



**Benemérita  
Universidad Autónoma de Puebla**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS  
OBTENIDOS A PARTIR DE X´KIJIT (*Renealmia  
alpina*), EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*),  
CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens  
(Schltdl) Schiede ex Standl*) Y CANCERINA  
(*Hippocratea excelsa*) SOBRE *Colletotrichum  
sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* Y  
*A. wentii*”**

**TESIS PROFESIONAL**

**Que para obtener el Título de:**

**Licenciatura en Ingeniería en Alimentos**

**Presenta:**

**LIZBETH ROSAS ORDOÑEZ**

**Director de Tesis Interno:**

**Dra. Ma. Lorena Luna Guevara**

**Puebla, Pue. Junio 2016**



**BUAP**

Oficio No. FIQ/AC/1103/2015  
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. ROSAS ORDOÑEZ LIZBETH  
PASANTE DE LA LICENCIATURA  
EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo título es el siguiente:

“POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE X'KIJIT (*Renealmia alpina*), EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*), CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl) Y CANCERINA (*Hippocratea excelsa*) SOBRE *Colletotrichum sp.* Y *Fusarium oxysporum*”

Con el siguiente contenido:

**INTRODUCCIÓN**

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>ANTECEDENTES</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>METODOLOGÍA</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>

**CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

**ATENTAMENTE**  
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”  
H. Puebla de Z., 07 de octubre del 2015

**M.I.C. MA. GPE. TITA VAZQUEZ E. DE LOS MONTEROS  
SECRETARIA ACADÉMICA**



C.c.p Director de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara  
Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad  
de Ingeniería  
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San  
Manuel, Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00  
Ext. 7250 y 7251

## Índice de contenido

I. Introducción .....	3
II. Objetivos .....	5
III. Hipótesis .....	5
Capítulo 1. Marco Teórico .....	6
1.1. Agentes fúngicos .....	6
1.1.1. Relevancia de las micotoxinas en la seguridad alimentaria..	6
1.1.1.2. <i>Fusarium</i> .....	9
1.1.1.3. <i>Colletotrichum</i> .....	10
1.1.1.4. <i>Aspergillus</i> .....	11
1.1.2. Modelos de crecimiento microbiano .....	12
1.2. Agentes antifúngicos.....	13
1.2.1. Clasificación de los fungicidas.....	15
1.2.1.1 Polienos.....	18
1.2.1.2. Triazoles.....	18
1.2.1.3. Fungicidas Qol.....	19
1.2.1.4. Benzimidazoles.....	21
1.2.2. Fungicidas y su toxicidad.....	21
1.3 Plantas con potencial antifúngico.....	22
1.3.1 X´kijit ( <i>Renealmia alpinia</i> ).....	25
1.3.1.1 Características Taxonómicas.....	25
1.3.1.2 Antecedentes.....	25
1.3.1.3 Propiedades antimicrobianas.....	26
1.3.2. Eucalipto.....	26
1.3.1.1 Características Taxonómicas.....	27
1.3.1.2 Antecedentes.....	27
1.3.1.3 Propiedades antimicrobianas.....	27
1.3.3. Cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl)	28
<i>Schiede ex Standl</i> ).....	29
1.3.1.1 Características Taxonómicas.....	29

1.3.1.2 Propiedades antimicrobianas.....	29
1.3.4. Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> HBK).....	29
1.3.4.1 Características Taxonómicas.....	30
1.3.4.2 Propiedades antimicrobianas .....	30
1.4 Métodos de extracción .....	31
1.5 Métodos de emulsificación y dispersión.....	33
1.5.1. Importancia de la sonicación como proceso de emulsificación. ....	34
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	36
2.1. Obtención y selección del material vegetal .....	37
2.2. Preparación del material vegetal.....	37
2.3. Obtención de extractos.....	37
2.4. Preparación de los sistemas modelo.....	38
2.4.1. Cultivos fúngicos.....	39
2.4.2. Inoculación.....	39
2.5. Mediciones de crecimiento radial: variaciones en la fase Lag, velocidad de crecimiento radial e índice de inhibición de crecimiento del micelio.....	39
2.6. Sistemas Modelo.....	40
2.7. Análisis Estadístico.....	40
Capítulo 3. Discusión de resultados	
3.1. Rendimientos de extractos.....	41
3.2. Actividad antifúngica .....	41
3.2.1. Sistemas Modelo con Extracto de X´kijit ( <i>Renealmia alpinia</i> ).....	42
3.2.2. Sistemas Modelo con Extracto de Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> ).....	46
3.2.3. Sistemas Modelo con Extracto de cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl</i> ).....	50
3.2.4. Sistemas Modelo con Aceite Esencial de Eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ).....	53
3.2.5. Sistemas Modelo adicionados Aceite Esencial de	

Eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) homogenizados mediante sonicación .....	57
3.3. Índice de inhibición.....	64
IV. Conclusiones.....	70
V. Anexo 1.....	71

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Estructura química de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV).....	9
<b>Figura 2</b> Pudrición de melón causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> .....	10
<b>Figura 3</b> Tejidos de diversas fuentes vegetales dañados por especies de <i>Colletotrichum</i> .....	11
<b>Figura 4</b> Curva de crecimiento de un microorganismo (Hernandez, 2013 ).....	13
<b>Figura 5</b> Estructura de la célula fúngica donde ER es el retículo endoplasmático, Gt es el aparato de Golgi, M es mitocondrias, N es núcleo, V es vesículas y Vac es vacuola junto con algunos ejemplos de los inhibidores de sitio específico y los inhibidores de sitio múltiple.....	16
<b>Figura 6</b> Estructura de la amfotericina B.....	18
<b>Figura 7</b> Isómeros químicos del triazol.....	19
<b>Figura 8</b> La estructura química básica de estrobilurinas. El residuo de $\beta$ -metoxiacrilato se resalta con un círculo y el oxígeno del carbonilo responsable de la unión se indica por una flecha. R1 y R2 representan radicales que son distintos en las diferentes estrobilurinas de origen natural.....	19
<b>Figura 9</b> La estructura química de la fenamidona. El residuo toxóforo se resalta con un círculo y el oxígeno del carbonilo responsable de la unión se indica por una flecha.....	20
<b>Figura 10</b> La estructura química básica de los bencimidazoles.....	21
<b>Figura 11</b> Estructura de los compuestos fenólicos de origen natural con actividad microbiana .....	24
<b>Figura 12</b> Planta y frutos de <i>R. alpinia</i> .....	25
<b>Figura 13</b> Capullos, cápsulas, las flores y el follaje de <i>Eucalyptus</i> .....	26
<b>Figura 14</b> Estructura química del eucaliptol.....	28
<b>Figura 15</b> Imagen del árbol y corteza del cuachalalate.....	28
<b>Figura 16</b> Tallo (izquierda) y raíz seca (derecha) de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	30
<b>Figura 17</b> Esquema de equipo de hidrodestilación.....	33

<b>Figura 18</b> Preparacion de nanoemulsiones por varios metodos de emulsificación de baja y alta energia (Preedy, 2015).....	34
<b>Figura 19</b> Preparación general de nanoemulsiones por tecnica de sonicación (Preedy, 2015).....	35
<b>Figura 20</b> Diagrama general del trabajo.....	36
<b>Figura 21</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de X´kijit ( <i>Renealmia alpinia</i> ) a concentración de 200 ppm.....	43
<b>Figura 22</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de X´kijit ( <i>Renealmia alpinia</i> ) a concentración de 500 ppm.....	44
<b>Figura 23</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de X´kijit ( <i>Renealmia alpinia</i> ) a concentración de 800 ppm.....	45
<b>Figura 24</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> ) a concentración de 200 ppm.....	47
<b>Figura 25</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> ) a concentración de 500 ppm.....	48
<b>Figura 26</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina ( <i>Hippocratea excelsa</i> ) a concentración de 800 ppm.....	49
<b>Figura 27</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltld) Schiede ex Standl) a concentración de 200 ppm.....	51
<b>Figura 28</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltld) Schiede ex Standl) a concentración de 500 ppm.....	52
<b>Figura 29</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltld) Schiede ex Standl) a concentración de 800 ppm.....	53
<b>Figura 30</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) a concentración de 200 ppm.....	54
<b>Figura 31</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii.</i> (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) a concentración de 500 ppm.....	55
<b>Figura 32</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A),	

<i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) a concentración de 800 ppm.....	56
<b>Figura 33</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) con 60 s de sonicación a concentración de 200 ppm.....	58
<b>Figura 34</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) con 60 s de sonicación a concentración de 500 ppm.....	59
<b>Figura 35</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) con 60 s de sonicación a concentración de 800 ppm.....	60
<b>Figura 36</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) con 90 s de sonicación a concentración de 200 ppm.....	62
<b>Figura 37</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) con 90 s de sonicación a concentraciones de 500 ppm.....	63
<b>Figura 38</b> Cinética de crecimiento radial (en mm <sup>2</sup> ) de <i>Fusarium oxysporum</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B), <i>Aspergillus niger</i> (C) y <i>A. wentii</i> . (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> ) a con 90 s de sonicación concentraciones de 800 ppm.....	64
<b>Figura 39</b> Intervalos del índice de inhibición de cada hongo con concentraciones de 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm.....	67
<b>Figura 40</b> Intervalos del índice de inhibición de cada tratamiento con extracto de X'kijit (1), cancerina (2), cuachalalate (3), aceite esencial de eucalipto (4), aceite esencial de eucalipto más 60s de sonicación (5), aceite esencial de eucalipto mas 90 s de sonicación (6) a las concentraciones de 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm.....	68
<b>Figura 41a</b> Tratamientos en <i>F. oxysporum</i> a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm.....	71
<b>Figura 41b</b> Tratamientos en <i>F. oxysporum</i> a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm. *TS1 (60s de sonicación) **TS2 (90s de sonicación).....	72
<b>Figura 42</b> Tratamientos en <i>Colletotrichum sp.</i> a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm. *TS1 (60s de sonicación) **TS2 (90s de sonicación).....	73
<b>Figura 43</b> Tratamientos en <i>A. wentii</i> a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm. *TS1 (60s de sonicación) **TS2 (90s de sonicación).....	74

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales condiciones de contaminación fúngica en frutas y vegetales, agentes etiológicos y productos típicamente afectados.....	8
<b>Tabla 2.</b> Grupos químicos de fungicidas y sus nombres genéricos.....	17
<b>Tabla 3.</b> Principales fungicidas QoI utilizados como productos fitosanitarios.	20
<b>Tabla 4</b> Componentes con Actividad antimicrobiana encontrada en plantas, hierbas y especias.....	23
<b>Tabla 5</b> Métodos de extracción en plantas del continente Americano.....	32
<b>Tabla 6.</b> Métodos y condiciones de extracción.....	37
<b>Tabla 7.</b> Diseño experimental completamente al azar.....	40
<b>Tabla 8.</b> Rendimiento de extractos metanólicos y acuosos.....	41
<b>Tabla 9.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag para los controles.....	42
<b>Tabla 10</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 200ppm.....	43
<b>Tabla 11.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 500ppm.....	44
<b>Tabla 12.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 800ppm.....	45
<b>Tabla 13.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 200ppm.....	47
<b>Tabla 14.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 500ppm.....	49
<b>Tabla 15.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 800ppm.....	49
<b>Tabla 16.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 200ppm.....	51
<b>Tabla 17.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 500ppm.....	52
<b>Tabla 18.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 800ppm.....	53
<b>Tabla 19.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de	

eucalipto a 200ppm.....	54
<b>Tabla 20.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de eucalipto a 500 ppm.....	56
<b>Tabla 21.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de eucalipto a 800 ppm.....	57
<b>Tabla 22.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 200ppm.....	58
<b>Tabla 23.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 500ppm.....	59
<b>Tabla 24.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 800ppm.....	60
<b>Tabla 25.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 200ppm.....	62
<b>Tabla 26.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 500ppm.....	63
<b>Tabla 27.</b> Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 800ppm.....	64
<b>Tabla 28</b> Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 200 ppm.....	66
<b>Tabla 29</b> Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 500 ppm.....	66
<b>Tabla 30</b> Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 800 ppm.....	66

## Resumen

La composición general de diversas plantas y vegetales los hace susceptibles a contaminación de microorganismos; uno de los principales agentes fitopatógenos son los hongos, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *A. wentii* y son de alto impacto en la inocuidad alimentaria a nivel mundial, por lo que su control e inhibición es de relevancia durante la pre y pos cosecha. Una alternativa más "natural" para su control es la implementación de extractos de plantas con antecedentes de actividad antimicrobiana, algunas nativas del estado de Puebla son X'kijit (*Renealmia alpinia*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*).

En el presente trabajo el material vegetal que se empleó fue secado previamente para someterse a una extracción con metanol y maceración, en el caso particular del eucalipto se utilizó la hidrodestilación como método de extracción para posteriormente ser homogenizados por sonicación.

Los extractos fueron incorporados al medio de cultivo en concentraciones de 200, 500 y 800 ppm mismos que fueron inoculados por los respectivos hongos, los cultivos se midieron para obtener la velocidad máxima de crecimiento radial, tiempo Lag e índice de inhibición.

Los resultados indicaron un mayor potencial antifúngico por parte del extracto de X'kijit debido a que afectó a *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* disminuyendo su velocidad máxima de crecimiento en un 15 y 11% respectivamente y en *Colletotrichum sp* incremento su tiempo Lag en un 91% en la concentraciones de 800 ppm; de igual forma se obtuvieron resultados relevantes con el tratamiento con aceite esencial de eucalipto emulsionado con 60 s de sonicación, el cual disminuyó la velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 79% y sobre *Colletotrichum sp.* en un 66% su velocidad máxima de crecimiento en la concentraciones de 800 ppm. En el caso de las cepas fúngicas *Colletotrichum sp.* fue la más susceptible debido a que con la mayoría de los

tratamientos probados se inhibió en un 70% o más, por su parte *Aspergillus niger* fue aquella con mayor resistencia ya que con las mayores concentraciones de los extracto se logro una máxima inhibición del 11%.

Los resultados obtenidos con los extractos de X'kijit y aceite esencial de eucalipto emulsionado con 60 s de sonicación representa una alternativa para poder ser probados *in vivo* en tratamientos post cosecha de frutas y hortalizas. Además del posterior estudio de ciertos compuestos contenidos en los extractos evaluados y demostrar su efectividad.

## I. Introducción

Las frutas y hortalizas son productos perecederos, susceptibles a contaminación de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, los cuales, de acuerdo con Herrera-Estrella y Carsolio (1998) pueden provocar grandes pérdidas en la producción de vegetales. Aunado a esto, los hongos son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, conocidas como micotoxinas, que pueden llegar a ser perjudiciales, aun cuando se encuentran en concentraciones muy bajas, afectando la inocuidad de los productos alimentarios (Trigos *et al.*, 2008). Datos revelan que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxina (Bhat y Vasanthi, 1999; Gómez-Ayala, 2007), lo cual representa un gran riesgo para la salud de la población de países importadores que no controlan estos contaminantes en alimentos. Especies de *Penicillium*, *Aspegillus* así como *Fusarium* han mostrado producción de micotoxinas en productos derivados de manzanas, cebollas, tomates entre otros productos frescos (Baert *et al.*, 2006; Velez-Rodriguez y Rivera-Vargas, 2007). Por su parte *Fusarium* y *Colletotrichum* son catalogados como unos de los más importantes géneros de hongos patógenos en cultivos de frutales, ornamentales y hortalizas (Kyanko *et al.*, 2010),

Actualmente existen diversos productos antifúngicos en el mercado; sin embargo, muchos de estos tienen una formulación a base de metales, como el cobre y el mercurio. Estas sustancias a pesar de sus beneficios son una fuente de contaminación química ya que se pueden mantenerse en niveles considerables en los alimentos (Vázquez, 2001).

Por su parte el uso de agentes antimicrobianos sintéticos en alimentos ha sido fuertemente discutido durante décadas, marcando una tendencia creciente por la demanda de productos con cantidades mínimas en aditivos (incluyendo conservadores antimicrobianos) y o bien utilizar antimicrobianos "naturales" (López-Malo *et al.*, 2000). Estudios actuales han demostrado que plantas, hierbas y especies así como sus aceites esenciales y compuestos aislados, contienen

sustancias conocidas como agentes inhibitorios de varias actividades metabólicas de bacterias, levaduras y hongos (López-Malo *et al.*, 2000). Debido a que su origen es "natural" y en su mayoría son sustancias generalmente reconocidas como seguras, se ha valorado en los últimos años su aplicación como método de conservación o medio de control de agentes patógenos en frutas y hortalizas. Cabe recalcar que su utilización implica una reducción en la incorporación de compuestos químicos "tóxicos" en alimentos.

Hoy en día existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control como son los agentes fúngicos de origen natural, ya que con esto se minimiza en gran medida las afectaciones a la inocuidad de los alimentos y se proporciona productos que satisfacen las nuevas necesidades y tendencias de los consumidores sobre productos más sanos y con menor contenido de aditivos sintéticos o nocivos para la salud.

Una alternativa clara en México implica el aprovechamiento de la diversidad de la flora con la que cuenta, y que, mediante su aplicación en la medicina tradicional se ha demostrado que presentan actividad biológica antibacteriana y antifúngica (Ghasemi-Pirbalouti *et al.*, 2009). De ahí que su aplicación como de extracto y su valoración con actividad fungicida.

El X'kijit (*Renealmia alpinia*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) han demostrado producir una gran variedad de compuestos con propiedades antimicrobianas. Es por ello la posibilidad de presenten actividad antifúngica y representen una alternativa de origen natural para el desarrollo de antimicrobianos aplicables en alimentos.

## II. Objetivos

### General:

Evaluar la actividad antifúngica de extractos obtenidos a partir de especies vegetales X'kijit (*Renealmia alpinia*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*).

### Específicos:

- Obtener extractos mediante diferentes procedimientos de extracción con el uso de solventes (X'kijit, cuachalalate y cancerina) e hidrodestilación (eucalipto) y evaluar su rendimiento.
- Evaluar la actividad antifúngica sobre *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *A. wentii* con diferentes concentraciones de extractos en sistemas modelo (200, 500 y 800 ppm).
- Evaluar la efectividad de los agentes antifúngicos en función de las variables de crecimiento como velocidad máxima de crecimiento radial, tiempo Lag e índice de inhibición del crecimiento del micelio.

## III. Hipótesis

Se presentarán diferentes potenciales antifúngicos en los extractos a partir de X'kijit (*Renealmia alpinia*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) sobre los mohos en estudio.

## **Capítulo 1. Marco Teórico**

### **1.1. Agentes fúngicos**

La composición general de diversas plantas y vegetales se encuentra en un rango del 72 al 95 % de agua (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008), 8.6% de carbohidratos, 1.9% de proteínas, 0.3% de lípidos y 0.84% de cenizas. Desde el punto de vista del contenido de nutrientes, las frutas y vegetales son susceptibles al crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, y como consecuencia, pueden ser contaminados por algunos de estos microorganismos; es por ello que los cultivos y cosechas son atacados por un gran número de patógenos que causan varios tipos de pérdidas en rendimiento incluyendo manchas en los productos frescos o la pudrición completa. Aunado a ello en algunos sistemas, los patógenos de plantas son difíciles de manejar porque sus poblaciones varían en el tiempo, el espacio y el genotipo (Ivic, 2010).

Los agentes fúngicos son unos de los contaminantes más comunes en frutas y vegetales; ellos son los agentes causales de numerosas enfermedades y contaminaciones causando pérdidas en todo el mundo debido a que han desarrollado mecanismos muy eficientes para efectuar una infección, crecer, multiplicarse y propagarse en períodos muy cortos de tiempo (Ivic, 2010). Algunos de los más géneros más significativos en el deterioro de vegetales se presentan en la Tabla 1. Asimismo la razón por la cual los agentes fúngicos son tan patogénicos es debido a que la mayoría producen varias clases de esporas, que entran en contacto con tejido de la planta, germinan, y penetran en la planta durante el proceso de infección. Después de la infección, los hongos siguen creciendo como micelio en o sobre órganos de la planta, donde producen sus nuevas estructuras vegetativas o generativas para su propagación (Ivic, 2010).

#### **1.1.1. Relevancia de las micotoxinas en la seguridad alimentaria**

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos, los cuales cuando son ingeridos, inhalados, o bien absorbidos a través de la piel, pueden causar intoxicaciones o incluso la muerte en humanos. Algunas de las micotoxinas de importancia son las

producidas por especies de hongos como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* ya que son tóxicas para los seres humanos y la mayoría son químicamente estables y/o sobreviven el tratamiento térmico prolongado (Soriano del Castillo, 2007).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas pueden ser significativos y variados dependiendo de la toxina, dosis, anfitrión y matriz del alimento en cuestión. Estos efectos incluyen:

- Carcinogenicidad (que causan cáncer), especialmente en el hígado
- Hepatotoxicidad (daño hepático)
- Mutagenicidad (cambios en el ADN)
- Otros efectos tóxicos incluyen enfermedad renal, immuno-supresión y alteración de los sistemas nervioso y hormonal (Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas son responsables de los brotes y muertes en todo el mundo cada año y a lo largo de la historia han sido responsables de una gran cantidad de epidemias en humanos y animales. Por ejemplo la toxina alimentaria *aleukia*, causada por la T-2 toxina producida por *Fusarium sporotrichioides* en granos, fue responsable de la muerte de al menos 100,000 rusos entre 1942 y 1948. Por su parte estudios recientes de Víctor-Ortega *et al.* en 2013 evidencian de que aún se presentan niveles elevados de patulina, micotoxina producida por especies del hongo *Penicillium*, en jugos de manzana comerciales así como otros de sus derivados (Baert *et al.*, 2006); asimismo se han reportado la presencia de micotoxinas de especies de *Alternaría* en diversos productos frescos como manzanas, tomates, frutos cítricos y olivos (EFSA, 2011). Por su parte Velez-Rodriguez y Rivera-Vargas, (2007); Monbaliu *et al.* (2009) y Degraeve *et al.*,(2015) reportan cebollas y pimientos contaminadas por *Aspegillus* y diversas especies de *Fusarium*, este último se asoció con la producción de micotoxinas FB1, FB2, DON, ZEA, toxina T-2 y HT-2.

**Tabla 1.** Principales condiciones de contaminación fúngica en frutas y vegetales, agentes etiológicos y productos típicamente afectados

<b>Condición de contaminación</b>	<b>Agente Etiológico</b>	<b>Productos típicamente afectados</b>
Pudrición por <i>Alternaria</i>	<i>A. tenuis</i>	Frutos cítricos
Antracnosis (podredumbre amarga)	<i>Colletotrichum musae</i>	Bananas
Antracnosis	<i>C. lindemuthianum</i> <i>C. lagenarium</i>	Frijoles Sandias
Podredumbre negra	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria</i>	Cebollas, coles
Podredumbre por mohos azul	<i>Penicillium digitatum</i>	Frutos cítricos
Podredumbre por <i>Cladosporium</i>	<i>C. herbarum</i>	Duraznos, cerezas
Pudrición de la corona	<i>Colletotrichum musae</i> <i>Fusarium roseum</i>	Plátanos
	<i>Verticillium theobromae</i> <i>Ceratocystis paradoxa</i>	
Podredumbre seca	<i>Fusarium spp.</i>	Uvas
Podredumbre de molde gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Uvas
Podredumbre de molde verde	<i>Penicillium digitatum</i>	Frutos cítricos
Podredumbre de lenticel	<i>Cryptosporiopsis malicorticis</i> , <i>Phylctaeana vagabunda</i>	Manzanas, peras
Podredumbre negra de piña	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Piñas
Podredumbre phytophthora	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Vegetales
Podredumbre de molde rosa	<i>Trichothecium roseum</i>	Vegetales
Podredumbre por <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Papas dulces, tomates
Podredumbre parda viscosa	<i>Rhizoctoria spp</i>	
"Carbon" (podredumbre de moho negro)	<i>Aspergillus niger</i>	Duraznos, albaricoque
Pudrición ácida	<i>Geotrichum candidum</i>	Tomates, frutos cítricos
Pudrición del pedúnculo	<i>Phomopsis citri</i> , <i>Diplodia natalensis</i> , <i>Alternaria citri</i>	Frutos cítricos
Pudrición acuosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Zanahorias
Costra de trigo	<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, cebada
Huitlacoche	<i>Ustilago maydia</i>	Maíz
Tizón del arroz	<i>Magnaporthe grisea</i>	Arroz
Tizón de la papa	<i>Phytophthora infestans</i>	Papas
Plaga	<i>cinnamomi</i>	Árbol de castañas
Pudrición de la raíz	<i>sojae</i>	Frijoles de soya
Muerte repentina del árbol	<i>ramorum</i>	Árbol de roble

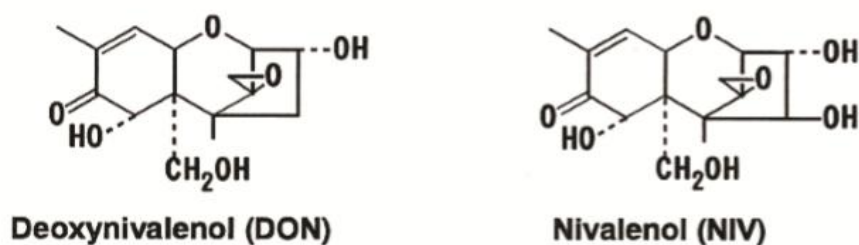
Fuente. Jay *et al.*, 2005

Para comprender mejor el nivel de incidencia e impacto que tienen ciertas especies de hongos sobre la inocuidad de los alimentos, se describen a continuación algunas de ellas y sus principales características.

### 1.1.1.2. *Fusarium*

El género *Fusarium* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo además de que persiste en residuos del suelo, de la planta y materia orgánica. El género incluye un grupo amplio y complejo de hongos de numerosas especies teleomorfas y ascomicetos que producen metabolitos secundarios nocivos (Shabani *et al.*, 2014).

Especies de *Fusarium* producen micotoxinas FHB tales como: deoxinivalenol (DON) y el nivalenol (NIV) que son tóxicos para los seres humanos y otros animales (Fig. 1). Por lo que el Comité Conjunto OMS / FAO de Expertos en Aditivos Alimentarios evaluaron el riesgo de DON y estableciendo una ingesta diaria tolerable máxima provisional de 1 mg/kg de peso corporal en 2001. Las medidas tomadas para su control se debe a que estas toxinas tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas mediante su unión a los ribosomas, un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN y ARN, y efectos tóxicos sobre las membranas celulares. Además, puede inducir apoptosis en el timo linfático, tejido hematopoyético a través de la proteína quinasa. Alimentos contaminados con tales toxinas pueden dar lugar a una intoxicación alimentaria grave acompañado de náuseas, vómitos y diarrea y generar inmunotoxicidad, que es un efecto crónico de micotoxinas, que disminuye la resistencia del huésped, además de estar acompañado de efectos promotores del cáncer.



**Figura 44** Estructura química de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV)

En forma particular *Fusarium oxysporum* es considerado por la como el quinto hongo de importancia patogénica (Dean *et al.*, 2012) y ha sido causante de diversos problemas como el daño a la producción bananera de Taiwán en 1970 (Smith, 2007), una de las afectaciones típicas de este hongo es sobre el melón como se puede observar en la Figura 2.



**Figura 45** Pudrición de melón causada por *Fusarium oxysporum* sp. *melonis*

#### **1.1.1.3. *Colletotrichum***

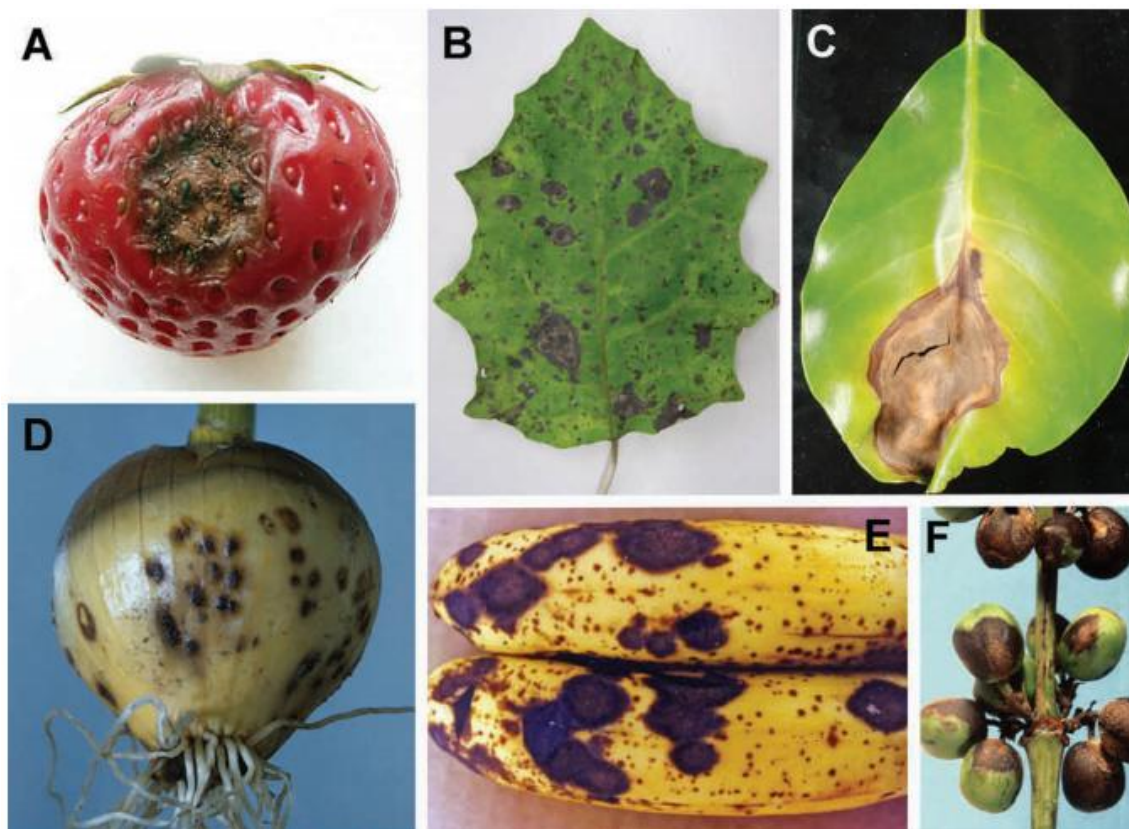
El género *Colletotrichum* incluye un número de patógenos de plantas de gran importancia, causando enfermedades en una amplia variedad de especies herbáceas y sus frutos. Su principal distribución es en las zonas tropicales y subtropicales aunque existen algunas especies que afectan a los cultivos de clima templado. La producción de frutas que está especialmente afectada son las de fresa, mango, cítricos, aguacate y cultivos básicos como el plátano (Fig. 3) (Cannon *et al.*, 2012).

Especies de *Colletotrichum* causan enfermedades devastadoras de las vallas de café en África, y afectan seriamente los cereales como el maíz, la caña de azúcar y sorgo. Asimismo de acuerdo con Dean *et al.* (2012) se consideró que *Colletotrichum* es el octavo género de hongos patógenos de plantas en el mundo, en base a la percepción importancia científica y económica.

Las especies de *Colletotrichum* son principalmente causantes de las enfermedades de antracnosis, aunque también se ha reportado como causante de la podredumbre roja de la caña de azúcar, enfermedad de la baya de café,

podredumbre de la corona de fresa y plátano, y mancha marrón de caupí (Lenné, 2002).

Debido a que durante su proceso de germinación se puede presentar una etapa asintomática de aparente inactividad para entrar a la posterior fase de necrotrósis que resulta en la muerte significativa de las células vegetales y la emergencia de lesiones de patógenos, lo que puede conducir a importantes pérdidas posteriores a la cosecha con los cultivos aparentemente sanos en degeneración durante el almacenamiento (Prusky y Plumbley, 1992) (Fig 3).



**Figura 46** A. La antracnosis en frutos de fresa causada por *C. nymphaeae* (*acutatum* clado) B. Hoja de *Brachyglottis repanda* causada por *C. beeveri* (*boninense* clado). C. Síntomas de antracnosis en las hojas de *Tecomathe speciosa* causada por *C. agg boninense*. D . Antracnosis del bulbo de la cebolla causada por *C. circinans* (*clado dematium*). E. Antracnosis de frutos de plátano causada por *C. musae* (*gloeosporioides* clado). F. Enfermedad del fruto del café causada por *C. subsp kahawae. kahawae* (*gloeosporioides* clado).

#### **1.1.1.4. *Aspergillus***

El género *Aspergillus*, que comprende unas 200 especies, tiene un notable impacto en la salud pública, ya que comprende especies descritas como patógenos humanos y productores de micotoxinas, varias nocivas para la salud (Reverberi *et al.*, 2010).

En el caso particular de la cepa *Aspergillus niger*, esta tiene la mayor adaptación a las condiciones ambientales, comparado con varias especies (Oliveira *et al.*, 2015), y diversos investigadores la declaran como la principal fuente infecciosa fúngica de deterioro rápido y extenso de uvas durante la cosecha, además de ser un obstáculo importante durante el almacenamiento; *A. niger* se encuentra en prácticamente todo nuestro entorno y es fuente constante de deterioro de los alimentos, productos industriales y agrícolas, junto con la producción de micotoxinas (ocratoxina A, malforminas, maftoquinonas y nigragillin) que comprometen la seguridad alimentaria (Li *et al.*, 2013; Tolouee *et al.*, 2010).

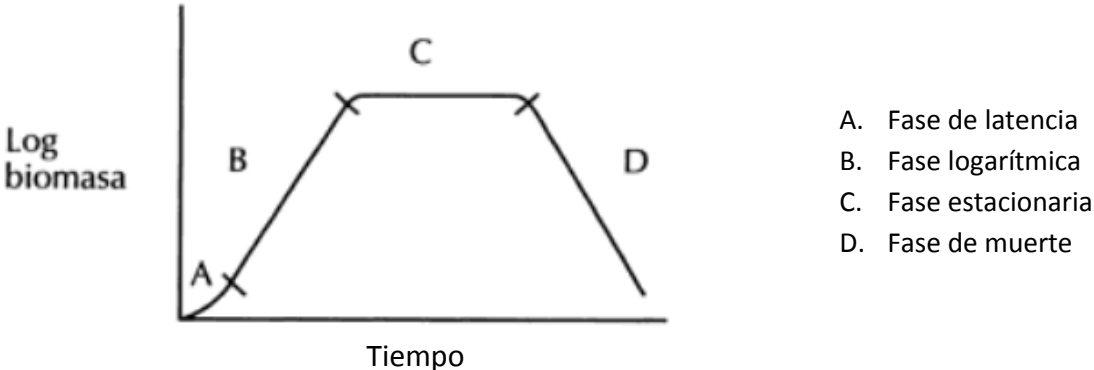
Por otro lado *Aspergillus wentii*, un hongo halotolerante, es una cepa común en climas cálidos, se ha logrado aislar en tierras no cultivadas como bosques y en productos como el de maíz, arroz, piña, nueces y entre otros; se ha demostrado su producción de las micotoxinas emodina (2-metil-4,5,7-trihidroxiantraquinona), wentilacton, ácido kójico, ácido 3-nitropropionico y fisicon (Smith, 2012).

#### **1.1.2 Modelos de crecimiento microbiano**

Para el estudio del crecimiento de los microorganismos y las afectaciones sobre sus comportamiento por incremento de ciertos sustratos en los modelos de crecimiento, es necesario considerar las curvas de crecimiento de los agentes patógenos y sus modificaciones por las condiciones de crecimiento. Para ello es necesario definir que una curva de crecimiento describe el comportamiento del microorganismos. Se encuentra segmentada por distintas fases una de ellas es la fase de latencia o fase Lag, que coincide con el periodo de adaptación del microorganismos a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. Se presenta inmediatamente después de la inoculación y su duración depende la fisiología de

la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Durante este tiempo no existe aumento en el número de células ya que el microorganismo utiliza la energía disponible con el fin de sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo medio (Hernandez, 2013).

En la fase logarítmica o esponencial, las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado en base al aumento de biomasa por unidad de tiempo (para hongos filamentosos).



**Figura 47** Curva de crecimiento de un microorganismo (Hernandez, 2013 ).

El modelo de crecimiento mas popular para describir las curvas de crecimiento microbiano, en los alimentos al menos, es el modelo de Gompertz. Sus propiedades y usos son encontrados en varios capitulos de libros e innumerables articulos. Una de las formas mas usuales para escribirla es por la ecuación 1 (Peleg, 2006).

$$y = ae^{-e^{-(x-x_0)/b}} \dots\dots\dots(1)$$

donde a y b son constantes ajustables. El parametro  $x_0$  de este modelo es considerado como la medida de crecimiento al tiempo Lag.

## 1.2. Agentes antifúngicos

La Enciclopedia Británica define a un fungicida como cualquier sustancia tóxica capaz de inhibir el crecimiento de los hongos capaces de causar daños económicos a los cultivos o plantas ornamentales así como poner en peligro la salud de los animales domésticos o de seres humanos.

Las medidas de control químicas son particularmente comunes en la gestión de control de plagas por hongos, y la mayoría de estas medidas se basan en el uso de fungicidas. Aunque, hoy en día existen desacuerdos en la comunidad científica sobre si continuar con el empleo de fungicidas para controlar enfermedades fúngicas o prohibirlos para proteger la salud humana y del medio ambiente (Ivic, 2010).

El control químico de enfermedades de las plantas comenzó a desarrollarse en la segunda mitad del siglo XIX cuando se hicieron recomendaciones sobre el uso de preparaciones de fungicidas basados en ingredientes activos con azufre, cal y sulfato de cobre; aunque la cantidad de sustancias fungicidas conocidas era limitada. En la época posterior a la Segunda Guerra Mundial se introdujeron nuevas sustancias para el control de agentes fúngicos tales como mancozeb (un ditiocarbamato) y captafol (una ftalimida). Sin embargo, el mayor logro de 1960 fue la introducción de fungicidas sistémicos como el tiabendazol y benomil, ambos se caracterizan por su modo de acción con el carbamato de metilbenzimidazol (CBM), que actúa a nivel intracelular en los cultivos (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010). Posteriormente el Fosetil-Al, un fungicida a base de fosfonato con la propiedad única de ser móvil a nivel del floema.

Opciones para el control de enfermedades fúngicas se ampliaron en la década de 1980 a través de la introducción de varios triazoles, los primeros miembros de la clase de los inhibidores de desmetilación esterol (DMI) y varios miembros adicionales del grupo morfolina (Russell, 2005).

Los primeros fungicidas en exhibir acción protectora, sistémica y erradicante fueron aquellos a base de estrobilurinas, de este tipo los que alcanzaron el

mercado fueron la azoxistrobina y kresoximmetil. En conjunto a estos fungicidas se les llama el grupo QoI, un término derivado de su modo de acción en la unión en el sitio Qo del citocromo b. Por otro lado las estrobilurinas rápidamente se convirtieron en uno de los fungicidas agrícolas más importantes, representando más del 20% del mercado mundial. Sin embargo, una de las aparentes ventajas de los fungicidas sistémicos es su alta especificidad (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010).

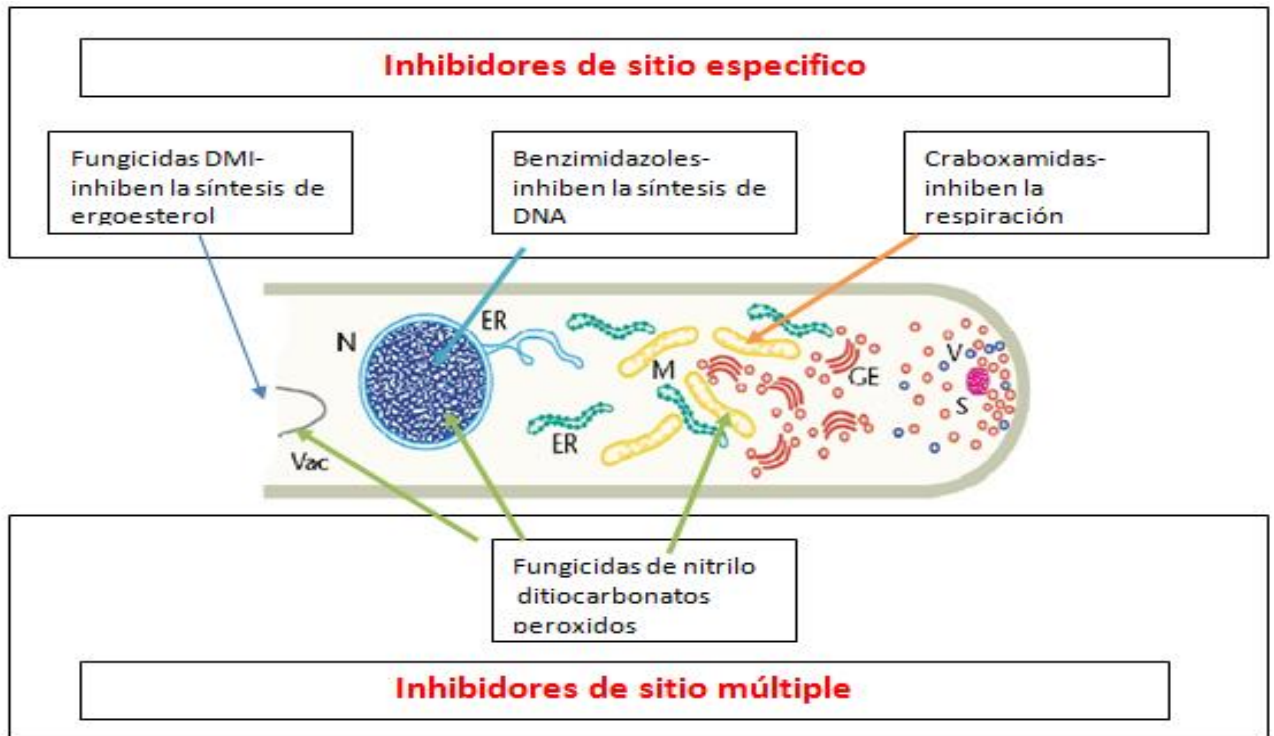
La mayoría de los fungicidas se aplican en forma de aerosoles o polvos. Para las semillas se aplican fungicidas como una cubierta protectora antes de la germinación. Los fungicidas sistémicos, o productos quimioterapéuticos, se aplican a las plantas, donde se distribuyen en todo el tejido y actúan a fin de erradicar enfermedades existentes o para prevenir dichas plagas (Morell y Candela, 1998). Cabe recalcar que casi todos los fungicidas utilizados hoy en día muestran un mejor efecto si se aplica antes de que ocurra la infección; si esta ya se encuentra presente en la superficie de órganos de la planta los fungicidas destruyen las esporas de hongos o suprimen tubos de germinación, hifas, y otras estructuras fúngicas (Ivic, 2010).

En general se aplican fungicidas después de la cosecha para controlar la descomposición, asimismo requieren ser aplicados una vez que los productos se lavan y se ponen a secar antes de ser empacarlos (FAO, 1993).

### **1.2.1. Clasificación de los fungicidas**

Los fungicidas pueden ser divididos en 2 grupos en base al modo de acción en las células fúngicas (Rouabhi, 2010):

- a. **Inhibidores en sitio específico:** son inhibidores específicos del sitio se dirigen a sitios individuales dentro de la célula fúngica (Fig. 4).
- b. **Inhibidores en sitios múltiples:** son inhibidores que actúan sobre varios a sitios en cada célula fúngica (Fig. 5).



**Figura 48** Estructura de la célula fúngica donde ER es el retículo endoplasmático, Gt es el aparato de Golgi, M es mitocondrias, N es núcleo, V es vesículas y Vac es vacuola junto con algunos ejemplos de los inhibidores de sitio específico y los inhibidores de sitio múltiple.

Por otra parte algunos investigadores clasifican a los fungicidas en función de su composición (Tabla 2) por lo cual se establecen distintos grupos de sustancias.

Otra forma de clasificar a los fungicidas es agrupándolos por su composición en dos grandes grupos: a) inorgánicos, donde se encuentran compuestos de azufre, cobre o mercurio y b) orgánicos, entre los que se incluyen ditiocarbamatos, tiazoles, trazinas, aromáticos sustituidos, dicarboximidias, entre otros (Morell y Candela, 1998).

**Tabla 2.** Grupos químicos de fungicidas y sus nombres genéricos

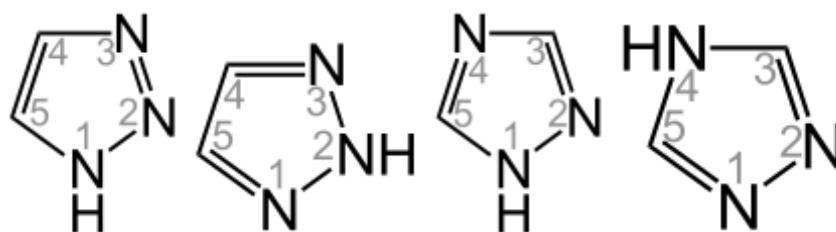
<b>Grupo químico</b>	<b>Nombre genérico</b>
Triazoles	Propiconazola Triadimefon Miclobutanil Triticonazole
Pirimidinas	Fenarimol
Estrobilurinas	Fluoxastrobina Trifloxistrobina Azoxistrobina Piraclotrobina
Polioxinas	Polioxina D
Benzimidazoles	Methiltiofanato
Dicarboxamines	Iprodione Vinclozolin
Fenilamidas	Mefenoxam
Carbamatos	Propamocarb
Fosfonatos	Fosetil aluminio fosfanato
Ditiocarbamatos	Mancozeb Tiram
Hidrocarburos aromáticos	Quintozene Cloroneb Etazola
Peroxidos	Dióxido de hidrogeno
Nitrilos	Clorotalonil
Fenilpiroles	Fludioxonil
Cianoimidazoles	Cyanofamid
Carboxamidas	Flutolanil Boscalid
Biofungicidas	Ecoguard Sonata Soilguard

Fuente Burpee, 2006.

A continuación se describen algunos de estos compuestos así como sus mecanismos de acción:



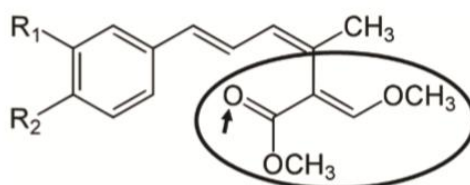
Todas las clases de azoles son sustratos e inhibidores de enzimas CYP450, pero en la medida en que sean metabolizados inhiben diversas isoformas de CYP (Venkatakrishnan *et al.*, 2000; Sakaeda *et al.*, 2005, Niwa *et al.*, 2005). Finalmente los triazoles individuales exhiben diferentes propiedades así como espectros de actividad (Fig. 7) (Ashbeea y Gilleeceb, 2014).



**Figura 50** Isómeros químicos del triazol

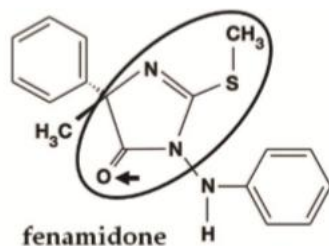
### 1.2.1.3. Fungicidas Qol

Las estrobilurinas son sustancias naturales producidas principalmente por hongos, su nombre deriva de género *Strobilurus*. Las estrobilurinas A, la primera molécula de Qol, se aisló a partir de cultivos líquidos de *S. tenacellus* y compuestos similares fueron posteriormente identificados y nombrados en el orden de su descubrimiento (B, C, D y así sucesivamente) (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010). En los hongos, estos productos son biosintetizados a partir de fenilalanina a través del ciclo del ácido shikímico (Balba, 2007). Estructuralmente, la característica común de todas las estrobilurinas es la presencia de un grupo metilo (E) -3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienilo) acrilato, unido al resto de la molécula y varía la posición de las sustituciones en los anillos aromáticos, específicamente en las posiciones 3 y 4 (Fig. 8).



**Figura 51** La estructura química básica de estrobilurinas. El residuo de  $\beta$ -metoxiacrilato se resalta con un círculo y el oxígeno del carbonilo responsable de la unión se indica por una flecha. R1 y R2 representan radicales que son distintos en las diferentes estrobilurinas de origen natural.

Además de las estrobilurinas, hay otros compuestos tales como la famoxadona y fenamidona que son distintos químicamente de las estrobilurinas, pero forman parte del mismo grupo fungicida de resistencia cruzada QoI (Fig. 9).



**Figura 52** La estructura química de la fenamidona. El residuo toxóforo se resalta con un círculo y el oxígeno del carbonilo responsable de la unión se indica por una flecha.

En la actualidad, basada en similitudes estructurales, ocho grupos químicos de los inhibidores de Qo se pueden distinguir, lo que representa quince ingredientes activos QoI (Tabla 3). Es por ello que los fungicidas QoI comerciales son algunos de los fungicidas agrícolas más comercializados a nivel mundial y se utilizan principalmente como productos fitosanitarios contra la mayoría de los principales patógenos fúngicos.

**Tabla 3.** Principales fungicidas QoI utilizados como productos fitosanitarios.

Clases	Compuestos fungicidas	Nombre comercial actual
Metoxiacrilatos	Azoxistrobina	Syngenta
	Picoxistrobina	Syngenta
	Enestrobina	SS <sup>a</sup>
	Piraxistrobina	SRICI <sup>b</sup>
Oximinoacetatos	Metil Kresoxim	BASF
	Trifloxistrobina	Bayer
Oxazalidinedionas	Famoxadono	DuPont
Oximinoacetamidas	Metominostrobin	Bayer
	Dimoxistrobina	BASF
	Orisastrobina	BASF
Imidazolinones	Fenamidone	Bayer
Metoxicarbamatos	Piraclostrobina	BASF
	Pyrametostrobin	SRICI
Dihidrodioxazinas	Fluoxastrobina	Bayer
Bencilcarbamatos	Piribencarb	KCI <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Sinochem Shanghai

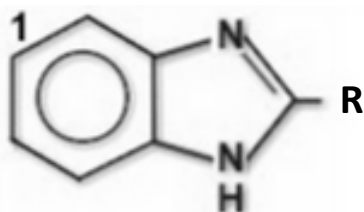
<sup>b</sup>Shenyang Research Institute of Chemistry Industry

<sup>c</sup>Kumiai Chemical Industry

Fuente Fernández-Ortuño *et al.*, 2010.

#### 1.2.1.4. Benzimidazoles

Los fungicidas benzimidazoles (BFS) son la familia química más amplia que tiene un anillo midazol en su estructura (Fig. 10). Son eficientes en dosis bajas e inhiben el desarrollo de una amplia variedad de hongos. Algunos bencimidazoles también han encontrado aplicaciones como fungicidas pre o post-cosecha. Se aplican ya sea directamente al suelo, o pulverizados sobre los campos de cultivo (Wu *et al.*, 2009). La mayoría de estos compuestos persisten en el medio ambiente después de su aplicación, incluso durante muchos años. Este grupo incluye los análogos de tiabendazol y carbamatos de benzimidazol (Torres-Padrón *et al.*, 2010).



**Figura 53** La estructura química básica de los bencimidazoles

#### 1.2.2. Fungicidas y su toxicidad

En su mayoría los microorganismos patógenos se controlan principalmente de forma química, sin embargo el uso de compuestos sintéticos resulta limitada debido a varios efectos indeseables, que incluyen carcinogenicidad, teratogenicidad, toxicidad aguda y la exigencia de un período de degradación prolongado con el consiguiente desarrollo de problemas de contaminación ambiental (Galvez *et al.*, 2014).

La toxicidad de los pesticidas incluyendo fungicidas puede ser evaluada en función de su dosis letal o toxicidad relativa aguda ( $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ ).  $DL_{50}$  es la dosis a la cual la mitad de los animales de ensayo mueren y se mide en miligramos de sustancia estudiada por kilogramo de animales (mg / kg). Cuanto mayor sea la  $DL_{50}$ , menos tóxico del material. Algunos fungicidas por ejemplo los triazoles se absorben rápidamente y distribuidos en todos los tejidos de quien los consume y estos compuestos presentan diversos efectos deletéreos sobre los sistemas

biológicos de mamíferos, especialmente en el sistema nervioso (Ferreira-Faro, 2010).

### **1.3. Plantas con potencial antifúngico**

En la última década se ha visto un incremento en consumidores con una nueva conciencia acerca de los problemas mencionados en el capítulo 2.2, y es así como se ha creado un perfil de consumidor "verde" con el interés por productos con menos aditivos y más "naturales", tal es el caso del uso de agentes antimicrobianos (Sokovic *et al.*, 2013). Diversos estudios avalan la efectividad de ciertas sustancias de origen natural contra contaminantes biológicos de alimentos. Hierbas y especias han sido reconocidas por poseer un amplio espectro de componentes activos que exhiben actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, y/o actividades antivirales.

La Tabla 4 presenta una lista de plantas, hierbas y especias que han demostrado una capacidad antimicrobiana natural. Estos compuestos pueden ser letales para los microorganismos o inhibir ciertos metabolismos. La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas son compuestos fenólicos (Fig. 11), terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonas (Gutiérrez *et al.*, 2008).

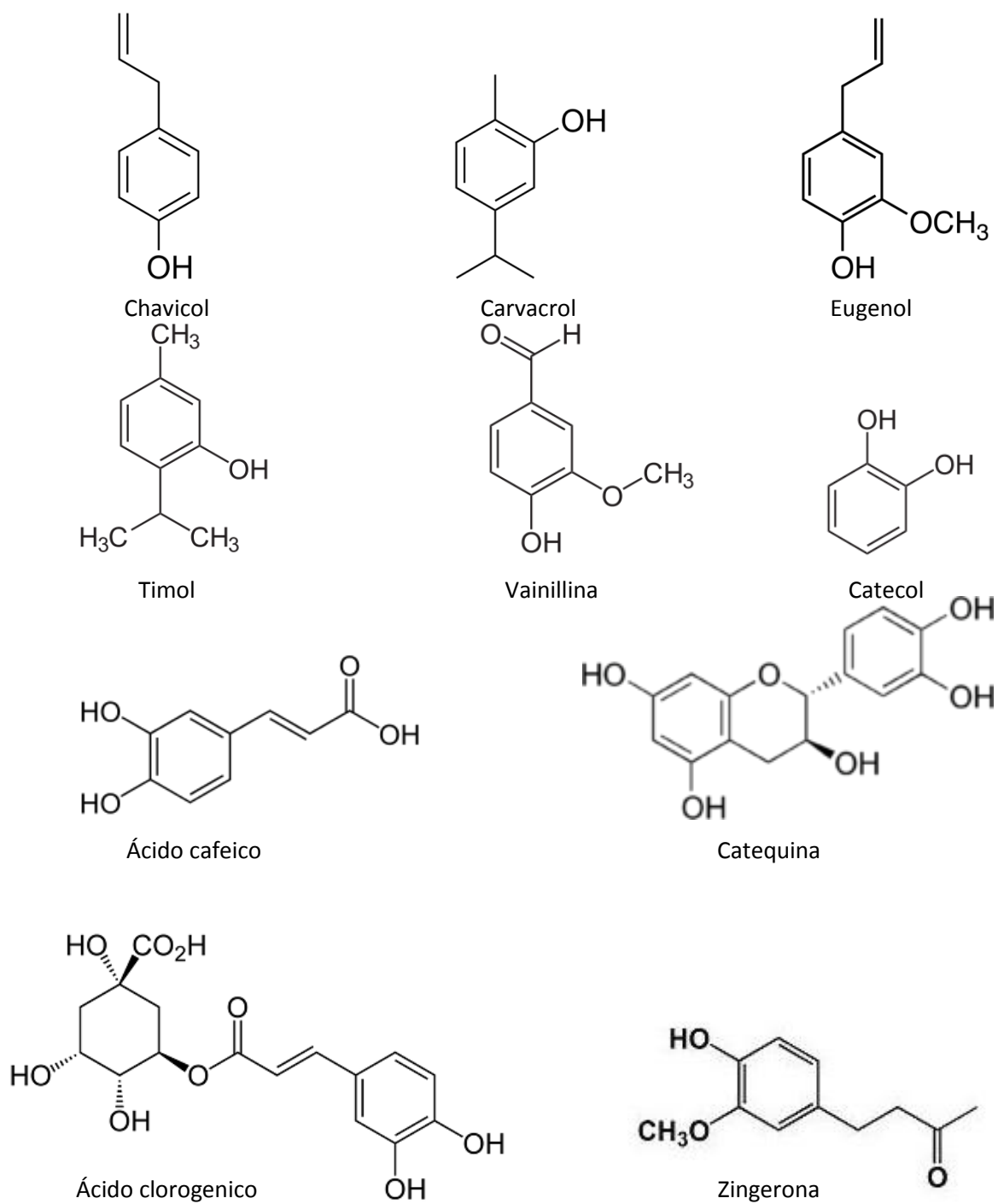
Los aceites esenciales se han utilizado durante siglos como parte de la medicina tradicional natural. Son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces). Los principales grupos de componentes principales que hacen que los aceites esenciales antimicrobianos eficaces incluyen saponinas, flavonoides, carvacrol, timol, citral, eugenol, linalol, terpenos y sus precursores (Burt, 2004).

Es así que aceites esenciales y componentes de distintas plantas, que presentan un potencial como agentes antimicrobianos naturales son reconocidos como. De ahí que pueden resultar ser una alternativa natural para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos en alimentos. Asimismo pueden resultar útiles para inhibir la generación de metabolitos (Gutiérrez *et al.*, 2008).

**Tabla 4** Componentes con actividad antimicrobiana encontrada en plantas, hierbas y especias.

Planta, hierba	Componente(s) mayoritario(s)	Otros componentes
Pimienta ( <i>Pimienta dioica</i> )	eugenol	metil eter cineol
Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> )	d-linalool, metil chavicol	eugenol, cineol, geraniol
Pimiento negro ( <i>Pipiper nigrum</i> )	monoterpeno, sesquiterpeno, compuestos oxigenados	
Laurel ( <i>Laurus nobilis</i> )	cineol	l-linalool, eugenol, geraniol
Semillas de comino ( <i>Apium graveolens</i> )	carvona	limoneno
Semillas de apio ( <i>Apium graveolens</i> )	d-limonene	
Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	aldehido cinnamicó	l-linalool, p-cimeno, eugenol
Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	eugenol	cariofileno
Cilantro ( <i>Coriandum sativum</i> )	d-linalol	d- $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno
Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )	cuminaldehido	p-cimeno
Hinojo ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	anetole	
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	disulfuro de dialilo, trialil disulfuro	sulfuro de dietilo, alicina geraniol
Limoncillo ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	citral	geraniol
Mejorana ( <i>Origanum majorama</i> )	Lanalool, cineol, eugenol, terpinineol	metil chavicol
Mostaza ( <i>Brassica hirta</i> , <i>B. juncea</i> , <i>B. nigra</i> )	Alil-isotiocianato	
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	d-n-propildisulfuro, metil-n-propil disulfuro	
Oregano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Timol, carvacrol	$\alpha$ -pineno
Perejil ( <i>Petroselinum crispum</i> )	$\alpha$ -pineno, fenol-eter-apiol borneol, cineol	alcanfor, $\alpha$ -pineno, acetato de bornilo, terpinol
Savia ( <i>Salvia officinalis</i> )	Tuyona, cineol, borneol	Anetol,
Estragon ( <i>Artemisia dracunculus</i> )	metil chavicol	anetol
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	timol	Carvacrol, l-linalool, geraniol, p-cymene

Fuente Gutiérrez *et al.*, 2008



**Figura 54** Estructura de los compuestos fenólicos de origen natural con actividad microbiana

A continuación se describen las plantas empleadas en el presente trabajo además de mencionarse sus antecedentes en relación con su potencial antimicrobiano.

### 1.3.1. X'kijit (*Renealmia alpinia*)

El género *Renealmia* L.f. (*Zingiberaceae*) se distribuye por las regiones tropicales de América y África. Consta aproximadamente de 85 especies, de las cuales 62 se encuentran en el trópico americano (Maas y Maas, 2001). En México existen cuatro especies, aunque es posible que actualmente su número sea más elevado debido a las muchas colecciones botánicas realizadas en las últimas décadas. Las especies citadas para México son: *Renealmia cernua*, *R. mexicana*, *R. occidentalis* y *R. alpinia* (Fig. 12) (Maas, 1977).



**Figura 55** Planta y frutos de *R. alpinia*

#### 1.3.1.1 Características Taxonómicas

**Nombre Científico:** *Renealmia alpinia*

**Reino:** Plantae

**Phylum:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Liliopsida*

**Orden:** *Zingiberales*

**Familia:** *Zingiberaceae*

**Género:** *Renealmia*

**Epíteto Específico:** *alpinia*

#### 1.3.1.2 Antecedentes

Los frutos comestibles de *Renealmia alpinia* son muy apreciados en la Sierra Norte de Puebla (México), en donde son manejados a nivel familiar. La planta

crece en forma silvestre en la región, aunque es una especie poco frecuente. La parte comestible es el arilo de los frutos. Ocasionalmente los frutos se comercializan en los mercados tradicionales. Solamente el 19 % del peso total de los frutos se aprovecha para alimentación (Macía, 2003).

En América tropical, *R. alpinia* ha sido utilizada para diferentes propósitos. Además del uso comestible del arilo; el exocarpo carnoso de los frutos se ha utilizado como tinta y de las semillas se han extraído aceites usados para frituras en la alimentación. Finalmente su uso medicinal se ha relacionado contra síntomas como náuseas y vómitos (Acero, 1979; Maas, 1977; Martínez *et al.*, 1995; Villalobos-Contreras, 1994).

### 1.3.1.3 Propiedades antimicrobianas

*R. alpinia* es tradicionalmente eficaz contra infecciones fúngicas y para la preparación de aceites de semillas (Benjumea y Gómez-Betancur, 2014), algunas partes, como trozos de hojas vainas, se añaden a la plantación de algunos cultivos, como el maíz, para evitar ser comido por los roedores y aves (Macía, 2003). De acuerdo con Coe (2008) *R. alpinia* cuenta con reportes del uso tradicional de los tallos, raíces y la planta entera para infecciones en vías digestivas y urinarias.

### 1.3.2. Eucalipto

Se conocen más de 500 especies diferentes de eucaliptos, de las cuales casi la totalidad son originarias de Australia, y algunas de Nueva Guinea y las islas vecinas (Geilfus y Bailón, 1994).



**Figura 56** Capullos, cápsulas, las flores y el follaje de *Eucalyptus*

### 1.3.1.1 Características Taxonómicas

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Subclase:** *Rosidae*

**Orden:** *Myrtales*

**Familia:** *Myrtaceae*

**Subfamilia:** *Myrtoideae*

**Tribu:** *Eucalypteae*

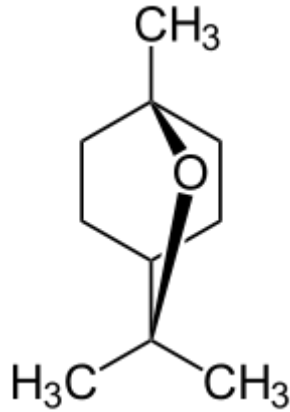
**Género:** *Eucalyptus*

### 1.3.1.2 Antecedentes

La introducción del eucalipto en México fue gradual, y con distintos fines. En el último tercio del siglo pasado los médicos impulsaron la aclimatación de eucalipto en el Valle de México con el fin de sanear la ciudad y reducir los casos de malaria. Esto tuvo como precedente el estudio eucalipto para dictaminar sobre su efecto higiénico y los posibles usos medicinales. En ese entonces el Consejo Superior de Salubridad concluyó que la introducción del árbol originario de Australia en suelos mexicanos sería provechosa (Hinke, 2000).

### 1.3.1.3 Propiedades antimicrobianas

El eucalipto contiene 3 a 5% de aceite esencial, con 60% ó más de cíneol ó eucaliptol (Fig. 14), con actividad antigripal, balsámica y astringente, siendo utilizado en el combate de la gingivitis (Forever, 1999; Xavier, 1995). Por su parte diversos estudios han demostrado su actividad antimicrobiana en distintas concentraciones contra cepas como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Lactobacillus casei* (Barreto *et al.*, 2005), así como con *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Alzamora *et al.*, 2001).



**Figura 57** Estructura química del eucaliptol

### 1.3.3. Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl)

*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht es una planta Julianiaceae. La característica de esta especie es que los árboles son resinosos. Es un género que se desarrolla en América desde México hasta Perú (Hutchinson, 1973).

La planta se conoce como cuachalalate, quechalalatl o cuachalalá (Fig. 15). Se cultiva en Estados de México como: Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos y Puebla, (Stanley, 1920, Rzedowski, 1978; Pennington y Sarukhán, 1998).



**Figura 58** Imagen del árbol y corteza del cuachalalate

### 1.3.1.1 Características Taxonómicas

**Reino:** *Plantae*

**Subreino:** *Tracheobionta*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Subclase:** *Rosidae*

**Orden:** *Sapindales*;

**Familia:** *Anacardiaceae*;

**Género:** *Amphipterygium*;

**Especie:** *A. adstringens*(Schltdl.) Schiede ex Standl.

### 1.3.1.2 Propiedades antimicrobianas

El cuachalalate es una planta medicinal utilizada en México y su corteza se vende en casi todos los mercados del país. Algunas personas atribuyen diversas propiedades curativas como son: cicatrizante, atenuante, antibiótico, para disolver los cálculos biliares y cálculos renales, para eliminar los cólicos y fiebre, antipalúdicos, anti-inflamatorias, cáncer del tracto digestivo, y úlceras gástricas. Estudios previos muestran que el ácido *hidroxi-masticadienónico* y ácidos masticadienónicos se encuentran en la resina de árboles machos, mientras que estos últimos se encuentra en la resina de árboles femeninos (Ortega y Soto-Hernández,1999).

### 1.3.4. Cancerina (*Hippocratea excelsa* HBK)

*Hippocratea excelsa* HBK (*Hippocrateaceae*) (sin.: *Hemiangium excelsum* HBK) es un liana nativa de México y América Central (Smith, 1940). La corteza de la raíz de esta planta (Fig. 16), conocida como 'Cancerina', se utiliza en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de las úlceras pépticas, enfermedades de la piel, enfermedades renales y trastornos de la menstruación (Martínez, 1969; Palacios *et al.*, 1989). En México rural esta planta es conocida como 'mata piojo';

como el nombre lo indica, las propiedades pesticidas son valorados por los agricultores y ganaderos (Palacios *et al.*, 1989).



**Figura 59** Tallo (izquierda) y raíz seca (derecha) de *Hippocratea excelsa*

#### 1.3.4.1 Características Taxonómicas

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Celastrales*

**Familia:** *Celastraceae*

**Género:** *Semialarium*

**Especie:** *S. mexicanum* (Miers) Mennega Sin.: *Hemiangium excelsum*

Debido a diversos factores la clasificación taxonómica de esta planta aun está en revisión; dentro de sus sinónimos se encuentra: *Hemiangium excelsum* (Kunth). *Hippocratea excelsa*, *Hippocratea mexicana*.

#### 1.3.4.2 Propiedades antimicrobianas

Diversos estudios ha encontrado actividad antimicrobiana como el caso de Alanís *et al.* (2005) donde se encontró que extractos de esta plata presenta actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157:H7, *Shigella sonnei*-1, *Shigella sonnei*-2, *Shigella flexneri*-1, *Shigella flexneri*-2 y *Salmonella* sp. De igual forma ha mostrado un *Giardia intestinalis* con una concentración de

inhibición de 27.4  $\mu\text{M}$  (Mena-Rejo *et al.*, 2007). Mientras que su actividad antimicrobiana más valorada es contra *Helicobacter pylori*, esta última cepa es causante de úlceras gastrointestinales, los reportes indican en la mínima concentración inhibitoria (MIC) varía de 7.81 a 125  $\mu\text{g/mL}$  dependiendo de que parte de la plata y región geográfica proceda la materia vegetal de la que se obtiene el extracto metanólico (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2014).

#### **1.4 Métodos de extracción**

Las técnicas para la obtención de extractos dependen de cada especie de planta y de los componentes biológicos de interés que se deseen extraer, es así como se pueden obtener extractos etanólicos, acuosos, fracciones solubles en agua, empleo de temperatura para su liberación, extracción hidro-alcohólica, extracción con diclorometano, extracción en hexano, entre otros (Tabla 5) (Falcão *et al.*, 2008).

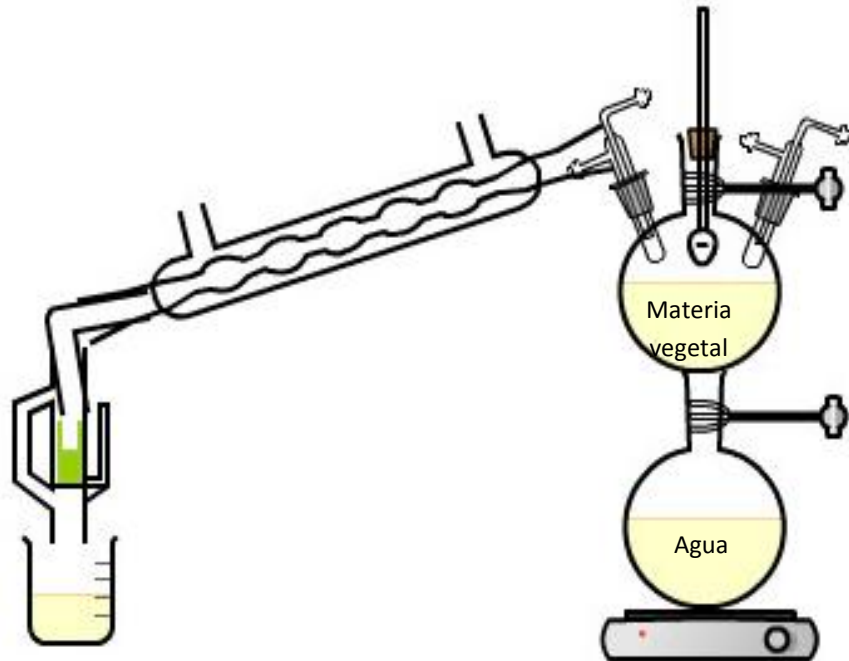
La hidrodestilación o destilación de material vegetal por medio de arrastre del aceite con vapor de agua es un procedimiento ampliamente utilizado debido a que es relativamente sencillo el equipo requerido. La hidrodestilación es utilizada para la obtención de aceites esenciales, lo anterior debido a que, los aceites esenciales presentan un punto de ebullición superior al del agua, pero la mezcla de este más agua presenta un punto de ebullición inferior por lo que es posible su destilación.

Al pasar por un condensador los vapores se enfrían y condensan pasando a fase líquida (Fig. 17). Debido a que la fase orgánica es un aceite esencial está se separa fácilmente de la fase acuosa por diferencia de densidades (Órtuño-Sánchez, 2006).

**Tabla 5** Métodos de extracción en plantas del continente Americano

Nombre botánico	Parte utilizada	Modelo
<i>Astronium urundeuva</i> (allemaño) Engl.	Corteza seca	Extr EtOh. 100% Extr. EtOh 100%
<i>Artemisia annua</i> L.	Parte aérea seca	Ext.H <sub>2</sub> O
<i>Aster squamatus</i> (Spreng.) Hieron.	Flores secas	Fracción soluble H <sub>2</sub> O Extracto de diclorometano Ext. EtOH 100% ext.H <sub>2</sub> O
<i>Baccharis genistelloides</i> Pers.	Flores secas	Extracto de hexano Extracto de diclorometano Ext. EtOH 100%
<i>Baccharis rubricaulis</i> Rusby.	Flores secas	Extracto de hexano
<i>Bidens subalternans</i> DC.	Parte aérea seca	Ext.MeOH Extracto de diclorometano Ext. EtOH 100% Ext H <sub>2</sub> O
<i>Franseria artemisioides</i> Wild.	Flores secas	Ext.de Hexano Ext CHCl <sub>3</sub> Ext. EtOH 95% Ext Hexane
<i>Neurolaena lobata</i> (L.) R. Br <i>Tanacetum vulgare</i> L.	Parte aérea seca Parte aérea seca	Ext.Hidro-alcoholico Ext.CHCl <sub>3</sub>
<i>Celastraceae</i>		
<i>Austroplenckia populnea</i> (Reiss.) Lund.	Hojas secas	Ext de hexano MeOH ext.
<i>Maytenus aquifolium</i>	Flores secas	Ext. EtOH 70% Ext. caliente H <sub>2</sub> O
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Corteza seca	Fracción cromatografica
<i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb	Jugo fresco	Fracción de flavonoides Ext. EtOH 100% Ext. EtOH 70%
<i>Davilla rugosa</i> Poirer	Tallo seco	Ext. EtOH-H <sub>2</sub> O (1:1) Ext. EtOH 100% fracción de flavonoides
<i>Syngonanthus arthrotrichus</i>	Raíz seca	Flavonoid-deficient fraction H <sub>2</sub> O ext.
<i>Dalbergia monetaria</i> L.	Corteza seca	Lyophilized ext.

Fuente: Modificado de Falcão *et al.*, 2008.



**Figura 60** Esquema de equipo de hidroddestilación

En general los rendimientos de cada tipo de extracción se calculan de acuerdo con la cantidad de material vegetal utilizada, empleando la ecuación propuesta por Boelens (1985):

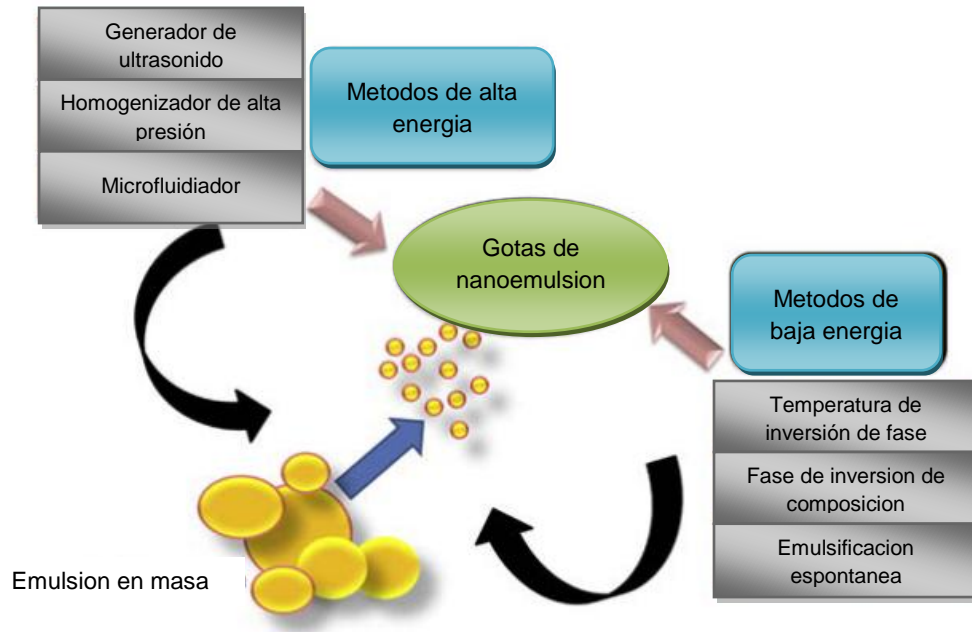
$$R_{HE}(\%) = (m_{HE}/m_S) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

donde  $m_{HE}$  = cantidad del extracto (mL),  $m_S$  = Masa del vegetal en materia seca (g) y  $R_{HE}$  = Rendimiento del extracto (%).

### 1.5 Métodos de emulsificación y dispersión

Cuando dos líquidos inmiscibles son dispersados como gotas en una fase continua el resultado de la mezcla es una emulsión. El proceso mediante el cual es formada una emulsión se llama emulsificación. Existen distintos métodos para su formación utilizando baja energía, alta energía y métodos combinados (Figura #). Los métodos de emulsificación de alta energía son inducidos por la acción de dispositivos tales como alta agitación de cizallamiento, emulsificación por ultrasonidos, homogeneización a alta presión, y la emulsificación por membrana.

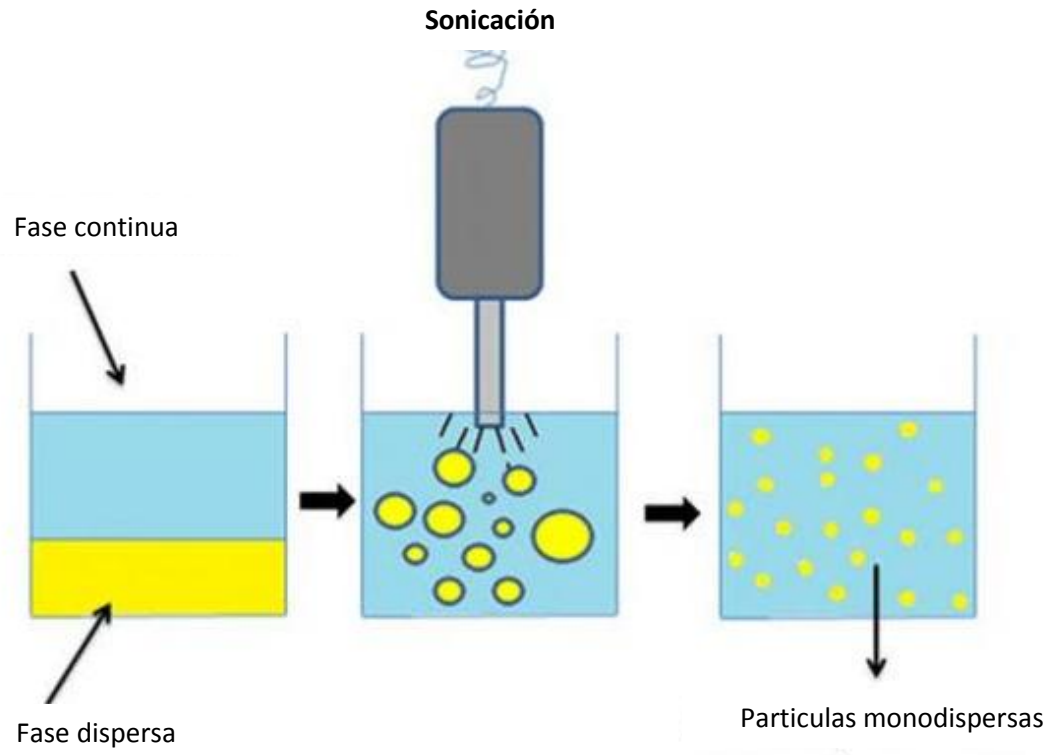
Los métodos de baja energía más ampliamente utilizados incluyen el método de la temperatura de inversión de fase (PIT), método del punto de inversión emulsión (EIP), y el método de emulsión espontánea (Preedy, 2015).



**Figura 61** Preparación de nanoemulsiones por varios métodos de emulsificación de baja y alta energía (Preedy, 2015).

### 1.5.1. Importancia de la sonicación como proceso de emulsificación.

Las gotas de nanoemulsión son formadas bajo sonicación debido al colapso de la burbuja inicial y la liberación de una cantidad sustancial de energía. La sonicación utiliza ondas sonoras de alta intensidad y produce una intensa fuerza perturbadora para romper el aceite y fases de agua en gotitas finas. La preparación de nanoemulsión por sonicación se muestra en la figura #. El uso de ultrasonidos para la formación de nanoemulsión que aumente la calidad alimentaria y a su vez haga frente a patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos ha sido estudiado (Preedy, 2015).



**Figura 62** Preparación general de nanoemulsiones por tecnica de sonicación (Preedy, 2015).

## Capítulo 2. Materiales y métodos

La metodología que se siguió se describe en la Figura 20.

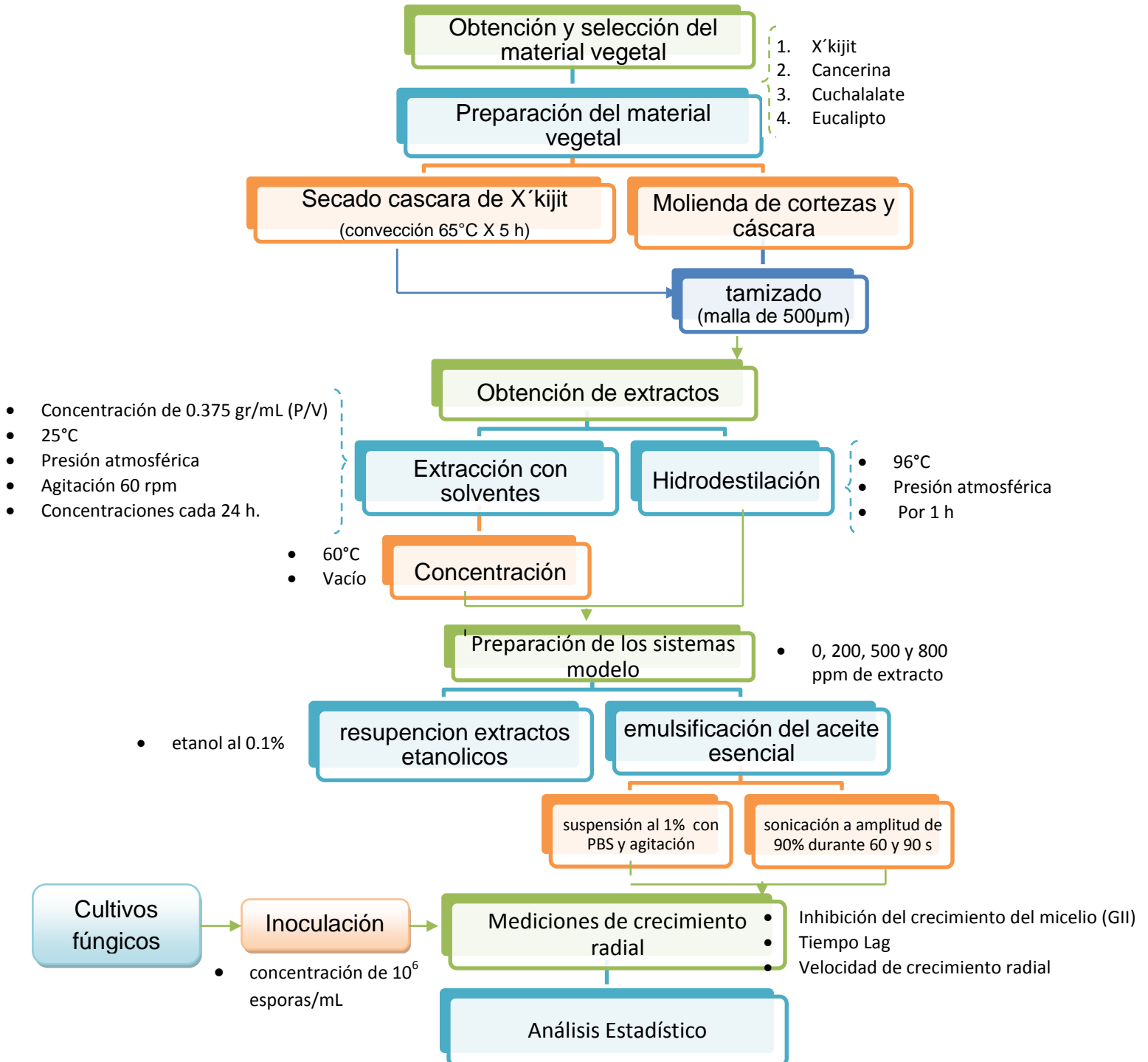


Figura 63 Diagrama general del trabajo

## 2.1. Obtención y selección del material vegetal

Las cáscaras del fruto de X'kijit (*Renalmia alpinia*) se obtuvo de frutos de la Sierra Norte del Estado de Puebla, en tanto que el eucalipto (*Eucalyptus sp.*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl*) y cancerina (*Hippocratea excelsa*) se obtuvieron de un centro de venta de plantas medicinales del estado de Puebla, Puebla.

## 2.2. Preparación del material vegetal

La cáscara del X'kijit se sometió a secado por convección a 65°C por 5 horas. Posteriormente las cortezas y cáscara fueron pulverizadas con un molino de café (KRUPS GX410011V), seguido de un tamizado con malla de 500 µm. El material vegetal tratado se almacenó en bolsas con cierre hermético tipo ziploc a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco hasta su utilización.

## 2.3. Obtención de extractos

Los métodos de extracción aplicados a cada especie vegetal se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Métodos y condiciones de extracción

Material vegetal	Obtención de extractos	Condiciones de extracción
X'kijit ( <i>Renalmia alpinia</i> )	Maceración con solventes (Camilo-Patiño <i>et al.</i> , 2013)	Se colocó el polvo de materia vegetal en maceración con etanol al 95% a una concentración de 0.375 gr/mL (P/V) a 25°C con agitación (60 rpm), realizando concentraciones cada 24 h por tres días.
Cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens (Schltdl) Schiede ex Standl</i> )	Maceración con solventes (Rosas-Pinóña <i>et al.</i> , 2012)	
Cancerina ( <i>Hippocratea excelsa HBK</i> )		
Eucalipto ( <i>Eucalyptus sp.</i> )	Hidrodestilación (Mann <i>et al.</i> , 2011)	A 96°C a presión atmosférica 1 hora por ciclo de extracción

Los extractos etanólicos obtenidos se concentraron con un rotavapor a 60 °C aplicando vacío para eliminar las trazas de etanol (Mbaya *et al.*, 2006).

Los extractos obtenidos, se pesaron y almacenarón a una temperatura de -20°C. Los rendimientos se estimaron de acuerdo con la cantidad de material vegetal utilizada, empleando la ecuación propuesta por Boelens (1985):

$$R_{HE}(\%) = (m_{HE}/m_S) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

Donde  $m_{HE}$  = cantidad del extracto (mL),  $m_S$  = Masa del vegetal en materia seca (g) y  $R_{HE}$  = Rendimiento del extracto (%).

#### **2.4. Preparación de los sistemas modelo**

Se aplicaron sistemas modelo debido a que permite simular el proceso de manera controlada para su posterior análisis de datos. Para la preparación de los sistemas modelos se utilizó el medio de crecimiento para hongos PDA (Papa Dextrosa Agar), al cual, previamente estéril, se añadió cada extracto etanólico y acuoso a una concentración de 0, 200, 500 y 800 ppm para posteriormente vertirse en placas. Para obtener una dispersión homogénea en el medio de crecimiento, los extractos etanólicos se volvieron a suspender en etanol en relación de 0.1% del volumen total de PDA (Monsálvez *et al.*, 2010). En tanto que para garantizar la estabilidad de la emulsión con el aceite esencial se empleó un método de agitación y otro de sonicación; en el primer caso se preparó una suspensión al 1% del aceite con una solución salina tampón de fosfato (50 mM de solución buffer de fosfatos [ PBS ; pH 7 ]); seguido de una vigorosa agitación (Friedman *et al.*, 2002) con ayuda de un Vortex y su posterior dilución en las concentraciones antes mencionadas en el medio de PDA, por otro lado la sonicación se aplicó a una amplitud de 90% durante un tiempo de 60 y 90 s. (Mirmajidi y Soleiman, 2014).

Se establecieron tres repeticiones por cada tratamiento y un control (PDA).

### 2.4.1. Cultivos fúngicos

Las cepas de hongos que se utilizarón en el estudio fueron obtenidas de aislados de cultivos de vainas de vainilla enfermas procedentes de municipios de Veracruz y Puebla, previamente identificadas mediante análisis macroscópicos y por secuenciación de ADN. Las cepas empleadas en el presente trabajo fueron *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *A. wentii* las cuales se mantuvieron en cuñas de PDA y se resembraron cada mes para garantizar su viabilidad.

### 2.4.2. Inoculación

En cada placa preparada se inoculó por picadura (alícuota de 10 µL) a partir del lavado de esporas de cada uno de los hongos previamente seleccionados, provenientes de cuñas de 5 días de crecimiento. Se garantizó una concentración de 10<sup>6</sup> esporas/mL mediante el conteo en cámara de Neubauer (Pekmezovic *et al.*, 2015). Posteriormente se incubaron a 28° C hasta el cubrimiento de total de la caja.

## 2.5. Mediciones de crecimiento radial: variaciones en la fase Lag, velocidad de crecimiento radial e índice de inhibición de crecimiento del micelio.

El crecimiento promedio radial acumulado se determinó en cuatro ejes, la medición se realizó hasta que el micelio cubrió toda la placa (French y Hebert, 1981). Además de los datos obtenidos, se determinó el índice de inhibición del crecimiento del micelio (GII)

$$(GII) = [(GMC - GMT) / GMC] \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

donde: GMC = crecimiento del micelio en el control, GMT = crecimiento del micelio en los sistemas modelo (Monsálvez *et al.*, 2010).

Finalmente se aplicó el Modelo de Gompertz de tres parámetros (ecuación 1) en el software SigmaPlot 12.0 para obtener las cinéticas de crecimiento los valores la

fase Lag y velocidad de crecimiento radial máxima para cada tratamiento. Todos los parámetros de las cinéticas con un valor de R<sup>2</sup> mayor a 0.86.

$$y = ae^{-e^{(x-x_0/b)}} \dots\dots\dots(1)$$

Donde la variable "x" es el tiempo de incubación y "y" es el crecimiento mientras a, b y x<sub>0</sub> son los parámetros característicos de cada cinética.

## 2.6. Sistemas Modelo

Se empleo un diseño experimental completamente al azar en todos los experimentos. Las variables implicadas se mencionan en la siguiente tabla:

**Tabla 7. Diseño experimental completamente al azar**

<b>Variables independientes</b>	<b>Variables dependientes</b>
<b>Agentes antifúngicos</b>	GII*
X'kijit	tiempo Lag
Cuachalalate	velocidad de crecimiento
Cancerina	radial
Eucalipto	
Eucalipto (60 s de sonicación)	
Eucalipto (90 s de sonicación)	
<b>Concentraciones (ppm)</b>	
200	
500	
800	
<b>Hongos</b>	
<i>Colletotrichum sp.</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Aspergillus wentii</i>	

\* Índice de inhibición del crecimiento del micelio

## 2.7. Análisis Estadístico

De acuerdo con el diseño experimental propuesto se analizó el efecto de los tratamientos (variables independientes) sobre las variables de respuesta, mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de α=0.05,

seguido por pruebas de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las variables de respuesta.

## Capítulo 3. Resultados y Discusión

### 3.1.- Rendimientos de extractos

En la Tabla 8 se presentan los rendimientos obtenidos con los diferentes antimicrobianos, calculados a partir de la ecuación 3. Específicamente el rendimiento de la corteza de cancerina (*Hippocratea excelsa*) coincide con valores obtenidos por Escobedo-Hinojosa *et al.*, (2014), con extractos etanólicos con hojas y tallos de la planta. Sin embargo los usos tradicionales de esta planta son aplicando la corteza (García-Jiménez, 2009). En relación con el rendimiento obtenido a partir del pericarpio del X'kijit fue ligeramente superior al reportado por Gómez-Betancur *et al.*(2015) con un valor del 4.93%. Por su parte al comparar los rendimientos del aceite esencial de eucalipto coincide con otros estudios donde se mostraron rendimientos de 0.21 a 0.5 %, dicha variación está en función de la localidad en la que se obtuvo la muestra y la época del año en la que se realiza la coleta del material vegetal (Silou *et al.*, 2009).

**Tabla 8.** Rendimiento de extractos metanólicos y acuosos

Materia vegetal	Tipo de extracto	Rendimiento (%)
X'kijit	etanólico	6.03
cuachalalate	etanólico	5.81
cancerina	etanólico	4.04
eucalipto	acuoso	0.25

### 3.2. Actividad antifúngica

Para la valoración de la actividad antifúngica se obtuvo la cinética de crecimiento respectiva de cada cepa fúngica y mediante el modelo de Gompertz se obtuvieron los valores de tiempo Lag y velocidad máxima de crecimiento, los valores para los controles se presentan en la tabla 9.

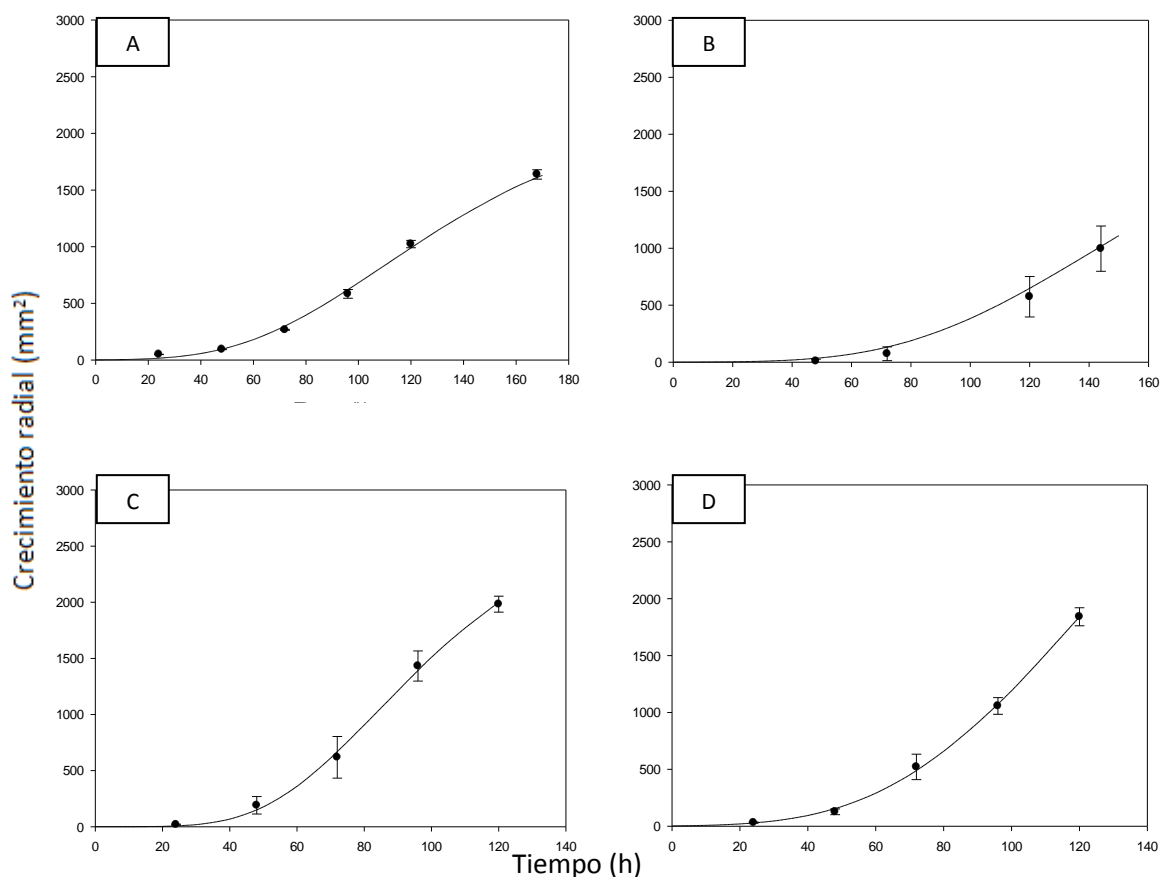
**Tabla 9.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag para los controles

Cepa fúngica	PDA		PDA + e-OH		PDA+PSB	
	Tiempo Lag	V max	Tiempo Lag	V max	Tiempo Lag	V max
<i>F. oxysporum</i>	19.25	25.45	18.25	25.58	15.15	23.75
<i>Colletotrichum sp.</i>	39	36.36	26.75	25.81	10.5	15.92
<i>A. niger</i>	32	38.27	24.5	33.17	33.75	46.38
<i>A. wentii</i>	5	3.2	5	1.52	3	1.93

A continuación se describe el efecto antifúngico de cada uno de los extracto sobre las cinéticas de crecimiento radial de cepas fúngicas de interés.

### 3.2.1. Sistemas Modelo con Extracto de X'kijit (*Renealmia alpinia*)

El extracto de X'kijit presentó propiedades antifúngicas teniendo un efecto significativo sobre el comportamiento cinético de *Fusarium oxysporum* (Fig 21A, 22A y 23A), disminuyendo su velocidad máxima de crecimiento de 15.41 a 13.08 mm<sup>2</sup>/h. De forma similar fue el comportamiento de *Aspergillus niger* donde su velocidad de crecimiento se redujo del 30.74 a 27.41mm<sup>2</sup>/h (Fig. 21C, 22C y 23C). Por su parte el *Colletotrichum sp.* mostró un incremento en su tiempo Lag conforme cambio la concentración del extracto (200-800ppm), variando de 42 a 80.5 h, lo cual implica una mayor sensibilidad de este hongo a los compuestos del extracto del fruto X'kijit. Cabe mencionar que un incremento en tiempo Lag es de relevancia y que esto revela un efecto sobre la homeóstasis de los microorganismos, lo cual ayuda a la preservación de los alimentos, esto debido a que al permanecer por más tiempo en la fase Lag estos no pueden reproducirse durante este periodo (Castillo, 2006).



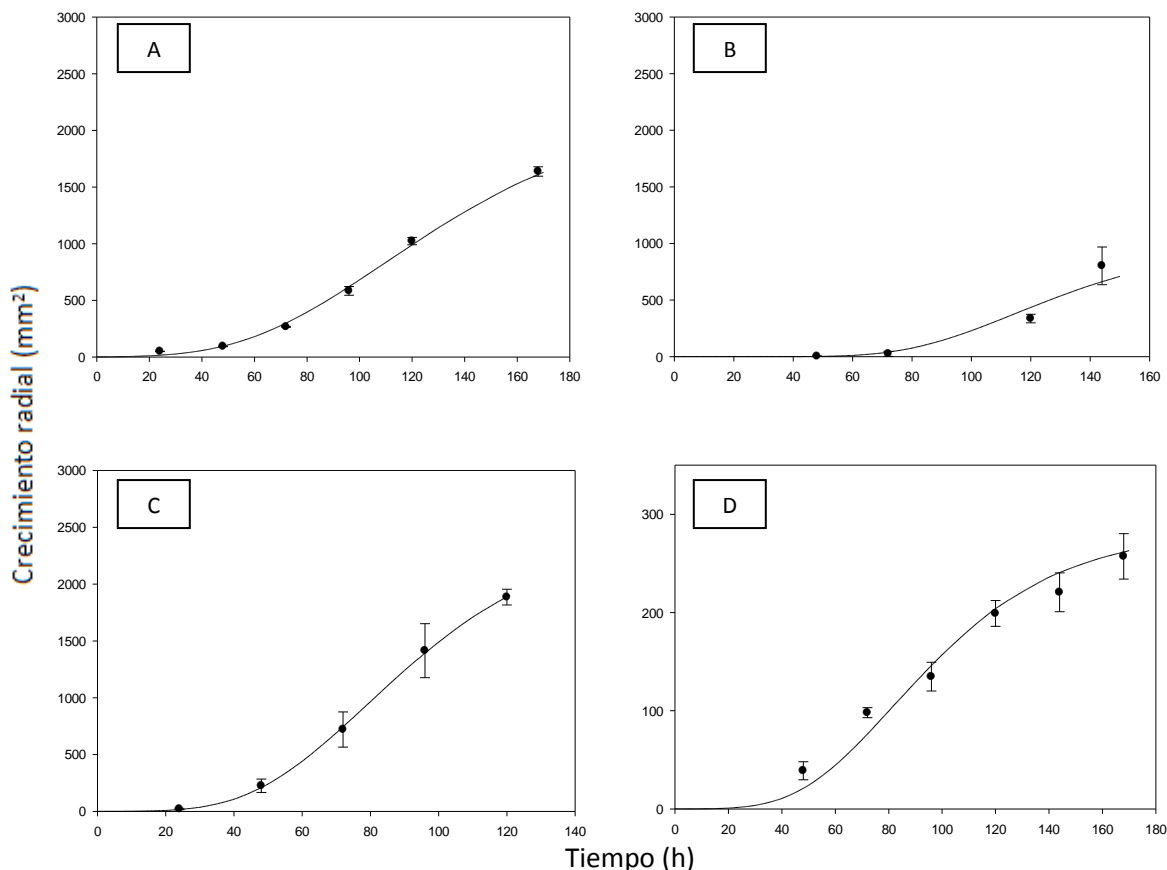
**Figura 64** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum* sp. (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de X'kijit (*Renalmia alpinia*) a concentración de 200 ppm.

**Tabla 10** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 200ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	28.00	15.41
<i>Colletotrichum</i> sp.	42.00	15.74
<i>A. niger</i>	8.75	30.74
<i>A. wentii</i>	35.50	3.48

En estudios previos se ha identificado compuestos a partir de extractos metanólicos del X'kijit (*R. alpinia*) tales como: pinostrobin, 7,40-dimetil éter naringenina, 20,60-dihidroxi-40-metoxicalcona, 4-metoxi-6-(2-feniletetil) 2H-piran-2-ona, 7-metil éter naringenina y 1,7-difenil,3,5-heptanodiol. De acuerdo con Gómez-Betancur *et al.* (2015) la composición fitoquímica de *R. alpinia* ha

mostrado la presencia de flavonoides, diarilheptanoides, kavalactonas y varias saponinas, donde algunos presentan actividad antimicrobiana.



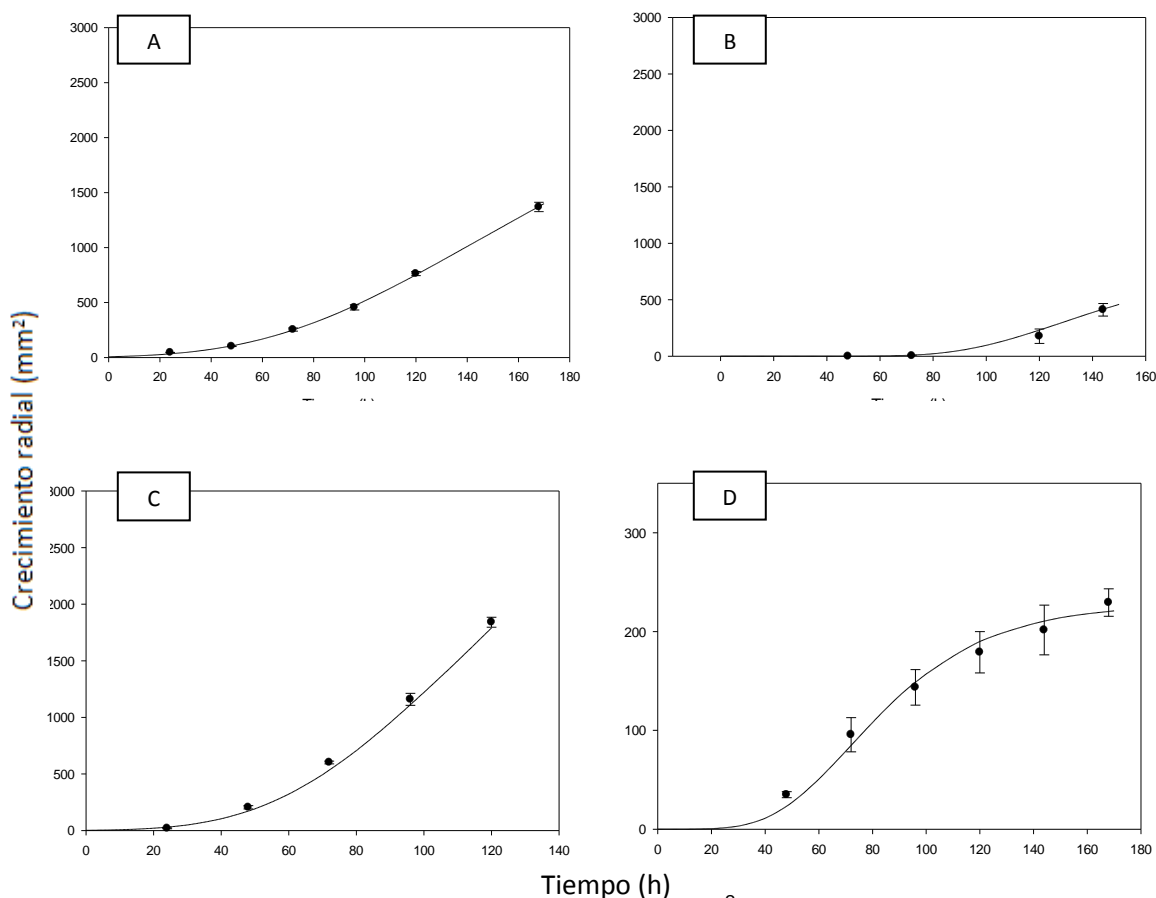
**Figura 65** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum* sp. (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de X'kijit (*Renalemia alpinia*) a concentración de 500 ppm.

**Tabla 11.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 500ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	24.00	14.34
<i>Colletotrichum</i> sp.	22.25	10.49
<i>A. niger</i>	26.25	27.41
<i>A. wentii</i>	39.25	2.96

Específicamente el pinostrobin, cuya estructura pertenece a los propóleos mismos que han demostrado actividad antimicrobiana y antifúngica. El efecto antimicrobiano de los propóleos se correlaciona con su compleja composición que

comprende flavonoides (Patel *et al.*, 2015). Si bien el mecanismo de acción no se conoce claramente, algunos estudios sugieren que ciertas moléculas interfieren con la división celular a través de la generación de compuestos pseudomulticelulares, además producen desorganización citoplasmática, lisis celular e inhibición en la síntesis de proteínas (Takaisi-Kikuni y Schilcher, 1994).



**Figura 66** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de X'kijit (*Renalmia alpinia*) a concentración de 800 ppm.

**Tabla 12.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de X'kijit a 800ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	17.00	13.08
<i>Colletotrichum sp.</i>	80.50	7.81
<i>A. niger</i>	20.75	28.41
<i>A. wentii</i>	39.00	2.89

Mientras tanto en las evaluaciones realizadas por Soleo-Funari *et al.* (2012) sobre la actividad antimicrobiana de la naringenina (concentración mínima inhibitoria mayor a 125 µg/mL) extraída de especies de *Lippia*, mostró un efecto inhibitorio sobre los hongos como *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *Cryptococcus neoformans*. Otro estudio similar en relación con la actividad de la hidroxilactona demostraron el efecto antimicrobiano sobre *Micrococcus flavus*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium sp.* y *Rhodotorula rubra* (Grabarczyk *et al.*, 2015).

Asimismo *Colletotrichum sp* presentó los mayores índices de inhibición en los sistemas modelos con 800 ppm del extracto (Fig. 17B, 18B y 19B).

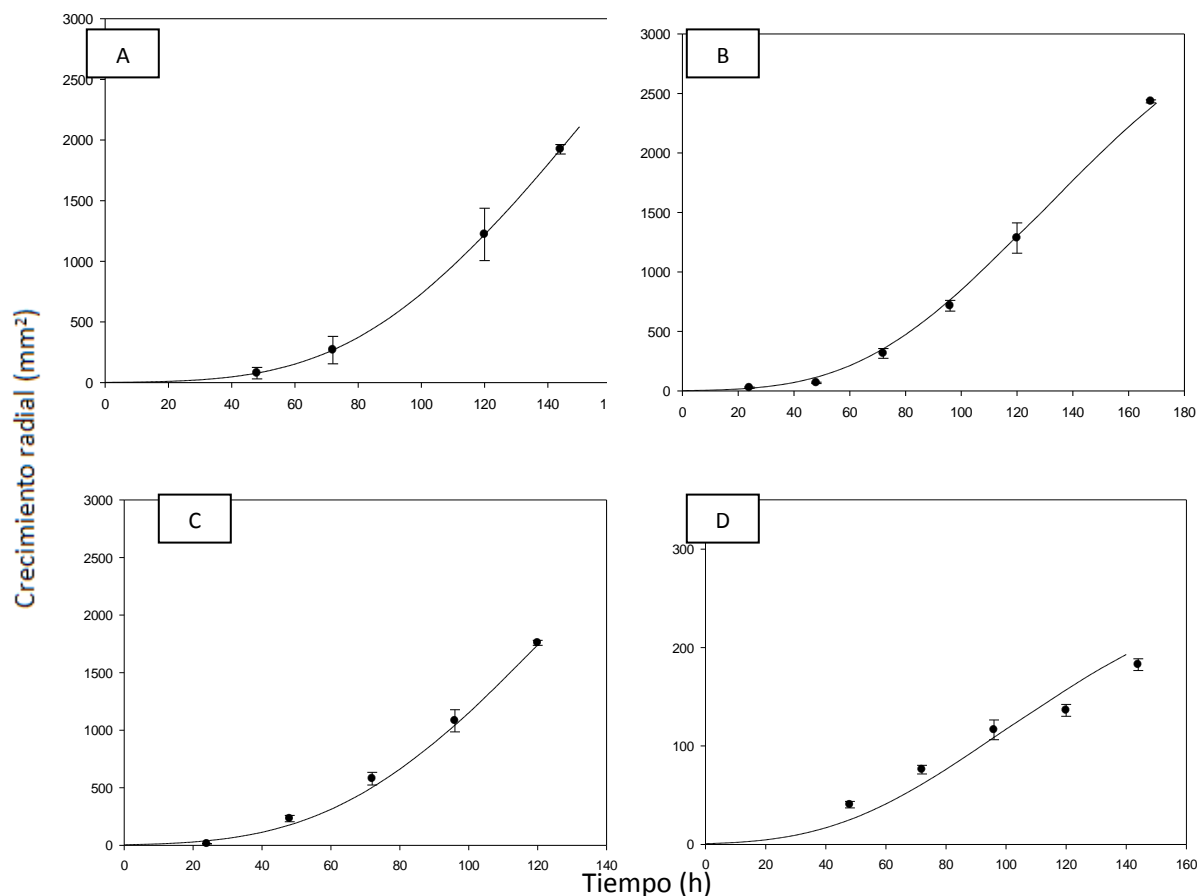
En tanto que las cinéticas de crecimiento radial de *Aspergillus wentii* y *Aspergillus niger* no presentaron cambio en relación con la concentración del extracto X'kijit manteniendo mayor inhibición con 200 ppm y 500 ppm (Fig. 21C, 22C, 23C, 21D, 22D y 23D).

### **3.2.2. Sistemas Modelo con Extracto de Cancerina (*Hippocratea excelsa*)**

Los sistemas modelos adicionados con los extractos de cancerina (*Hippocratea excelsa*) inoculados con *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum sp.* y *Aspergillus wentii*, presentaron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en sus cinéticas de crecimiento radial en relación con la concentración del agente antimicrobiano (Fig. 24A, 25A, 26A, 24B, 25B y 26B). De forma particular *Colletotrichum sp.* mostró un incremento en su tiempo Lag de 50.25 a 70.75 h en los sistemas modelo con 800ppm. De forma similar *Aspergillus wentii* exhibió inhibición resultando ser el moho menos resistente, donde mostro una disminución de su velocidad máxima de crecimiento de 2.06 a 1.45 mm<sup>2</sup>/h con los tratamientos del extracto de cancerina (*Hippocratea excelsa*) (Fig. 24D, 25D y 26D).

Para entender el efecto de la cancerina sobre los mohos es necesario mencionar que dentro de los compuestos que se han aislado de extractos metanólicos de *Hippocratea excelsa* se encuentran  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol y su

glucósido que tienen un grupo hidroxilo (libre o derivado) en la posición C-3 de la estructura de triterpenoides o esterol. Además de presentar los flavonoides: catequina, 3-O-metilcatequina y (+)cianidanol (Navarrete *et al.*, 2002). Otro estudio logró aislar alcaloides de extractos etanólicos de la plata entre los que se encuentran emarginatina A y hipocrateína I. Además de los dos anteriores presenta una combinación de otros 12 alcaloides (Furukawa *et al.*, 2002).

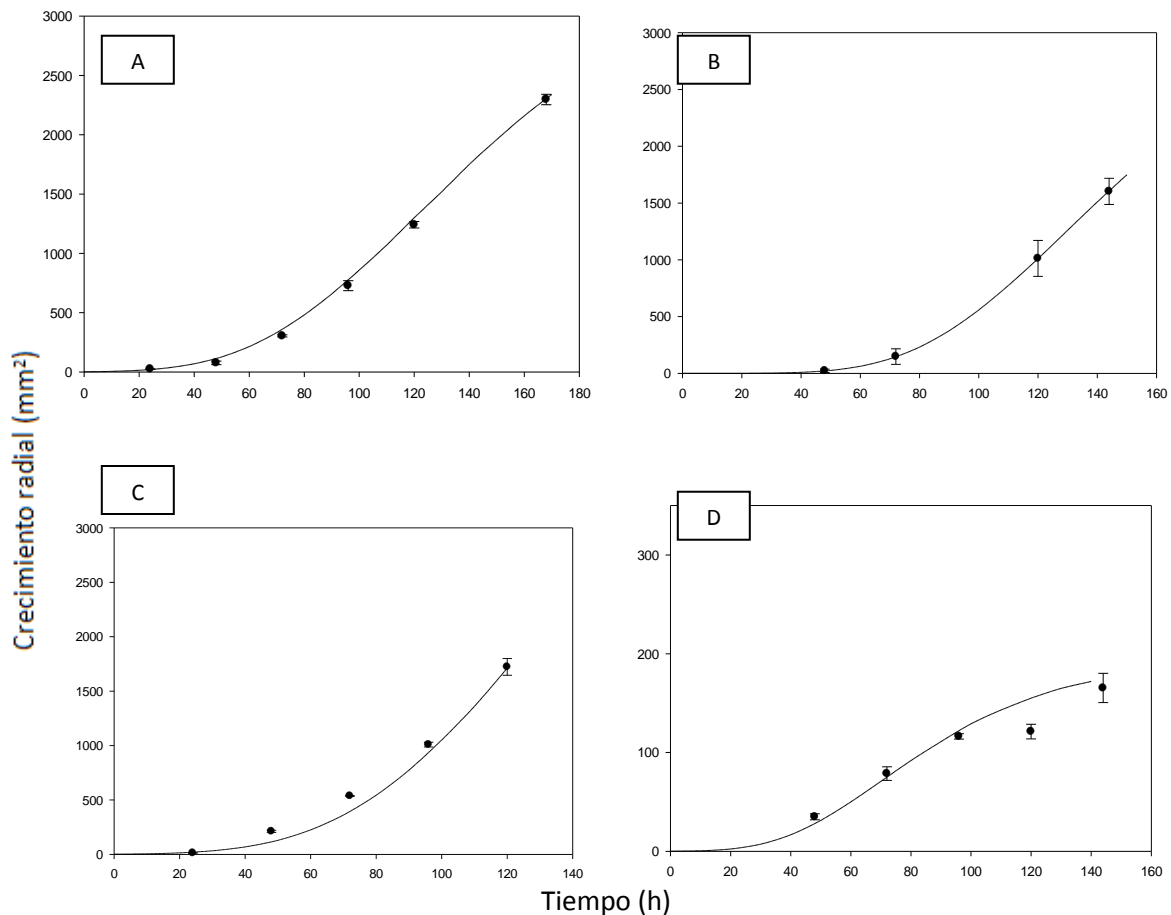


**Figura 67** Cinética de crecimiento radial (en  $\text{mm}^2$ ) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina (*Hippocratea excelsa*) a concentración de 200 ppm.

**Tabla 13.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 200ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{\text{max}}$ ( $\text{mm}^2/\text{h}$ )
<i>F. oxysporum</i>	15.00	23.59
<i>Colletotrichum sp.</i>	50.25	30.97
<i>A. niger</i>	12.25	30.98
<i>A. wentii</i>	31.00	2.06

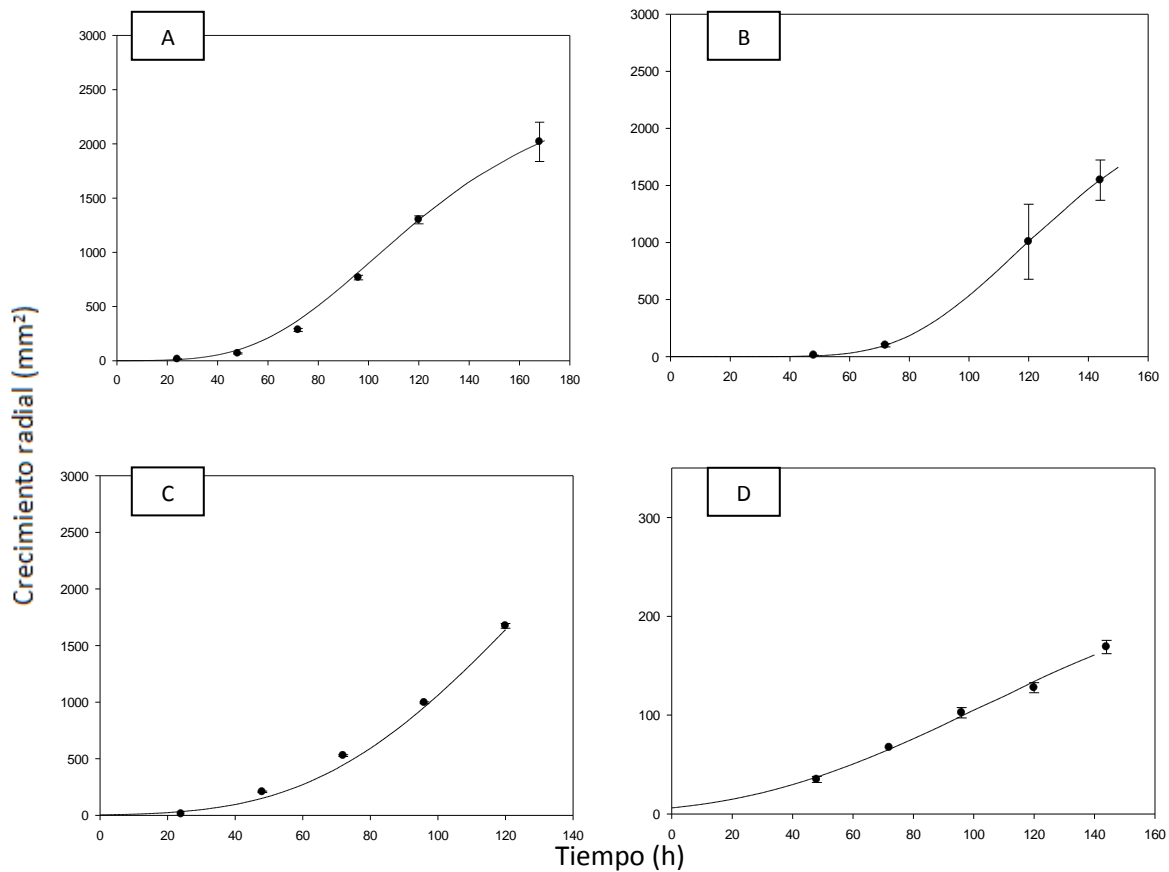
El compuesto de  $\beta$ -amirina (un triterpeno) ha demostrado actividad antimicrobiana con *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* con una concentración mínima inhibitoria para ambos de 2.5 mg/mL (Abdel-Raouf *et al.*, 2015). Asimismo la  $\beta$ -amirina es el segundo compuesto mayoritario de la *F. drupacea*, la cual ha demostrado actividad antifúngica contra *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus versicolor* (Yessoufou *et al.*, 2015). Otros estudios han reportado fuertes actividades antimicrobianas y antifúngicas de  $\alpha$  y  $\beta$ - amirinas (triterpenos pentacíclicos) extraídos de diversas especies de *Ficus* (Vázquez *et al.*, 2012).



**Figura 68** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum* sp. (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina (*Hippocratea excelsa*) a concentración de 500 ppm.

**Tabla 14.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 500ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{max}$ (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	16.50	22.58
<i>Colletotrichum sp.</i>	50.25	24.85
<i>A. niger</i>	25.25	38.06
<i>A. wentii</i>	33.50	2.09



**Figura 69** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cancerina (*Hippocratea excelsa*) a concentración de 800 ppm.

**Tabla 15.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cancerina a 800ppm

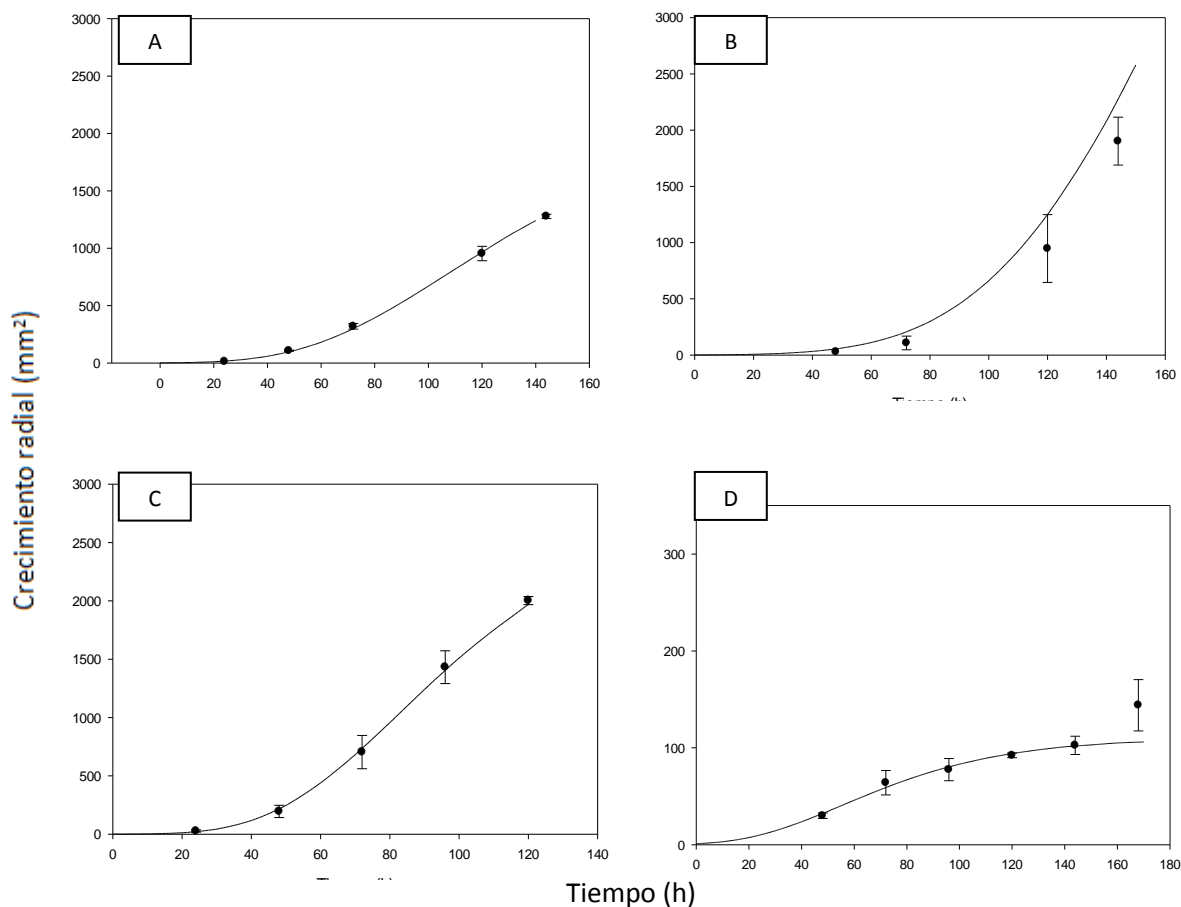
Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{max}$ (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	23.50	20.35
<i>Colletotrichum sp.</i>	70.75	24.25
<i>A. niger</i>	19.25	31.81
<i>A. wentii</i>	31.00	1.45

Por su parte el  $\beta$ -sitosterol un compuesto presente en diversas plantas y con una concentración mínima inhibitoria superior a 256 ug/mL presentó actividad antibacteriana con *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Providencia stuartii* (Seukep *et al.*, 2015; Tankeo *et al.*, 2015); de modo similar la catequina y sus derivados, compuesto fenólicos, han presentado un efecto inhibitorio significativo en el crecimiento de *H. pylori* (Díaz-Gómez, 2013).

### **3.2.3. Sistemas Modelo con Extracto de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl)**

Los extractos de cuachalalate mostraron un efecto antifúngico significativo sobre los mohos en estudio ( $P < 0.05$ ), específicamente sobre *Colletotrichum sp.* redujo su velocidad máxima de crecimiento de 20.67 a 18.24 mm<sup>2</sup>/h con los tratamientos de 800 ppm (Fig. 29B). De igual forma *Aspergillus wentii* se vio afectado su comportamiento con los tratamientos de 800 ppm presentando un tiempo Lag y velocidad máxima de crecimiento de 39.50 h y 1.09 mm<sup>2</sup>/h, respectivamente (Figura 27D, 28D y 29D).

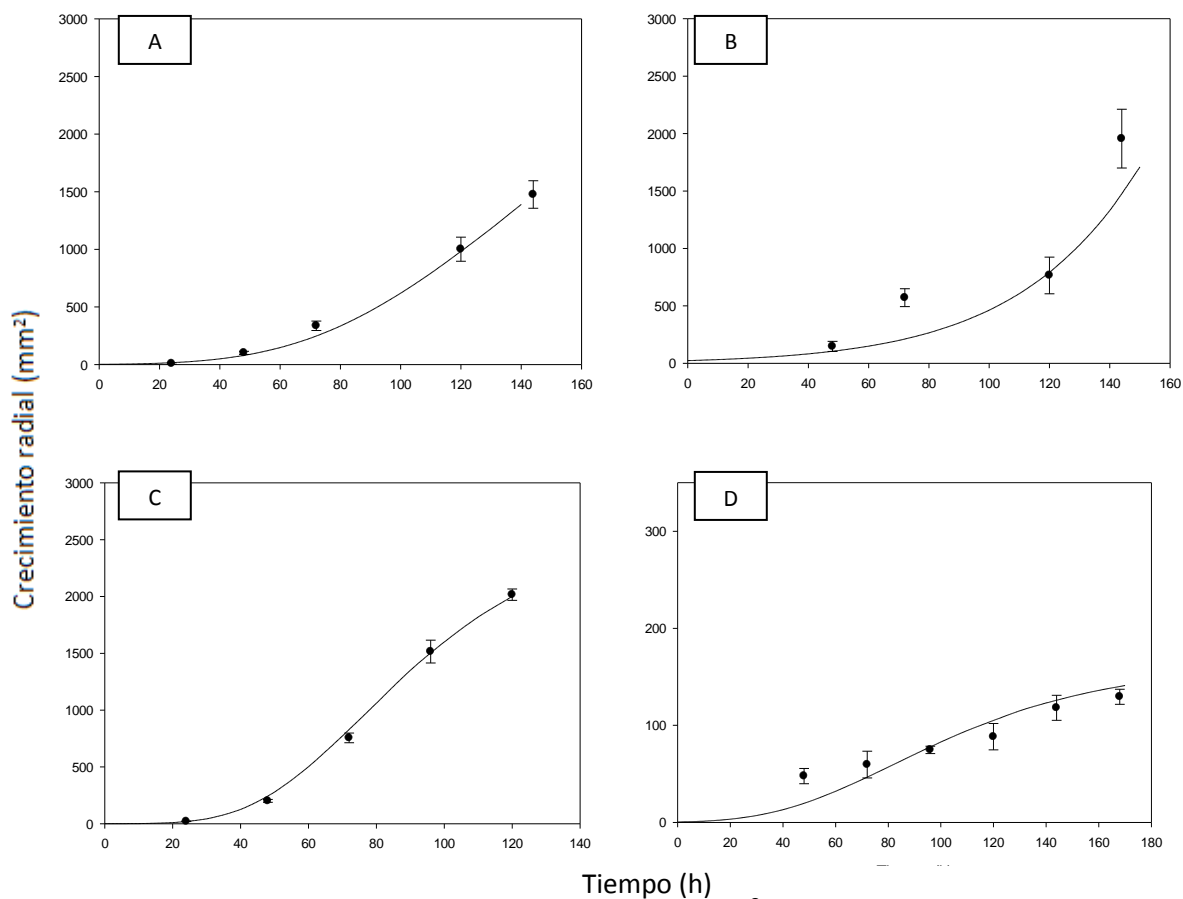
Algunos de los compuestos que se han logrado identificar de extractos de la corteza del árbol de cuachalalate incluyen ácidos masticadienónico y un hidroximasticadienónico así como dos mezclas de ácidos masticadienónico / isomasticadienónico y el ácido hidroximasticadienónico con un compuesto desconocido (Ortega *et al.*, 1999). Otro estudio similar realizado por Castillo-Juárez (2007) también identificaron triterpenos a partir de la corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl), tales como: ácido masticadienónico, ácido 3 $\alpha$ -hidroxi masticadienónico, ácido 3-ep-oleanólico; así como el esteroide  $\beta$ -sitosterol junto con los ácidos fenólicos alquino saturados (C15: 0, C16: 0, C17: 0 C19: 0), estos últimos han demostrado ser una nueva fuente de compuestos con actividad anti-*Helicobacter pylori*.



**Figura 70** Cinética de crecimiento radial (en  $\text{mm}^2$ ) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltld) Schiede ex Standl) a concentración de 200 ppm.

**Tabla 16.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 200ppm

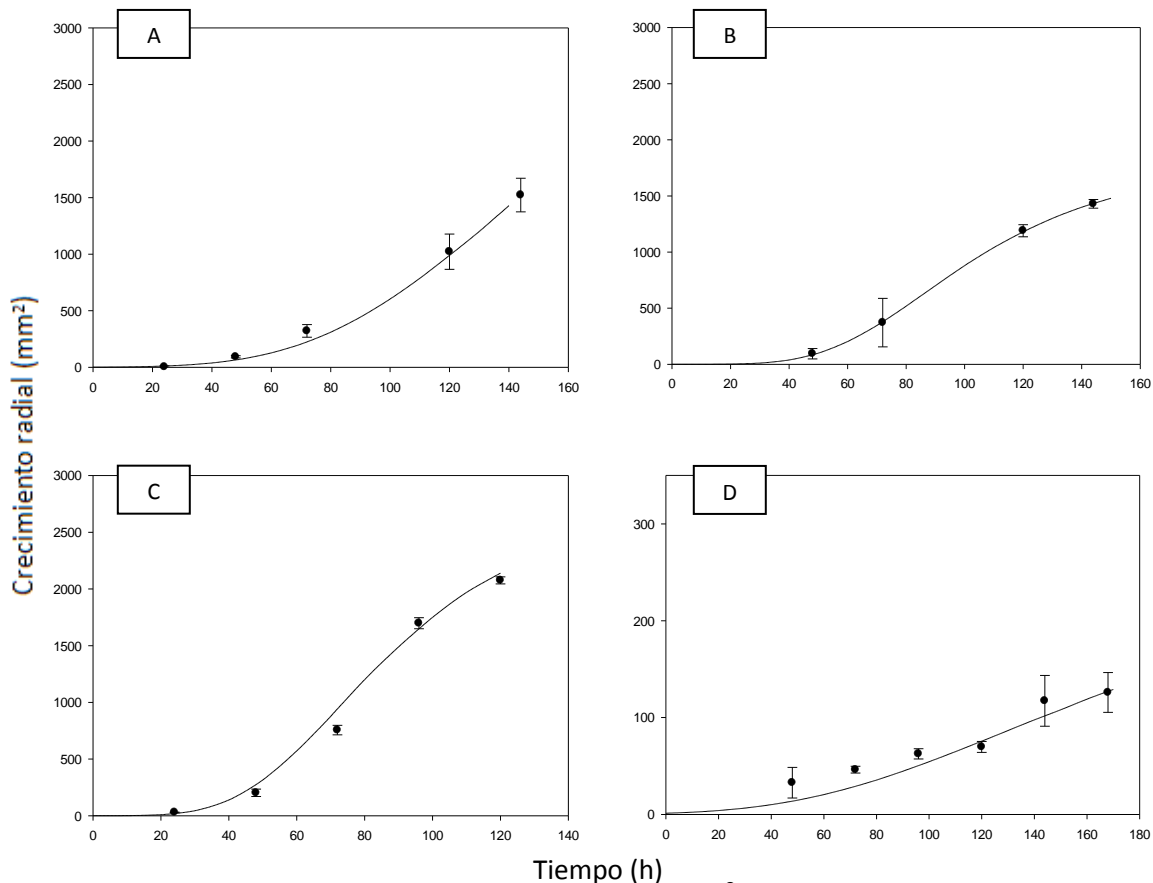
Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{\text{max}}$ ( $\text{mm}^2/\text{h}$ )
<i>F. oxysporum</i>	19.00	14.82
<i>Colletotrichum sp.</i>	43.00	20.67
<i>A. niger</i>	16.75	28.10
<i>A. wentii</i>	24.00	1.13



**Figura 71** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl) a concentración de 500 ppm.

**Tabla 17.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 500ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	18.50	20.60
<i>Colletotrichum sp.</i>	45.50	18.80
<i>A. niger</i>	25.25	29.09
<i>A. wentii</i>	35.50	1.30



**Figura 72** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl) Schiede ex Standl) a concentración de 800 ppm.

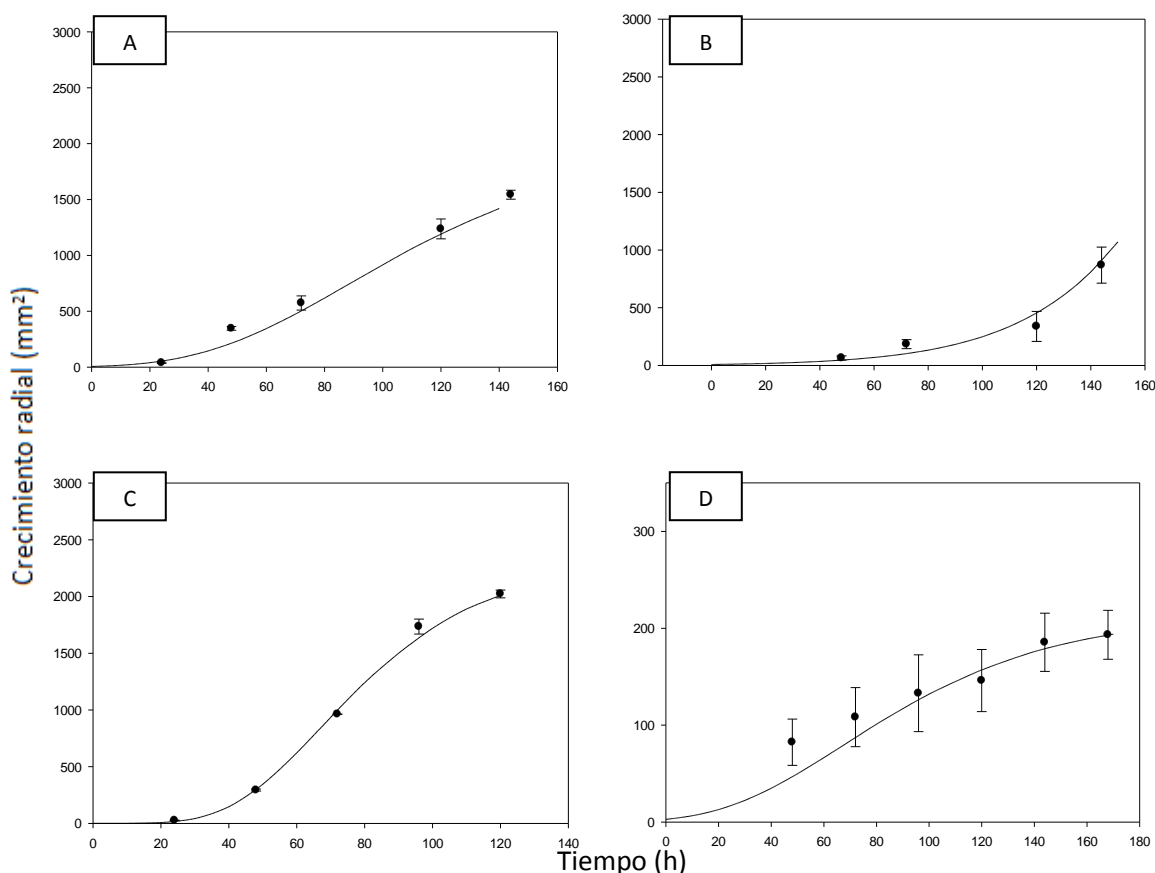
**Tabla 18.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de cuachalalate a 800ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	23.00	22.33
<i>Colletotrichum sp.</i>	40.25	18.24
<i>A. niger</i>	19.25	31.77
<i>A. wentii</i>	39.50	1.09

### 3.2.4. Sistemas Modelo con Aceite Esencial de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*)

El aceite esencial de eucalipto afectó significativamente el desarrollo de *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.*, quienes redujeron su velocidad máxima de crecimiento de 14.88 a 12.98 mm<sup>2</sup>/h y de 2.69 a 2.32 mm<sup>2</sup>/h, respectivamente con los tratamientos con 500 ppm y se rebeló una variación en la velocidad máxima de

crecimiento (Figura 30A, 31A, 32A, 30B, 31B y 32B). Mientras que para *Aspergillus niger* y *A. wentii* no se observó un efecto tan notorio sobre sus cinéticas de crecimiento (Figura 28C, 29C, 30C, 28D, 29D y 30D).



**Figura 73** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum* sp. (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) a concentración de 200 ppm.

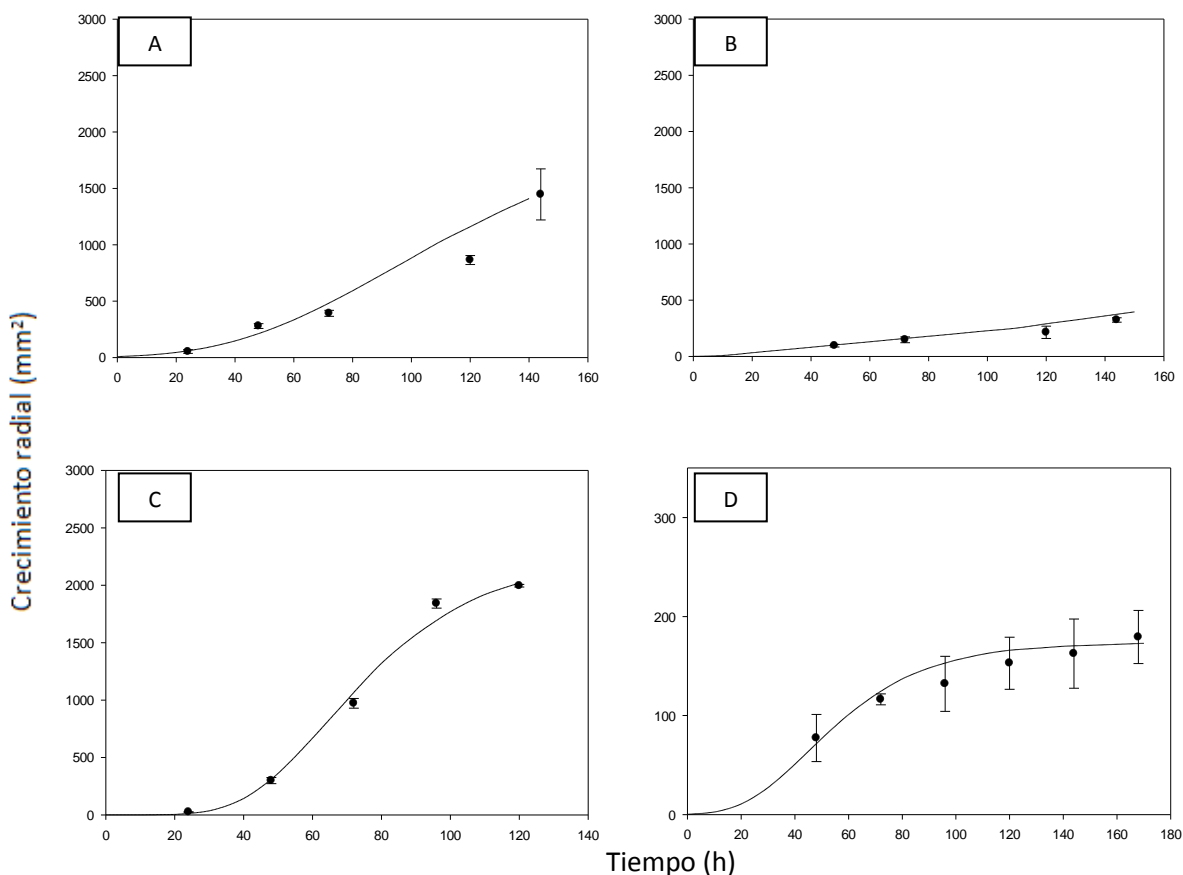
**Tabla 19.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de eucalipto a 200ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	23.00	22.33
<i>Colletotrichum</i> sp.	40.25	18.24
<i>A. niger</i>	19.25	31.77
<i>A. wentii</i>	39.50	1.09

En la composición del aceite esencial de eucalipto se encuentran compuestos tales como: α-pineno, o-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, α-terpinoleno, (-) isopulegol

y  $\beta$ -citronellol (Maciel *et al.*, 2010). El aceite esencial de eucalipto es conocido por su potencial antifúngico y su efecto sobre *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* con una concentración mínima fungicida de 1.25  $\mu$ L/mL (Tolba *et al.*, 2015).

De los compuestos antes mencionados Barakat (2011) y Liu *et al.* (2010) demostraron que la actividad de los aceites esenciales se atribuye a la presencia de pineno con un alto efecto tóxico contra el pulgón del algodón *Aphis gossypii* ( $DL_{50}$  alcanzó 0,65  $10^{-1}$  g por individuo).

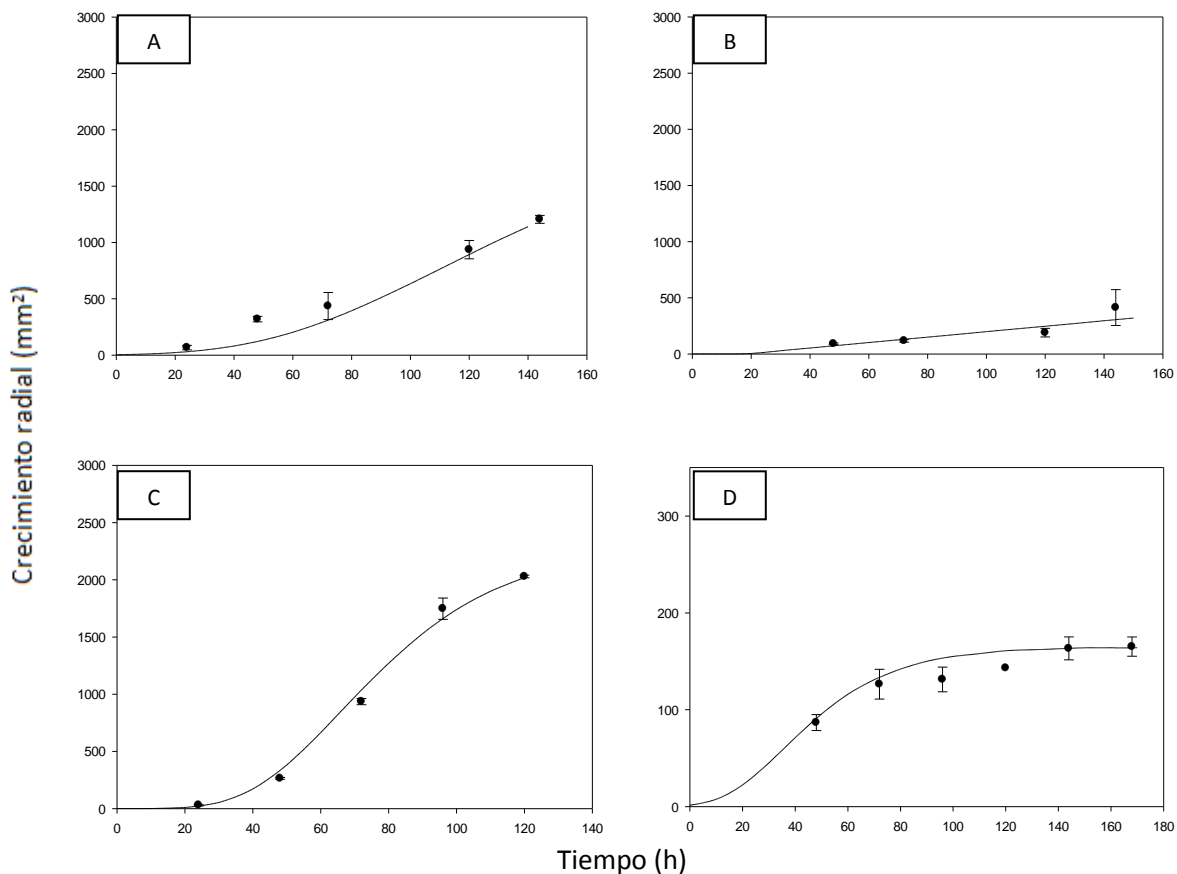


**Figura 74** Cinética de crecimiento radial (en  $mm^2$ ) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) a concentración de 500 ppm

**Tabla 20.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de eucalipto a 500 ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	10.75	14.63
<i>Colletotrichum sp.</i>	43.00	2.44
<i>A. niger</i>	27.50	33.60
<i>A. wentii</i>	27.50	2.35

De acuerdo con Ojeda-Sana *et al.* (2013) los aceites esenciales de eucalipto y específicamente la presencia de  $\alpha$ -pineno revelaron un amplio espectro antibacteriano frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los reportes de Cox *et al.*(2000) y Matsuo *et al.* (2011) revelaron que el mecanismo de acción del  $\alpha$ -pineno radica en alterar la integridad celular incrementando la permeabilidad de la membrana, asimismo se conoce que este compuesto es capaz de permear la membrana mitocondrial externa a nivel celular.



**Figura 75** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) a concentración de 800 ppm.

**Tabla 21.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con extracto de eucalipto a 800 ppm

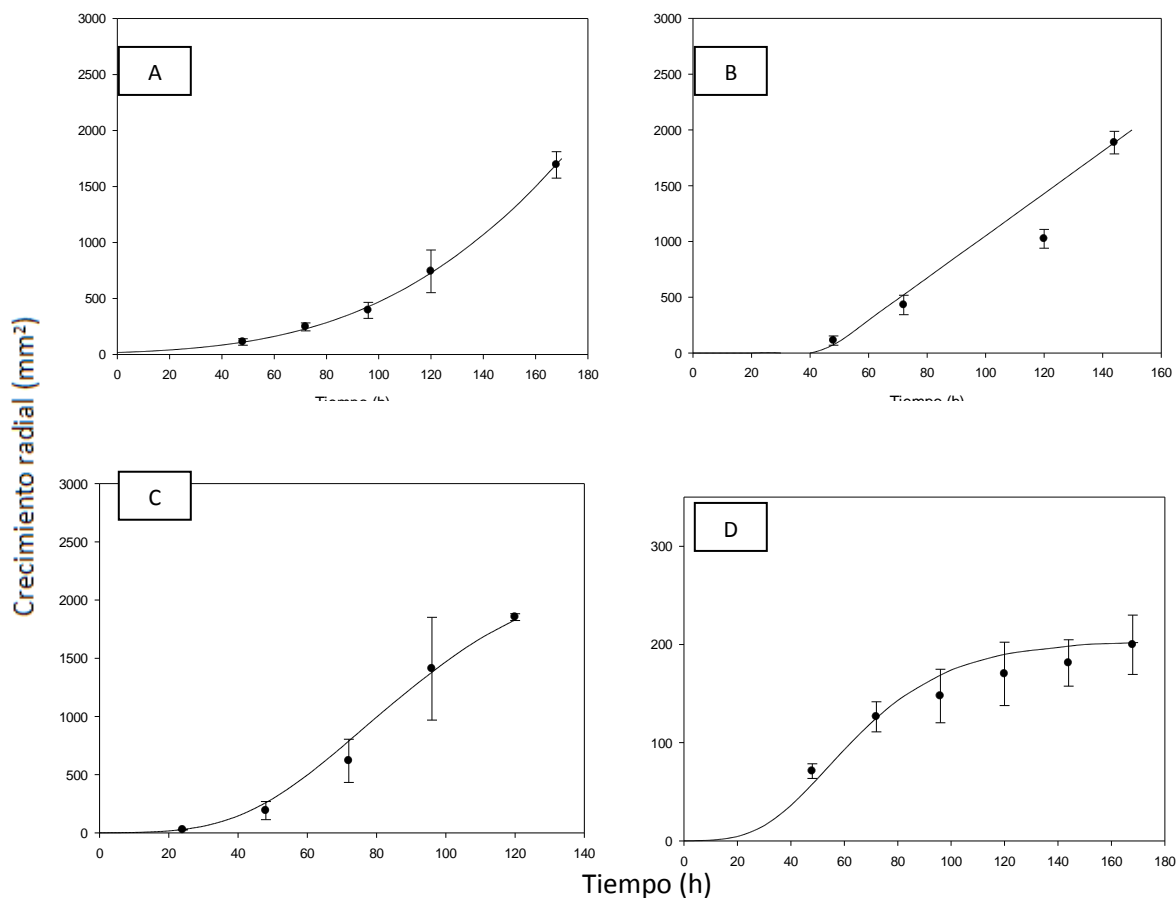
Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	10.00	12.98
<i>Colletotrichum sp.</i>	34.00	2.42
<i>A. niger</i>	24.50	31.10
<i>A. wentii</i>	20.00	2.60

Por su parte el 1,8-cineol es activo contra las bacterias Gram-negativas con valores de concentración mínima inhibitoria de 8 a 20  $\mu\text{L/mL}$  (Ojeda-Sana *et al.*, 2013). Debido a la naturaleza lipófila de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, se cree que su actividad antibacteriana se lleva a cabo por la alteración en las membranas celulares (Sikkema, de Bont y Poolman, 1995). El limoneno, es un compuesto aromático y mayoritario en diversas plantas, el cual ha mostrado actividad antimicrobiana y antifúngica contra varias especies como *Microcystis aeruginosa*, *Trichoderma viride*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus flavus* (Mourey y Canillac, 2002; Ozturky-Ercisli, 2006; Singh *et al.*, 2010; Sanchez-Aldana *et al.*, 2015).

### 3.2.5. Sistemas Modelo adicionados Aceite Esencial de Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) homogenizados mediante sonicación

#### a) Sistemas modelo adicionados aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) sonicados durante 60 s

Con la aplicación de 60 s de sonicación en la dispersión del aceite esencial de eucalipto se observó un efecto significativo sobre el crecimiento radial *Fusarium oxysporum*, con una disminución de la velocidad máxima de crecimiento de 39 a 8.22  $\text{mm}^2/\text{h}$ , y un incremento del 27% del tiempo Lag de 31.50 a 40.25 h, con el tratamiento de 200 ppm (Fig. 33A, 34A y 35A). Una tendencia similar se observó con el crecimiento de *Colletotrichum sp.* y una disminución del 66% de la velocidad máxima de crecimiento (de 18.97 a 6.60  $\text{mm}^2/\text{h}$ ) con una concentración de 800 ppm (Fig. 33B, 34B y 35B).

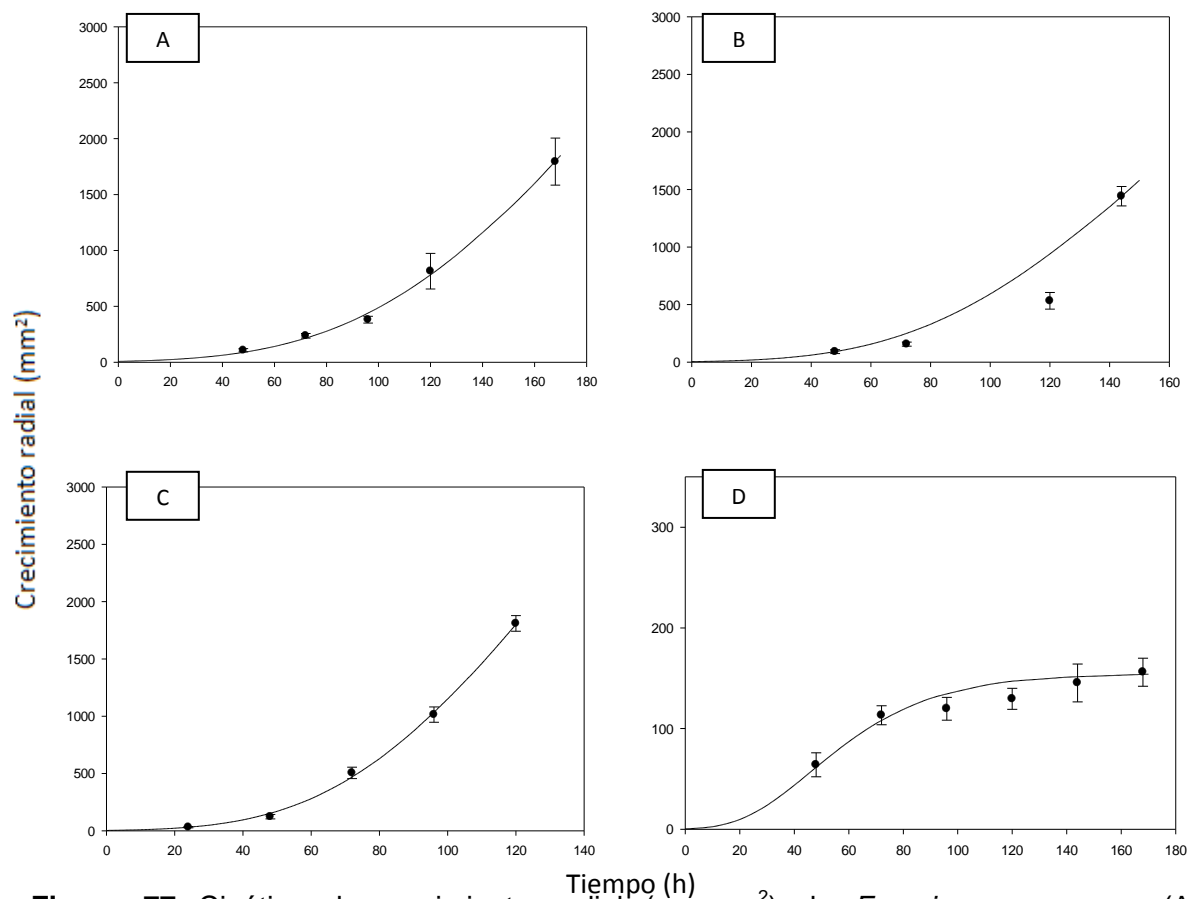


**Figura 76** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) con 60 s de sonicación a concentración de 200 ppm.

**Tabla 22.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 200ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	31.50	39.00
<i>Colletotrichum sp.</i>	46.75	18.97
<i>A. niger</i>	22.25	25.60
<i>A. wentii</i>	33.75	2.94

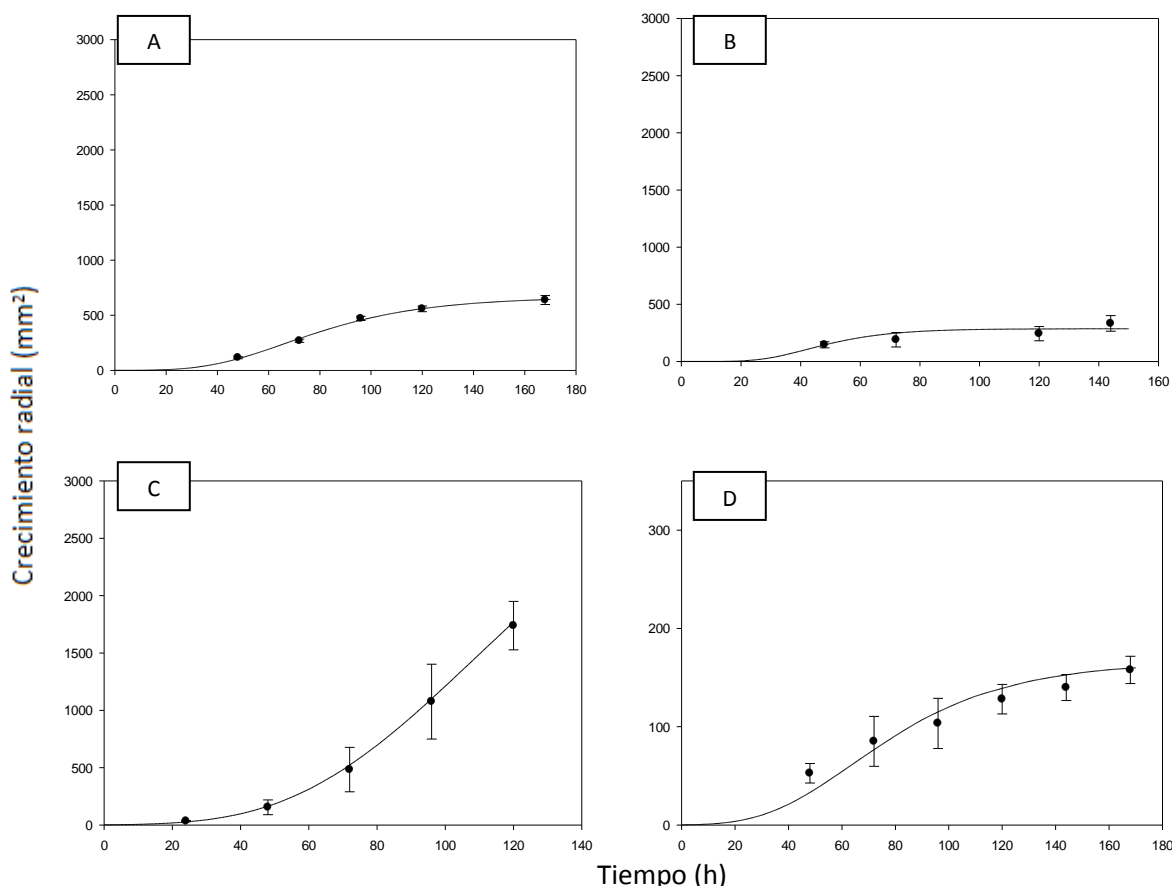
Por otra parte, *A. wentii* disminuyó su velocidad máxima de crecimiento de 2.94 a 1.86 mm<sup>2</sup>/h con los tratamientos con mayores concentraciones de antimicrobiano. Mientras que una tendencia opuesta se presentó con *Aspergillus niger* quien incrementó su velocidad de crecimiento de 25.60 a 36.39 mm<sup>2</sup>/h con el tratamiento de 500ppm(Fig. 33C, 34C y 35C).



**Figura 77** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) con 60 s de sonicación a concentración de 500 ppm.

**Tabla 23.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 500ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	39.50	27.59
<i>Colletotrichum sp.</i>	30.25	22.98
<i>A. niger</i>	20.00	36.39
<i>A. wentii</i>	29.00	2.22



**Figura 78** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) con 60 s de sonicación a concentración de 800 ppm.

**Tabla 24.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 60s de sonicación a 800ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	40.25	8.22
<i>Colletotrichum sp.</i>	31.50	6.60
<i>A. niger</i>	22.00	28.13
<i>A. wentii</i>	40.75	1.86

Estas alteraciones sobre el tiempo Lag y velocidad máxima de crecimiento sobre los cuatro hongos de interés alimentario son significativamente diferentes a los valores mostrados con los tratamientos con aceite esencial de eucalipto únicamente; este cambio sustancial se puede relacionar con un cambio en la composición del aceite esencial inducido por el sometimiento a sonicación, esta

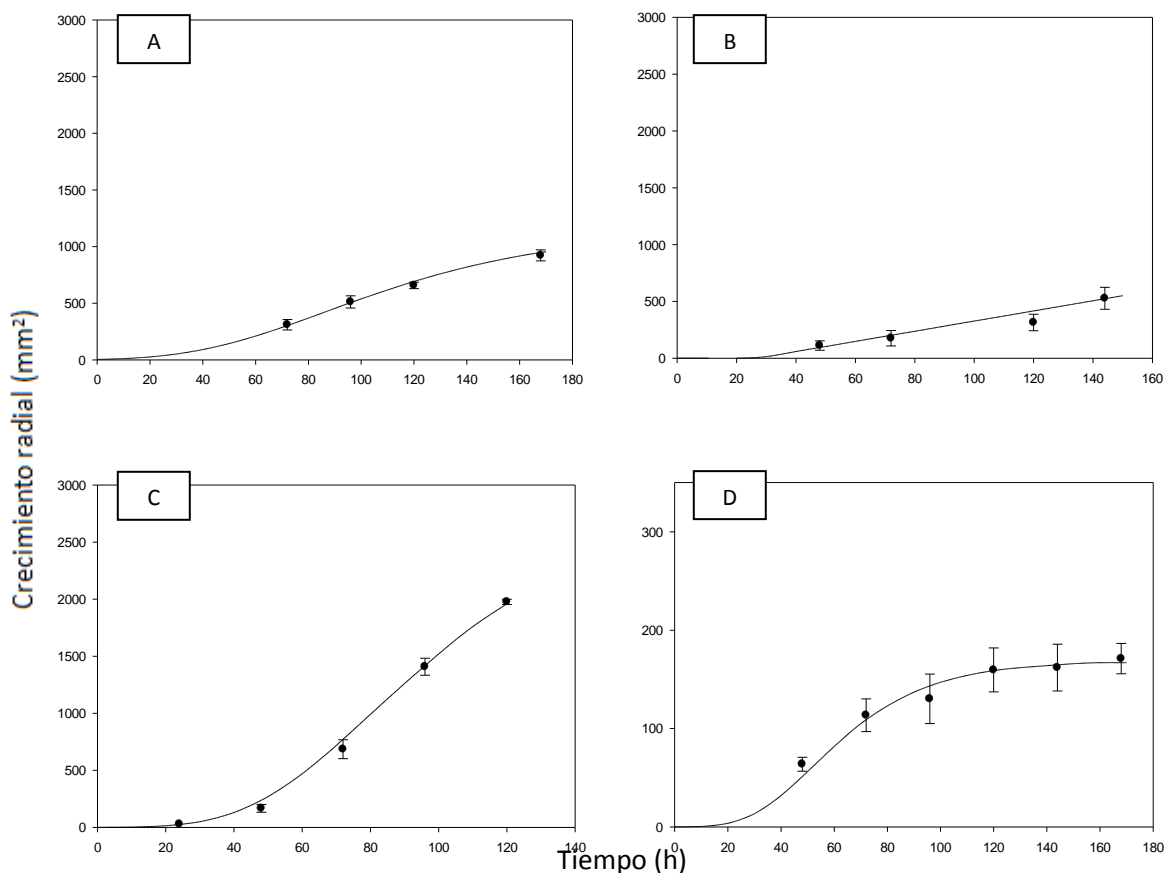
modificación es avalado por diversos estudios como el realizado por Adid *et al.* (2014) donde se rebeló un incremento significativo en compuestos polifenólicos, aunque se observó una ligera disminución en algunos de ellos cuando el tiempo del tratamiento se duplicó. Otro estudio sobre el jugo de naranja tratado con alta presión también mostró una mejora significativa en la presencia de flavanonas en comparación con el zumo sin tratar (Plaza *et al.*, 2011). Una explicación para esta mejora podría ser la posible unión de radicales hidroxilo al anillo aromático de los compuestos fenólicos que pueden ser producidos durante las reacciones sonocquímicas. Por otra parte, ha sido previamente informado la adición del segundo grupo hidroxilo en las posiciones orto o para para mejorar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos (Ashokkumar *et al.*, 2008).

Otros posible efecto del empleo de sonicación sobre el aceite esencial de eucalipto es su nanoemulsión lo cual representa un cambio sustancial en el tamaño de partícula del aceite en el medio de cultivo. Ese efecto es descrito por Sugumar *et al.* (2014) donde se sometió a *Staphylococcus aureus* con emulsiones de eucalipto nanoemulsionado por ultrasonicación; se observó un incremento en la pérdida de contenido intracelular a través de los estudios de permeabilidad en comparación con el tratamiento sin nanoemulsión. Además las células tratadas de *S. aureus* con nanoemulsión mostraron cambios morfológicos en comparación con las células intactas.

#### **b) Sistemas modelo adicionados aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) sonicados durante 90 s**

La aplicación esencial de eucalipto con 90 s de sonicación provocó un cambio significativo en la cinética de crecimiento radial *Aspergillus wentii* donde mostró una reducción en su velocidad de 2.54 a 1.64 mm<sup>2</sup> y un incremento del tiempo Lag de 35.25 a 39.50 h (Figura 36D, 37D y 38D). Mientras que *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* no mostraron una alteración significativa en sus comportamientos. Cabe mencionar que aún que se incrementó el tiempo de sonicación para realizar la emulsión del aceite, este no observó una respuesta

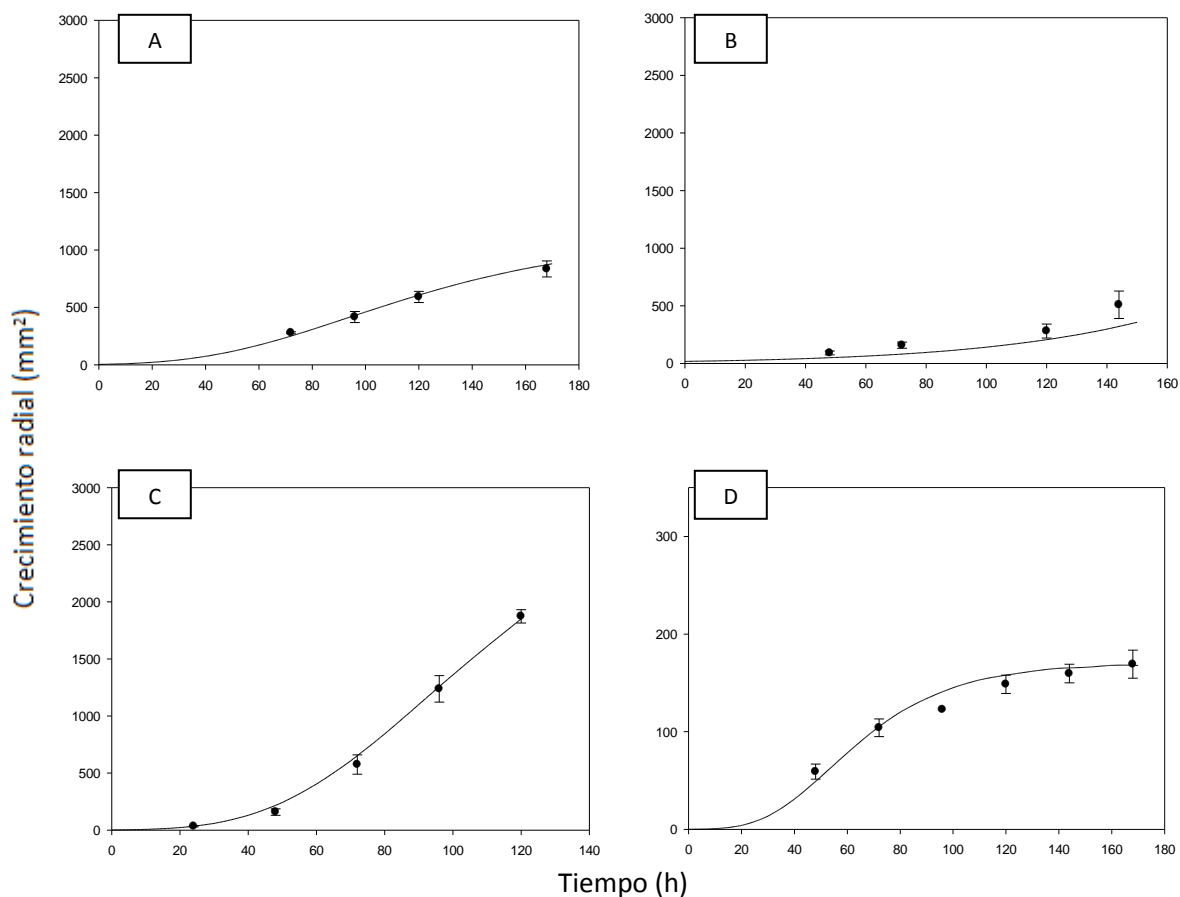
de la capacidad antifúngica en comparación con los sistemas antifúngicos con 60 s de sonicación. El comportamiento mencionado se puede relacionar con una posible degradación de los compuestos cíclicos y fenólicos propios del aceite, comportamiento semejante observado en el estudio por Adid *et al.* (2014) quienes reportan una ligera disminución en algunos compuestos cuando el tiempo del tratamiento de sonicación se duplica.



**Figura 79** Cinética de crecimiento radial (en mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) con 90 s de sonicación a concentración de 200 ppm.

**Tabla 25.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 200ppm

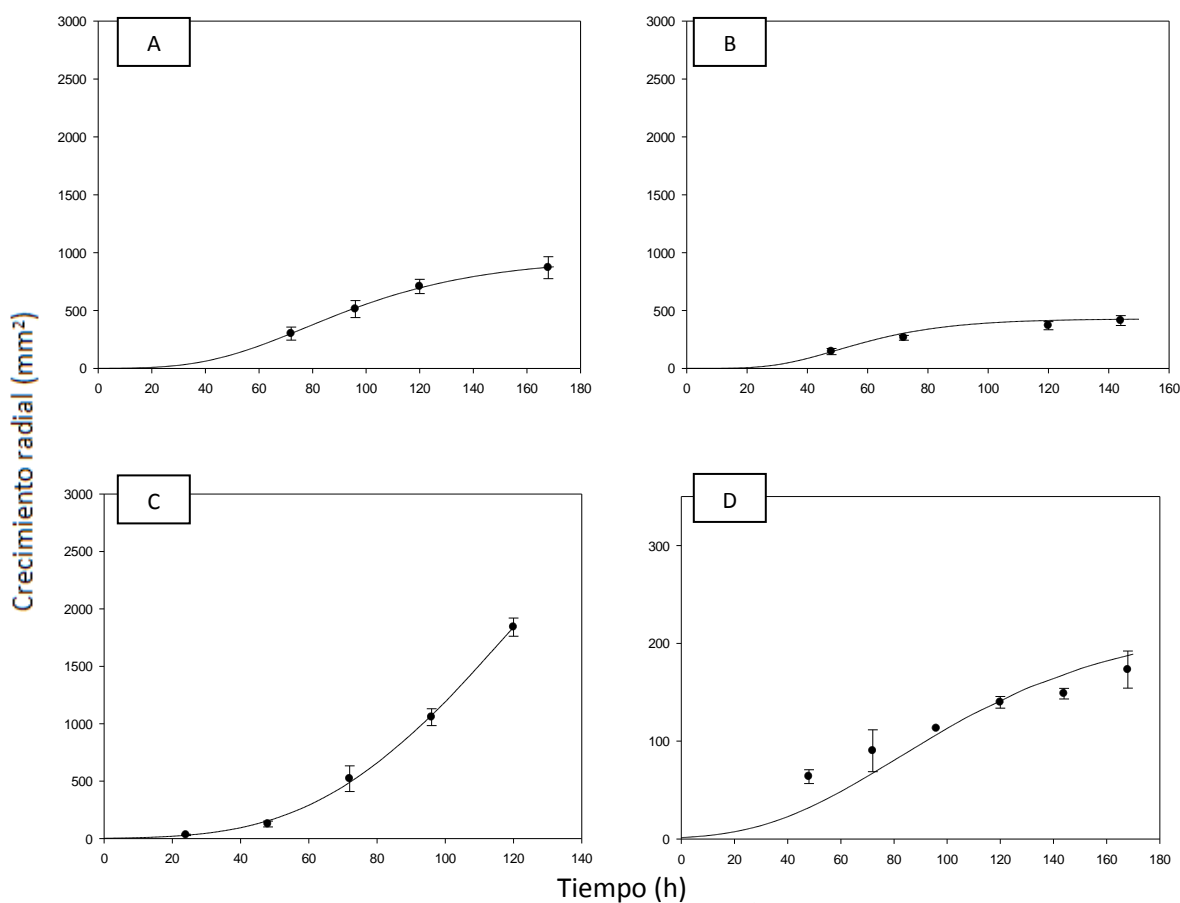
Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	V <sub>max</sub> (mm <sup>2</sup> /h)
<i>F. oxysporum</i>	33.00	8.48
<i>Colletotrichum sp.</i>	35.75	4.46
<i>A. niger</i>	23.25	27.45
<i>A. wentii</i>	35.25	2.54



**Figura 80** Cinética de crecimiento radial (en  $\text{mm}^2$ ) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) con 90 s de sonicación a concentraciones de 500 ppm.

**Tabla 26.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 500ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{\max}$ ( $\text{mm}^2/\text{h}$ )
<i>F. oxysporum</i>	36.50	7.66
<i>Colletotrichum sp.</i>	37.25	5.88
<i>A. niger</i>	20.00	25.97
<i>A. wentii</i>	35.50	2.44



**Figura 81** Cinética de crecimiento radial (en  $\text{mm}^2$ ) de *Fusarium oxysporum* (A), *Colletotrichum sp.* (B), *Aspergillus niger* (C) y *A. wentii*. (D) en sistemas modelo con extracto de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) a con 90 s de sonicación concentraciones de 800 ppm.

**Tabla 27.** Velocidad máxima de crecimiento radial y tiempo Lag con eucalipto y 90s de sonicación a 800ppm

Cepa fúngica	Tiempo Lag (h)	$V_{\text{max}}$ ( $\text{mm}^2/\text{h}$ )
<i>F. oxysporum</i>	34.25	9.41
<i>Colletotrichum sp.</i>	31.75	7.34
<i>A. niger</i>	22.00	33.87
<i>A. wentii</i>	39.50	1.64

### 3.3 Índice de inhibición

En general los porcentajes de índice de inhibición (Tabla 28, 29 y 30) sobre *F. oxysporum* indican una diferencia significativa para los extractos de X'kijit y aceite de eucalipto con 90 s de sonicación. Obteniendo el mayor porcentaje de inhibición

con el extracto de X'kijit con 800 ppm. Estudios previos sobre la actividad antifúngica de otros compuestos naturales contra *F. oxysporum* emplean concentraciones mayores con los que se obtuvieron valores de inhibición semejantes a los del presente trabajo, tal es el caso de la actividad antifúngica de extracto etanólico de *Rhus muelleri* en sistemas modelo con 6000 ppm con la que se consiguió una inhibición del 70.7% del hongo (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2015) o de los resultados obtenidos por Rodríguez-Maturino *et al.* (2015) donde se emplearon compuesto fenólicos y carotenoides del chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) sobre el mismo hongo mostraron nula actividad y 20,3 % de inhibición respectivamente con una concentración del agente antimicrobiano de 100 mg/mL, caso similar para el trabajo de Rosado-Álvarez *et al.* (2014) donde se aplicaron 0,063 y 0,127 mg/mL de flavonoides de extractos de esparrago en sistemas modelo presentando una actividad inhibitoria del 63.2 % y 85.5 % respectivamente sobre el hongo ya mencionado. Para contrastar los valores sobre compuesto cinéticos cabe mencionar un estudio realizado sobre compuestos sintéticos derivados de complejo de cobre (II) 2-(difenilmetileno) carboxamida hidracina con concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL mostrando una actividad inhibitoria en un intervalo de 33-94 % conforme se varió el derivado y se incremento su concentración (Yi-Chen *et al.*, 2014).

En el caso de *Colletotrichum sp.* se apreciaron índices de inhibición en varios de los tratamientos superiores al 40%, siendo los de mejor resultado con 79.08, 78.5, 73.34 y 73.34% con extracto de X'kijit, eucalipto y 60 s de sonicación, eucalipto unicamente y eucalipto con 90 s de sonicación, todos a 800 ppm, lo cual demuestra su potencial actividad para el control del desarrollo de este patógeno. En contraste con estudios previos sobre actividad fungicida sobre especies del genero *Colletotrichum* se encuentra el trabajo de Yenjit *et al.* (2010) donde se probaron distintos compuesto aislados del pericarpio de *Areca catechum* contra *Collectotrichum gloeosporioides*, en estos análisis *in vitro* los compuesto mostraron una concentración efectiva para inhibir el 50% del crecimiento micelar con valores de 36.7, 47. 5, 111.5 hasta mayores a 200 mg/L.

**Tabla 28** Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 200 ppm

	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
X'kijit	31.07±1.73 Aaβ	49.27±10.11 Abα	NO Bbμ	NO Bbμ
Canserina	NO Cb	1.98±1.98 BCb	4.75±1.15 Aa	37.24±2.05
Cuachalalate	NO Cβ	NO Caβ	NO Bβ	43.60±10.38Aaα
Eucalipto	NO Cbα	35.85±28.77 Aaα	NO Bα	24.25±9.89aα
Eucalipto +TS1	NO Cbβ	NO Cbβ	NO Baβ	32.96±6.06aα
Eucalipto +TS2	36.95±3.33 Baβ	66.00±6.23 Aaα	5.64±1.48 Aaμ	21.73±11.82aβμ

Mayúsculas Diferencia entre tratamiento en un mismo hongo a una misma concentración  
 Minúsculas Diferencia entre concentraciones de un tratamiento en un mismo hongo  
 Griegas Diferencia entre hongos en un mismo tratamiento a una misma concentración

**Tabla 29** Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 500 ppm

	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
X'kijit	35.53±0.84 Bbβ	59.15±8.45 Abα	4.01±3.51 Aabβμ	NO Bbμ
Canserina	3.33±1.85 Cb	18.33±5.86 Ba	6.72±4.16 Aa	43.19±5.11
Cuachalalate	NO Cβ	NO Baβ	NO Aβ	49.29±3.02aα
Eucalipto	NO Cbμ	68.47±13.59 Aaα	NO Aμ	29.73±10.50aβ
Eucalipto +TS1	NO Cb	67.18±7.67 Bb	4.65±2.97 Aa	33.73±5.65a
Eucalipto +TS2	42.90±4.76 Aaβ	70.00±5.44 Aaα	7.87±3.47 Aaμ	38.89±5.47aβ

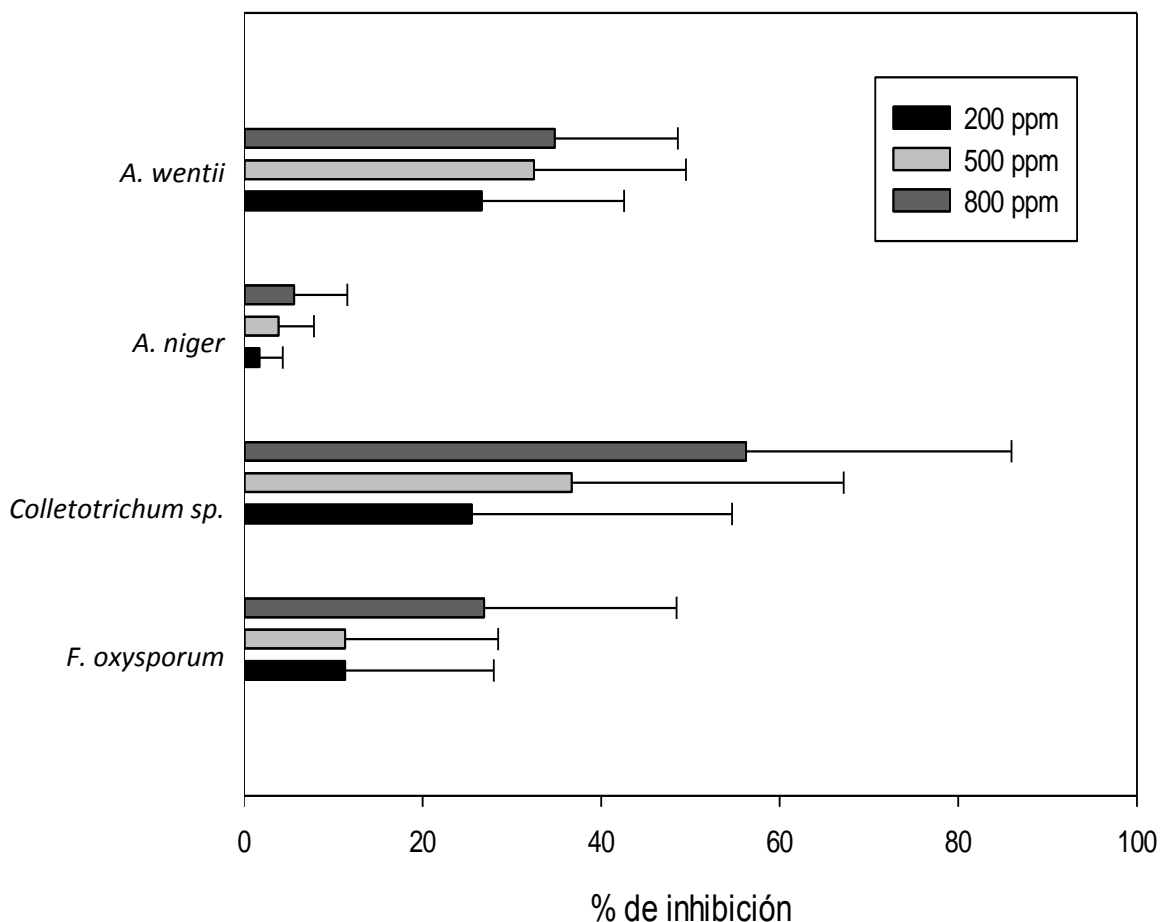
Mayúsculas Diferencia entre tratamiento en un mismo hongo a una misma concentración  
 Minúsculas Diferencia entre concentraciones de un tratamiento en un mismo hongo  
 Griegas Diferencia entre hongos en un mismo tratamiento a una misma concentración

**Tabla 30** Índice de inhibición (%) para cada hongo con tratamientos a 800 ppm

	<i>F. oxysporum</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. wentii</i>
X'kijit	42.38±1.81 Bcβ	79.08±2.81 Aaα	6.30±2.22 Abμ	10.14±5.4352Aaμ
Canserina	15.04±7.63 Ca	21.21±8.97 Ba	9.38±1.13 Aa	41.94±2.29
Cuachalalate	NO D β	11.87±9.59 Baβ	NO Aβ	51.05±8.21aα
Eucalipto	7.05±2.72 Cdaμ	73.34±10.30 Aaα	NO Aμ	35.26±3.89aβ
Eucalipto +TS1	56.34±2.77 Aaβ	78.55±4.39 Aaα	11.48±10.76 Aap	32.16±7.43aμ
Eucalipto +TS2	40.49±6.50 Ba β	73.34±2.77 Aaα	6.26±4.01 Aaμ	38.16±5.46aβ

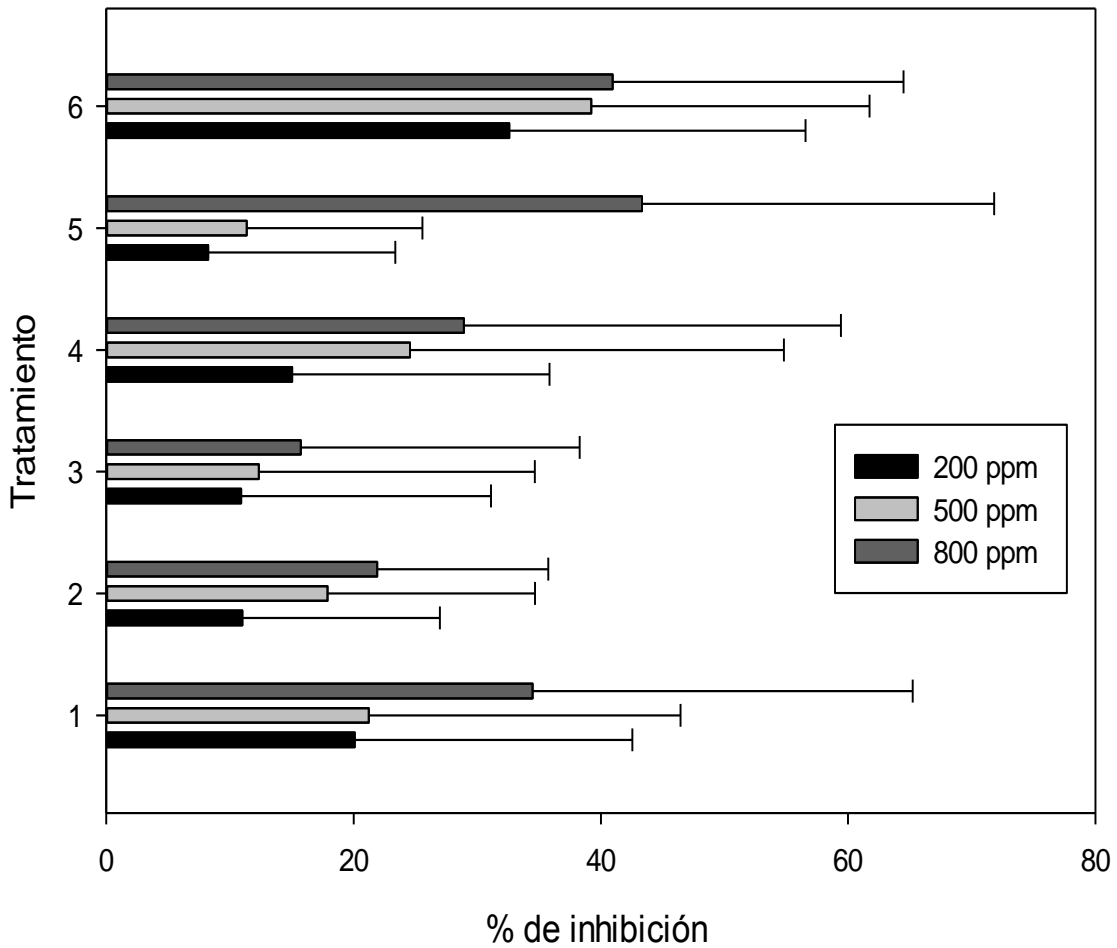
Mayúsculas Diferencia entre tratamiento en un mismo hongo a una misma concentración  
 Minúsculas Diferencia entre concentraciones de un tratamiento en un mismo hongo  
 Griegas Diferencia entre hongos en un mismo tratamiento a una misma concentración

Por su parte *A. wentii* es el que mostró menos sensibilidad al extracto de X´kijit aun en la más alta concentración pero reveló un porcentaje de inhibición 51% con el extracto de cuachalalate, siendo así el hongo más susceptible a tal tratamiento.



**Figura 82** Intervalos del índice de inhibición de cada hongo con concentraciones de 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm.

Al analizar la Figura 39 sobre dispersión es posible observar que se incrementó el valor promedio del índice de inhibición conforme se incremento la concentración en los tratamientos. Siendo *Coletotrichum sp.* el más susceptible a los tratamientos con una media de 25.5, 36.69 y 56.23% en las concentraciones de los tratamientos de 200, 500 y 800 ppm; en contraparte *A. niger* demostró una resistencia contra todos los tratamientos y dando valores promedio de 1.73, 3.87 y 5.67 % de inhibición conforme se incremento el contenido de los extractos en los sistemas modelo.



**Figura 83** Intervalos del índice de inhibición de cada tratamiento con extracto de X'kijit (1), cancerina (2), cuachalalate (3), aceite esencial de eucalipto (4), aceite esencial de eucalipto más 60s de sonicación (5), aceite esencial de eucalipto mas 90 s de sonicación (6) a las concentraciones de 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm.

En el caso individual de cada tratamiento (Figura 40) se observó una orientación al incremento del índice de inhibición al elevar la intensidad del tratamiento, fenómeno que coincide con lo sugerido por López-Malo (1995), ya que mientras sea mayor la concentración aplicada de extracto, mayor será la inhibición de crecimiento de los microorganismos. En este caso los sistemas modelo con el extracto de X'kijit y con eucalipto más 60 y 90 s de sonicación mostraron los mejores promedio de inhibición; con valores para el primero de 20.09, 24.67 y 34.47%; para el segundo de 8.24, 11.35 y 43.33%; para el tercero resultados

promedio de 32.58, 39.21 y 40.95; todos para las concentraciones de 200, 500 y 800 ppm, respectivamente. Lo anterior muestra que los tratamientos con eucalipto y 60 s de sonicación tienen un cambio significativo en la concentración de 800 ppm en tanto que las defenecías para el tratamiento con eucalipto y 90 s de sonicación son menos significativas al cambiar de concentración.

Es importante señalar que se ha informado de la actividad antibacteriana y antifúngica de las plantas seleccionadas para este trabajo. Sin embargo, decidimos evaluar estas especies ya que las propiedades antifúngicas sobre *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *A. wentii* hongos de interés para la inocuidad alimentaria, es de relevancia en el campo de investigación para la implementación de compuestos mas naturales.

## VII. Conclusiones y subgerencias

- Se logró obtener extractos etanólicos y acuosos semejantes a los reportados en bibliografía.
- Se encontró que *Colletotrichum sp.* fue la cepa más susceptible frente a los tratamientos probados, así como *Fusarium oxysporum* quien mostró una inhibición considerable con los tratamientos aplicados en el trabajo, revelando ser una alternativa para el control de estos principales hongos que comprometen la inocuidad de productos frescos. Se encontró que *Aspergillus niger* es la cepa con mayor resistencia frente a los tratamientos probados, por lo que encontrar una fuente natural para su inhibición o control muestra ser una alternativa interesante para posteriores investigaciones.
- El extracto fueron los tratamientos con mayor actividad antifúngica y el aceite esencial de eucalipto con 60 s de sonicación. *Renealmia alpinia* afectó a *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* disminuyendo su velocidad máxima de crecimiento en un 15 y 11% respectivamente y en *Colletotrichum sp* incremento su tiempo Lag en un 91% en la concentraciones de 800 ppm; y el aceite esencial de eucalipto con 60 s de sonicación el cual disminuyó la velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 79% y sobre *Colletotrichum sp.* en un 66% su velocidad máxima de crecimiento en la concentraciones de 800 ppm. De ahí su potencial para poder ser probados *in vivo* en tratamientos post cosecha de frutas y hortalizas. Cabe recalcar que las concentraciones empleadas de los tratamientos utilizados en esta investigación fueron menores que las reportadas con otros agentes antifúngicos, lo que demuestra la capacidad inhibitoria de los extractos.
- El proceso de homogenización con sonicación mostró un efecto significativo sobre la actividad antifúngica de aceite esencial del eucalipto incrementándola, por lo que representa un alternativa interesante a valorar para posteriores trabajos.

- Debido a que los hongos empleados se aislaron de cultivos de vainilla, el empleo de los extractos con mayor potencial antifúngico pueden ser valorados como tratamientos pre y post cosecha.
- Se sugiere en estudios posteriores trabajar con ciertos compuestos contenidos en los extractos evaluados y demostrar su efectividad.

## Anexo 1

Evidencia grafica de efecto significativo de tratamientos en crecimiento radial de cada hongo.

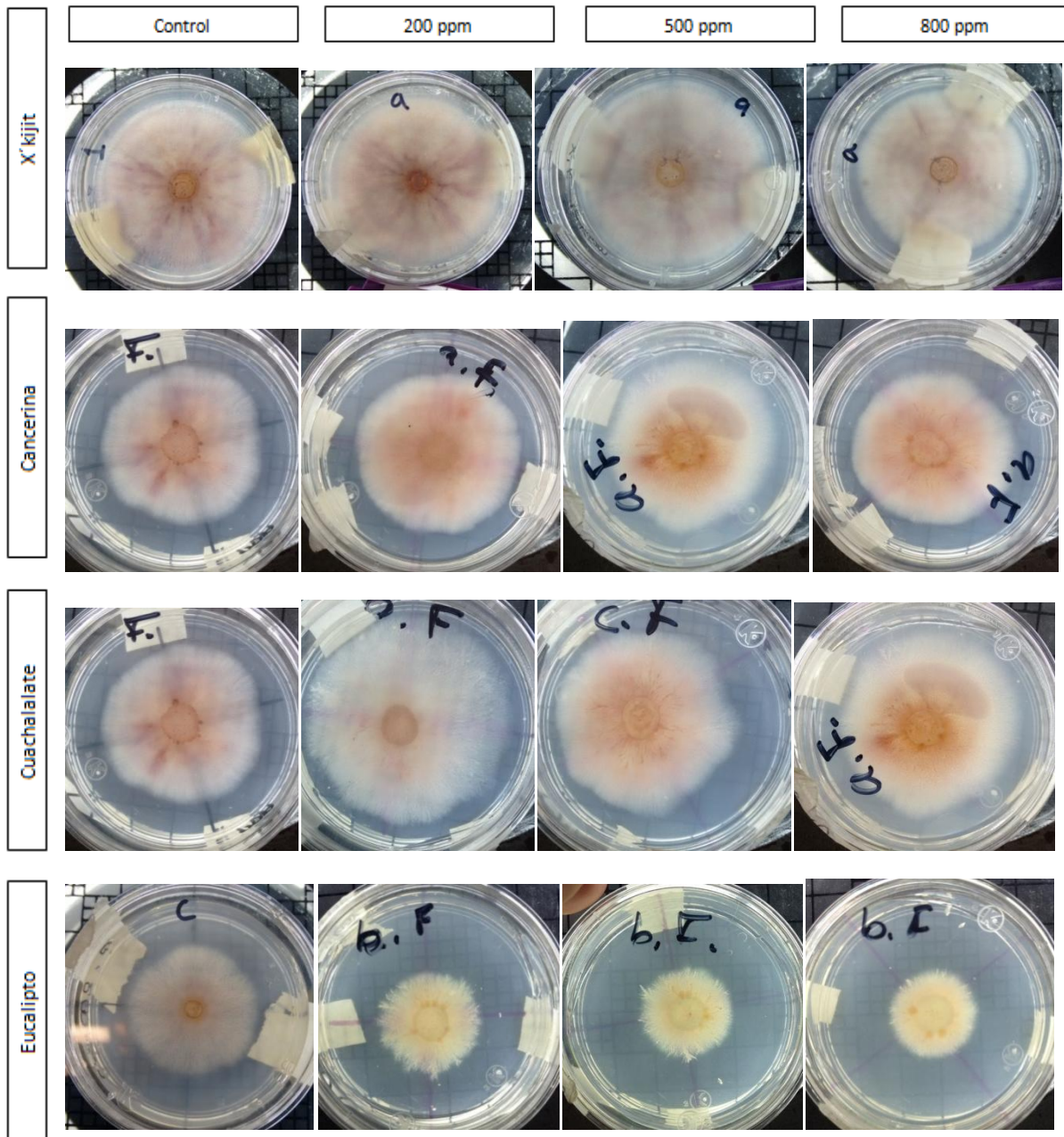
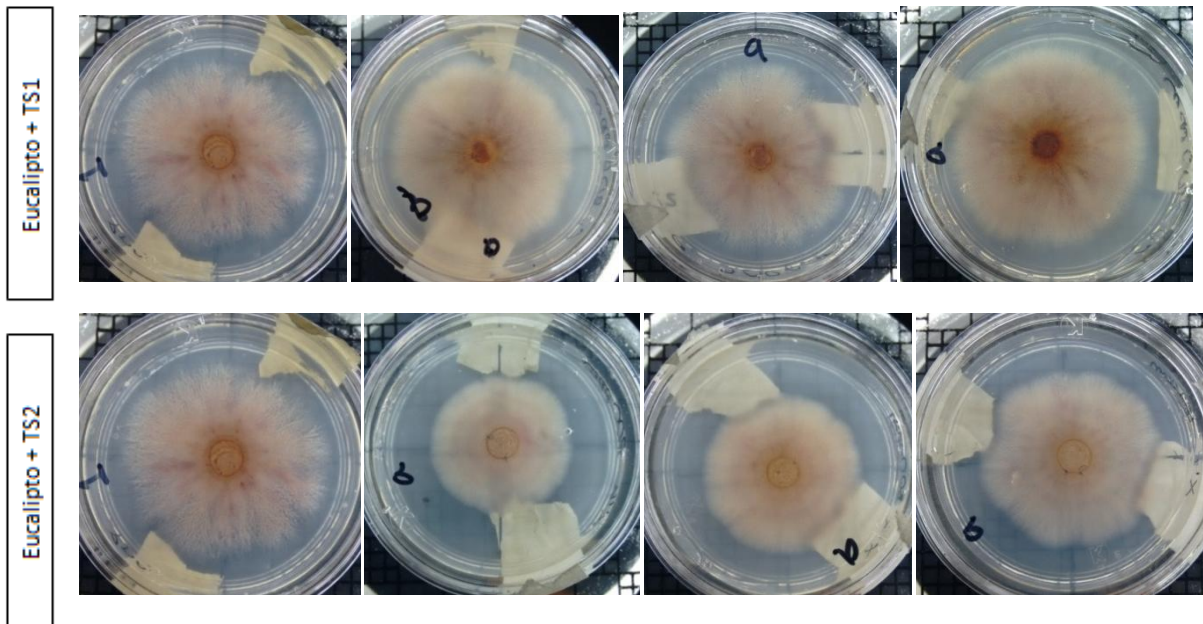
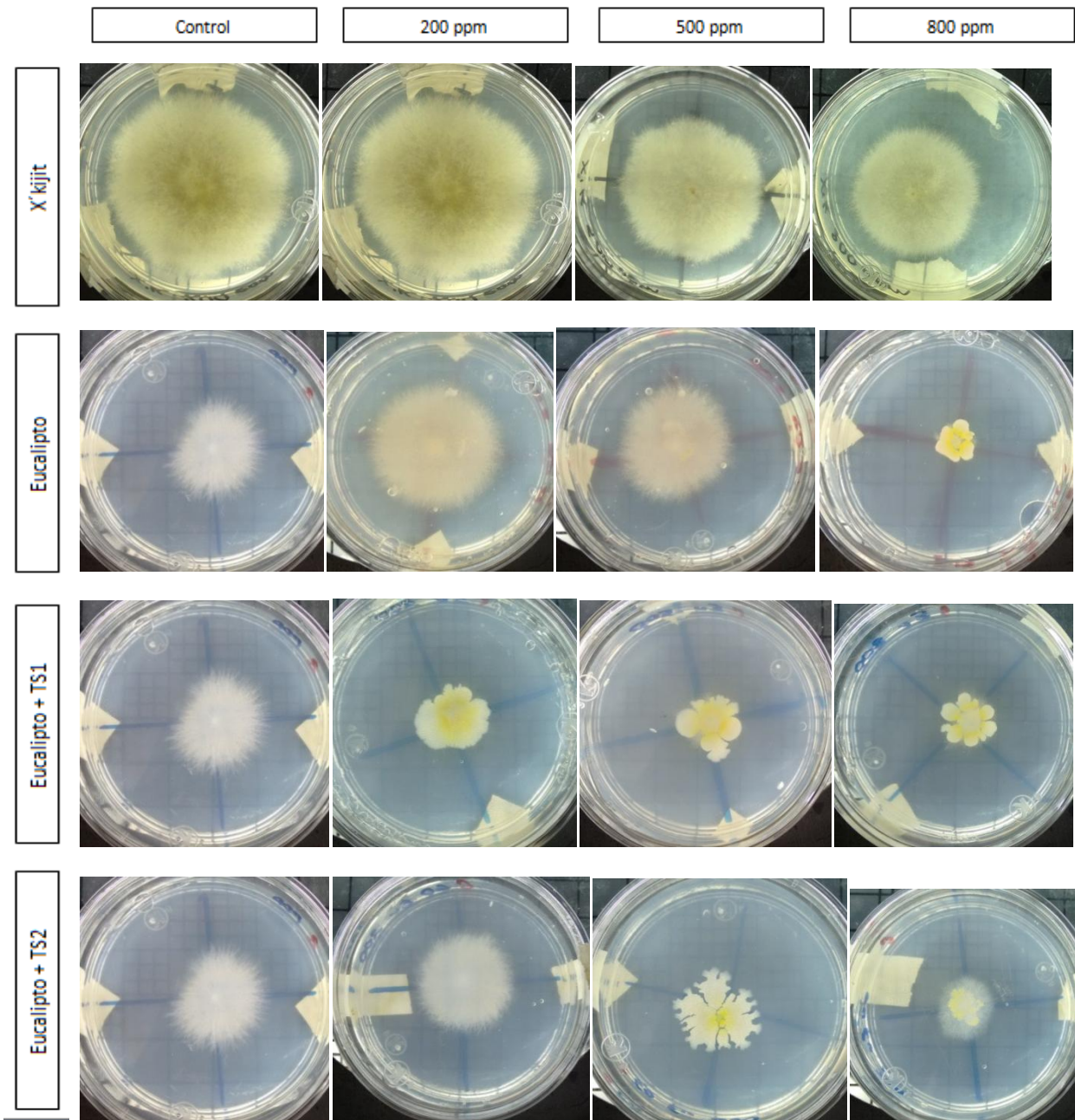


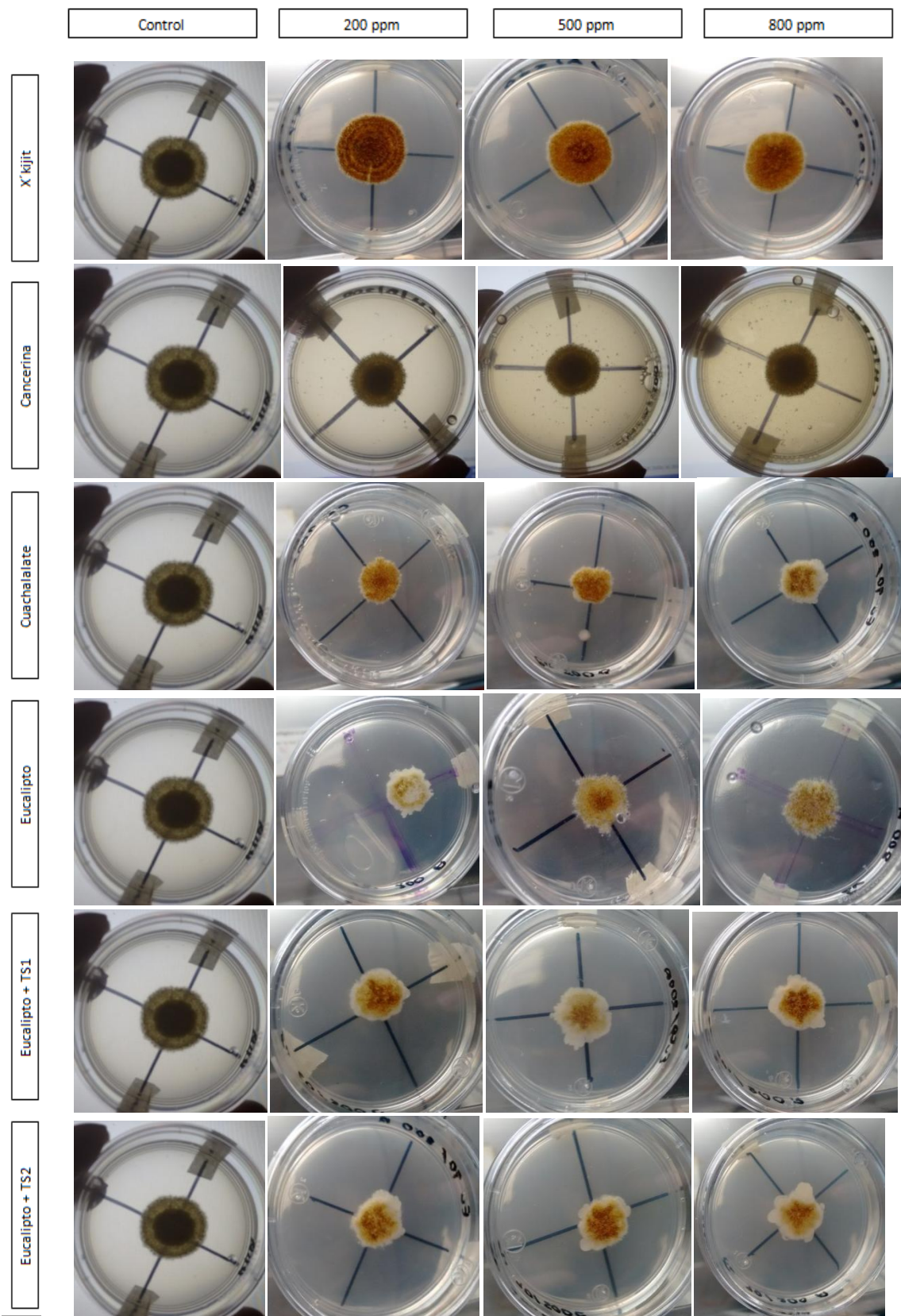
Figura 84a Tratamientos en *F. oxysporum* a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm.



**Figura 41b** Tratamientos en *F. oxysporum* a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm.  
\*TS1 (60s de sonicación) \*\*TS2 (90s de sonicación)



**Figura 85** Tratamientos en *Colletotrichum sp.* a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm.  
 \*TS1 (60s de sonicación) \*\*TS2 (90s de sonicación)



**Figura 86** Tratamientos en *A. wentii* a concentraciones de 200, 500 y 800 ppm. \*TS1 (60s de sonicación) \*\*TS2 (90s de sonicación)

## Bibliografía

**Abdel-Raouf**, N., Al-Enazi, N. M., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M., Al-Othman, M. R. y Hatamleh, A. A. (2015) Antibacterial b-amyirin isolated from *Laurencia microcladia*. *Arabian Journal of Chemistry* Vol- 8, pp.32–37.

**Abid, M.**, Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei S. y Zeng, X (2014) Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* Vol-21, pp. 93–97.

**Acero, L.E.** (1979). Principales plantas útiles de la Amazonia colombiana. Editora Guadalupe. Bogotá, pp 263

**Alanís, A.D.**, Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. y Ceballos, G.M. (2005) Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 153-157.

**Ashokkumar, M.**, Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. y Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system, *Innov. Food Science Emergen Technology*, Vol-9, pp. 155–160.

**Alzamora, L.**, Morales, L., Armas, L y Fernández, G. (2001) Actividad Anti Microbiana *in vitro* De Los Aceites Esenciales Extraídos De Algunas Plantas Aromáticas. *Medicina Tradicional en el Perú* 62, 2, pp. 156-161

**Ashbeea, H.R.** y Gilleceeb, M.H., (2014) Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Pharmacogenomics of Antifungal Agents, Elsevier Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, UK

**Baert, K.**, De Meulenaer, B., Kamala, A., Kasase, C., y Devlieghere, F. (2006). Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *Journal of Food Protection*, 69, pp. 1371-1378.

**Balba, H.** (2007) Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Experimental Science and Health Part B* 42, pp. 441-451.

**Barakat, D.A.**, (2011) Insecticidal and antifeedant activities and chemical composition of *Casimiroa Edulis* la Lave & Lex (Rutaceae) leaf extract and its fractions against *Spodoptera Littoralis* larvae. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* Vol-5, pp. 693–703.

**Barreto, L.**, Feitosa, M.A., de Araújo, T.J., Chagas F. K. y Costa L. K.I (2005) Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápico. *Avances En Odontología*, 21,4, pp. 1995-2001

**Benjumea, D.** y Gómez-Betancur, I. (2014) Traditional use of the genus *Renealmia* and *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae)-a review in the treatment of snakebites. *Asian Pac Journal of Trop Med* ; 7(1): S574-S582

**Bhat RV** y Vasanthi S. (1999) Contaminación por micotoxinas de alimentos y piensos. Tercera Conferencia Internacional FAO/OMS/PMA sobre Micotoxinas, Túnez.

- Boelens M.H.** (1985). The esencial oil from *Rosmarinus officinalis* L., perfum. Flavor, 10, pp. 21-37.
- Burpee, L.** (2006). Integrated disease management, an introduction to Fungicides. Courses support.
- Burt, S.** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiol 94: pp.223–253.
- Calzada, F.,** Yepez-Mulia, L. y Aguilar, A. (2006) In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology Vol-108, pp.367–37.
- Camilo-Patiñon, A.,** Benjumea, D. M. y Pereañez, J. A., (2013) Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpina* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. Journal of Ethnopharmacology 149, pp. 590–596
- Cannon, P.F.,** Damm, U., Johnston , P.R., y Weir, B.S. (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. Studies in Mycology 73: pp. 181–213.
- Castillo, J. L.** (2006) ReCiTeIA: Revisión de la ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Aliemntos. Cali, Colombia. Vol. 6-2, pp. 8.
- Castillo-Juárez, I.,** Rivero-Cruz, F., Celis, H. y Romero I.(2007) Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens* Journal of Ethnopharmacology Vol-114, Issue 1, pp.72–77.
- Coe, F.** (2008) Rama midwifery in eastern Nicaragua. Journal of Ethnopharmacology; 117, pp 136-157.
- Cox, S.D.,** Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E. y Warmington, J.R. (2000) The mode of action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, Vol-88 , pp. 170–175.
- Dean, R.,** Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, ,K.E., Di Pietro, A., Rudd, A. J., Dickman, M., KAHMANN R., ELLIS, J. y Foster G.D., (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13: 414–430.
- Degraeve, S.,** Madege, R.R. , Audenaert K., Kamala, A. , Ortiz J. , Kimanya M. Tiisekwa, B. , De Meulenaer B. y Haesaert, G. (2015) Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania Food Control, 59, pp. 225-233.
- Díaz-Gómez, R.,** López-Solís, R., Obreque-Slier, E. y Toledo-Araya, H. (2013) Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. LWT - Food Science and Technology Vol-54, pp. 331-335.
- Dodds A.** (2010) Pharmacology of azole antifungal agents. In: Antifungal therapy. Informa Healthcare; pp. 199–218.

**EFSA** (2011) Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. EFSA Journal, Vol 9(10), pp. 97.

**Escobedo-Hinojosa, W. I.**, Acevedo-Quiróz, M., Romero-Álvarez, I., Escobar-Castañeda, P., Villarreal, M. L. y Cardoso-Taketa, A. (2014) Anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of methanolic extracts of five different populations of *Hippocratea celastroides* collected in Mexico Journal of Ethnopharmacology Vol-155, pp. 1156–1163.

**Falcão H.S.**, Mariath I.R., Diniz M.F., Batista L.M. y Barbosa-FilhoJ, M.(2008) Plants of the American continent with antiulcer activity. Phytomedicine, 15, Issues 1–2, pp. 132–146

FAO. (1993). Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tuberculos . 27/08/2015, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/docrep/t0073s/T0073S07.htm>

**Fernández-Ortuño, D.**, Torés, J. A., de Vicente, A. y Pérez-García, A. . (2010). *The QoI Fungicides, the Rise and Fall of a Successful Class of Agricultural Fungicides*. En FUNGICIDES (pp. 203-220). India: InTech.

**Ferreira-Faro, L.** (2010) Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission. En FUNGICIDES (pp. 405-420). India: InTech.

**French, E.R.** y Hebert, T.T.. (1981). Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica : Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

**Forever Living** (1999). Aloe: Perspectiva Histórica. Texto informativo

**Friedman, M.**, Henika, P. y Mandrell, R. . (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65, No. 10, pp. 1545–1560.

**Furukawa, M.**, Makino, M., Uchiyama, T., Ishimi, K., Ichinohe, Y. y Fujimoto, Y. (2002) Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Hippocratea excelsa*. Volume 59, Issue 7, pp. 767–777.

**Gallis, H.A.**, Drew, R.H. y Pickard, W.W.(1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. Rev Infectious Disease ;12(2), pp. 308–329.

**Galvez, A.**, Grande-Burgos, M. J., Lucas-López, R. y Pérez-Pulido R. (2014) Chapter 2 Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. En Food Biopreservation, Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition, DOI 10.1007/978-1-4939-2029-7\_2

**Gang-sheng, W.**, Jie-hua, D., Yao-hui, M.A., Min, S. y Bo, L. (2012) Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*. Journal of Traditional Chinese Medicine Vol- 15; pp.1-2.

**García-Jiménez, A. L.** (2009) Manejo Social de la Cancerina (*Hippocratea*) Planta Medicinal de la Selva Baja Caducifolia en la Cuenca del Rio Papagayo, Guerrero, México. (Tesis inédita de doctorado). Colegio de Postgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Edo. de México.

- Geilfus, F.** y Bailón, P. (1994) El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies. Costa Rica, pp. 421-425
- Ghasemi, A.,** Bahmani, M. y Avijgan, M. (2009). Anti-Candida activity of some of the Iranian medicinal plants. *Electronic Journal of Biology*, 5, pp. 85–88.
- Gómez-Ayala, A. E.** (2007) Alimentos y micotoxinas. *Farmacia Profesional* Vol. 21, Núm. 8, pp. 49-53.
- Gómez-Betancur, I.,** Cortés, N., Benjumea, D., Osorio, E., León, F. y Cutler, S. J. (2015) Antinociceptive activity of extracts and secondary metabolites from wild growing and micropropagated plants of *Renealmia alpinia*. *Journal of Ethnopharmacology* 165, pp. 191–197.
- Grabarczyk, M.,** Win´ska, K., Mazczka, W., Zarowska, B. y Białońska, A. (2015) Miroslaw Anioł a Hydroxy lactones with the gem-dimethylcyclohexane system – Synthesis and antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry* (2015) Sitio web <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.02.018>
- Gutierrez, J.,** Barry-Ryan, C. y Bourke, P., (2008). The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124, pp. 91–97
- Hernandez, A.** (2013) *Microbiología Industrial*. EUNED
- Herrera-Estrella A.** y Carsolio C. (1998). Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. *Avance y Perspectiva*, 17, pp. 195-204.
- Hinke, N.** (2000) La llegada del eucalipto a México, *Ciencias “Del herbario”*. 58, pp. 60-62
- Hutchinson, J.** (1973) *The Families of Flowering Plants* (3rd edn), Clarendon Press, Oxford, p. 457
- Ivic, D.** (2010). *Curative and Eradivative Effects of Fungicides*. En *FUNGICIDES* (pp. 3-22). India : InTech.
- Jasso de Rodríguez, D.,** Trejo-González F.A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M.L.V., **Sáenz-Galindoc, A.,** Hernández-Castillo, F.D., Villarreal-Quintanilla, J.A. y Pena-Ramos, F.M. (2015) Antifungal activity in vitro of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Industrial Crops and Products* Vol-75, pp. 150–158.
- Jay, J. M.,** Loessner, M. J. y Golden, D. A. (2005) *Modern Food Microbiology*, Cap LV. Springer Science & Business Media, Seventh Edition
- Kyanko, V.M.,** Russo, L.M., Fernández, M. y Pose, G. (2010) Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas, *Información Tecnológica*, 21(4), pp. 125-130
- Lenné, J.M.** (2002). Some major plant diseases. In: *Plant Pathologist's Pocketbook* (Waller JM, Lenné JM, Waller SJ, eds). 3rd edn. CABI, Wallingford, UK: 4–18

- Li, W. R.**, Shi, Q. S., Ouyang, Y. S., Chen, Y. B. y Duan, S. S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16): pp. 7483-7492
- Liu, Y.**, Ming, X., Zhang, Q.C., Zhou, F.Y. y Wei, J.Q. (2010) Toxicity of caryophyllene from *Vitex negundo* (Lamiales:Verbenaceae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) and its action mechanism. *Acta Entomol. Sin.* Vol-53, pp. 396–404.
- López-Malo, A.** Alzamora, S. M. y Argaiz, A. (1995). Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. *Food Microbiology*, Vol-12, pp. 213-219.
- López-Malo, A.**, Alzamora S. M., y Guerrero, S. (2000) Minimally Processed Fruits and Vegetables, Chapter 14 Natural antimicrobials from Plants. An Aspen Publication, pp. 237-263.
- Maas, P.J.M.** (1977). *Renealmia* (Zingiberaceae-Zingiberoideae). *Flora Neotropica* 18, pp. 1-161.
- Maas, P.J.M.** y H. Maas-Van DeKarmen (2001). Zingiberaceae Lindl. In: W.D. Stevens, C. Ulloa-Ulloa, A. y Pool O.M. Montiel (eds.), *Flora de Nicaragua*. Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden 85, pp. 2549-2554
- Macía, M.** (2003). *Renealmia alpinia* (Rottb) Maas (Zingiberaceae. Edible plant of the Sierra Norte of Puebla Mexico. *Anales Jardín Botánico De Madrid*; 60(1), pp. 183-187
- Maciel a, M.V.**, Morais, S.M., Bevilacqua, C.M.L., Silva, R.A., Barros, R.S., Sousa, R.N., Sousa, L.C. Brito, E.S. y Souza-Neto, M.A. (2010) Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology* Vol-167, pp. 1–7.
- Mann T.S.**, Kiran Babu G.D., Guleria S. y Singh B. (2011) Comparison of *Eucalyptus cinerea* essential oils produced by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Communications*, 6(1), pp. 107-110.
- Martínez A, M.A.**, V. Evangelista, M. Mendoza, G. Morales, G. Toledo y A. Wong (1995). Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Cuadernos del Instituto de Biología 27, pp. 1-303. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Martínez, M.** (1969) *Plantas Medicinales de México* (5a. edición). Botas, México.
- Matsuo, A.L.**, Figueiredo, C.R., Arruda, D.C., Pereira, F.V., Borin, J.A. y Massaoka, M.H. (2011)  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol-411, pp. 449–454.
- Mena-Rejón, G.J.**, Pérez-Espadas, A.R., Moo-Puc, R.E., Cedillo-Rivera, R., Bazzocchi, I.L., Jiménez, I.A., Quijano, L. (2007) Antigiardial activity of triterpenoids of root bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.* 70, pp. 863–865.
- Mbaya A. W.**, Nwosu C. O. y Onyeyili, P.A. (2006). Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of *Butyrospermum paradoxum* (Sapotaceae) stem bark in rats infected with

Trypanosomabrucei and Trypanosomacongolense.. Journal of Ethnopharmacology, 111, Issue 3, pp. 526–530.

**Mirmajidi H. A.** y Soleiman A. (2014) Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. Biochemical Engineering Journal, 99, pp. 131–137

**Monbaliu, S.**, Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Van Poucke, K., Heungens, K., y DeSaegher, S. (2009). Identification and mycotoxin spectrum of four new Fusarium populations from bell pepper. Online Source.

**Monsálvez, M.**, Zapata, N., Vargas, M., Berti, M., Bittner, M., Hernandez, V. (2010) *Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of Drimys winteri bark against Take-All disease. Industrial Crops and Products*, Volume 31, Issue 2, March 2010, Pages 239–244

**Morell, I.** y Candela, L. (1998) Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Universidad Jaume, CastellóD'Impressió.

**Mourey, A.** y Canillac, N. (2002) Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. Food Control Vol-13, pp. 289–292.

**Nakajima, T.** (2010). *Fungicides Application against Fusarium Head Blight in Wheat and Barley for Ensuring Food Safety*. En FUNGICIDES(pp. 139-156). India: InTech.

**Navarrete, A.**, Trejo-Miranda, J. L. y Reyes-Trejo, L. (2002) Principles of root bark of *Hippocratea excelsa*(Hippocrataceae) with gastroprotective activity. Journal of Ethnopharmacology Vol-79, Issue 3, pp. 383–388.

**Niwa, T.**, Shiraga, T. y Takagi, A. (2005) Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. Biol Pharm Bull ;28(9), pp. 1805–1808

**Ojeda-Sana, A. M.**, Van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A. y Moreno S. (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control Vol-31, Issue 1, pp. 189–195.

**Oliveira, M.**, Pereira, C., Bessa, C., Araujo, R. y Saraiva, L. (2015) Chronological aging in conidia of pathogenic Aspergillus: Comparison between species. Journal of Microbiological Methods 118: pp. 57–63

**Olivera-Ortega, A.G.**, Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., Terrazas-Salgado, T. y Solares-Arenas, F. (1999) Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht) Journal of Ethnopharmacology, Vol-68, pp.109–113.

**Ortega, A.** y Soto-Hernández, M. (1999) Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipherygiumadstringens*, Schiede ex Schlecht)Journal of Ethnopharmacology. 68, Issues 1–3, pp. 109–113

**Ortuño-Sánchez, M. F.** (2006) Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Cap. 2 Métodos de obtención de aceites esenciales. España, Edición Aiyana, pp. 23-47

**Ozturk, S.** y Ercisli, S. (2006) The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol-106, pp. 372–376.

**Palacios, J.**, Mata R., López R. y Linares E., (1989), *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae), a new source of transpolyisopren. *Economic Botany*, 43, pp. 508–509

**Patel J.**, Ketkar S., Patil S., Fearnley J., Mahadik K. R. y Paradkar A. R., Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. *Integrative Medicine Research* 4 (2015) pp. 94–101.

**Pekmezovic M.**, Rajkovic, K., Barac, A. , Senerovic, L. y ArsicArsenijevic, V. (2015) Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, Vol-99, pp. 131–137

**Peleg, M.** (2006) *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: Models for Predicting Growth and Inactivation*. CRC Press. pp. 213-215

**Pennington, T.D.** y Sarukhán, J., (1998) *Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México*, 2nd edn. INIF-SAG, FAO, pp. 413.

**Pitt J.L.** (2014) *Encyclopedia of Food Safety, Mycotoxinas; Aflatoxins*, Elsevier Inc. pag. 289-346

**Plaza, L.**, Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. y Cano, M.P. (2011) Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization, *LWT – Food Sci. Technology*, Vol 44, pp. 834–839.

**Preedy, V.** (2015) *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. pp. 94-97

**Prusky D y Plumbley RA** (1992). Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. In: *Colletotrichum. Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK, pp. 289–307.

**Reverberi, M.**, Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. y Fanelli, C. (2010) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: pp. 899–911.

**Rodriguez-Maturino, A.**, Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O. y Aviles-Marin M., (2015) Antifungal effect of phenolic and carotenoids extracts from chiltepin (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, Vol-47, Issue 1, pp. 72–77.

**Rodriguez-Rivera, V. M.** y Simón-Magro, E. (2008) *Bases de la Alimentación Humana*. Foro Europe de Editores, España. p. 215.

- Rosado-Álvarez, C.**, Molinero-Ruiz, L. , Rodríguez-Arcos, R. y Basallote-Urebaa, M.J. (2014) Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Scientia Horticulturae*, Vol-171, pp. 51–57.
- Rosas-Pinóña, Y.**, Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nietoc, S. y Rivero-Cruz, J. F. (2012) Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, pp.860–865
- Rouabhi, R.** (2010) *Introduction and Toxicology of Fungicides*. En *FUNGICIDES* (pp. 203-220). India: InTech.
- Russell, P.E.** (2005). A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Science* 143, pp. 11-25.
- Rzedowski, J.** (1978) *Vegetación de México*, Limusa, México, p. 210
- Sakaeda, T.**, Iwaki, K., Kakumoto, M., Nishikawa, M., Niwa, T. y Jin, J.S. (2005) Effect of miconazole on cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1 activities, and its comparison with azole antifungal drugs. *J Pharm Pharmacol* ;57(6), pp.759–764.
- Sanchez-Aldana, D.**, Andrade-Ochoa, S., Aguilar, C. N., Contreras-Esquivel, J. C. y Nevarez-Moorillón, G. V. (2015) Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. *Food Control*, Vol-50, pp. 907-912.
- Seukep, J.A.**, Sandjo, L.P., Ngadjui, B.T. y Kuete, V. (2015) Antibacterial activities of the methanol extracts and compounds from *Uapaca togoensis* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *South African Journal of Botany* Vol-103, pp.1–5.
- Shabani , F.**, Kumar, L. y Esmaeili, A. (2014) Future distributions of *Fusarium oxysporum* f. spp. in European, Middle Eastern and North African agricultural regions under climate change, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 197: pp. 96–105.
- Silou. T.**, Loumouaoumou, A. y Loukakou, E. (2009) Intra and Interspecific Variations of Yield and Chemical Composition of Essential Oils From Fice Eucalyptus Species Growing in the Congo-Brazzaville. *Journal of Essential Oil Research*. Volume 21, Issue 3, pp. 126-139.
- Singh, P.**, Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P.K. y Dubey, N.K. (2010) Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. *Food Chemistry of Toxicology*, Vol-48, pp. 1734–1740.
- Sokovic, M. D.**, Glamočlija, J. M. y Ćirić, A. D. (2013) Chapter 9 Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides (e-book) licensee InTech(<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)
- Soleo-Funari, C.**, Gullo, F. P., Napolitano, A., Carneiro, R. L., Mendes-Giannini, M. J. S., Fusco-Almeida, A. M., Piacente, S., Pizza, C. y Siqueira-Silva, D. H. (2012) Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. *Food Chemistry* Vol-135, pp. 2086–2094.

- Soriano del Castillo, J. M.** (2007) Micotoxinas en alimentos. España: Ediciones Díaz de Santos. pp. 16-19
- Smith, A.C.** (1940) The American species of Hippocrataceae, Britonia, 3, pp. 410–417
- Smith, J. E.** (2012). *Aspergillus*. En *Biotechnology Handbook 7*(pp. 228). Glasgow, Scotland : Springer Science & Business .
- Smith, S.N.** (2007) An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathol. Bull.* 16: pp. 97–120.
- Stanley, P.** (1920) *Trees and Shrubs of México*, 23. United States National Museum, Washington, pp. 672-673.
- Sugumar, S.,** Ghosh, V., Nirmala, M. J., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2014) Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol-21, Issue 3, pp. 1044–1049.
- Takaisi-Kikuni, NB** y Schilcher, H. (1994) Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medicinal* Vol-60, pp. 222–227.
- Tankeo, S. B.,** Damen, F., Awouafack, M. D., Mpetga, J., Tane, P., Eloff, J. N. y Kuete, V. (2015) Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Fagara tessmannii*. *Journal of Ethnopharmacology* Vol-169, pp. 275–279.
- Tolba, H.,** Moghrani, H., Benelmouffok, A., Kellou, D. y Maachi, R. (2015) Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Médicale* Vol- 25, 128—133.
- Tolouee, M.,** Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J. y Jaimand, K. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3): pp. 127-133.
- Torres-Padrón, M. E.,** Aufartová, J., Sosa-Ferrera, Z. y Santana-Rodríguez, J.J. (2010) *Benzimidazole Fungicides in Environmental Samples: Extraction and Determination Procedures*. En *FUNGICIDES* (pp. 203-220). India: InTech.
- Trigos A.,** Ramírez K. y Salinas A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Mexicana de Micología* , 5, pp. 85–88.
- Velez-Rodriguez, L.,** y Rivera-Vargas, L. (2007) Recent studies of fungal pathogens of onion in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 91, pp. 31-45
- Vázquez, L.H.,** Palazon, J. y Navarro-Ocaña, A. (2012) The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns: A Review of sources and biological activities, phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health, Rao, V. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech Sitio web :<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyryns-a-review-of-sources-and-biological-activities>.

- Vázquez, M.** (2001). Avances en seguridad alimentaria. España: Altaga p. 5
- Venkatakrishnan, K.,** Von Moltke, L.L y Greenblatt, D.J. (2000) Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*; 38(2), pp. 111–180.
- Víctor-Ortega, M. D.,** Lara, F. J., García-Campaña, A. M. y del Olmo-Iruela M. (2013) Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography. 31, Issue 2, pp. 353–358.
- Villalobos-Contreras, G.** (1994). Plantas comestibles en dos comunidades de la Sierra Norte de Puebla: Xochitlán de Vicente Suárez y Zapotitlán de Méndez Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.; pp. 315.
- Woolley, D.W.** (1994) Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *Journal of Biology and Chemistry* ;152, pp. 225–232.
- Wu, Q.;** Li, Y.; Wang, C.; Liu, Z.; Zang, X.; Zhou, X. & Wang, Z. (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 638 (2), pp. 139-145
- Xavier M.N.** (1995). Fitoterapia no Combate as Afecções Bucais João Pessoa Brasil, Editoral déia , p.145
- Yenjit, P.,** Issarakraisila, M., Intana, W. y Chantrapromma, K. (2010) Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Vol-55, pp. 129–132.
- Yessoufou, K.,** Elansary, H. O., Mahmoud, E. A. y Skalicka-Woźniak, K. (2015) Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. *Industrial Crops and Products* Vol-74, pp. 752–758.
- Yi-Chen C.,** Abdussalam-Salhin M.A., Baharuddin S., Hafizi R. y Ching-Kheng Q. (2014) Cu(II) complexes of 2-(diphenylmethylene)hydrazinecarboxamide derivatives: Synthesis, characterization and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Arabian Journal of Chemistry* Available online 10.1016/j.arabjc.2014.02.014

