reportado la actividad de la quercetina contra hongos fitopatógenos como *Penicillium expansum* (Sanzani *et al.*, 2009). La actividad antifúngica de compuestos polifenólicos ha sido de interés gracias a su baja toxicidad y efímera persistencia en el ambiente, siendo de utilidad en la agricultura orgánica (López *et al.*, 2019).



compounds were extracted, depending on the plant material, the m/v ratio, the solvent and its concentration. The group of polyphenols CD extracted from Creosote bush showed levels of mycelial growth inhibition of *F. solani* of 90%. The mycelial growth of *Alternaria alternata* was inhibited by 50-60% by the groups of polyphenols obtained from tarbush and soursop leaves. In the group profile of CD polyphenols obtained from Creosote bush, various polyphenolic compounds reported to have antioxidant and antimicrobial activity were found, among which the following stand out: epirosmanol, rosmadiol, Apigenin, catechin, and procyanidin C1.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Secretary of Agriculture, Fisheries and Livestock - Mexico, through the project: FON. SEC. SAGARPA-CONACYT CV-2015-4-266936.

#### CITED LITERATURE

- Abbas MF, Rafiq M, Al-Sadi AM, Alfarraj S and Alharbi SA. 2021. Molecular characterization of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on buttonwood (*Conocarpus erectus* L.) and determination of pathogenicity by a novel disease rating scale. PLoS ONE 16 (5): e0251471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251471>
- Abdel MF, Abo EK, and Morsy KM. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Protection 30(2): 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Álvarez CE y Orallo CF. 2003. Actividad biológica de los flavonoids (I). 2003. Acción frente al cancer. Offarm 22(10): 130-140. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13054406>
- Andrade AG, Delgado AA, Herrera CB, Arévalo GLL y Caso BL. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. Agrociencia 52(1): 55-66. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952018000100055&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000100055&lng=es&tlng=es)
- Apolonio RI, Franco MO, Salgado SM and Aquino MJ. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grape vine (*Vitis* spp.) leaves. Mexican Journal of Phytopathology 35(2): 170-185. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-1>

#### CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró extraer compuestos polifenólicos a partir de hojas de gobernadora, hojásen y guanábana, en muy corto tiempo (20 minutos) utilizando simultáneamente métodos (ultrasonido-microondas) y disolventes (agua y etanol) amigables con el medio ambiente. Dependiendo del material vegetal, la relación m/v, el disolvente y su concentración se lograron extraer diferentes compuestos polifenólicos. El grupo de polifenoles CD extraído de gobernadora mostro niveles de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* de 90%. Mientras que el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* fue inhibido en un 50-60% por los grupos de polifenoles obtenidos de hojásen y guanábana. En el perfil de grupo de polifenoles CD obtenido de gobernadora se encontraron diversos compuestos polifenólicos reportados por tener actividad antioxidante y antimicrobiana entre los que destacan: epirosmanol, rosmadiol Apigenina, catequina, procianidina C1.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Secretaria de Agricultura, Pesca y Ganadería - México, a través del proyecto: FON. SEC. SAGARPA-CONACYT CV-2015-4-266936.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Ashurst JV and Nappe TM. 2022. Methanol Toxicity. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482121/>
- Ávila SR, Navarro CAR, Aguilar AP, Vera LO y Dávila MRM. 2011. Romero: una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar 15(43): 23-36. [http://cienciaymar.mx/Revista/index.php/cienciaymar/issue/view/22/ART43\\_2](http://cienciaymar.mx/Revista/index.php/cienciaymar/issue/view/22/ART43_2)
- Bäumler ER, Carrín ME and Carelli AA. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. Journal of Food Engineering 178: 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.020>

- Berlanga PAM, Gallegos MG, Cepeda SM, Rodríguez HR, Aguilar CN, Castillo RF and Hernández CFD. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6(3): 410-417. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.410.417>.
- Bocker R and Silva EK. 2022. Innovative technologies for manufacturing plant-based non-dairy alternative milk and their impact on nutritional. Sensory and Safety Aspects 5: 100098. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100098>
- Castrillo M, Bich G, Sioli G, Zapata P and Villalba L. 2021. Biocontrol capacity of native isolates of *Trichoderma* sp. against the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 37(3): 244-256. <https://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-26cbml50026>
- Chemat F, Rombaut N, Anne-Gaëlle S, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS and Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry 34: 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.jultsonch.2016.06.035>
- Chemat F, Abert Vian M., Ravi HK., Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, and Tixier AF. 2019. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Principles, Applications and Prospects. Molecules 24(16): 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Costa M, Sezgin BZ, Losada BS, Paiva MF, Saso L, and Bravo DC. 2021. Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases.: Encapsulation and Interfacial Phenomena. Biomedicines 9(12) 1909. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909>
- Dasiman R, Nor NM, Eshak Z, Mutalip SSM, Suwandi NR and Bidin H. 2022. A Review of Procyanidin: Updates on current bioactivities and potential health benefits. Biointerfase Research in Applied Chemistry 12(5):5918 – 5940. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.59185940>
- Farag HR, Zeinab AA, Dawlat AS, Mervat ARI and Srour HAM. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. Annals of Agricultural Sciences 56(1): 1-7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aas.2011.05.007>
- Gamboa-Alvarado R, Hernández CFD, Guerrero RE, Sánchez AA y Lira SRH. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* DC.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.). Revista Mexicana de Fitopatología 21(1): 13-18. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221102>
- García W, Lezama H y Pumachagua P. 2019. Estudio teórico de la actividad antioxidante de compuestos aromáticos con bases de schiff heterocíclicas sustituidos en posiciones meta y para. Rev Soc Quím Perú 85(2): 242-257. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a11v85n2.pdf>
- Gómez-Martínez M, Ascacio-Valdés JA, Flores-Gallegos AC, González-Domínguez J, Gómez-Martínez S, Aguilar CN and Rodríguez-Herrera R. 2020. Location and tissue effects on phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of *Moringa oleifera*. Industrial Crops and Products 151: 1124-1139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112439>
- Guerrero RE, Solís GS, Hernández CF, Flores OA, Sandoval LV, y Jasso CD. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc.. Mexican Journal of Phytopathology 25(1): 48-53. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100007&lng=es&tlng=es)
- Gutiérrez GE, Ambriz PD, Leyva LN, Castillo LR and Heredia JB. 2016. Bioavailability of dietary phenolic compounds: review. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética 20(2): 140-147. <https://dx.doi.org/10.14306/rehyd.20.2.184>
- Istúriz ZMA, Pérez PM, Contreras SS, and Barrera NLL. 2019. Effect of ethanol extract of fig residue (*Ficus carica*) on growth of postharvest fungi. Mexican Journal of Phytopathology 37(1):72-79. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-6>
- Joaquín RAJ, López PCU, Pinedo EJM, Altamirano RSE, Santiago SYO, Aguirre MCL, and Gutiérrez TJ. 2020. Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* Rob & Brettell). Chilean Journal of Agricultural Research 80(3): 352-360. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000300352>
- Leslie J and Summerell A. 2006. The *Fusarium* Lab Manual. Blackwell Publishing, Ames. 278p. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470278376>
- López MNR, Romero BM, Arce APM and Hernández RJS. 2019. Actividad antifúngica de antioxidantes derivados de cuatro cultivares de *Capsicum* spp. contra hongos fitopatógenos. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 6(18): 487-498. <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2174>
- Mantecón JD. 2015. Fungicidas aplicados al suelo como estrategia de manejo integrado de enfermedades en papa, bajo escenarios de elevada infestación inicial y residual. Revista Latinoamericana de la Papa 19(1): 29-39. <https://doi.org/10.37066/ralap.v19i1.224>
- Martínez MT, Guerrero AB, Pecina QV, Rivas VP, González PE y Angeles NJ. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(5): 1135-1147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325>
- Martínez PE, Abreu FJ and Cantillo PT. 2021. Incidence of *Alternaria* spp. on cereal, vegetable, fruit and ornamental sedes. Revista de Protección Vegetal 36(1): 2224-4697. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/1123/1754>
- Martínez SG, Rey BJ, Pargas PR y Manzanilla EE. 2020. Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. Agronomía Mesoamericana 31(1): 259-276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>

- Mata SC, Leyva MS, Camacho TM, Tovar PM, Huerta EJ, Villaseñor MH and García LE. 2018. Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México. Mexican Journal of Phytopathology 36(3): 432-443. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1803-3>
- Morales RI, Yañez MM, Silva RH, García DG Guzmán PD. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in México associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia 163:31-39. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0082-1>.
- Mutha RE, Tatiya AU and Surana SJ. 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. Future Journal of Pharmaceutical Sciences 7(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
- Nguyen TLA and Bhattacharya D. 2022. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. Molecules 27:2494. <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>.
- Oufensou S, Balmes V, Azara E, Fabbri D, Dettori MA, Schüller C, Zehetbauer F, Strauss J, Delogu G, and Migheli Q. 2020. Naturally occurring phenols modulate vegetative growth and deoxynivalenol biosynthesis in *Fusarium graminearum*. ACS Omega 5(45): 29407-29415. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04260>
- Pan JH, Peng CY, Lo CT, Dai CY, Wang CL and Chuang HY. 2017. n-Hexane intoxication in a Chinese medicine pharmaceutical plant: a case report. Journal of Medical Case Reports 11: 120. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1280-9>
- Peñuelas RO, Arellano GM, Verdugo FAA, Chaparro- ELA, Hernández RSE, Martínez CJL y Vargas AIC. 2017. Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. Mexican Journal of Phytopathology 35(3): 360-376. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-3>
- Pérez RL, Pérez ML, Guzmán MR, Sanzón GD y Belmonte VJ. 2019. Sensibilidad *in vitro* de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. Acta universitaria 29: 1-11. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2339>
- Quintana SE, Villanueva BD, Reglero G, García RMR and Fornari T. 2019. Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Journal of CO2 Utilization 34: 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032>
- Rahardiyani D. 2019. Antibacterial potential of catechin of tea (*Camellia sinensis*) and its applications. Food Research 3 (1): 1 – 6. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(1\).097](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(1).097)
- Reyes TA, Rodríguez AG, Santillán MR, Díaz CM y Fernández PS. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. Mexican Journal of Phytopathology 37 (No. Esp. 1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>
- Rodríguez CA, Torres HS, Domínguez CA, Romero GA and Silva FM. 2020. Plant extracts to control *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*: a sustainable alternative for agriculture. Abanico Agroforestal 2:1-13. <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-agroforestal/article/view/265>
- Sanzani SM, De Girolamo A, Schena L, Solfrizzo M, Ippolito A and Visconti A. 2009. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone European Food Research and Technology 228: 381-389. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0944-5>
- Sepúlveda-Rincón CT, Ciro-Gómez GL y Zapata-Montoya JE. 2016. Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(2):133-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n2/pla02216.pdf>
- Shisong J, Xinran R, Li W, Xiangri K, Xingye W, Xiren C, Xuerui G, Yan S, Jiyu G, Tiedong W, Bingmei W, Wu S and Yicheng Z. 2022. Nepetin reduces virulence factors expression by targeting ClpP against MRSA-induced pneumonia infection. Virulence 13(1):578-588, <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2022.2051313>
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*: an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp. <https://www.nhbs.com/alternaria-an-identification-manual-book>.
- Singh R and Chandrawat KS. 2017. Role of phytoalexins in plant disease resistance. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(1): 125-129. <http://dx.doi.org/10.20546/ijemas.2017.601.016>
- Soto GM y Rosales CM. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. Maderas. Ciencia y Tecnología 18(4): 701-714. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Sridhar N, Krishnakishore C, Sandeep Y, Sriramnaveen P, Manjusha Y and Sivakumar V. 2011. Chloroform Poisoning – A Case Report. Renal Failure 33(10): 1037-1039. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2011.618920>
- Takshak S and Agrawal SB. 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 193: 51-88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
- Valdez GD, Esparza GS, Morlett CJ, Nery FS, Flores GA, Ascacio VJ and Rodríguez-Herrera R. 2021. Isolation of polyphenols from soursop (*Annona muricata* L.) leaves using green chemistry techniques and their anticancer effect. Biological and Applied Sciences 64: e21200163. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200163>
- Vitola RD and Pérez CA. 2016. Bioactivity from *Annona muricata* extracts and essential oils from *Citrus aurantium* against *Phytophthora cinnamomi*. Revista Colombiana de Ciencia Animal 8(s): 325-334. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n0.2016.388>
- Zhang Y, Cai P, Cheng G and Zhang Y. 2022. A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. Natural Product Communications 17(1): 1-14. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Zhang J, Cui X, Zhang M, Bai B, Yang Y and Fan S. 2021.  
The antibacterial mechanism of perilla rosmarinic  
acid. *Biotechnology Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/bab.2248>.