



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

JOSUÉ ORDAZ RIVERA

CON EL TEMA:

“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO, COMPOSICIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIRADICAL DE LAS HOJAS DE LA PLANTA DE ZARZAMORA (*Rubus sp.*) CULTIVADA ORGÁNICAMENTE”

MEDIANTE:

**OPCION I
(TESIS PROFESIONAL)**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

SEPTIEMBRE 2015

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos Y Pavón"

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 11 de agosto del 2015

OFICIO NUM. DEP-CT-633-2015


C. JOSUÉ ORDAZ RIVERA
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI, DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO , DR. JOAQUIN MONTES MOLINA e ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ, en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

" EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO, COMPOSICIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIRADICAL DE LAS HOJAS DE LA PLANTA DE ZARZAMORA (rubus sp.) CULTIVADA ORGÁNICAMENTE."

Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"


ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'JJA0/I'eeam

Vo. Bo.


M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR



Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez,
Div. de Est. Profesionales



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Tels. (961) 61 54285, 61 50461
www.ittg.edu.mx



Índice

Índice de figuras	5
Índice de cuadros	5
Resumen	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Zarzamora (<i>Rubus sp.</i>)	9
2.2 Biofertilizantes	11
2.2.1 Hongo micorrízico arbuscular	12
2.2.2 Roca fosfórica	17
2.2.3 Vermicomposta	22
2.3 Compuestos polifenólicos	25
2.3.1 Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos	28
2.4 Síntesis de compuestos polifenólicos	32
2.5 Determinación de compuestos polifenólicos	36
2.5.1 Preparación de la muestra	36
2.5.2 Extracción	37
2.5.3 Análisis y cuantificación de fenoles	40
2.5.4 Análisis y cuantificación de flavonoides	43
2.6 Radicales libres	44
2.6.1 Antioxidantes	45
2.6.2 Pruebas utilizadas para detectar y cuantificar antioxidantes en extractos vegetales	46
3. JUSTIFICACIÓN	49
4. OBJETIVOS	51
4.1 Objetivo General	51
4.2 Objetivos específicos	51
5. MATERIALES Y MÉTODOS	52
5.1 MATERIALES	52
5.1.1 Plantas de zarzamora	52
5.1.2 Hongo micorrízico arbuscular	52
5.1.3 Roca fosfórica	52
5.1.4 Vermicomposta	52
5.2 METODOLOGÍA	53

5.2.1 Siembra de las plantas de zarzamora y diseño experimental.....	53
5.2.2 Análisis de la altura y diámetro de la planta.	54
5.2.3 Obtención de extracto metanólicos	54
5.2.4 Cuantificación de fenoles totales.....	54
5.2.5 Cuantificación de flavonoides.....	55
5.2.6 Actividad antirradical mediante el radical DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo) .	55
5.2.7 Análisis estadístico	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1 Factores de crecimiento	57
6.1.1 Altura de tallo	57
6.1.3 Diámetro del tallo	59
6.2 Fenoles y flavonoides.....	61
6.3 Actividad antirradical	64
7. CONCLUSIONES	66
8. RECOMENDACIONES	67
9. BIBLIOGRAFÍA.....	68
Anexos	77

Índice de figuras

	pagina
1. Interacción hongo-planta-suelo	13
2. Estructura de flavonoides, ácidos fenólicos y taninos	27
3. Estructura de estilbenos y lignanos	28
4. Estructura básica de ácidos fenólicos y flavonoides	28
5. Ácidos fenólicos: denzoicos (hidroxibenzoicos), cinamicos (hidroxicinámicos) y derivados (estilbenos)	30
6. Clasificación de flavonoides	35

Índice de cuadros

	pagina
1. Valor nutricional en cada 100g de zarzamora	10
2. Efectos de los tratamientos en la altura de las plantas de zarzamora en diferentes etapas de crecimiento	59
3. Efectos de los tratamientos en el diámetro del tallo de las plantas de zarzamora en diferentes etapas de crecimiento	61
4. Datos de fenoles totales y flavonoides totales de las hojas de la planta de zarzamora	64
5. Efecto de los tratamientos en la actividad antiradical de las hojas de la planta de zarzamora	65

Resumen

En la actualidad existen múltiples reportes que demuestran la capacidad antioxidante de plantas, frutas y vegetales que han sido utilizadas en tratamientos médicos tradicionales. El presente trabajo utilizó tres diferentes biofertilizantes para evaluar su efecto sobre el crecimiento, concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, y la actividad antiradical de las hojas de zarzamora. Se realizó el método colorimétrico de Folin Ciocalteu para la evaluación de fenoles, método colorimétrico del tricloruro de aluminio para flavonoides y la actividad antiradical mediante el radical DPPH, la evaluación del crecimiento consistió en medir la altura de la planta y el diámetro del tallo a diferentes etapas de crecimiento.

Durante la evaluación del efecto de los biofertilizantes en el crecimiento, no se presentó efecto estadístico significativo en los parámetros de crecimiento. Sin embargo la roca fosfórica promovió mayor altura y diámetro del tallo en comparación con los otros tratamientos.

Los resultados de fenoles y flavonoides mostraron diferencia estadística en su cantidad, sin embargo no en la actividad antiradical. Se determinó mayor contenido polifenólico total de 58.16 mg EAG g⁻¹ (equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra seca) en muestras con hongo micorrízico arbuscular y vermicomposta, mientras que el contenido de flavonoides fue mayor en el testigo con 7.83 mg EQ g⁻¹ (equivalentes a quercetina por gramo de muestra seca). La actividad antiradical se determinó por valor IC50. Los resultados indicaron que la aplicación del hongo micorrízico arbuscular y vermicomposta fueron los más influyentes en el contenido de fenoles, en cuanto a los flavonoides no se mostraron resultados positivos en su síntesis y la actividad antiradical de los extractos de zarzamora los perfila como una alternativa de interés para su uso como antioxidante natural.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen múltiples reportes que demuestran la capacidad antioxidante de plantas, frutas y vegetales que han sido utilizadas en tratamientos médicos tradicionales durante muchos años en diversas partes del mundo. La actividad antioxidante de dichas plantas se debe principalmente a compuestos no nutricionales que presentan una gran actividad biológica, tales como compuestos fenólicos, vitaminas y minerales. La acción antioxidante presente en estas plantas es importante debido a que puede ayudar a las personas que las consumen a combatir enfermedades provocadas por una reacción de radicales libres o especies reactivas del oxígeno, nitrógeno o hierro. Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado, capaces de favorecer reacciones en cadena muy dañinas para el organismo, desencadenando un fenómeno conocido como estrés oxidativo. Dicho fenómeno ha sido recientemente asociado a enfermedades tales como Alzheimer, cáncer, además de algunas enfermedades cardiovasculares, debido a mecanismos de peroxidación lipídica, daño al DNA y proteínas, entre otros.

Es por esta razón entre otras que los compuestos fenólicos en las plantas han sido ampliamente estudiados, con el fin de conocer su composición en las plantas, el tipo de metabolismo que presenta, su relación con otras rutas metabólicas, la actividad antioxidante que poseen, la forma en que se puede estimular su síntesis, etc.

En el presente trabajo se utilizaron hojas de zarzamora (*Rubus sp.*) debido a que los compuestos fenólicos están en todas partes en todos los órganos de la planta y a que los frutos presentan propiedades antioxidantes, además de ser una excelente fuente de vitaminas, en especial de las vitaminas C y A, que la convierten en un buen antioxidante, por lo que se reconoce que las hojas podrían tener un nivel considerable de compuestos fenólicos y a su vez de actividad antioxidante.

Por ello se decidió cuantificar el contenido de polifenoles en las hojas de la zarzamora tratada con tres diferentes biofertilizantes; los hongo micorrizicos arbusculares debido a que incrementan el grado de crecimiento de las plantas debido a una mayor absorción de fosforo y otros nutrimentos, así como el agua, incrementa la salinidad y longevidad de las raíces, incrementa la tolerancia a la sequía, a altas temperaturas del suelo, a la toxicidad por metales pesados a pH extremos y al estrés al trasplante; también juega un papel importante en la nutrición mineral, principalmente mejorando la absorción del fosforo en suelos de baja fertilidad y otros nutrimentos poco móviles, la roca fosfórica por ser el segundo fertilizante mineral más influyente para el crecimiento vegetal, y la vermicomposta por sus características físicas, químicas, microbiológicas y nutrimentales mejora la estructura del suelo, la aireación, retención de agua, drenaje, y aumenta el intercambio iónico y disponibilidad de fósforo.

El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar los resultados de crecimiento, compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antiradical para distinguir si los tratamientos son efectivos para el desarrollo de la planta, síntesis de compuestos fenólicos y su actividad antiradical en las hojas de zarzamora, debido al beneficio que proporcionan los compuestos fenólicos, la perdida de hojas por el proceso de poda que se realiza a las plantas para la producción de frutos; para el cual se pudiese dar un uso extra para las hojas de zarzamora y debido a que no se tienen reportes del uso de vermicomposta, roca fosfórica y hongo micorrízico arbuscular, en el efecto que estos biofertilizantes puedan tener sobre la producción de metabolitos secundarios tales como los compuestos fenólicos; entre ellos flavonoides y su actividad antiradical en las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Zarzamora (*Rubus sp.*)

Características:

- Nombre común.- zarzamora
- Especie.-*Rubus sp.*
- Familia botánica.-*Rosaceae*

Existen unas 250 especies semejantes del género *Rubus* repartidas por los cinco continentes con innumerables subespecies e híbridos, ya sean naturales o inducidos.

- Composición nutrimental

La zarzamora es una fruta con escaso aporte de carbohidratos, es por eso que se describe como una fruta de bajo valor calórico. Es una excelente fuente de vitaminas, en especial de las vitaminas C y A. Estas dos vitaminas convierten a este fruto en un buen antioxidante, además de la abundancia de antocianinas y carotenoides presentes en esta fruta (Cerón, 2008).

Este tipo de frutas son de las fuentes más importantes de antocianinas en la dieta, gracias a este tipo de compuestos fenólicos, la zarzamora tiene su color característico debido a que las antocianinas son de los grupos principales de pigmentos naturales (Badui, 2006).

Contiene del 75 a 90% de su peso total en agua, mientras que solo alrededor de uno por ciento es proteína careciendo de grasa, como se muestra en cuadro 1 (Cerón, 2008).

Cuadro 1. Valor nutricional en cada 100g de zarzamora¹.

Valor nutricional por cada 100g	
Carbohidratos	11.94g
Azucares	4.42g
Fibra	6.5g
Grasas 0.65g	0.65g
Proteínas	1.2g
Tiamina	0.032mg
Riboflavina	0.038mg
Niacina	0.598mg
Ácido pantoténico	0.329mg
Vitamina B6	0.055mg
Ácido fólico	21µg
Vitamina C	26.2mg
Vitamina E	0.87mg
Vitamina K	7.8µg
Calcio	25mg
Hierro	0.69mg
Magnesio	22mg
Manganeso	0.67mg
Fosforo	29mg
Potasio	151mg
Sodio	1mg
Zinc	0.42mg
Fuente: Base de datos de nutrientes de USDA ¹	

¹United States Department of agriculture (2001)

- Descripción botánica

Para describir las diversas variedades de zarzamoras de forma general, diremos que son arbustos vigorosos con numerosos tallos arqueados que brotan de la base de la planta, aristados y con la facultad de emitir raíces. Los tallos poseen numerosas espinas prominentes como ganchos. Son tallos bianuales que durante el primer año se desarrollan y durante el segundo florecen. Permanecen erectos solo durante su primer desarrollo para luego arquearse hasta tocar el suelo donde pueden enraizar (Morales y Box, 2005).

Las hojas son similares a las del frambueso, trifoliadas y estipuladas con peciolo más o menos espinoso. Los folíolos son oblongos y con el margen aserrado, de un verde oscuro y brillante por el haz y blanquecinos por el envés, debido a la presencia de una velloso. Las flores son hermafroditas y autofértiles, pentámeras con pétalos de color blanco y rosado, agrupadas en inflorescencias en racimos, panículas o solitarias. Se desarrollan en los tallos de dos años y pueden ser terminales o axilares (Morales y Box, 2005).

Las infrutescencias o zarzamoras son realmente una polidrupa de 1-2 cm de largo, que está formada por varias pequeñas drupas carnosas de color verde, que a medida que maduran pasan al rojo hasta llegar a un negro muy intenso y brillante. Cada drupilla contiene una diminuta semilla leñosa y cuando están bien maduras tienen un agradable sabor dulzón (Morales y Box, 2005).

2.2 Biofertilizantes

El término “biofertilizantes” o “inoculantes microbianos” puede ser definido de manera general como preparaciones que contienen células vivas o latentes de cepas eficientes para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato o microorganismos celulíticos, usadas para aplicarse en semillas, suelo o áreas de composteo con el objetivo de aumentar el número de microorganismos y acelerar los procesos

microbianos para incrementar la disponibilidad de nutrientes en una forma tal que puedan ser fácilmente asimilados por las plantas. El término puede usarse para incluir a todos los materiales orgánicos (abonos) que las plantas pueden utilizar para crecer y que se encuentren disponibles para su absorción a través de los microorganismos o de las asociaciones o interacciones planta – microorganismos (Figueroa y Gutiérrez, 2009).

Los biofertilizantes son tecnologías limpias apropiadas dentro de los esquemas de certificación nacional e internacional, porque ofrecen soluciones a problemas de deficiencia de nutrientes en el suelo, permiten la sustitución total o parcial de fertilizantes de síntesis con restricciones para su uso en tecnologías limpias, contribuyen con la disminución de los costos de producción y son compatibles con la protección al ambiente (Gómez y Vélez, 2008).

2.2.1 Hongo micorrízico arbuscular

Micorrizas

- La simbiosis micorrízica

La micorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre ciertos hongos del suelo y las raíces de muchas plantas. Los organismos asociados pertenecen al reino fungí (basidiomicetos, ascomicetos y zigomicetos) y a la mayor parte de las plantas vasculares (Silvano, 2010). Por lo que estas asociaciones micorrízicas involucran interacciones entre los hongos, la planta y los factores del suelo (figura1).

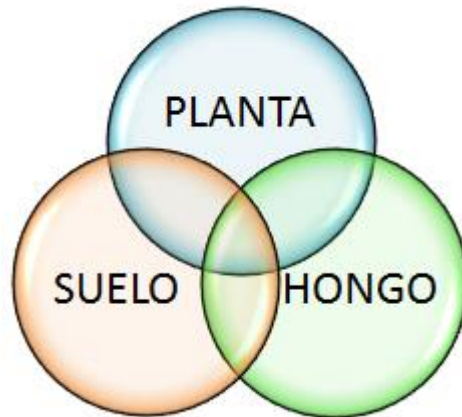


Figura 1. Interacción hongo-planta-suelo (Silvano, 2010).

La asociación micorrizica probablemente surgió como un mecanismo de supervivencia para ambos socios en ambientes terrestres de baja fertilidad, sequia, enfermedades y temperaturas extremas donde no hubieran podido establecerse solos (Silvano, 2010).

La importancia agronómica de la micorriza vesículo-arbuscular radica en el papel que juega en el crecimiento de las plantas de interés agrícola, frutícola, forestal y en los ecosistemas naturales (Pérez, 1998).

Hasta hace pocos años, el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) se encontraba restringido a aquellos cultivos que necesitan de una fase inicial de establecimiento y crecimiento antes de quedar definitivamente establecidos en el campo, tales como los semilleros de hortalizas, los viveros en frutales y la fase de adaptación en vitroplantas. En esos casos, los volúmenes de inóculos eran aceptables; sin embargo, no se recomendaban para los cultivos de siembra directa aun cuando los efectos eran positivos. Se puede considerar que una de las principales causas que limitan la obtención de micorrizas por los productores, puede estar dada por su forma de reproducción, ya que el fertilizante biológico se obtiene a partir de la inoculación previa de una determinada cepa de HMA a plantas hospederas (ya sea en el momento de la siembra o por recubrimiento de sus semillas), que incluyen por lo general las especies de

Sorghum vulgare y *Brachiaria decumbens*, entre otras, y su posterior desarrollo en el sistema radical. El inoculante está listo cuando se cumple el ciclo reproductivo de dichas plantas y es extraído conjuntamente con el sustrato, el cual incluye todos los propágulos infectivos del hongo micorrizógeno (esporas, raicillas infectadas y fragmentos de hifas). No obstante, este puede ser extraído en cualquier otro momento, en dependencia de la cantidad de propágulos existentes en el sustrato (Noda, 2009).

- Principales tipos de micorrizas

Aproximadamente unas 5 000 especies de hongos (principalmente *Basidiomycetes*) están asociadas a los árboles forestales en las regiones boreales y templadas, estableciendo un tipo de micorrizas. Las raíces de los árboles de las selvas tropicales, de los árboles frutales y de casi la totalidad de las demás plantas verdes, están asociadas a hongos inferiores, la mayoría microscópicos. Estos hongos, aunque presentes en casi todo el Planeta, asociados con casi todas las plantas verdes, establecen otro tipo de micorrizas y pertenecen a seis géneros y alrededor de un centenar de especies (Noda, 2009).

Las micorrizas se han agrupado tradicionalmente, sobre la base de la anatomía de las raíces que colonizan; en:

- a) Ectomicorrizas: Se caracterizan por la penetración intracelular del micelio fúngico en la corteza radicular, que forma la “red de Harting” y el “manto” que se desenvuelve alrededor de los segmentos de raíces colonizados, provocando cambios anatómicos evidentes que producen el crecimiento dicotómico de estas raíces (Pérez, 1998).
- b) Ectendomicorrizas: Son generalmente ectomicorrizas con penetración intracelular. Existen diferencias anatómicas en función de la planta hospedera, de manera que se diferencian los subgrupos de las pinaceae y de las Ericales (géneros *Arbutus* y *monótropas*, *micorrizas arbutoides*) (Pérez, 1998).

- c) Endomicorrizas: Se caracterizan por la inter e intracelular pero sin formación del manto ni modificaciones morfológicas evidentes en las raíces. Cumplan con estas condiciones los tipos de micorrizas ericoides, orquidoides y las vesículo arbusculares, siendo las micorrizas vesículo arbusculares las de más amplia distribución, tanto geográfica como florística (Pérez, 1998).

Los dos tipos más comunes y más conocidos son las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Cada tipo se distingue sobre la base de la relación de las hifas del hongo con las células radicales del hospedero. Plantean que en las ectomicorrizas el micelio invade la raíz sin entrar en el interior de las células; en el caso de las endomicorrizas el micelio invade la raíz, inicialmente es intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Se señala que este tipo de micorrizas es muy frecuente y están extendidas en todo el Planeta. Se distribuyen además, en la mayoría de los árboles de las zonas tropicales y algunos árboles de bosques templados (Noda, 2009).

Estos hongos inferiores que forman endomicorrizas vesículo arbusculares pertenecen a un solo grupo, las Glomales (*Zygomycetes*), con seis géneros y muchas especies distribuidas en todos los continentes; son estrictamente simbióticos y no pueden ser cultivados en cultivo puro, o sea en ausencia de su hospedero, contrariamente a los hongos ectomicorrícicos (Noda, 2009).

Los arbusculos de las endomicorrizas son estructuras altamente ramificadas, típicamente intracelulares, que se localizan en las células cercanas al cilindro vascular, y su función es la transferencia de nutrimentos desde el suelo hasta el huésped; las vesículas son protuberancias que quedan revestidas por la membrana plásmatica. Las hifas, por otra parte, se extienden varios centímetros por fuera de la raíz, incrementando la cantidad de nutrientes absorbidos. En este sentido, las hifas no están septadas, es decir, ausentes de tabiques que separan

las células y las asociaciones hongo/ hospedante no son muy específicas. Muchas gramíneas las presentan: *Andropogon*, *Bromus*, *Festuca*, *Panicum*, *Poa*, *Saccharum*, *Sorghum*, *Sporobolus*, *Stipa* y *Zea mays*. El intercambio entre el hongo y el hospedante tiene lugar en los arbusculos, que se llenan de gránulos de fosfatos (Noda, 2009).

La utilización de las micorrizas como biofertilizante no implica que se puede dejar de fertilizar, sino que la fertilización se hace más eficiente y que puede disminuirse la dosis a aplicar hasta en un 100% (Pérez, 1998).

Entre los factores que han estimulado el interés en la micorriza es que incrementa el grado de crecimiento de las plantas debido a una mayor absorción de fósforo y otros nutrientes, así como el agua, incrementa la salinidad y longevidad de las raíces, incrementa la tolerancia a la sequía, a altas temperaturas del suelo, a la toxicidad por metales pesados a pH extremos y al estrés al trasplante; también juega un papel importante en la nutrición mineral, principalmente mejorando la absorción del fósforo en suelos de baja fertilidad y otros nutrientes poco móviles. Además se ha mostrado que tienen un efecto en la formación de agregados semiestables en suelos sueltos, induce a la tolerancia a patógenos y favorece la adaptación de las plantas a condiciones limitantes así como al estrés ambiental (Pérez, 1998).

En el ámbito mundial, se reportan múltiples experiencias acerca de los beneficios de las micorrizas arbusculares en especies frutales, donde frecuentemente se compara el crecimiento de las plantas micorrízicas con las no micorrízicas; estas diferencias son atribuibles a una mayor absorción de nutrientes, una producción de hormonas más alta y mayores contenidos de clorofila. Estas diferencias se han observado en especies tropicales como *Mora excelsa*, *Pitaria copaifera* en el Caribe (Trinidad y Tobago, y Panamá) y en múltiples árboles tropicales de la familia *Fabaceae*. Otros autores reportan beneficios en especies como la chirimoya, *Tamarindus indica*, *Parkia biglobosa*, *Sclerocaria birrea*, *Balanites*

aegyptica, *Adansonia digitata*, *Codyla pinnata*, *Saba senegalensis*, *Landolfia heudelotti*, *Dialium guineensis*, *Anacardium occidentale*, *Afsellia africana* y *Aphala senegalensis* (Noda, 2009).

2.2.2 Roca fosfórica

Después de nitrógeno, el fósforo (P) es el fertilizante mineral más influyente para el crecimiento vegetal, y es el segundo mayor producto químico agrícola del mundo (Fateh *et al.*, 2011).

Roca fosfórica es un nombre colectivo utilizado para denominar todos los minerales que contienen fosfatos. Las rocas fosfóricas constituyen un recurso natural finito, no renovable y los depósitos geológicos de diferente origen se encuentran en todo el mundo. En la actualidad son explotados pocos yacimientos de roca fosfórica y cerca del 90 por ciento de la producción mundial es utilizada por la industria para la fabricación de fertilizantes fosfatados, mientras que el resto se emplea para la producción de alimentos para animales, detergentes y otros productos químicos.

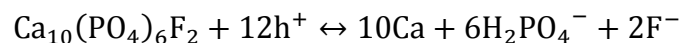
Además es uno de los principales elementos nutritivos para las plantas y animales que restringe en mayor grado la producción agropecuaria. Este problema puede corregirse mediante la aplicación de abonos químicos fosfatados de alta solubilidad como el súper fosfato simple (SFS) o el súper fosfato triple (SFT) o con la aplicación de fuentes menos solubles, pero al mismo tiempo, más económicas, como es el caso de las rocas fosfóricas. Solucionado la deficiencia de P en el suelo, la producción de biomasa incrementará y por ende la productividad (Arévalo *et al.*, 2003).

Las rocas fosfóricas son la materia prima básica para la producción de los fertilizantes fosfatados. El compuesto fosfatado en las rocas fosfóricas es algún

tipo de apatita. Según el origen del depósito de la roca fosfórica y su historia geológica, las apatitas pueden presentar propiedades físicas, químicas y cristalográficas diferentes. Con las rocas fosfóricas se hallan asociados grupos definidos de minerales accesorios de diversos orígenes y edades geológicas. Por lo tanto, es imperativo establecer procedimientos simples para la caracterización normalizada de las rocas fosfóricas, definir las normas de calidad para fines de la aplicación directa y luego clasificarlas. Las fuentes de roca fosfórica de calidad conocida pueden ser utilizadas como materiales de referencia para los fines de comparación.

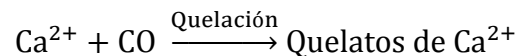
Las características mineralógicas, químicas y texturales de los minerales de fosfatos y sus concentrados determinan: i) su conveniencia para los diversos tipos de procesos de «beneficio» o enriquecimiento para mejorar la calidad de los minerales y eliminar las impurezas, ii) su adecuación a los varios tipos de procesamiento químico y, iii) su capacidad para ser utilizada como roca fosfórica para la aplicación directa. Los factores más importantes en su evaluación para la aplicación directa son: el grado o ley, la conveniencia para el beneficio y la reactividad de la apatita. Una matriz completa de caracterización basada en la integración de todos los datos obtenidos por varios métodos analíticos determina el potencial de beneficio y los mejores usos posibles de la roca fosfórica en la producción de los fertilizantes fosfatados solubles o como fertilizante de aplicación directa.

La aplicación de roca fosfórica al suelo como fuente de fósforo requiere de un ambiente apropiado que facilite el proceso de disolución de la misma, este proceso ha sido descrito, por Khasawneh y Doll (1978) de acuerdo a la siguiente ecuación:



De acuerdo a esta ecuación la disolución de la roca puede ser favorecida por la remoción de los productos de disolución, en particular los iones calcio y fosfato, o bien por la suplencia de protones.

En este orden de ideas se ha sugerido que la aplicación de diversos materiales orgánicos, el estiércol de diversos orígenes, entre éstos, en forma conjunta a la roca fosfórica (RF) permite incrementar los niveles de fósforo liberados por ésta, con relación a eso He *et al.*, (1997) muestran resultados según los cuales la solubilidad de la roca se incrementó notablemente con la aplicación de celulosa; efecto que sería posible cuando se incorpora estiércol de bovino dado sus elevados contenidos de celulosa. Una de las teorías propuestas para explicar tal efecto supone que, el calcio liberado por la roca durante su proceso de disolución puede ser quelatado por los compuestos orgánicos (CO) gracias a grupos funcionales o aniones como el citrato y el oxalato (Chien, 1979; Tan, 1986). La reacción general sería la siguiente:



Amberger y Singh (1994), señalan que en el caso de la materia orgánica (MO) estable del suelo, la fracción correspondiente a los ácidos fúlvicos es en gran medida, responsable de los procesos de quelación. Este mecanismo, sea mediado por la MO estable o por productos orgánicos de incorporación reciente, permite “eliminar” del sistema uno de los productos de la reacción de disolución de la RF, ello conducirá a un desplazamiento de los equilibrios y en consecuencia al incremento de la disolución de la misma. La producción de este fenómeno requiere, según estimaciones hechas, periodos de dos a cuatro semanas (Chien, 1979).

Otro enfoque importante es aquel que sostiene que es la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, durante las primeras etapas de descomposición de los CO añadidos (Christ y Davies, 1996; Baziramakenga y Simard, 1998), la

responsable del incremento del proceso de disolución. En este caso se considera que los mencionados ácidos suministran los H⁺ necesarios para el ataque de fosfatos altamente insolubles tales como la RF (Fox *et al.*, 1990; Gerke *et al.*, 2000). Es evidente que existe la posibilidad de que ambos fenómenos ocurran y que el predominio de uno u otro dependerá de la combinación de suelo, clima y CO incorporados, así como de las características de la roca utilizada. Existe, no obstante otro enfoque, que no ha sido considerado, y es el hecho de que el estiércol constituye un inóculo rico en un gran número de cepas bacterianas que han sido señaladas como solubilizadoras de fósforo, tal es el caso de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Xanthomonas* (De Freitas *et al.*, 1997; Sahn y Jana, 2000).

- El fósforo en el sistema suelo-planta

El fósforo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza y ocurre conjuntamente con el nitrógeno y el potasio como constituyente primario de los seres vivos, vegetales y animales. El fósforo posee una serie de funciones en el metabolismo vegetal y es uno de los nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Desempeña funciones estructurales en las macromoléculas como los ácidos nucleicos y de transferencia de la energía en los procesos metabólicos de biosíntesis y degradación. A diferencia de los nitratos y sulfatos, los fosfatos no son reducidos en la planta y permanecen en su forma más altamente oxidada (Marschner, 1993).

El fósforo es absorbido principalmente durante el crecimiento vegetativo y luego la mayoría del fósforo absorbido es movilizado a los frutos y semillas durante las etapas reproductivas. Las plantas con deficiencias de fósforo tienen un crecimiento retardado (reducción del crecimiento celular y de la expansión foliar así como de la fotosíntesis y de la respiración) y a menudo presentan un color verde oscuro (más alta concentración de clorofila) y rojizo (aumento de la formación de antocianinas). Se ha indicado que el nivel de abastecimiento de fósforo durante los estados reproductivos regula el fraccionamiento entre las hojas

y los órganos reproductivos, siendo este efecto esencial para las leguminosas fijadoras de nitrógeno (Marschner, 1993). Los animales y los seres humanos en buena salud requieren también cantidades adecuadas de fósforo en sus alimentos para que sus procesos metabólicos sean normales (FAO, 1984, 1995).

Este elemento nutritivo es absorbido por las plantas a partir de la solución suelo como aniones ortofosfato monovalente (H_2PO_4) y divalente (HPO_4), cada uno representando un 50 por ciento del fósforo total en la solución a un pH cercano a la neutralidad (pH 6-7). A un pH entre 4 y 6, el anión ortofosfato monovalente (H_2PO_4) representa casi el 100 por ciento del fósforo total en la solución. A un pH 8, el anión monovalente (H_2PO_4) constituye el 20 por ciento y el divalente (HPO_4) el 80 por ciento del fósforo total en la solución (Black, 1968).

La físico-química del fósforo en los suelos minerales es bastante compleja debido a la ocurrencia de una serie de reacciones simultáneas e instantáneas tales como solubilización, precipitación, adsorción (retención)/desorción y oxido-reducción. Los compuestos solubles del fósforo presentan reactividad muy alta, solubilidad baja y movilidad reducida. La mineralización e inmovilización son procesos importantes del ciclo del fósforo en los suelos con alto contenido de materia orgánica (Black, 1968; FAO, 1984).

Cuando se aplica al suelo un fertilizante fosfatado soluble en agua, este reacciona rápidamente con los compuestos del suelo. Los productos resultantes son compuestos de fósforo menos solubles y el fósforo que es adsorbido sobre las partículas coloidales del suelo (FAO, 1984). Una pequeña concentración de fósforo en la solución del suelo es por lo general adecuada para el desarrollo normal de las plantas. Por ejemplo, Fox y Kamprath (1970) y Barber (1995) han sugerido que una concentración de 0.2 ppm de fósforo es suficiente para un crecimiento óptimo. Sin embargo, para que las plantas absorban las cantidades de fósforo necesarias para producir buenos rendimientos, la concentración de fósforo

en la solución suelo que está en contacto con las raíces debe ser renovada continuamente durante todo el ciclo de crecimiento.

2.2.3 Vermicomposta

La vermicultura es el cultivo de las lombrices, en donde la meta es incrementar continuamente el número de lombrices para obtener una cosecha sustentable. El vermicomposteo es el proceso por el cual las lombrices son usadas para convertir materiales orgánicos (generalmente desechos) en un material parecido a humus conocido como vermicomposta (Náfate, 2006). Una meta del proceso es que el material sea producido tan rápida y eficientemente como sea posible. Estos procesos son similares pero diferentes. Si lo que se desea es producir vermicomposta, es necesario tener una densidad poblacional máxima de las lombrices en todo el tiempo del proceso. Si la meta es producir lombrices, debe mantener la densidad poblacional de las lombrices en niveles bajos de tal manera que la tasa reproductiva sea optimizada (Mandujano, 2006).

La vermicomposta se considera uno de los abonos orgánicos de fácil adquisición, manejo y producción rápida. Tiene buenas características físicas, químicas, microbiológicas y nutrimentales, y su uso mejora la estructura del suelo, la aireación, retención de agua, drenaje, y aumenta el intercambio iónico y disponibilidad de fósforo. Por ello, se ha utilizado como fertilizante orgánico con efectos favorables sobre el desarrollo de los cultivos hortícolas y las plantas ornamentales en invernaderos (Náfate, 2006).

La vermicomposta es el producto de una serie de transformaciones bioquímicas y microbiológicas que sufre la materia orgánica al pasar a través del tracto digestivo de las lombrices; al utilizar este biofertilizante puede reducirse el uso de fertilizantes químicos (Velasco *et al.*, 2001).

La descomposición de la materia orgánica bajo condiciones ambientales variables es una característica fundamental de los ecosistemas terrestres. En el caso del vermicomposteo, las interacciones complejas entre residuos orgánicos, microorganismos, lombrices y otros animales de la fauna del suelo provocan la bioxidación y estabilización de dichos residuos. Una gran variedad de microorganismos y organismos invertebrados del suelo proliferan e interactúan contribuyendo al “ciclo de la materia” dentro del vermicomposteo. El sistema de vermicomposteo soporta complejas cadenas alimenticias, y al mismo tiempo, modifica diferentes formas químicas de diversos elementos nutritivos contenidos en los compuestos orgánicos, los cuales son importantes para la dinámica de los elementos nutritivos (Mandujano, 2006).

La vermicomposta o lombricompuesto, es un material de color oscuro, limpio, suave al tacto, con un agradable olor a mantillo de bosque y debido a su bioestabilidad no sufre de procesos de fermentación y putrefacción, contiene además, una elevada carga enzimática y bacteriana que aumenta la solubilización de los nutrientes haciendo que puedan ser fácilmente absorbidos por las raíces y asimilables por las plantas evitando la lixiviación; con el agua de riego manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo e influye en forma efectiva en la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plantas, árboles y arbustos en comparación con otros ejemplares de la misma edad (Náfate, 2006). Incrementa la superficie activa de las partículas minerales favoreciendo la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los suelos. Favorece e incrementa la actividad biótica del suelo.

También se ha demostrado que provoca aumento en la biomasa, en la actividad microbiana y modifica la estructura de la comunidad bacteriana, estimulando el aumento de grupos bacterianos de acción favorable, que disminuyen el impacto de fitopatógenos. Estos efectos en la comunidad varían según la materia prima utilizada para elaborar la composta, el periodo de curado (tiempo transcurrido

luego de ser cosechada la composta) y la dosis de aplicación (Robledo *et al.*, 2010).

Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas en contra de plagas, enfermedades y organismos patógenos. Se puede utilizar sin inconvenientes en estado natural y se encuentra libre de nematodos. Los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene regeneran las características químicas del suelo y, al igual que cierto tipo de hormonas de crecimiento, favorecen el desarrollo de las especies vegetales. Posee un pH neutro. Mejora las características estructurales del terreno, desliga suelos arcillosos y agrega suelos arenosos. Durante el transplante previene enfermedades y evita el choque por heridas o cambios bruscos de temperatura y humedad. Amortigua el efecto de los compuestos químicos aplicados al suelo. Aumenta la retención hídrica de los suelos (4-27%) disminuyendo el consumo de agua por los cultivos (Mandujano, 2006).

Neutraliza eventuales presencias contaminadoras (herbicidas, ésteres fosfóricos), evita, facilita y aumenta la eficacia del trabajo mecánico del terreno, favorece e incrementa la actividad biótica del suelo y aumenta la retención hídrica de los suelos disminuyendo el consumo de agua por los cultivos (Náfate, 2006).

La vermicomposta se caracteriza por estar conformada por materiales que facilitan la aireación, drenaje y capacidad de retención de humedad. Además presentan una gran área superficial, la cual le permite adsorber y retener fuertemente los elementos nutritivos, los cuales se encuentran en formas que son fácilmente asimilables para las plantas tales como los nitratos, el fósforo intercambiable, potasio, calcio y magnesio solubles. En consecuencia, las vermicomposta pueden tener un gran potencial en las industrias hortícolas y agrícolas como sustrato para el crecimiento de la planta (Mandujano, 2006).

- Papel de las lombrices en el vermicomposteo

Las lombrices de tierra son consumidores voraces de residuos orgánicos aun cuando sólo utilizan una pequeña porción para la síntesis de sus cuerpos, ellas excretan una gran parte de los residuos consumidos en una forma medio digerida. Puesto que los intestinos de las lombrices contienen una amplia gama de microorganismos, enzimas, hormonas, etc., éstos materiales medio digeridos se descomponen rápidamente y son transformados a una forma de vermicomposta en un período de tiempo corto (Mandujano, 2006).

Las familias de lombrices comúnmente utilizadas para realizar el vermicomposteo son *Eisenia foetida* y *Lumbricus rebellus*. La crianza de estos animales requiere de un esfuerzo mínimo por parte de quienes se interesan en su manejo y reproducción, ya que, en ausencia de los riesgos que habitualmente enfrentan los organismos dentro de sus hábitats naturales, estas lombrices crecen más rápido, se mantienen más saludables, viven más tiempo, y se reproducen a una mayor velocidad siempre y cuando las lombrices se coloquen sobre los materiales requeridos para su óptimo desarrollo. La actividad de las lombrices transforma los residuos orgánicos en una fuente nutritiva para las especies vegetales (Mandujano, 2006).

2.3 Compuestos polifenólicos

Los fenoles son compuestos que se distribuyen ampliamente en el reino de las plantas y son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, con más de 8,000 estructuras fenólicas actualmente conocidas, que van desde simples moléculas tales como ácidos fenólicos hasta sustancias altamente polimerizadas tales como taninos. Los fenoles vegetales son generalmente involucrados en la defensa contra radiación ultravioleta o agresión por patógenos, parásitos y predadores, así como contribuye a los colores de plantas (Dai y Mumper, 2010), atracción de polinizadores (Nascimento *et al.*, 2013) e insectos para la dispersión

de semillas, pueden actuar como controladores de hormonas vegetales (Cartea *et al.*, 2011) y en el fortalecimiento de las paredes celulares de la planta durante el crecimiento por polimerización en lignanos y ligninas (Ibrahim y Jaafar, 2012). Están en todas partes en todos los órganos de la planta y son por lo tanto una parte integral de la dieta humana (Dai y Mumper, 2010) y han sido reportados por poseer múltiples efectos biológicos tales como antioxidante y actividad antimicrobiana (Proestos y Komaitis, 2006). Los fenoles son constituyentes generalizados de alimentos vegetales (frutas, verduras, cereales, aceites de oliva, legumbres, chocolate, etc.) y bebidas (te, café, cerveza, vino, etc.) y parcialmente responsables de las propiedades organolépticas globales de alimentos vegetales. Por ejemplo, los fenoles contribuyen a la acidez y astringencia de fruta y jugos de fruta, debido a la interacción entre fenoles, principalmente procianidina, y la glicoproteína en saliva (Dai y Mumper, 2010).

Los fenoles son antioxidantes con propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrogeno (Proestos y Komaitis, 2006), extintores de oxígeno singlete y triplete o descomponiendo peróxidos (Cartea *et al.*, 2011). También tienen propiedades de quelación de metales. Los fenoles vegetales incluyen ácidos fenoles, flavonoides, taninos y los menos comunes estilbenos y lignanos (figura 2 y 3) (Dai y Mumper, 2010).

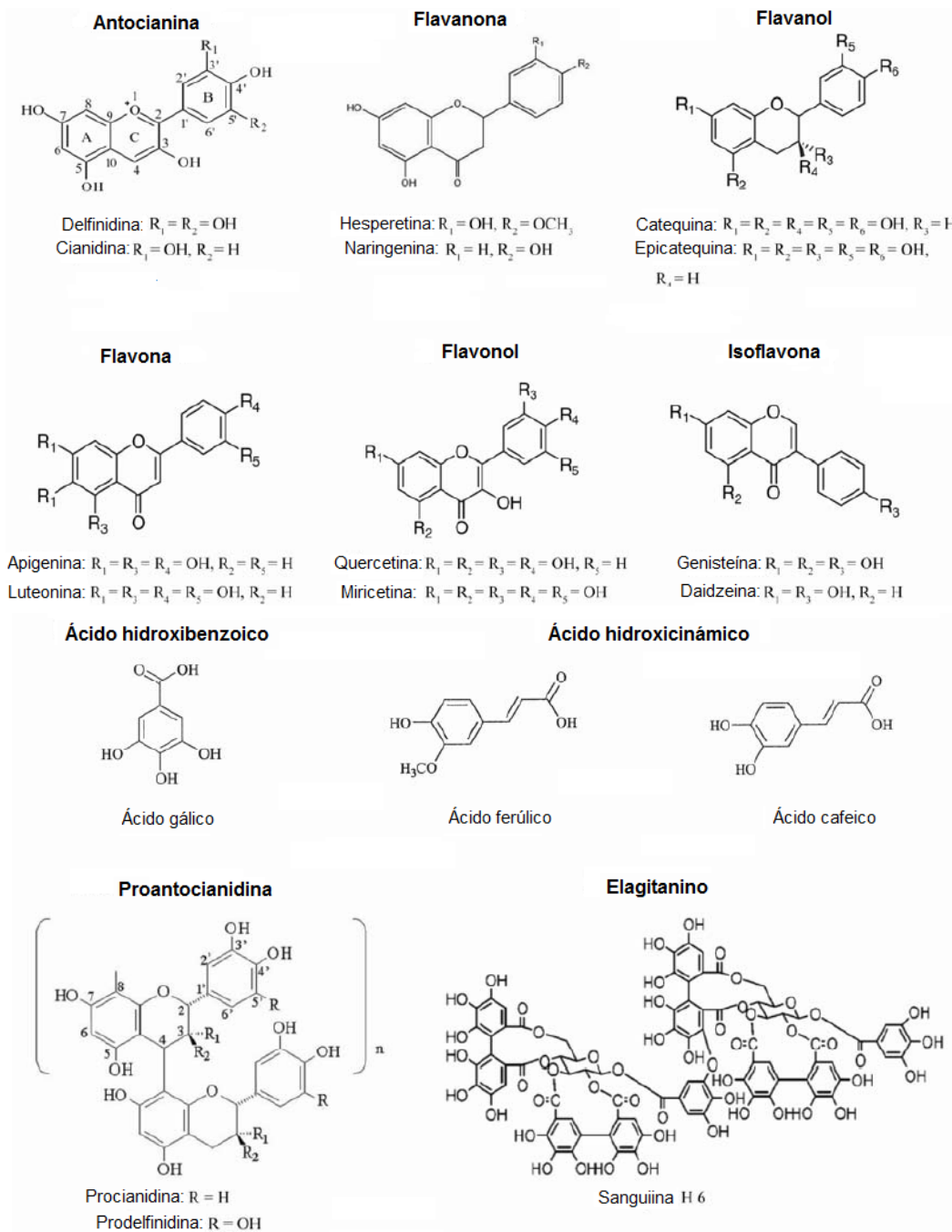


Figura 2. Estructura de flavonoides, ácidos fenólicos y taninos.

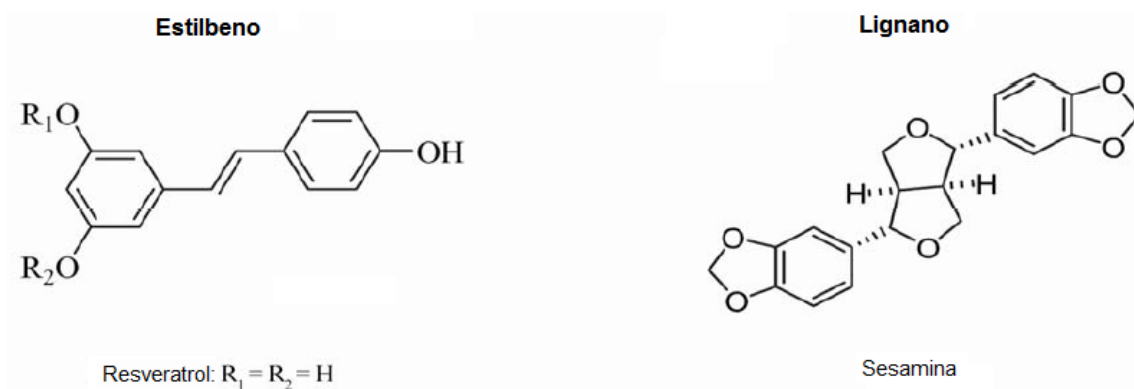


Figura 3. Estructuras de estilbenos y lignanos.

2.3.1 Estructura y clasificación de los compuestos polifenólicos

La estructura básica característica de los compuestos fenólicos es un anillo aromático que porta uno o más grupos hidroxilo (figura 4). Los compuestos fenólicos vegetales son clasificados como fenoles simples o polifenoles basado en el número de unidades fenol en la molécula. Así, los fenoles vegetales comprenden fenoles simples, cumarinas, ligninas, lignanos, taninos condensados e hidrolizables, ácidos fenólicos y flavonoides (Khoddami *et al.*, 2013).

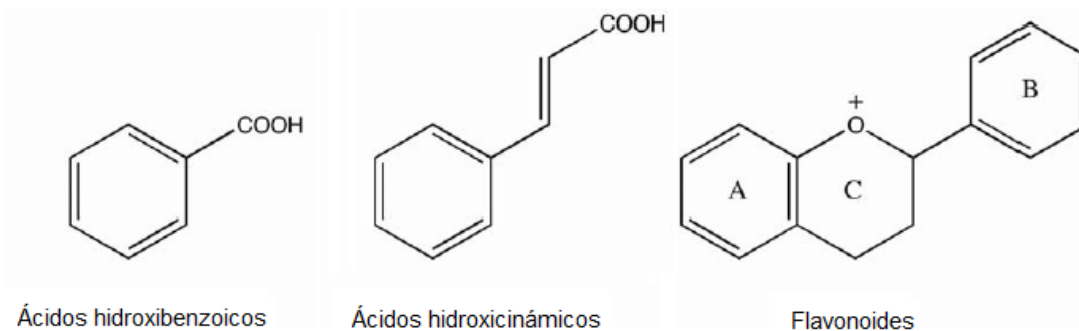


Figura 4. Estructura básica de ácidos fenólicos y flavonoides (Khoddami *et al.*, 2013).

Los fenoles van desde simples, moléculas de bajo peso molecular, compuestos de anillos aromáticos individuales a largos y complejos taninos y derivados

polifenoles. Se pueden clasificar en base al número y disposición de sus átomos de carbono en flavonoides (flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas y otros) y no flavonoides (ácidos fenólicos, hidroxicinamatos, estilbenos y otros) y que comúnmente se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos (Cartea *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos están caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos, es decir, están formados por un esqueleto carbonado C₆-C₃; esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, que a su vez se dividen en ácidos benzoicos (ácido gálico) (C₆-C₁) y ácidos cinámicos (ácidos cinámico, caféico y cumárico) quienes portan una cadena lateral insaturada (C₆-C₃), pero también incluyen a otros derivados fenólicos como estilbenos (Figura 5). La reactividad de este tipo de molécula es debida tanto a la presencia de la función fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrógeno, presenta un carácter ácido, como al núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrófilas (Flanzy, 2003).

Pueden estar también en formas conjugadas (glucósidos) con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático; forma más común de hallar a esta clase de compuestos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los azúcares más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucorónico y galacturónico. Aunque también pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos o ácidos orgánicos (ácidos fenil-acéticos), aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Hernández, 2013).

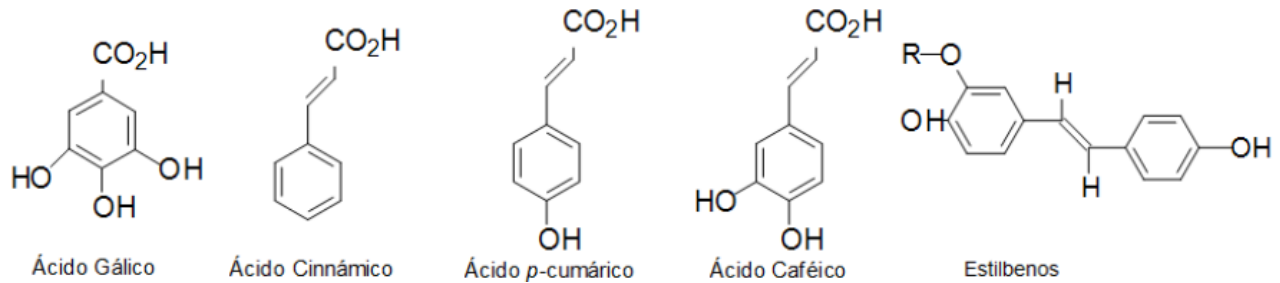


Figura 5. Ácidos fenólicos: benzoicos (hidroxibenzoicos), cinámicos (hidroxicinámicos) y derivados (Estilbenos) (Hernández, 2013).

Flavo proviene del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro; y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (Jiménez *et al.*, 2009). Los flavonoides son metabolitos secundarios, cuya concentración en las plantas depende, en gran medida, del estado en que ésta se encuentre y de las condiciones climatológicas (Escalona *et al.*, 2001). Son los más numerosos de los fenoles y se encuentran en todo el reino vegetal. Están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y frutos, y tienen papeles importantes y variados como metabolitos secundarios (Cartea *et al.*, 2011).

Los flavonoides absorben muy fuertemente la luz UVB y se consideran, que pueden jugar un papel muy importante en la prevención de daños en los tejidos de las hojas por las radiaciones ultravioleta sirviendo de defensa a las plantas. Ellos son reproducidos relativamente en grandes cantidades en las plantas y tienen efectos significativos en la composición de los suelos después de separar el vegetal de su medio de desarrollo (Márquez y García, 2007). Además participan en los procesos de estimulación de nódulos fijadores de nitrógeno y resistencia a enfermedades (Cartea *et al.*, 2011).

La estructura básica del flavonoide es el núcleo flavano, que contiene 15 átomos de carbono organizados en 3 anillos (C6-C3-C6), los cuales son designados como

A, B y C (Dai y Mumper, 2010), los tres anillos consistentes en dos centros aromáticos (Anillos A y B) y un heterociclo oxigenado central (anillo C), y están típicamente conjugados a azúcares (Gutiérrez, 2002).

Los flavonoides se dividen en 6 subgrupos: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas, conforme al estado de oxidación del anillo central. Su variación estructural en cada subgrupo se debe en parte al grado y patrón de hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación. Algunos de los flavonoides más comunes incluyen la quercetina, un flavonol abundante en la cebolla, brócoli y manzana, catequina, un flavanol encontrado en el té y severas frutas; naringenina la principal flavanona en la toronja; cianidina-glucósido, una antocianina abundante en bayas (grosella negra, frambuesa, zarzamora, etc.); y daidzeína, genisteína, gliciteína, las principales isoflavonas en soya (Dai y Mumper, 2010).

La capacidad antioxidante de los flavonoides está relacionada con el número y posición de los grupos hidroxilo en la molécula; un incremento en el número de grupos hidroxilos conduce a una mayor actividad antioxidante. Los compuestos con tres grupos hidroxilo en el anillo B de los flavonoides tienen una alta actividad antioxidante. La pérdida de un grupo hidroxilo decrece la actividad ligeramente, mientras que la pérdida de dos grupos hidroxilo decrece significativamente la actividad. Además, la glicosilación resulta en una baja actividad antioxidante para algunos flavonoides tales como quercetina, la adición de una fracción de azúcar disminuye la actividad de la aglicona y la adición de una segunda fracción decrece más la actividad, probablemente debido al impedimento estérico por la adición de fracciones de azúcar (Cartea *et al.*, 2011).

2.4 Síntesis de compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados en plantas principalmente en respuesta a presiones ecológicas y fisiológicas como ataque de patógenos e insectos, radiación UV e hiriendo (Khoddami *et al.*, 2013). Entre ellos la irradiación (densidad de flujo de fotones fotosintética, PFFD; 400-700nm) es conocido que regula no solo el crecimiento y desarrollo de la planta, sino también la biosíntesis de ambos metabolitos primarios y secundarios (Ibrahim y Jaafar, 2012).

Los fenoles son metabolitos secundarios basados en el carbono, primariamente producidos a través de la ruta de las pentosas fosfato (PPP), fenilpropanoide y rutas del ácido shikímico. La PPP proporciona el precursor oxidativo eritrosa-4-fostato para la vía de shikimato. Esta ruta convierte estos fosfatos de azúcar en amino ácidos aromáticos tales como fenilalanina, el cual se convierte en el precursor para la ruta de fenilpropanoides que sintetiza polifenoles (Ibrahim y Jaafar, 2012).

La enzima fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) cataliza la conversión de fenilalanina en ácido trans-cinámico, causando de este modo el flujo de metabolitos primarios en metabolitos secundarios en la ruta de fenoles. La actividad de PAL y otras enzimas fenilpropanoides son principalmente reguladas por síntesis del novo (Ibrahim y Jaafar, 2012).

La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Jiménez *et al.*, 2009).

La biosíntesis de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides.

El primer paso de la ruta metabólica es catalizada por la chalcona sintetasa (CHS), en donde tres moléculas de malonil-CoA y una molécula de p-cumaril-CoA son condensadas para generar una tetrahidroxichalcona. En ciertas especies, la acción coordinada de CHS y una enzima reductasa dependiente de NADPH generan una 6-desoxichalcona. Ambas chalconas pueden entonces ser convertidas en auronas, una subclase de flavonoides encontrada en ciertas especies de plantas. El siguiente paso compartido por la mayoría de las rutas de biosíntesis de flavonoides es catalizada por la chalconas isomerasa (CHI), que cataliza una reacción estereoespecífica de ciclación de un anillo para formar flavanonas, naringenina y liquirigenina. Las flavanonas pueden representar el punto más importante en el metabolismo de flavonoides porque la isomerización de estos compuestos produce fitoalexinas isoflavonoides; la introducción de dobles enlaces en C₂-C₃ produce flavonas y flavonoles y la hidroxilación en la posición 3 genera dihidroflavonoles. La entrada a la rama de los isoflavonoides ocurre por la vía de dos enzimas, la primera la isoflavona sintetasa (IFS) que cataliza una migración inusual del aril de C₂ a C₃ y la segunda, que es una enzima dependiente de NADPH y de citocromo P₄₅₀, causando una hidroxilación que da 2-hidroxi flavonas. La deshidratación de la 2-hidroxi isoflavanona, catalizada por la 2-hidroxi isoflavanona deshidratasa (IFD) forma los isoflavonoides genisteína y daidzeína.

El segundo punto en el metabolismo general de flavonoides implica la deshidratación de naringenina en la posición C₂-C₃ que produce abundantes

flavonoides tales como apigenina. Esta conversión es catalizada por la enzima flavona sintetasa (FNS) y varía según la especie.

El tercer punto importante es la hidroxilación estereoespecífica en la posición 3 de la naringenina y el eriodictiol produciendo dihidroflavonoles como dihidrokaemferol y dihidroquercetina respectivamente. La enzima involucrada es la flavanona 3 hidroxilasa (FHT) que es una dioxigenasa dependiente de Fe^{2+} y de 2-oxoglutarato. Los dihidroflavonoles, convertidos a flavonoles (kaemferol y quercetina) por la flavonol sintetasa (FLS) catalizan la formación del doble enlace en $\text{C}_2\text{-C}_3$, la FLS es una dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato. Alternativamente, los dihidroflavonoles pueden ser reducidos por una dihidroflavonol reductasa (DFR) que nos da los correspondientes 3, 4 flavandioles los cuales son los sustratos para la biosíntesis de antocianinas y taninos (Abadía, 2007) (Figura 6).

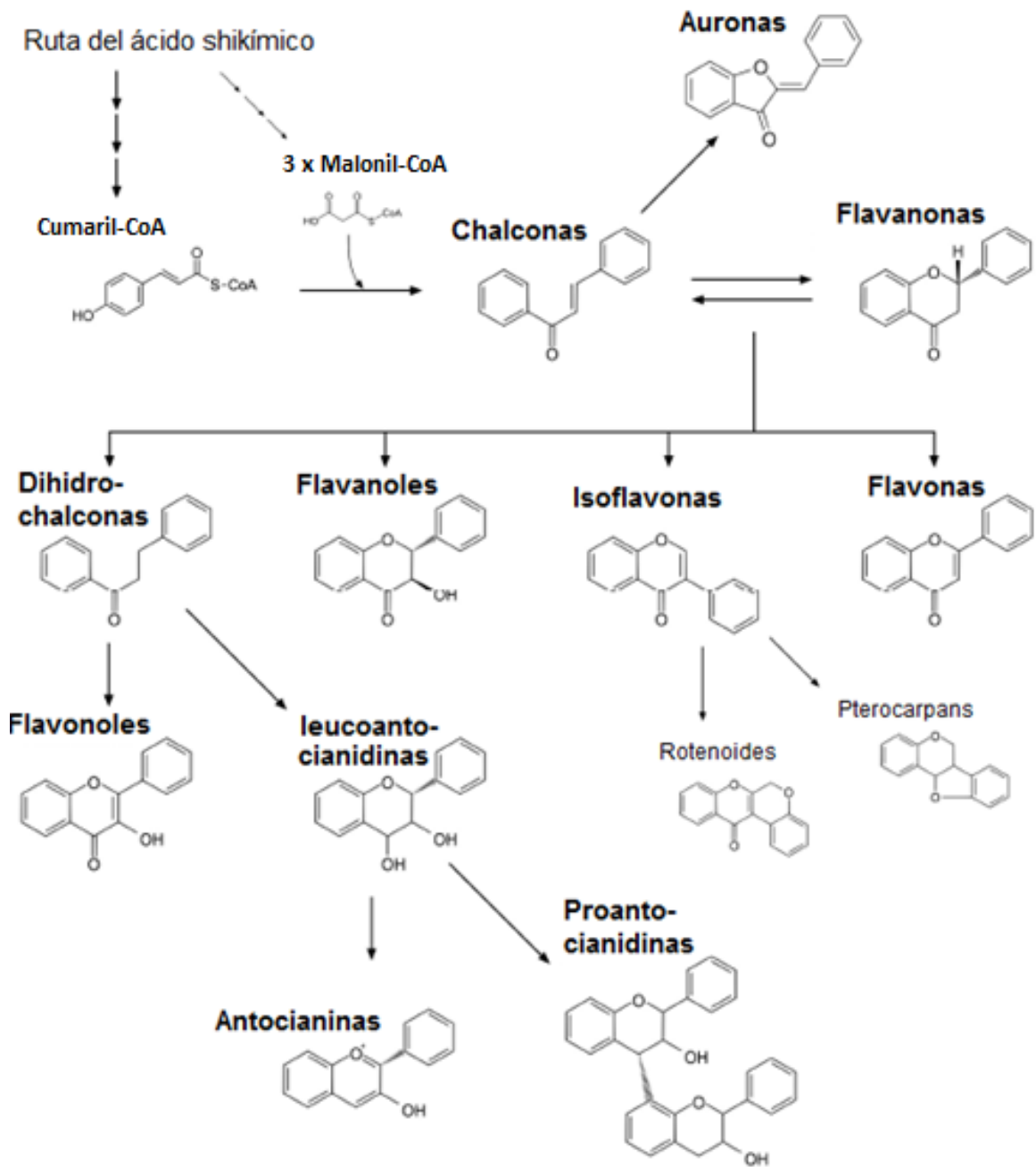


Figura 6. Clasificación de flavonoides (Mierziak *et al.*, 2014).

2.5 Determinación de compuestos polifenólicos

El aislamiento de antioxidantes de un material vegetal puede llevarse a cabo utilizando diferentes técnicas y solventes debido a la diversidad de la naturaleza química de estos componentes y a menudo de distribución única de estos compuestos en la matriz de la planta. Entre ellos la extracción es la técnica más frecuentemente usada para recuperar los antioxidantes de la planta (Anwar y Przybylski, 2012).

Los pasos más importantes para el análisis de compuestos fenólicos son la preparación de muestra y la extracción, seguido por la clasificación y cuantificación utilizando métodos de espectrofotometría, cromatografía de gas (GC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o electroforesis capilar (CE) (Khoddami *et al.*, 2013).

2.5.1 Preparación de la muestra

La preparación y la extracción de compuestos fenólicos a partir de su amplia gama de muestras dependen en su mayoría de la naturaleza de la matriz de la muestra y de las propiedades químicas de los fenoles, incluyendo la estructura molecular, polaridad, concentración, número de anillos aromáticos y grupos hidroxilo. La variación en la química de los fenoles en una muestra está relacionada con la concentración de compuestos polifenólicos simples y complejos y las diferentes proporciones de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y proantocianinas (entre otros). Por lo tanto, es difícil elegir un solo método de preparación y extracción de fenoles para muchos productos vegetales.

Los complejos con proteínas, carbohidratos u otros elementos que dificultan la extracción completa de algunos fenoles. Para algunas técnicas de preparación, las muestras de plantas necesitan ser secadas utilizando secado por congelación,

secado por aire o secado en horno. Por ejemplo, Sejali y Anuar, (2001) indicaron que cantidades más altas de fenoles pueden ser extraídas en secado por aire en sombra en la hoja neem que muestras secadas por horno (Khoddami *et al.*, 2013). Generalmente, el secado por congelación retiene altos niveles de contenido fenólico en muestras de planta que el secado al aire. Sin embargo, los procesos de secado, incluyendo el secado por congelación, pueden causar efectos indeseables en los perfiles constituyentes de las muestras vegetales, por lo tanto, se debe tener cuidado en la planificación y el análisis de los estudios de investigación en las propiedades de las plantas (Dai y Mumper, 2010).

Las muestras secas son molidas o pulverizadas para obtener cierto tamaño de partícula, mientras que las muestras líquidas son tratadas por centrifugación, filtración y purificación usando un sistema de separación cuando se requiere. Los rendimientos de extracción más altos de fenoles son conseguidos por la molienda de la muestra en tamaños de partículas más pequeñas, lo que mejora la acción enzimática y la extracción. Los procesos desengrasantes pueden ser aplicados para eliminar el aceite de las muestras que contienen lípidos. Por ejemplo, Weidner *et al.*, (2012) desengrasa las semillas pulverizadas de la uva para simplificar la extracción de fenoles utilizando hexano. En general, la molienda en tamaño de partícula pequeño (en combinación con el secado y el desengrasado en su caso) se aconseja para la preparación de muestra más completa antes de la extracción (Khoddami *et al.*, 2013).

2.5.2 Extracción

Los fenoles se pueden extraer de muestras de plantas frescas, congeladas o secas. Usualmente antes de extraer las muestras vegetales son tratadas por molienda, rectificado y homogenización, la cual puede ser precedida por secado al aire o secado por congelación.

Las extracciones de solventes son los procedimientos más comúnmente usados para preparar extractos de plantas debido a su fácil uso, eficiencia, y amplia aplicabilidad. Es generalmente conocido que el rendimiento de la extracción química depende del tipo de solvente con diferentes polaridades, tiempo de extracción y temperatura, relación muestra-solvente, así como de las composiciones químicas y físicas características de las muestras. La solubilidad de fenoles es regida por la naturaleza química de la muestra vegetal, así como de la polaridad de los solventes utilizados. Los materiales vegetales pueden contener compuestos fenólicos variando desde simples (por ejemplo, ácidos fenólicos, antocianinas) a sustancias altamente polimerizadas (por ejemplo, taninos) en diferentes cantidades. Por otra parte, los fenoles pueden también ser asociados con otros componentes vegetales tales como carbohidratos y proteínas. Por lo tanto, no hay procedimiento de extracción universal adecuado para la extracción de todos los fenoles vegetales. Dependiendo del sistema de solvente utilizado durante la extracción, una mezcla de fenoles solubles en el solvente deberá ser extraída del material vegetal. También puede contener algunas sustancias no fenólicas como azúcar, ácidos orgánicos y grasas. Como resultado, adicional a los pasos puede ser requerido eliminar esos componentes no deseados.

Los solventes, como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, y sus combinaciones se han utilizado para la extracción de fenoles de materiales vegetales, a menudo con diferentes proporciones de agua. La selección del solvente adecuado afecta la cantidad y velocidad de extracción de polifenoles. En particular, el metanol ha sido generalmente encontrado ser más eficiente en la extracción de polifenoles de bajo peso molecular mientras los flavonoides de mayor peso molecular son mejor extraídos con acetona acuosa. El etanol es otro buen solvente para extracción de polifenoles y es seguro para el consumo humano.

En la preparación de extractos fenólicos ricos de antocianina de materiales vegetales, un solvente orgánico acidificado, más comúnmente usado es el metanol

y etanol. Este sistema de solvente desnaturaliza las membranas celulares, simultáneamente disuelve las antocianinas, y las estabiliza. Sin embargo, se debe tener cuidado para evitar la adición de exceso de ácido lo cual puede hidrolizar lábiles, acilos, y residuos de azúcar durante las etapas de concentración. Para obtener el mejor rendimiento de extracción de antocianinas, ácidos orgánicos débiles, tales como ácido fórmico, acético, cítrico, tartárico y fosfórico, y bajas concentraciones de ácidos fuertes, tales como 0,5-3,0% de ácido trifluoroacético y <1,0% de ácido clorhídrico se recomiendan. Además el agua sulfurada también ha sido utilizada como solvente de extracción en la búsqueda de una reducción de uso de solventes orgánicos así como el costo de extracción. La recuperación de compuestos fenólicos de materiales vegetales también es influenciada por el tiempo de extracción y la temperatura, la cual refleja las acciones conflictivas de solubilización y la degradación del analito por oxidación. Un incremento en la temperatura de extracción puede promover mayor solubilidad del analito mediante el incremento de solubilidad y velocidad de transferencia de masas. Además, la viscosidad y la tensión superficial de los solventes disminuyen en altas temperaturas, lo cual ayuda al solvente para alcanzar las matrices de la muestra, mejorando la tasa de extracción. Sin embargo, muchos compuestos fenólicos se hidrolizan y oxidan fácilmente. Los largos tiempos de extracción y alta temperatura incrementan la posibilidad de oxidación de fenoles lo cual disminuye el rendimiento de fenoles en los extractos. Por ejemplo, la extracción convencional y la concentración de antocianinas se realiza típicamente a temperaturas que oscilan de 20 a 50 °C, porque temperaturas >70°C han mostrado que causan la degradación rápida de antocianina. Por lo tanto, es de importancia crítica para seleccionar el procedimiento/método de extracción eficiente y mantener la estabilidad de los compuestos fenólicos. Los métodos de extracción convencional tales como la maceración y extracción de soxhlet han mostrado baja eficiencia y potencial de contaminación del medio ambiente, debido a los grandes volúmenes de solvente orgánico utilizado y de largo tiempo de extracción requerida en estos métodos. Un número de métodos se han desarrollado en años recientes tales como microondas, extracción asistida por ultrasonido, y técnicas basadas en el

uso de fluidos comprimidos como agentes de extracción, tales como extracción de agua subcrítica (SWE), extracción de fluido supercrítico (SFE), extracción de fluido presurizado (PFE) o extracción con solvente acelerado (ASE) fueron también aplicados en la extracción de compuestos fenólicos de materiales vegetales.

La extracción de compuestos fenólicos de materiales vegetales también puede ser influenciada por otros factores tales como la relación solvente-sólido y el tamaño de partícula de la muestra. El aumento de la relación solvente-sólido fue encontrado que trabaja positivamente para mejorar los rendimientos de fenoles. Sin embargo, un equilibrio entre el uso de relaciones altas y bajas de solvente-sólido, involucra un equilibrio entre el alto costo y desechos de solventes y evitar los efectos de saturación, respectivamente, ha de ser encontrado para obtener de un valor optimizado. Bajando el tamaño de partícula también mejora el rendimiento de compuestos fenólicos. Para aumentar la liberación de límite de fenoles, un número de procedimientos enzimáticos que involucran el uso de varias mezclas pectinolíticas y preparaciones enzimáticas degradadores de polisacáridos de pared celular en extracción de fenoles se ha descrito. El tamaño de partícula de las muestras trituradas se encontró que era un factor principal para aumentar la acción enzimática y la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos de muestras en estas extracciones de enzimas asistida (Dai y Mumper, 2010).

2.5.3 Análisis y cuantificación de fenoles

Los fenoles naturales son de interés desde muchos puntos de vista (antioxidantes, astringencia, amargura, reacciones de pardeamiento, etc.). La selección de la estrategia analítica apropiada para el estudio de fenoles en materia vegetal depende del propósito del estudio, así como de la naturaleza de la muestra y el analito. Los ensayos utilizados para el análisis de fenoles son generalmente clasificados ya sea como contenido de fenoles totales, la cuantificación de un grupo o clase específica de compuestos fenólicos. La cuantificación de

compuestos fenólicos en el extracto vegetal es influenciada por la naturaleza química del analito, así como el método de ensayo, la selección de las normas y la presencia de sustancias interferentes.

Debido a la heterogeneidad de los fenoles naturales y la posible interferencia de otras sustancias fácilmente oxidables en los materiales vegetales, no es sorprendente que tengan varios métodos utilizados para la determinación de fenoles totales y ninguno es perfecto. Entre tales métodos están los métodos Folin-Denis (FD), método Folin-Ciocalteu (F-C), titulación permanganato, colorimetría con sales de hierro, y absorbancia ultravioleta. En la mayoría de los casos, F-C ha sido encontrado preferible en comparación con los otros métodos. El ensayo F-C se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenoles a complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico para formar complejos azules (posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$) que son determinados espectrofotométricamente en aproximadamente 760nm. El ácido gálico es ampliamente utilizado como el estándar de comparación y los valores generalmente son comparados como miligramos de ácido gálico equivalente por kilogramo o litro de extracto entre muestras. Debido a la naturaleza general de la química del F-C, es de hecho una medida de fenoles totales y otros sustratos de oxidación. El otro sustrato de oxidación presente en un extracto de muestra dada puede interferir la medición de fenoles totales en una manera de inhibición, aditiva o de mejora. Los efectos inhibidores podrían ser debido a los de los oxidantes que compiten con el reactivo F-C y/o la oxidación del aire después de que la muestra se hizo alcalina. Por esta razón, el reactivo F-C es agregado antes de alcalinizarse. Los efectos aditivos se producen de fenoles imprevistos, aminos aromáticos, altos niveles de azúcar o ácido ascórbico en la muestra. Los efectos aditivos se pueden medir antes de añadir el álcali o por un ensayo más específicos de una interferencia conocida y después restar del valor del F-C. Los sulfatos y dióxido de azufre que es un aditivo común para el vino pueden causar efectos de mejora. Sin embargo, a pesar de estas desventajas, el ensayo F-C es simple y

reproducibile y ha estado ampliamente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos en materiales vegetales y extractos.

En general, los tradicionales ensayos espectrofotométricos proporcionan métodos simples y rápidos de detección para cuantificar las clases de compuestos fenólicos en muestras vegetales crudas. Sin embargo, debido a la complejidad de los fenoles vegetales y diferente reactividad de fenoles hacia reactivos de ensayo, un amplio espectro de métodos es usado para el ensayo de componentes, dando lugar a resultados diferentes y a menudo no comparables.

Dada la existencia intrínseca de dobles enlaces conjugados y aromáticos, cada fenol exhibe una absorción mayor o menor en ultravioleta (UV) o región ultravioleta/visible (UV/VIS). Por lo tanto, los medios más comunes de detección, junto a la cromatografía líquida (LC), son los de UV/VIS, matriz de fotodiodos (PDA), y detectores de fluorescencia UV. El PDA es el método más frecuente ya que permite el escaneo en tiempo real del espectro UV/VIS de todos los solutos que pasan a través del detector, dando más información de los compuestos en mezclas complejas tales como un extracto vegetal crudo. Otros métodos empleados para la detección de compuestos fenólicos incluyen detección electroquímica (ECD), la técnica voltametría, técnica de voltametría en línea conectada a PDA y la matriz de detección electro (EAD), las técnicas de detección de reacciones químicas, espectrofotometría de masa (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) de detección. Las detecciones MS y NMR son más de confirmación de estructura que métodos de cuantificación.

Las técnicas de electromigración incluyendo electroforesis capilar (CE), electroforesis de zona capilar (CZE), y cromatografía electrocinética micelar acoplada con UV, y en menor medida la detección EC y MS son también empleadas para el análisis de fenoles (Dai y Mumper, 2010).

2.5.4 Análisis y cuantificación de flavonoides

Los flavonoides son compuestos altamente bioactivos encontrados tanto en plantas comestibles y no comestibles. Son a menudo extraídos con metanol, etanol, acetona, agua o mezclas de estos solventes usando métodos de extracción de reflujo caliente (Khoddami *et al.*, 2013).

El método colorimétrico con tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) y el de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4NFH) han sido utilizados para la determinación complementaria de flavonoides. El tricloruro de aluminio forma complejos ácidos estables con el grupo ceto en C-4 o en grupos hidroxil libres en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, y aunque también puede reaccionar con el grupo hidroxilo C-5 de flavanonas, las absorbencias de los complejos generados son casi insignificantes. Además, el tricloruro forma complejos ácido-lábiles con los grupos orto-dihidroxilo en los anillos A o B de los flavonoides; estos complejos muestran un máximo de absorbencia entre 415-440 nm; producto del efecto batocrómico del complejo con tricloruro de aluminio.

Los flavonoides en general poseen una coloración amarilla, cuya intensidad está relacionada al pH de la solución; mientras más básica sea ésta, la coloración será más intensa; característica que se aprovecha en su determinación. Una característica de los flavonoides que es de gran utilidad en su análisis, es la presencia del anillo aromático. Este es un excelente cromóforo, y por consiguiente, absorbe en la región UV del espectro electromagnético, proveyéndonos de valiosa información estructural, con lo que se distingue el tipo de fenol y grado de oxidación en su estructura (Andersen y Markham, 2006).

2.6 Radicales libres

Un radical libre tiene un electrón desapareado que es producido por la radiación o es un sub-producto de los procesos metabólicos. Ellos empiezan a desintegrar las membranas celulares y compuestos celulares por daño a los componentes de la biomembrana como lípidos, proteínas y ADN interno y decrece la fluidez de membrana.

Dos especies de estos radicales libres son las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ($O_2\cdot^-$), el hidroxilo ($OH\cdot$), el hidroperóxilo ($OOH\cdot$), peróxilo ($ROO\cdot$), alcoxilo ($RO\cdot$), los radicales no libres son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), oxígeno singlete (1O_2) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) similar a un óxido nítrico ($NO\cdot$), peroxinitrito ($ONOO\cdot$), dióxido de nitrógeno (NO_2) (Tajalli, 2014).

Los RNS son comúnmente generados en compartimentos sub-celulares tales como los gránulos secretores que contienen peroxidasa de neutrófilos y eosinófilos, la mitocondria y el retículo endoplásmico endotelial y células del músculo liso, y la vasculatura. En condiciones fisiológicas, las células producen ROS a través del transporte de electrones mitocondrial de la respiración aeróbica. A bajos niveles, ROS son bien tolerados por las células gracias a sistemas de desintoxicación enzimática como las superóxido dismutasas (SOD) y glutatión S-transferasa, que neutraliza los radicales libres. Bajo contextos patológicos (por ejemplo, durante la inflamación sostenida), ROS alcanza altas concentraciones y se convierte tóxico, lo que afecta el metabolismo celular por cualquiera de las oxidaciones directas de macromoléculas o después se combinan con el NO para generar RNS (Sanctis *et al.*, 2014).

Las especies reactivas del oxígeno, derivados de los procesos de oxidación, son una importante parte de los mecanismos de defensa contra la infección, pero la generación excesiva de radicales libres de oxígeno puede dañar el tejido. Cuando hay un desequilibrio entre ROS y mecanismos de defensa antioxidante, las ROS

llevan a la modificación oxidativa en las membranas celulares o moléculas intracelulares y dar lugar a la peroxidación de los lípidos de membrana, lo que lleva a la acumulación de peróxidos de lípidos.

2.6.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son agentes y moléculas que pueden reducir y limitar el daño oxidativo a estructuras biológicas por eliminación de radicales libres, neutralizando los perjudiciales radicales libres ROS y RNS que pueden atacar las células y evitar daño a células vivas, proteínas, enzimas, DNA, daños en alimentos, carbohidratos y también degradar materiales como la goma, gasolina y aceite lubricante. Ellos rompen las reacciones en cadena a través de la eliminación de radicales libres e inhibe otras reacciones de oxidación. Además estos se clasifican en dos clases principales enzimáticas y no enzimáticas (Tajalli, 2014).

El sistema enzimático antioxidante endógeno es importante para proteger al organismo contra altas concentraciones de ROS. Este sistema está compuesto principalmente por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y peroxidasas (POD) (Zhang *et al.*, 2014).

Los antioxidantes no enzimáticos consisten en compuestos nutrientes y no nutrientes. Algunos antioxidantes no nutrientes como el glutatión y la coenzima Q son principalmente de origen endógeno, mientras que la mayoría de los tipos de nutrientes y no nutrientes de antioxidantes no enzimáticos se derivan de los alimentos que consumimos.

Mientras que las vitaminas como la vitamina A, tales como C, tales como E y minerales tales como zinc y selenio son algunos de los nutrientes importantes con actividad antioxidante (AOA), hay una variedad de sustancias no nutritivas tales como carotenoides, flavonoides, fenoles, polifenoles y ácido úrico que son

potentes antioxidantes. Hay muchos más componentes menores en alimentos vegetales, tales como sulfuros, tioles, saponinas, lignanos e inositol, que tienen excelente actividad antioxidante (Saxena *et al.*, 2007).

Totalmente, las plantas y animales se protegen ellos mismos por un complejo sistema de múltiples antioxidantes, tales como glutatión, tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides y taninos, y vitamina E junto con algunas enzimas como catalasa, superóxido dimutasa y varios peróxidasas. Por otra parte, hay antioxidantes sintéticos tales como el hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), terbutilhidroquinona y ésteres de ácido gálico los cuales son usados en la industria de alimentos y otros materiales que provocan efectos negativos para la salud (Tajalli, 2014).

2.6.2 Pruebas utilizadas para detectar y cuantificar antioxidantes en extractos vegetales

Para evaluar la actividad antioxidante de plantas y vegetales primero es necesario realizar una extracción de los compuestos presentes. Existen diversos métodos para obtener tales compuestos, desde una simple maceración hasta la utilización de fluidos súper críticos y ultrasonido; no obstante, independientemente de la técnica utilizada, el primer paso de separación estará basado en la destrucción celular para extraer el compuesto de interés, y en la compatibilidad de polaridades entre el compuesto a extraer y la solución a usar como solvente, es decir, se utilizan soluciones polares para extraer compuestos hidrófilos y solventes apolares para los compuestos hidrófobos.

Entre las pruebas químicas que se utilizan para la detección y cuantificación de antioxidantes destacan las siguientes:

Actividad antioxidante usando el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Se evalúa la capacidad que presenta el extracto para neutralizar o ceder un electrón al radical DPPH. (Para determinar la eficacia que tendrá el extracto para detener una reacción en cadena formada a partir de un radical libre) (Aguirre-Joya *et al.*, 2012). Se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (Molyneux, 2004).

Reducción del hierro. La prueba está basada en la capacidad del extracto para reducir el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ). La capacidad de reducir los metales es importante debido a que estos están involucrados en los procesos de propagación de la cadena radicalaria extendiendo el proceso de daño celular en el organismo.

Contenido polifenólico total. Los polifenoles son unos de los compuestos antioxidantes más importantes en la naturaleza, tanto por su acción como por su abundancia, por lo que su medición es ampliamente utilizada. Esta prueba se realiza agregando reactivo de Folin-Ciocalteu para dar lugar a una reacción colorimétrica que puede ser medida mediante espectroscopia; la relación se compara con una curva de calibración que se realiza con un polifenol conocido (generalmente ácido galico o catequina) y se extrapolan los datos. Así mismo se pueden caracterizar los antioxidantes presentes en las plantas por sistemas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Dosis efectiva media (DE_{50}). La dosis efectiva media o concentración efectiva media (DE_{50}) se refiere a la concentración mínima requerida para inhibir la actividad radicalaria en el 50% de la población (Aguirre-Joya *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Se escogió la zarzamora porque es una planta cuyo fruto posee una excelente fuente de vitaminas; en especial de A y C, además de contener compuestos fenólicos, convirtiéndolo en una buena fuente de antioxidantes. Debido a la pérdida de hojas ocasionada por la poda que recibe la planta para la temporada de fructificación, el trabajo desea conocer si existe mayor crecimiento de la planta y presencia de compuestos fenólicos en las hojas por la adición de los biofertilizantes, para incrementar su valor comercial, debido a que tales compuestos han sido reportados por poseer propiedades antioxidantes.

Debido al interés en el cultivo de zarzamora por la identificación de metabolitos secundarios de alto valor agregado, es necesario dar a conocer a los agricultores que existen varias alternativas de cultivo distintas a lo tradicional, ya que el empleo de fertilizantes químicos erosiona el suelo. Por lo que es necesario sustituir y promover el uso de biofertilizantes, ya que algunos de estos pueden ser producidos por los mismos agricultores o adquirirlos a bajos costos.

Las principales justificantes científicas es que no se tienen reportes del uso de vermicomposta, roca fosfórica y hongo micorrízico arbuscular, en el efecto que estos biofertilizantes pueden tener sobre el crecimiento de la planta y la producción de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos; entre ellos flavonoides y su actividad antiradicalar en las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*), ya que se desean utilizar en la actualidad en la industria de alimentos para su conservación, debido a que los antioxidantes artificiales empleados en la actualidad tienen a causar efectos perjudiciales a la salud como son el hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) que son comúnmente utilizados en alimentos procesados, los cuales han sido reportados por causar inducción de daño al DNA y ser cancerígenos. Además de la presión ejercida por los consumidores en la actualidad por ser proveídos de productos saludables. Agregando que son compuestos utilizados en la medicina para tratar

enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y poseer efecto antidiarreico, antiviral, antialérgica, entre otros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la roca fosfórica, vermicomposta y hongo micorrízico sobre el crecimiento, concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, y la actividad antiradical de las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*).

4.2 Objetivos específicos:

- Analizar el efecto del hongo micorrízico, la roca fosfórica y la vermicomposta; sobre la altura y diámetro del tallo de la planta de zarzamora (*Rubus sp.*).
- Inferir la concentración de fenoles en los extractos metanólicos de las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*) biofertilizadas con roca fosfórica, vermicomposta y hongo micorrízico.
- Inferir la concentración de flavonoides en los extractos metanólicos de las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*) biofertilizadas con roca fosfórica, vermicomposta y hongo micorrízico.
- Evaluar la capacidad antiradical de los extractos metanólicos de las hojas de zarzamora (*Rubus sp.*).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Plantas de zarzamora

Las 160 plantas de zarzamora se obtuvieron de una plantación de zarzamora ubicada en la autopista a Coatzacoalcos Km. 184, perteneciente al municipio de Berriozábal, Chiapas entre los paralelos 16°43' y 17°20' de latitud norte y los meridianos 93°12' y 93°26' de longitud oeste, con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano. La zona de experimentación fue en la empresa Luanda planta de vermicomposta, ubicada en el Km 10.5 carretera Ocozocoautla – Villaflores, Chiapas, con 16°40'44 de latitud norte y 93°24'47 de longitud oeste.

5.1.2 Hongo micorrízico arbuscular

Glomus mosseae fue obtenido de la colección microbiana del Cinvestav-Irapuato (México) (León *et al.*, 2011).

5.1.3 Roca fosfórica

La roca fosfórica fue obtenida de una compañía con el nombre de Calizas Industrializadas de Hidalgo S. A. de C.V., México. Con una densidad de 1700g/cc, soluble en agua, utilizado por su alto contenido en fósforo.

5.1.4 Vermicomposta

La vermicomposta fue obtenida en la empresa Luanda, planta de vermicomposta, ubicada en Km 10.5 carretera Ocozocoautla – Villaflores, Chiapas. Con las características del compost de lombriz con un pH de 8.25, una conductividad eléctrica 1,44 dS m⁻¹, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 98.6 kg⁻¹ cmol, fósforo total 341,4 mg kg⁻¹, fósforo extraíble 472 mg kg⁻¹, la materia orgánica 20,17% y el nitrógeno total 132 mg kg⁻¹. La densidad aparente fue 0,69 g mL⁻¹, la concentración de ácido húmico 4,34% y la concentración de ácido fúlvico 3,99%

del contenido total de C de la vermicomposta. El humus de proporción de ácidos fúlvicos fue de 1,08 (León *et al.*, 2011).

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Siembra de las plantas de zarzamora y diseño experimental

El diseño experimental se llevó acabo en el software estadístico Minitab 16; consistió en tres factores: roca fosfórica, vermicomposta, y hongo micorrízico arbuscular, 8 tratamientos de forma aleatorizada para disminuir los factores ruido, veinte repetición, dos niveles (testigo y variables independientes), dando como resultado el uso de 160 plantas para la investigación. De manera aleatoria se designaron 8 tratamientos; tomando al azar y el orden quedo de la manera siguiente:

1. Hongo micorrízico arbuscular (HMA)
2. Roca fosfórica (RF)
3. Vermicomposta (V)
4. HMA + RF + V
5. HMA + RF
6. HMA + V
7. V + RF
8. Testigo

Estos tratamientos se anotaron en papelitos se colocaron en una tómbola y se designó el orden de los 4 bloques al azar. Cada bloque tiene 40 plantas y la aplicación de los tratamientos fue de la siguiente manera.

Bloque 1: 4, 8, 6, 1, 7, 2, 3, 5

Bloque 2: 5, 4, 1, 7, 2, 6, 3, 8

Bloque 3: 6, 5, 4, 7, 8, 1, 3, 2

Bloque 4: 1, 7, 4, 8, 2, 5, 3, 6

Las cantidades de fertilizantes orgánicos se pesaron en balanza analítica en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se pesaron 80 bolsas con 1 g de roca fosfórica, 80 bolsas con 10 g de vermicomposta, y 80 bolsas con 1 g de hongo micorrízico arbuscular.

5.2.2 Análisis de la altura y diámetro de la planta

Para la evaluación de la altura se utilizó un flexómetro y para la determinación del diámetro del tallo por medio de un vernier. Las mediciones se realizaron en un periodo de cinco meses.

5.2.3 Obtención de extracto metanólicos

Para la recolección de las muestras, se descartó cualquier hoja que estuviera maltratada, seca o contaminada con algún tipo de microorganismo. El material vegetal recolectado fue secado bajo sombra a temperatura ambiente, posteriormente se trituro empleando un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino. Los extractos crudos se obtuvieron pesando 1 gramo de cada muestra vegetal y se adicionan 20 mL de metanol, posteriormente se sometió a una sonicación en baño maría durante 2 horas controlando la temperatura con hielo. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm a 10° C durante 20 minutos. El extracto crudo se concentró en un rotaevaporador (Buchi) y se resuspendió en 2 mL de metanol. Los extractos se almacenaron a -18° C.

5.2.4 Cuantificación de fenoles totales

El análisis del contenido polifenólico total se determinó de acuerdo al método colorimétrico de Folin Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999), diluyendo el extracto metanólico a una concentración de 1:50, empleando ácido gálico como estándar. Una alícuota de 50 µL de muestra se transfirió a un tubo de ensaye junto a 2.1 mL de agua y 250 µL del reactivo de Folin Ciocalteau (2N). La mezcla se agitó

vigorosamente durante 1 minuto para luego agregar 500 μL de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20% y 2.1 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo cubierto de la luz durante 2 horas, para luego leer su absorbencia a 765 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca de zarzamora (mg EAG/g) empleando una curva estándar de ácido gálico de 0.0 a 1000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ANEXO I).

5.2.5 Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002) diluyendo el extracto metanólico a una concentración de 1:50, empleando quercetina como estándar. Una alícuota de 250 μL de muestra se mezcla con 750 μL de EtOH al 95% y 50 μL de tricloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{-H}_2\text{O}$) al 10%, luego de agitar se agregaron 50 μL de acetato de potasio 1M y 1.4 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo cubierto de la luz durante 30 minutos para luego medir su absorbencia a 415 nm en un espectrofotómetro. El volumen de tricloruro de aluminio se reemplazó por agua destilada en la preparación del blanco. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de hoja seca de zarzamora (mg EQ/g) empleando una curva estándar de quercetina de 0.0 a 100 $\text{ug}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ANEXO II).

5.2.6 Actividad antirradical mediante el radical DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo)

La actividad antirradical de los extractos se determinó en términos de la habilidad de donar hidrógeno o de atrapar radicales utilizando el radical estable DPPH \cdot (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) de acuerdo a la metodología empleada por Mensor *et al.*, (2001), empleando ácido gálico como testigo. A 2.5 mL de muestra a diferentes concentraciones (0.1, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se adicionaron 1 mL de una solución etanólica de DPPH (0.3 mM), luego de 30 minutos de reacción se leyó la absorbencia a 518 nm en un espectrofotómetro que se calibro con etanol y

se convirtió en porcentaje de actividad antiradical (AA) usando la siguiente fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) \times 100]}{Abs_{control}} \right\}$$

El blanco fue una de solución de extracto de 2.5 mL más 1 mL de etanol. Una solución de DPPH (1 mL; 0.3 mM) con etanol (2.5 mL) fue usada como control negativo. El control positivo fueron las soluciones estándar. El experimento se llevó a cabo en una habitación con iluminación tenue y temperatura ambiente (~25 °C). Los resultados se expresaron como índice de concentración media (IC50 [ug/ml]). Se empleó una curva de actividad antiradical con ácido gálico como comparación de la efectividad de los extractos metanolicos de 0.0 a 100 ug·mL⁻¹ (ANEXO II).

5.2.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos y variables evaluadas, realizándose un análisis de varianza y la prueba de comparación de medidas de DMS (Diferencia Mínima Significativa) para las variables registradas. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS System para Windows 7 en lo correspondiente a altura y diámetro del tallo, en el caso de la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antiradical se utilizó el statgraphic.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Factores de crecimiento

6.1.1 Altura de tallo

La altura de las plantas obtenidas durante los cinco meses de evaluación se muestra en el cuadro 2. Los resultados fueron analizados estadísticamente con un ANOVA ($p < 0.05$) y se observó que la biofertilización empleada no tuvo efecto estadístico significativo. Durante los primeros dos meses las plantas biofertilizadas con la mezcla de HMA, RF y vermicomposta (tratamiento 4) promovieron una mayor altura del tallo, mientras que el tratamiento 7 (V + RF) en el cuál no está presente el HMA se observó que la altura del tallo fue menor. Este comportamiento se puede atribuir a que el HMA facilita la incorporación y asimilación de los nutrientes en la planta.

Bagyaraj *et al.* (2015), menciona que los hongos micorrízicos arbusculares mejoran el crecimiento de las plantas, lo que se atribuye principalmente a la facilitación de la llegada de nutrientes a la planta de elementos como P, Zn, Cu, etc. en el suelo. Además en el mismo estudio Bagyaraj *et al.* (2015), discute que el fósforo es el segundo elemento más importante en el crecimiento de las plantas, en especial en forma de roca fosfórica, puesto que las plantas lo requieren principalmente en las primeras etapas de crecimiento para un cultivo óptimo. En cuanto a la vermicomposta; Duran y Enríquez (2010), mencionan que el aporte de N y C al suelo puede ser muy significativo y favorece la humificación, además de N y C también aporta otros elementos como P, Ca, Mg y K.

En el tercer mes, la altura de planta fue de 34.22 cm en promedio y de acuerdo al ANOVA ($p < 0.05$) no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Cuadro 2).

Durante los últimos dos meses la roca fosfórica (tratamiento 2) fue el tratamiento que promovió mayor altura. Este efecto se atribuye a que el fósforo se mantiene en la concentración adecuada para un óptimo crecimiento. Según Ramírez (2006), el proceso de liberación del P de la roca fosfórica es lento, por lo que su efecto en la planta se observa de manera tardía. Además Fox y Kamprath (1970) y Barber (1995) mencionan que la concentración de fósforo suficiente para alcanzar un crecimiento óptimo en las plantas es de 0.2 ppm. Además, si se considera que las plantas sólo fueron biofertilizadas al momento del trasplante en suelo, es posible que los nutrientes provenientes de la vermicomposta se hayan agotado durante este tiempo y por ende la acción del HMA también se haya visto disminuida.

También se observó que a partir del 4 mes de monitoreo, la presencia de HMA en los tratamientos tenía un efecto negativo en el crecimiento de la planta, posiblemente porque el HMA en ese tiempo ya desempeñaba una función parasitaria en la planta en lugar de una actividad simbiótica, en donde el HMA consume nutrientes provenientes de la planta. Seguel (2014), menciona que los HMA reciben compuestos carbonados provenientes de la fotosíntesis de la planta, necesarios para su metabolismo por tratarse de un simbiote obligado.

Cuadro 2. Efectos de los tratamientos en la altura de las plantas de zarzamora en diferentes etapas de crecimiento.

Tratamiento	Altura de las plantas (cm.)				
	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes
1. HMA	27.9 ± 6.3 ab	29.4 ± 6.8 ab	35.8 ± 10.5 a	68.7 ± 17.9 ab	96.7 ± 18.1 ab
2. RF	27.4 ± 10.2 ab	30.6 ± 10.3 a	36.1 ± 9.5 a	70.4 ± 16.7 a	105.5 ± 17.3 a
3. V	25.2 ± 8.9 ab	27.4 ± 6.4 ab	32.3 ± 8.5 a	62.6 ± 12.7 ab	91.4 ± 11.7 b
4.HMA + RF + V	30.2 ± 8.6 a	32.0 ± 8.4 a	35.6 ± 8.1 a	65.0 ± 14.5 ab	93.7 ± 16.5 b
5. HMA + RF	29.0 ± 6.6 ab	28.6 ± 7.2 ab	32.9 ± 11.2 a	59.9 ± 13.6 b	98.2 ± 18.8 ab
6. HMA+V	29.0 ± 9.5 ab	31.5 ± 10.7 a	36.4 ± 11.1 a	63.6 ± 12.9 ab	94.1 ± 11.5 b
7. V + RF	24.2 ± 9.9 b	24.4 ± 6.9 b	30.6 ± 10.2 a	64.7 ± 18.7 ab	95.5 ± 20.4 ab
8.TESTIGO	27.0 ± 7.9 ab	28.5 ± 7.9 ab	34.1 ± 11.8 a	68.5 ± 11.6 ab	97.9 ± 17.5 ab
DMS (0.05)	5.4	5.1	6.4	9.4	10.5

Letras iguales dentro de una misma columna denotan que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (P<0.05).
HMA, hongo micorrízico arbuscular; RF, roca fosfórica; V, vermicomposta; DMS, diferencia mínima significativa.

6.1.3 Diámetro del tallo

El diámetro del tallo de las plantas durante los cinco meses se muestra en el cuadro 3. El ANOVA realizado mostró que la biofertilización aplicada no tuvo efecto estadístico significativo en el diámetro del tallo. Durante los primeros dos meses las plantas suministradas con el tratamiento de HMA con roca fosfórica (tratamiento 5) promovieron mayor diámetro del tallo.

Esto es ocasionado al igual que en la altura, por la presencia del HMA debido a que las plantas con mayor crecimiento fueron suministradas con él, además de la adición de otro biofertilizante ya sea vermicomposta o roca fosfórica que proporciona nutrientes para la planta. Por lo que, el HMA promovió a la planta

mayor absorción de nutrientes y la roca fosfórica aportó el fósforo necesario para el crecimiento de la planta.

Treseder (2013), menciona que el HMA facilita el crecimiento de muchas plantas por mejoramiento de adquisición de nutrientes sólidos. Además Fateh *et al.* (2011), menciona que el fósforo es el segundo fertilizante mineral más influyente para el crecimiento vegetal. Y Ali *et al.* (2012), menciona que la aplicación de fósforo promueve características de crecimiento como la altura y diámetro de tallo.

En el tercer mes, el diámetro de la planta fue de 0.53 cm en promedio y de acuerdo al ANOVA ($p < 0.05$) no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos (cuadro 3).

Durante el cuarto mes la roca fosfórica (tratamiento 2) fue el tratamiento que promovió mayor diámetro del tallo. Probablemente ocasionado a que en etapas tardías la roca fosfórica tiene mejor efecto entre los tratamientos suministrados, debido a que el fósforo se mantiene en la cantidad adecuada para su crecimiento y la planta necesita cierta concentración de fósforo para un crecimiento óptimo, ocasionado por un menor consumo debido a la falta de un medio que facilite su absorción o porque el fósforo en la roca empezó a consumirse.

Como ha reportado Ramírez (2006), donde menciona que el proceso de liberación del P de la roca fosfórica es lento.

En el quinto mes, el diámetro de la planta fue de 1.33 cm en promedio y de acuerdo al ANOVA ($p < 0.05$) no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos de los tratamientos en el diámetro del tallo de las plantas de zarzamora en diferentes etapas de crecimiento.

Tratamiento	Diámetro del tallo de las plantas (cm.)				
	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes
1. HMA	0.42 ± 0.09 b	0.45 ± 0.11 b	0.51 ± 0.14 a	1.06 ± 0.36 ab	1.34 ± 0.37 a
2. RF	0.42 ± 0.09 b	0.48 ± 0.09 ab	0.57 ± 0.12 a	1.10 ± 0.27 a	1.44 ± 0.35 a
3. V	0.41 ± 0.08 b	0.45 ± 0.09 b	0.51 ± 0.15 a	1.00 ± 0.24 ab	1.38 ± 0.35 a
4.HMA + RF + V	0.46 ± 0.12 ab	0.47 ± 0.13 ab	0.52 ± 0.14 a	0.92 ± 0.25 b	1.37 ± 0.34 a
5. HMA + RF	0.51 ± 0.14 a	0.54 ± 0.17 a	0.58 ± 0.19 a	1.03 ± 0.24 ab	1.34 ± 0.28 a
6. HMA+V	0.46 ± 0.11 ab	0.50 ± 0.13 ab	0.55 ± 0.14 a	0.91 ± 0.23 b	1.26 ± 0.20 a
7. V + RF	0.44 ± 0.09 b	0.47 ± 0.16 ab	0.51 ± 0.16 a	0.9 ± 0.18 b	1.26 ± 0.23 a
8.TESTIGO	0.46 ± 0.10 ab	0.46 ± 0.08 ab	0.52 ± 0.1 a	0.95 ± 0.27 ab	1.32 ± 0.31 a
DMS (0.05)	0.06	0.08	0.09	0.16	0.19

Letras iguales dentro de una misma columna denotan que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (P<0.05).
HMA, hongo micorrízico arbuscular; RF, roca fosfórica; V, vermicomposta; DMS diferencia mínima significativa.

6.2 Fenoles y flavonoides

En el cuadro 4 se presentan los resultados de fenoles y flavonoides totales de las hojas de la planta de zarzamora biofertilizadas con diferentes abonos. Se observó que los tratamientos con HMA, HMA con roca fosfórica, HMA con roca fosfórica y vermicomposta, roca fosfórica y vermicomposta (tratamientos 1, 2, 3, 5 y 7) no presentaron diferencia estadística significativa en comparación al HMA con vermicomposta, el testigo y la vermicomposta con roca fosfórica (tratamientos 4, 6 y 8).

Respecto a los fenoles totales en las hojas de las plantas de zarzamora, el tratamiento que presentó una mayor síntesis de compuestos fenólicos en comparación con el testigo fue el HMA con vermicomposta (tratamiento 4). El

resultado se podría explicar por un mayor porcentaje de la raíz colonizada por el HMA.

Pérez (1998), menciona que el HMA provoca un aumento de absorción de fosforo y otros nutrimentos así como el agua, debido a la existencia de raíces largas. Lo cual es favorecido por la presencia de la vermicomposta, ya que Treseder (2013), comenta que algunos factores que afectan la existencia de raíces largas es la disponibilidad de nutrientes y la humedad del suelo. Y Náfate (2006), reporto que la vermicomposta aumenta la retención de agua y la disponibilidad de fosforo, además contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que aumenta la solubilización de los nutrientes haciendo que puedan ser fácilmente absorbidos por las raíces y asimilables por las plantas evitando la lixiviación. Asimismo Fateh *et al.* (2011), menciona que la vermicomposta contiene nitrógeno y fosforo, los cuales son los fertilizantes minerales más influyentes para el crecimiento vegetal.

Otro factor podría ser la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos, ya que Mandujano (2006), menciona que favorecen el desarrollo de las especies vegetales. La más baja concentración de fenoles se obtuvo con vermicomposta y roca fosfórica (tratamiento 8). Esta baja concentración posiblemente fue ocasionada porque la roca fosfórica promueve el crecimiento de la planta y no la estimulación de compuestos fenólicos, debido a que el fosforo es un elemento esencial en el crecimiento de la planta, siendo un componente requerido para ácidos nucleicos y fosfolípidos, además de ser fundamental en la transferencia y almacenamiento de energía (Rotaru y Sinclair, 2009). Estos resultados muestran que el HMA con vermicomposta causó un incremento en la síntesis de fenoles, sin embargo la roca fosfórica con roca fosfórica causó el efecto contrario.

En cuanto a la razón por la cual el testigo presento una mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación con el resto de los tratamientos, podría ser ocasionado porque los tratamientos le proporcionaron un ambiente adecuado para su desarrollo, por lo que no presento la necesidad de sintetizar dichos

compuestos, debido a que los fenoles vegetales son generalmente involucrados en la defensa contra radiación ultravioleta o agresión por patógenos, parásitos y predadores (Dai y Mumper, 2010).

En flavonoides totales (cuadro 4) los tratamientos que no presentaron diferencia estadística significativa fueron el HMA, HMA con roca fosfórica y vermicomposta, HMA con vermicomposta, roca fosfórica y vermicomposta con roca fosfórica (tratamientos 1, 3, 4, 5, y 8), presentando diferencia estadística significativa el HMA con RF (tratamiento 2), cuyas muestras fueron las que tuvieron menos contenido de flavonoides, posiblemente por la asimilación de fosforo de la planta, debido a que el HMA incrementa su absorción y a la roca fosfórica que le proporciona una mayor cantidad de fosforo.

Ya que se ha encontrado con Malu'sa *et al.* (2006), reportes donde muestran que la deficiencia de fosforo induce a un incremento en el contenido de antocianina, en cultivos de células de tabaco los niveles de fenoles totales incrementan sustancialmente cuando el medio se agota de fosforo y en investigaciones previas se ha reportado un incremento sigmoideal de fenoles asociado con el tiempo de inanición de fosforo.

Esto podría ser ocasionado al rol de protección y promoción del desarrollo de micorrizas e interacción con bacterias fijadoras de nitrógeno y al tener un estado adecuado de nutrientes la planta no se ve en la necesidad de sintetizar metabolitos como flavonoides, que le proporcionen mayor disponibilidad de nutrientes o relaciones con otros organismos para dicho fin, por lo que el testigo (tratamiento 6) fue el tratamiento con mayor cantidad de fenoles y la vermicomposta (tratamiento 7), que resulto el segundo tratamiento con menos contenido de flavonoides en las hojas. Debido a que la baja producción de flavonoides en el tratamiento de vermicomposta podría ser ocasionada por el contenido de fosforo y nitrógeno que posee la vermicomposta.

Como menciona Mierziak *et al.* (2014), donde encontraron que bajas concentraciones de nitrógeno solido induce a la acumulación de flavonoides, la

cual actúa como atrayentes para diazótrofos, lo que resulta en el transporte de las formas de nitrógeno reducido a las células vegetales.

Cuadro 4. Datos de fenoles totales y flavonoides totales de las hojas de la planta de zarzamora.

Tratamiento	Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹)	Flavonoides totales (mg EQ g ⁻¹)
1. HMA	42.50 ± 1.43 cd	6.89 ± 0.25 bc
2. HMA+RF	43.55 ± 2.77 cd	5.62 ± 0.44 d
3. HMA+RF+V	45.12 ± 0.12 bc	7.52 ± 0.49 ab
4. HMA+V	58.16 ± 3.83 a	7.65 ± 0.34 ab
5. RF	41.86 ± 2.45 cd	6.98 ± 0.02 abc
6. T	50.32 ± 2.90 b	7.83 ± 0.66 a
7. V	46.45 ± 6.16 bc	5.88 ± 1.02 d
8. V+RF	37.10 ± 2.03 d	6.38 ± 0.35 cd
DMS (0.05)	5.73	0.91
<p>Letras iguales dentro de una misma columna denotan que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (P<0.05). HMA, hongo micorrízico arbuscular; RF, roca fosfórica; V, vermicomposta; DMS, diferencia mínima significativa.</p>		

6.3 Actividad antiradical

Como se observó anteriormente en los resultados de fenoles totales el tratamiento de HMA + V fue el más alto (cuadro 4), por lo cual se hubiera podido suponer que estaría correlacionado con una mayor actividad antiradical al contener una mayor cantidad de compuestos fenólicos, sin embargo esto no sucedió. Los efectos ejercidos por los tratamientos en las hojas de zarzamora en cuanto a la actividad antiradical en el tratamiento más alto, más bajo y el testigo no mostraron diferencia estadística mínima significativa (cuadro 5). Esto podría ser ocasionado porque la

actividad antiradical no solo depende de la cantidad de compuestos capaces de neutralizar los radicales libres, sino también de la calidad de estos.

Como menciona Cartea *et al.* 2011, donde encontraron que la capacidad antioxidante de los flavonoides está relacionada con el número y posición de los grupos hidroxilo en la molécula, además de las glicosilaciones que presenta.

También se observó una mayor actividad antiradical de los extractos metanólicos en comparación con el ácido gálico (2.1 µg/ml), probablemente ocasionado por una mayor presencia de compuestos con mayor actividad antiradical en las hojas de zarzamora (cuadro 5).

Cuadro 5. Efectos de los tratamientos en la actividad antiradical de las hojas de la planta de zarzamora.

Tratamiento	Promedio IC50 (µg/ml)
1. HMA + V	0.082 ± 0.006 a
2. RF + V	0.076 ± 0.004 a
3. Testigo	0.072 ± 0.009 a
DMS (0.05)	0.013
Ácido gálico	2.1
<p>Letras iguales dentro de una misma columna denotan que no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (P<0.05). HMA, hongo micorrízico arbuscular; RF, roca fosfórica; V, vermicomposta; DMS, diferencia mínima significativa; IC50, índice de concentración media.</p>	

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

Las plantas de zarzamora suministradas con vermicomposta, hongo micorrízico arbuscular y roca fosfórica no tuvieron efecto estadístico significativo sobre la altura y diámetro del tallo. Sin embargo la roca fosfórica de forma individual promovió mayor altura y diámetro del tallo en comparación con los otros tratamientos.

Respecto a la concentración de fenoles, el tratamiento con hongo micorrízico arbuscular (HMA) y vermicomposta (V) promueve la síntesis de compuestos fenólicos en las hojas de la planta de zarzamora.

En cuanto a la concentración de flavonoides, los tratamientos aplicados no promueven la síntesis de flavonoides en las hojas de la planta de zarzamora.

Respecto a la actividad antiradical, los extractos metanólicos de las hojas de zarzamora no mostraron una correlación positiva entre el contenido de fenoles y flavonoides, sin embargo su actividad antiradical los perfila como una alternativa de interés para su uso como antioxidante natural.

8. RECOMENDACIONES

La experiencia obtenida durante el desarrollo de este trabajo de investigación, aunada a la literatura revisada durante el mismo proceso, permite dar las siguientes recomendaciones:

Para poder conocer el porcentaje en que afecta los tratamientos la colonización del HMA a la raíz sería de gran interés realizar una medición de HMA en las raíces de las plantas y a su vez poder reafirmar la conclusión propuesta en el trabajo respecto a los compuestos fenólicos.

Debido a la relación en deficiencias de fósforo y nitrógeno de la planta con la cantidad de compuestos fenólicos en la misma, sería útil conocer la proporción, por lo cual se sugiere que se proceda a realizar una cuantificación del fósforo y nitrógeno de las plantas, con el fin de obtener una relación y confirmar los resultados obtenidos, o bien una evaluación de las enzimas principalmente involucradas en la síntesis de los fenoles y flavonoides, con el fin de identificar si la concentración de fósforo tiende a afectar dichas enzimas.

En la actividad antiradical la sugerencia de una cromatografía es muy aconsejada para poder analizar la composición de fenoles y flavonoides, y posteriormente evaluar el perfil de dichos metabolitos con la actividad antiradical que presentan.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abadía G.L.G. (2007). Actividad antimicrobiana de flavonoides presentes en extractos de *Acrocomia mexicana*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Tesis Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 8 y 9.

Aguirre J.J.A., Zugasti C.A., Belmares C.R., Aguilar C.N. y Garza T.H.D. (2012). Actividad antioxidante de algunas plantas tropicales, subtropicales y semidesérticas. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 4(7).

Amberger A. y Sing B. (1994). Effect of humic acid substances on solubilization of rock phosphate incubated with wheat straw. In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health. N. Senesi and T.M. Miano (Eds). Pág. 463-466.

Andersen Ø.M. y Markham K.R. (Eds.) (2006). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. USA: Taylor & Francis Group.

Anwar F. y Przybylski R. (2012). Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.). Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria. 11(3), 293-301.

Arévalo L.A., Alegre J.C. y Fasabi R. (2003). Efecto del fósforo sobre el establecimiento del *Centrosema macrocarpum* Benth. Ecología aplicada, 2(1): 93-97.

Ali S., Sahiba, Malik M.A., Hassan F. y Ansar M. (2012). Growth of rainfed fodder maize under different levers of nitrogen and phosphorus. Journal of Agricultural Research. 25(3).

Badui D.S. (2006). Química de los alimentos. Editorial Person Educación, México.

Bagyaraj D.J., Sharma M.P. and Maiti D. (2015). Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Science*. 180(7) 1288-1293.

Barber S.A. (1995). *Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach*. Nueva York, Estados Unidos de América, John Wiley y Sons.

Baziramakenga R. y Simard R.R. (1998). Low molecular weight aliphatic acid content of composted manure. *Journal of Environmental Quality*. 27: 557-561.

Black C.A. (1968). *Soil-plant relationships*. Nueva York, Estados Unidos de América, John Wiley y Sons.

Cartea M.E, Francisco M., Soengas P. y Velasco P. (2011). Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules*. 16: 251-280.

Cerón B.M. (2008). Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora. Tesis Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla.

Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M. y Chern J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drugs Analysis*, 10(3): 178-182.

Chien S.H. (1979). Dissolution of phosphate rock in acid soil as influenced by nitrogen and potassium fertilizers. *Soil Science* 127: 371-376.

Christ M.J. y Davies M.B. (1996). Temperature and moisture effects on the production of dissolved organic carbon in a spodosol. *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1191-1199.

Dai J. y Mumper R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.

De Freitas J.R., Banerjee M.R. y Germida, J.J. (1997). Phosphate solubilizing rhizobacterias enhance the growth and yield but not phosphorus uptake by canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*. 24: 358-364.

Duran U.L., Henríquez H.C. (2010). El vermicompost: Su efecto en algunas propiedades del suelo y la respuesta a la planta. *Agronomía mesoamericana*. 21 (1): 85-93.

Escalona J.C.A., Villalón C.R., Rodón L.P., Escudro M.M. y Pérez R.R. (2001). Estudio de la acumulación de flavonoides en las hojas de una población de *Tamarindus indica* L. *Revista cubana de química*. 13: 3.

Fateh E., Rengel Z., Chaichi M. y Sepehr E. (2011). Differential capacity of wheat, lupin and subterranean clover to acquire P from different sources. *Australian Journal of Crop Science*. 5(7): 899-903.

FAO (1984). Fertilizer and plant nutrition guide. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* N° 9. Rome.

FAO (1995). Integrated plant nutrition systems, by R. Dudal y R.N. Roy, eds. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* N° 12. Rome.

Figuroa M.S. y Gutiérrez F.M. (2009). Experiencias con biofertilizantes en cultivos de importancia en el estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: UNACH. Pag. 14 - 26.

Flancy C. (2003). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos* (2ed.). (Gómez A.L., Quevedo J.M., Vicente A.M. y Cenzano A.M, Trads) París: Mundi-Prensa.

Fox T.R., Comerford N.B. y McFee W.W. (1990). Phosphorous and aluminium from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Science Society American Journal*. 54: 1763-1767.

Gerke J., Beissner L. y Römer W. (2000). The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxilate anions on P uptake by a single root. I. The basic concept and determination of soil parameters. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163: 207-212.

Gómez M.R. y Vélez Á.T. (2008). Uso de microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de la mora. Colombia: Produmedios. Pág. 11 - 13.

Gutiérrez M.A. (2002). Té: Polifenoles y Protección a la Salud. *Medicentro*. 6(4).

He Z.L., Baligar V.C., Martens D.C. y Ritchey K.D. (1997). Effect of phosphate rock, lime and cellulose on soil microbial biomass in acidic forest soil and its significance in carbon cycling. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 329-334.

Hernández G.M. (2013). Actividad antioxidante y antiradical de extractos de zacate limón. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Tesis Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 9 y 10.

Ibrahim M.H. y Jaafar H.Z.E. (2012). Reduced Photoinhibition Under Low Irradiance Enhanced Kacip Fatimah (*labisia pumila Benth*) Secondary Metabolites, Pheny Alanine Lyase and Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Science*. 13: 5290-5306.

Jiménez C.I.E., Martínez E.Y.C y Fonseca L.G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. 52(2).

Kamprath E.J. (1970). Exchangeable aluminum as a criterion for liming leached mineral soils. Soil Science Society American Proceedings. 34: 252–254.

Khasawneh F.E y Doll E.C. (1978). The use of phosphate rock for direct application to soils. Advances in Agronomy. 30: 159-206.

Khoddami A., Wilkes M. A. y Roberts T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules. 18: 2328-2375.

León A.E., Abud A.M., Dendooven L., Ventura C.L.M.C. y Gutiérrez M.F.A. (2011). Effect of vermicompost, worm-bed leachate and arbuscular mycorrhizal fungi on lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) growth and composition of its essential oil. Electronic Journal of Biotechnology.

Malu'a E., Russo M.A., Mozzetti C. y Belligno A. (2006). Modification of Secondary Metabolism and Flavonoid Biosynthesis Under Phosphate Deficiency in Bean Roots. Journal of Plant Nutrition. 29: 245-258.

Mandujano D.G. (2006). Producción de vermicomposta y ácido húmico usando suero de leche estiercol de vaca y rastrojo de maíz. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Tesis Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 5 - 8.

Márquez G.E. y García V.Y. (2007). Colorantes naturales de origen vegetal. Ciencia y tecnología de alimentos. 17: 1.

Marschner H. (1993). Mineral nutrition of higher plants. Londres, Academic Press Ltd., Harcourt Brace y Co. Publishers.

Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S. y Leitão S.G. (2001). Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*. 15: 127-130.

Mierziak J., Kostyn K. y Kulma A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plants Interactions with Environment. *Molecules*. 19: 16240-16265.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.

Morales M.C. y Box J.M. (2005). *Prontuario de agricultura*. Madrid, España: Mundi – Prensa. Pág. 822-824.

Náfate M.C.C. (2006). Vermicompostas de Excretas de borrego como suplemento del suelo para mejorar el crecimiento, rendimiento y calidad del tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad Rio Grande. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Tesis Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 17 – 21.

Nascimento L.B.S., Leal C.M.V., Coutinho M.A.S, Moreira N.S., Lage C.L.S, Barbi N.S., Costa S.S y Tavares E.S. (2013). Increased Antioxidant Activity and Changes in Phenolic Profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) Specimens Grown Under Supplemental Blue Light. *Photochemistry and Photobiology*. 89: 391-399.

Noda Y. (2009). Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. *Pastos y Forrajes*. 32(2): 105 -118.

Pérez L.Y. del C. (1998). Evaluación de cepas de hongos Micorrízicos va en Maíz, botil y chilacayote a nivel invernadero. Tuxtla Gutiérrez, Proyecto de Investigación: Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 4-10.

Proestos C. y Komaitis M. (2006). Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *Journal of Food Quality*. 29: 567-582.

Ramirez R. (2006). Eficiencia del uso del fosforo de la roca fosfórica por cultivares de Maiz. *INCI*. 31(1): 45-49.

Robledo O., Grosso E., Zoppolo R., Lercari D. Y Etchebehere C. (2010). Producción de tomate y dinámica microbiología del suelo de invernáculo al aplicar vermicompostas. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 14(1): 35-51.

Rotaru V. y Sinclair T.R. (2009). Influence of plant phosphorus and iron concentrations on growth of soybean. *Journal of Plant Nutrition*. 32: 1513-1526.

Sahn S.N. y Jana B.B. (2000) Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. *Ecological Engineering*. 15: 27-39.

Sanctis F.D., Sandri S., Ferrarini G., Pagliarello I., Sartoris S., Ugel S., Marigo L., Molon B. y Bronte V. (2014). The emerging immunological role of post-translational modifications by reactive nitrogen species in cáncer microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 5(69).

Saxena R., Venkaiah K., Anitha P., Venu L. y Raghunath M. (2007). Antioxidant Activity of Commonly Consumed Plant Foods of India: Contribution of Their Phenolic Content. *International journal of Food Sciences and Nutrition*. 58(4): 250-260.

Seguel F.A. (2014). El potencial de las micorrizas arbusculares en la agricultura desarrollada en zonas áridas y semiáridas. *IDESIA (Chile)*. 32(1): 3-8.

Sejali S.N.F. y Anuar M.S. (2011). Effect of drying methods on phenolic contents of neem (*Azadirachta indica*) leaf powder. *Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants*. 17: 119–131.

Silvano J.L.L. (2010). Capacidad Competitiva de hongos micorrizicos. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Memoria de residencia profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Pág. 12 - 13.

Singleton V., Orthofer R. y Lamuela R.R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299: 152-178.

Tajalli F. (2014). Evaluation of Antiradical Activity Grape seeds and Olive (*Olea europea*) Pits Extracts. *Journal of Scientific Research*. 6(1): 185-190.

Treseder. K.K. (2013). The extent of mycorrhizal colonization of roots and its influence on plant growth and phosphorus content. *Plant Soil*. 371: 1-13.

Tan K. (1986). Degradation of soil minerals by organic acid. In: Interaction of soil minerals with natural organic and microbes *SSSA Spec*. 17: 1-17.

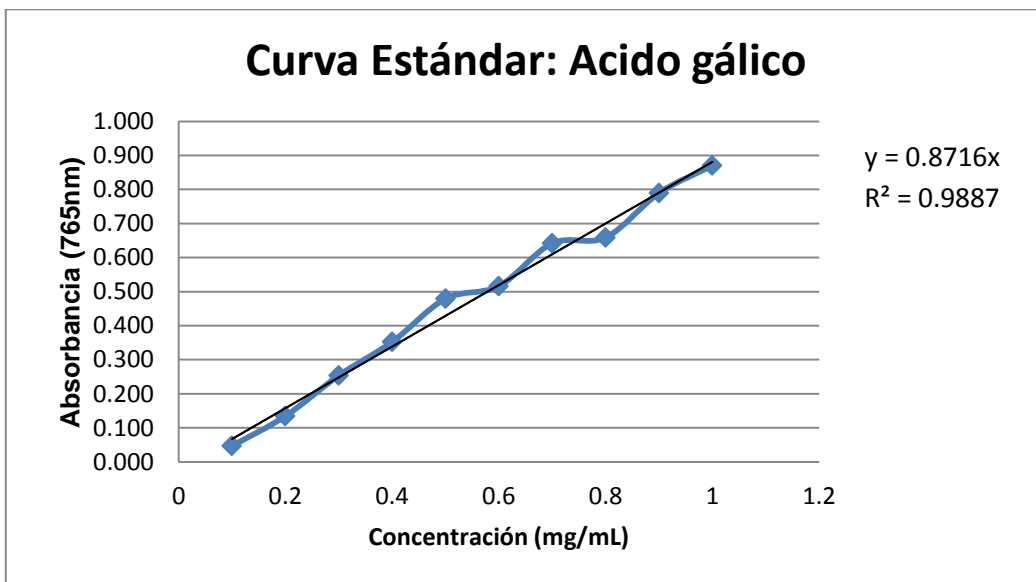
Velasco J.V., Cerrato R.F. y Suárez J.J. (2001). Vermicomposta, Micorriza Arbuscular y *Azospirillum Brasilense* en Tomate de Cáscara. *Terra Latinoamérica*. 19(3): 241 - 248.

Weidner S., Powalka A., Karamać M. y Amarowicz, R. (2012). Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines—Comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 3444–3457.

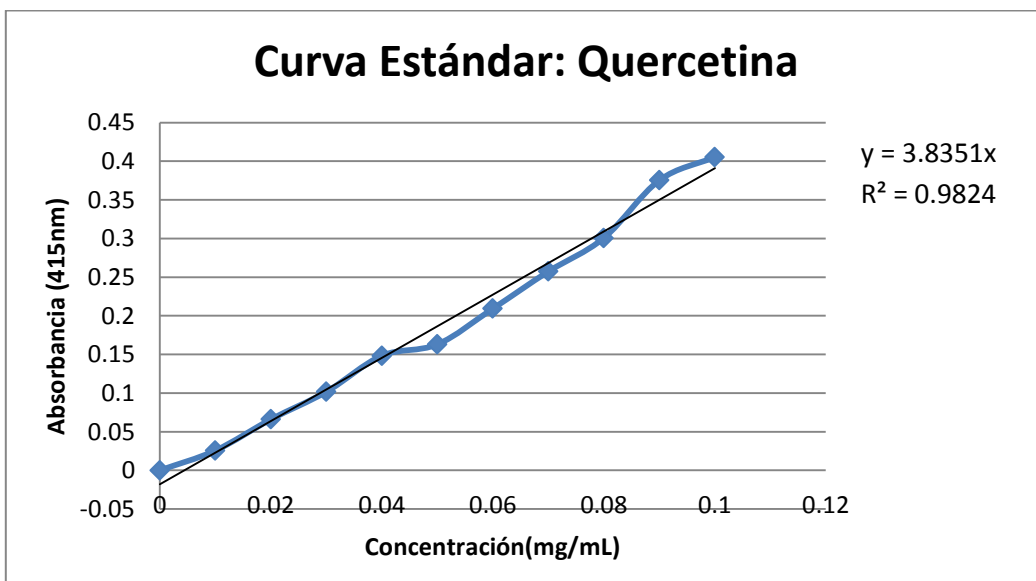
Zhang K., Li Z., Zhu S. y Weng Q. (2014). Co- γ Irradiation Affects the Enzymatic Antioxidant System of the Citrus Red Mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Molecules*. 19: 6382-6392.

Anexos

ANEXO I. Curva estándar de ácido gálico (Método de Folin Ciocalteu):
Cuantificación de Fenoles Totales.



ANEXO II. Curva estándar de Quercetina (Método de tricloruro de aluminio):
Cuantificación de flavonoides.



ANEXO III. Curva de actividad antirradical de ácido gálico (Método de Actividad antirradical mediante el radical DPPH): Cuantificación de actividad antirradical.

