BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

# INHIBICIÓN DE *Trichoderma* sp. EN CULTIVOS DE *Pleurotus ostreatus* A PARTIR DE EXTRACTOS DE *Anacardium occidentale, Ruta chalepensis* Y *Thymus vulgaris*

TESIS DE LICENCIATURA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA:

JOEL DE LA CRUZ ENRÍQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. MA. DOLORES CASTAÑEDA ANTONIO

ASESOR DE TESIS

M. EN C. OSCAR PÉREZ TORIZ

Junio 2015

BUAP

Puebla, Pue. a 27 de Octubre de 2014

**C. DE LA CRUZ ENRIQUEZ JOEL**
**P R E S E N T E**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Microbiología,

MC. DOLORES CATAÑEDA ANTONIO, Director de Tesis,

QFB. OSCAR PEREZ TORIZ, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**INHIBICIÓN DE Trichoderma sp. EN CULTIVOS DE Pleurotus ostreatus A PARTIR DE EXTRACTOS DE Anacardium occidentale, Ruta chalepensis Y Thymus vulgaris**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien para vivir mejor"

**M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA**
**D I R E C T O R**

Facultad de Ciencias Químicas
Av. San Claudio y 18 Sur,
Edificio 105-H, Col. San Manuel,
Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

BUAP

**M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA**
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**
**P R E S E N T E**

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

**DE LA CRUZ ENRIQUEZ JOEL**

realizada en el area de Microbiología, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

**INHIBICIÓN DE Trichoderma sp. EN CULTIVOS DE Pleurotus ostreatus A PARTIR DE EXTRACTOS DE Anacardium occidentale, Ruta chalepensis Y Thymus vulgaris**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 25 dias del mes de Mayo de 2015

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien para vivir mejor"

M.E.C. ANA BERTHA ESCOBEDO LOPEZ

MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ

MC. PATRICIA GPE. SUAREZ ALBORES

C.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
Av. San Claudio y 18 Sur,
Edificio 105-H, Col. San Manuel,
Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

*Un logro en la vida de una persona no sería posible sin dedicación y sobre todo sin apoyo, por lo cual desde mi corazón dedico esta obra, a las personas que me han apoyado a lo largo de mi vida.*

*A mi madre Melva por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida gracias por sus consejos, sacrificios que ha hecho por vernos triunfar y sobre todo por su amor y apoyo, eso para mí es el regalo más valioso que una madre puede darle a su hijo.*

*A mi padre Joel por su cariño, apoyo, por sus ejemplos de coraje y perseverancia, el cual me ha ayudado a crecer como persona.*

*A Mi hijo Joelin que ha llenado mi vida de felicidad.*

*A Paloma por el amor y apoyo que me has dado en esta etapa de mi vida y darme el mejor regalo nuestro hijo.*

*A mi hermano Cesar por todo el apoyo que me ha brindado.*

*A mi abuela Juana Chevez fue una segunda madre para mí, hoy ya no está con nosotros, pero aún vive en mi corazón, gracias por el amor y apoyo que me diste, el cual fue muy importante para lograr concluir mi licenciatura.*

*A Mis familiares gracias al amor y apoyo incondicional he logrado un objetivo en mi vida, a mis tías, Araceli, Irlanda gracias a su apoyo y cariño, pero sobre todo a mis tíos Gaspar Chevez y Adelina Pineda gracias a ellos mi trabajo experimental fue posible.*

*A mis amigos, porque siempre estuvieron y me dieron su apoyo cuando lo necesite sin pedirme nada a cambio y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca voy a olvidar.*

*A mis asesores, MC. Ma. Dolores Castañeda Antonio por su gran apoyo y motivación para la elaboración y la culminación de esta tesis, al MC. Oscar Pérez Toriz por su apoyo ofrecido para lograr este trabajo.*

*A mis sinodales, Por tomarse la molestia y el tiempo de leer y revisar este trabajo.*

*Y gracias a dios por permitirme lograr este gran objetivo.*

*JOEL DE LA CRUZ ENRIQUEZ.*

# Contenido

Introducción ..... 8
1. Marco teórico ..... 9
1.1 Enfermedades y plagas de los hongos comestibles ..... 9
1.2 Mohos verdes ..... 9
1.3 Descripción de *Trichoderma* ..... 10
1.3.1 Características macroscópicas ..... 10
1.3.2 Características microscópicas ..... 11
1.3.3 Transmisión de la infección ..... 11
1.4 El género *Pleurotus* ..... 11
1.4.1 Taxonomía ..... 12
1.4.2 Características morfológicas ..... 12
1.4.3 Cultivo ..... 13
1.5 Extractos vegetales: alternativa para el manejo de insectos, plagas y enfermedades en cultivos ..... 14
1.6 Alelopatía ..... 15
1.7 Métodos para obtener extractos de las plantas alelopáticas ..... 15
1.7.1 Infusión ..... 15
1.7.2 Maceración ..... 15
1.7.3 Hidrolato ..... 15
1.7.4 Purín ..... 16
1.7.5 Purín hidrolatado ..... 16
1.7.6 Hidrodestilación o arrastre con vapor ..... 16
1.8 *Anacardium occidentale* ..... 16
1.8.1 Taxonomía ..... 16
1.8.2 Nombres comunes ..... 17
1.8.3 Descripción botánica ..... 17
1.8.4 Usos medicinales ..... 17
1.9 *Thymus vulgaris* ..... 18
1.9.1 Nombres populares ..... 18
1.9.2 Taxonomía ..... 18
1.9.3 Descripción ..... 18
1.9.4 Usos medicinales ..... 19
1.10 *Ruta chalepensis* ..... 19

1.10.1 Nombres comunes ..... 19
1.10.2 Taxonomía ..... 19
1.10.3 Descripción ..... 19
1.10.4 Usos ..... 19
2. Planteamiento del problema ..... 20
3. Justificación ..... 21
4. Objetivo general ..... 22
4.1 Objetivos específicos ..... 22
5. Hipótesis general ..... 22
6. Diseño del estudio ..... 23
6.1 Tipo de estudio ..... 23
6.2 Material biológico ..... 23
6.3 Medios de cultivo ..... 23
6.4 Sustrato ..... 23
6.5 Procedencia del material vegetal ..... 23
7. Metodología ..... 24
7.1 Diagrama general de trabajo ..... 24
7.2 Obtención de extractos ..... 25
7.3 Preparación del inóculo de *Trichoderma aggresivum* ..... 25
7.4 Evaluación *in vitro* de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales ..... 26
7.5 Evaluación de los extractos contra *Trichoderma* en cultivos de *Pleurotus ostreatus* ..... 28
7.6 Preparación de semilla de *Pleurotus ostreatus* ..... 28
7.7 Pasteurización del sustrato (paja) ..... 29
7.8 Siembra de las semillas de *Pleurotus ostreatus* con sus respectivos tratamientos (extractos) ..... 29
7.9 Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas ..... 29
7.10 Efecto de inhibición (%) ..... 30
7.11 Eficiencia biológica ..... 30
8. Resultados ..... 31
8.1 Evaluación *in vitro* de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales ..... 31
8.1.1 Primera prueba *in vitro* ..... 31
8.1.1.1 Efecto de inhibición (%) ..... 33
8.1.2 Segunda prueba *in vitro* ..... 35

8.1.2.1 Efecto de inhibición (%) ..... 37
8.1.3 Tercera prueba *in vitro* ..... 39
8.1.3.1 Efecto de inhibición (%) ..... 44
8.2 Resultados de la evaluación de la inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales en cultivos de *Pleurotus ostreatus* ..... 45
8.2.1 Primera prueba ..... 45
8.2.2 Segunda prueba ..... 48
8.2.3 Tercera prueba ..... 51
8.2.4 Eficiencia biológica (EB) ..... 55
8.3 Resultado de análisis por cromatografía de gases acoplada a masas de *Pleurotus* cultivadas con diferentes tratamientos ..... 57
8.4 Resultado de análisis por cromatografía de gases acoplada a masas de los extractos vegetales ..... 59
9. Discusión. ..... 62
10. Conclusiones ..... 64
11. Perspectivas ..... 64
12. Bibliografía ..... 65

# Introducción

Los hongos forman un grupo de microorganismos muy abundantes en la naturaleza, pueden crecer en cualquier tipo de sustrato orgánico vivo o muerto, actuando como degradadores o descomponedores de la materia orgánica, creciendo frecuentemente sobre restos vegetales, como, cortezas, hojas, semillas, troncos, etc. existen muchas que son benéficos para el hombre y los animales, pero al igual existen muchos que son patógenos o venenosos para ellos. También son utilizados para la obtención y producción de metabolitos, como antibióticos como es el caso de *Penicillium,* ácidos orgánicos, enzimas, alcohol y otros. (Cortés Sánchez A.J, Mosqueda Olivares T., 2013)

Por otro lado los hongos aportan mucho económicamente en diferentes aspectos. Una de ellas es la producción de hongos comestibles, que actualmente se cultivan en todo el mundo, con mayor inversión en Europa y Asia, los hongos comestibles no solo son una fuente de proteínas y vitaminas sino que también muchas especies incluidas en este grupo tienen propiedades medicinales, resultando así muy saludables para nuestra dieta. Otro aspecto muy utilizado es en alimentos fermentados, siendo utilizados desde las primeras civilizaciones para la producción de alimentos como son, queso y sus derivados, pan, cerveza, vino, etc. (Mena P. J., Herrera F. S., Mercado S. A., n.d)

En la agricultura los hongos constituyen pérdidas económicas importantes, siendo estos microorganismos uno de los principales agentes causales de una gran variedad de enfermedades en plantas, provocando un derroche económico por perdidas de cultivos ocasionadas por enfermedades de hongos. Los hongos causan extensos daños cuando son introducidos accidentalmente en hábitats de los que no son nativos.

Al igual estos microorganismos producen enfermedades importantes en los humanos y animales. Entre las más comunes están las micosis superficiales afectando la piel, pelo y uñas, aunque existen especies que producen enfermedades sistémicas o mortales. Sin embargo los hongos también pueden ser utilizados como agentes de control biológico, ayudando a mantener a los patógenos, insectos, nematodos, otros hongos yerbas no deseables, en un nivel en el cual ya no constituyan un problema. Ayudando así a disminuir

los problemas ambientales ocasionados con la utilización de agroquímicos. (Mena P. J., Herrera F. S., Mercado S. A., n.d)

# 1. Marco teórico

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios, dentro de estos tenemos macroscópicos y microscópicos que poseen una amplia gama de propiedades y características benéficas o dañinas. Dentro de los macroscópicos existen un grupo de hongos que son comestibles, aportando múltiples beneficios para los seres vivos.

## 1.1 Enfermedades y plagas de los hongos comestibles

En varias etapas de la producción de hongos, tales como la preparación del sustrato, el cultivo, el corrimiento micelial y el desarrollo de los hongos mismos (cuerpos fructíferos), existen oportunidades para que otros organismos entren y crezcan en el sustrato o en el micelio, o en el esporóforo en desarrollo y estas situaciones consecuentemente causan enfermedades. Incluidos aquí están los virus, las bacterias, hongos, nematodos e insectos. (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

Con esto el estudio de las enfermedades en hongos comestibles ha tomado relevancia en la investigación ya que estas enfermedades causan una baja importante en producción y pérdidas económicas en la industria agrícola. En especial existen unas especies conocidas como mohos verdes que afectan la producción y el cultivo de los hongos comestibles.

## 1.2 Mohos verdes

Es cualquier enfermedad causada por mohos de color verde sobre hongos comestibles puede llamarse “enfermedad de mohos verdes”. El color verde mostrado por estos hongos viene de sus esporas, no de las hifas, las hifas de estos hongos son normalmente hialinas. Existen más de 30 hongos causantes de la enfermedad del “moho verde”. Esto es muy común en los sustratos que no ha sido adecuadamente pasteurizado. Frecuentemente se encuentran especies de *Trichoderma, Aspergillus* y *Penicillium*. Los mohos suelen considerarse competidores por los nutrientes, o antagonistas. El “moho verde” causado por

especies de *Trichoderma* fue una vez reconocido como indicador de deficiente calidad del compost y era de menor importancia en el cultivo comercial de *hongos comestibles*. Sin embargo, en años recientes, este "moho verde" se ha vuelto una enfermedad de mayor importancia y que genera graves pérdidas económicas (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

## 1.3 Descripción de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon en 1794 para cuatro hongos microscópicamente similares, que fueron descritos como de apariencia pulverulenta, con una cobertura pilosa. Las especies de *Trichoderma* son hongos que aparecen en cualquier tipo de suelo y que producen colonias blancas, amarillas o (más típicamente) verdes cuando se cultivan.

Es un hongo anaerobio facultativo, de rápido crecimiento, puede crecer en condiciones climáticas extremas, es hiperparásito que actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas y microparasitismo además el hongo *Trichoderma* es ampliamente utilizado como biocontrolador de algunas especies de hongos fitopatógenos y nematodos.
(Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

Hongo superior

Sub – División: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Hifales (Moniliales)
Género: *Trichoderma* (Chávez García M. P. 2006).

### 1.3.1 Características macroscópicas

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas - verdes, amarillo – verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos (Chávez García M. P. 2006).

El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo-verde y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivos sumergido (Chávez García M. P. 2006).

### 1.3.2 Características microscópicas

Los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificada, no verticilada, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgada hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Las conidias son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Chávez García M. P. 2006).

### 1.3.3 Transmisión de la infección

Individualmente, las esporas verdes son microscópicas. Pueden infectar el sustrato de los hongos comestibles más fácilmente justo después de sembrar. Se transmiten al sustrato fresco por el viento, adheridas a las partículas de polvo de sustrato contaminado, o por ácaros que se han alimentado del micelio de *Trichoderma* en sustrato infectado, en las manos y ropa de los trabajadores y por la maquinaria. Las esporas y los ácaros que las llevan se producen en muy grandes cantidades y consecuentemente pueden llegar a casi cualquier parte del hongo (Ramírez Carrasco, A. P. 2010). Provocando así que el cultivo de hongos comestibles tenga una diversidad de rutas de contaminación, implicando así un agente de infección potencialmente contaminante para los hongos comestibles, uno de ellos es *Pleurotus spp*. Que ha tomado gran importancia a nivel mundial.

## 1.4 El género *Pleurotus*

En México, los hongos comestibles cultivados del género *Pleurotus* son conocidos con el nombre comercial de “setas”, las setas ocupan el segundo lugar en producción en Latinoamérica, solo después del champiñón.

Actualmente, estos hongos son cultivados en 21 estados de México y se observa que el interés por cultivarlos se incrementa no solo en este país, sino en la mayoría de los países latinoamericanos, como estrategia de desarrollo económico, de producción de un alimento y de utilización de subproductos agrícolas. México es el principal productor de *Pleurotus* en todo América, incluidos Canadá y Estados Unidos, por lo mismo, las experiencias nacionales son relevantes para un grupo de personas interesadas que trasciende las fronteras del país y que abarca las esferas económica, educativa, biotecnológica y de investigación, principalmente (Sánchez Vázquez J. E., Martínez Carrera D., Mata G., Leal Lara H. 2007).

Respecto al aporte nutricional del mismo, también tiene apreciables valores alimenticios.

• Proteína bruta entre 26 % y 34 %
• Proteína verdadera ≈ 18 %
• Carbohidratos – 48.9 %
• Grasa – 2,2 %
• Valor energético – 350 cal/Kg
• Riboflavina – 4.7 mg/100gr
• Niacina – 108.7
• Tiamina – 4.8 (Romero Jiménez, A. M., Rodríguez García, A. S., Pérez Marchena R., n.d.).

### 1.4.1 Taxonomía

Superreino: *Eucaryota*
Reino: *Fungi*
División: *Eumycota*
Subdivisión: *Basidiomycotina*
Clase: *Holobasidiomycetes*
Subclase: *Hymenomycetidae*
Orden: *Agaricales*
Familia: *Tricholomataceae*
Género: *Pleurotus* (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

### 1.4.2 Características morfológicas

El cuerpo fructífero de esta seta, es redondeado, con la superficie lisa abombada y convexa, recordando la forma de las conchas de las ostras, por esta razón es que comúnmente se le llama "Hongo ostra" (*Oyster Mushroom*). Su tamaño depende de la edad y oscila entre 5 y 15 cm de diámetro, aunque pueden encontrarse ejemplares mucho más grandes. El color es muy variable, crema, blanco grisáceo, pardo, etc. La carne blanca es de olor fuerte, tierno al principio y después correoso (Romero Jiménez, A. M., Rodríguez García, A. S., Pérez Marchena R., n.d.).

### 1.4.3 Cultivo

El cultivo de *Pleurotus spp e*mpezó alrededor de 1917 en troncos de Alemania, Falk reportó por primera vez el cultivo de este hongo. El cultivo ha tenido un desarrollo muy rápido y gran aceptación en el mercado, al igual que en la agroindustria. Cultivándose hoy en día en casi todo el mundo. Actualmente compite con *Lentinula edodes*, por el segundo lugar en producción mundial de hongos comestibles, solo después de *Agaricus bispurus*. Todo esto gracias a su calidad organoléptica, su capacidad de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa, permitiéndole crecer en gran diversidad de sustratos. También desarrolla en un amplio rango de temperatura, son fáciles de cultivar y no requiere de mucha demanda para su cultivo como otros hongos, haciendo su cultivo sea tal vez el más sencillo de todos los macromicetos conocidos. Gracias a la diversidad de sustratos el cual puede crecer se puede observar un impacto benéfico para cultivar hongos aprovechando desechos agropecuarios (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

Su gran aceptación se debe a las siguientes características:

1. El género *Pleurotus* es cosmopolita con varias especies comestibles.
2. Varias especies se pueden cultivar en diferentes rangos de temperatura, haciendo posible su cultivo en casi todo el mundo.
3. Es un hongo de “pudrición blanca” capaz de degradar tanto la lignina como la celulosa. Haciéndolo un agente primario de descomposición. Capaces de degradar directamente materiales que llevan celulosa y lignina sin preparación química ni biológica.
4. El crecimiento micelial de todas las especies cultivadas es estimulado por una alta concentración de $CO_2$. La concentración de $CO_2$ en el aire de hasta 28% estimuló el crecimiento de *P. ostreatus* y *P.* “florida”, mientras que el límite para *P. eryngii* fue de sólo 22%. La alta concentración de $CO_2$ en el sustrato es útil en su establecimiento ya que otros organismos competidores no pueden tolerar concentraciones tan altas.
5. Las técnicas de cultivo son baratas y sencillas.
6. Se dispone de una tecnología sencilla para la conservación post-cosecha (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

En México, el cultivo de hongos comestibles inició en el año de 1933, en un rancho cercano a Texcoco, Estado de México, propiedad del Sr. José Leben Zdravie. Esto convirtió al país en

el tercer lugar de América, donde se emprendía dicho cultivo, sólo antecedido por E.U.A. (1880) y Canadá (1912) (Mora V. M., Martínez C. 2007).

Actualmente, la producción comercial de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47,468 toneladas anuales. El cultivo de hongos en México ha evolucionado, sin embargo las setas (*Pleurotus*) solo representa cerca del 4.62% de la producción comercial de hongos comestibles en México. El cultivo de *Pleurotus* es reciente, tuvo auge en 1974 en Cuajimalpa, D. F., dentro de las instalaciones de "Hongos de México, S. A. de C. V." En 1990, la producción anual estimada de setas en México fue de 356 ton. A partir de este año, la producción comercial de setas se incrementó notablemente, alcanzando alrededor de 1,825 ton en 1997, lo que representó un incremento del 413% durante este período. Esta tendencia se mantuvo alcanzando una producción nacional estimada de 2,190 ton en el 2005. (Mora V. M., Martínez C. 2007).

## 1.5 Extractos vegetales: alternativa para el manejo de insectos, plagas y enfermedades en cultivos

La modernización de la agricultura y los aumentos de la producción, han traído un incremento en la utilización masiva y a veces indiscriminada de plaguicidas y fertilizantes generando problemas como desarrollo de resistencia en las plagas, eliminación de insectos benéficos, presencia de residuos tóxicos en el producto cosechado, desequilibrio del ecosistema y efectos negativos sobre la salud humana.

Las investigaciones actuales buscan alternativas de plaguicidas que no sean persistentes, no generen resistencia, que sean específicos, no provoquen toxicidad a los seres vivos, sean biodegradables y de bajo costo. Ante las exigencias mencionadas, muchos de los productos vegetales conocidos, constituyen una atractiva fuente, no solo por su diversidad en la composición química que poseen, sino por su acción biológica como plaguicida y su carácter menos nocivo sobre el medio ambiente y la salud humana (Luna Geller L.A., Lara Acevedo G. n.d.).

## 1.6 Alelopatía

El término alelopatía (del griego *allelon* = uno al otro, del griego *pathos*= sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue utilizado por primera vez para referirse a los efectos perjudicial o benéficos, que son directa o indirectamente el resultado de la acción de compuestos químicos, (Blanco Yaisys, 2006), perjudiciales sobre otras plantas, o de una planta sobre un microorganismo (hongos, bacterias), o de una planta sobre un insecto, como resultado de la liberación al medio ambiente de sustancias o compuestos químicos llamados alelopáticos que son producidos por las plantas y que actúan como repelentes, atrayentes, estimulantes e inhibidores (Luna Geller L.A., Lara Acevedo G. n.d.).

Esta definición se amplió a «alelopatía se refiere a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos (Blanco Yaisys, 2006). Estos metabolitos secundarios se pueden obtener de diferentes formas en las que se destacan las siguientes:

## 1.7 Métodos para obtener extractos de las plantas alelopáticas

### 1.7.1 Infusión

Las hojas, semillas, flores y tallos tiernos, se colocan en agua caliente, se deja enfriar, para luego utilizar el líquido. Este método se usa cuando los metabolitos secundarios son muy volátiles o se desprenden fácilmente con el calor. Con este método se obtienen metabolitos secundarios en bajas concentraciones.

### 1.7.2 Maceración

Se maceran las plantas, se le colocan solventes y se dejan reposar por un tiempo determinado.

### 1.7.3 Hidrolato

Introducir hierbas frescas o secas, en un recipiente resistente al fuego, al cual se le añade agua, generalmente en proporción de tres litros por kilo de hierbas. Se pone al fuego y se

deja hervir hasta que el agua cambie a colores más oscuros. Se deja enfriar y se aplica diluido con más agua.

### 1.7.4 Purín

Para extraer los metabolitos secundarios de los tallos de las plantas, en un recipiente lleno de agua pura, se colocan los tallos y se tapa. La mezcla se remueve diariamente hasta que la mezcla no haga más espuma. Se cuela y diluye, para utilizarlo solamente en la zona de las raíces.

### 1.7.5 Purín hidrolatado

Consiste en poner en remojo las hierbas durante 24 horas y luego colocarlas por 20 minutos a fuego lento, enfriar, colar y utilizar. Este método, suele ser usado cuando se trabajan principios activos contenidos en plantas muy leñosas o troncos fuertes. La concentración de sustancias por este método es mejor que la del purín, pero es más baja que la que se obtiene a partir del hidrolato.

### 1.7.6 Hidrodestilación o arrastre con vapor

Es el sistema más adecuado para extraer o atrapar y concentrar sustancias volátiles y no volátiles contenidas en flores, hojas, tallos o raíces de muchas plantas aromáticas, responsables de la acción alelopática.

(Luna Geller L.A., Lara Acevedo G. n.d.).

## 1.8 *Anacardium occidentale*

### 1.8.1 Taxonomía

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clases: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: *Anacardium*
Especie: *occidentale*
(Tello, V, J. 2011)

### 1.8.2 Nombres comunes

Cajueiro (Brasil), cashew (USA), marañón (Costa Rica, Ecuador, Perú), merey (Colombia, Venezuela), Castaña de cajú (en Uruguay, Argentina y Chile) marañón, nuez de la india (México)

Figura 1. De la cruz E, J. (2014)
Fruto *Anacardium occidentale*

**1.8.3 Descripción botánica** Árbol de 5-8 m con hojas sencillas, oblongas, coriáceas y alternas de 8-12 cm de largo y 4-6 cm de ancho. Flores pequeñas unisexuales con cáliz de cinco pétalos, en panículas terminales muy aromáticas. El color de la flor es blanco cuando se abre por la mañana y se torna rojizo en la tarde; su fruto es una nuez reniforme de 2-3 cm verde grisácea sostenida por un pedicelo vistoso, carnoso, de color amarillo o anaranjado, muy jugoso cuando madura (V it, P., 2003).

### 1.8.4 Usos medicinales

Se le atribuyen las siguientes propiedades o acciones: antidisentérica, anti-inflamatoria, antitusiva, antiparasiticida, afrodisiaca, febrífuga, hipoglicémica, hipotensiva, purgante, refrigerante, estomáquica y tónica. Al Fruto (astringente, diurética, aceite, cardol): poderoso aceite vesicante, vermífugo, se emplea para remover verrugas y para combatir la lepra y úlceras. A la hoja, corteza: diabetes, diarrea e hinchazones de origen sifilítico. Al pedúnculo carnoso o hipocarpio (jugo): hemoptisis, bronquitis y tos, enjuague para la inflamación de amígdalas. Se usa como tónico general, ducha para las secreciones vaginales, como astringente para detener sangrados (extracción de dientes), disentería, hipoglucemia. Semilla: purgante, afrodisiaca. El aceite (cardol) de la vaina es caústico y ampolla la piel. (Conabio). Extractos metanólicos de Anacardium occidentale han mostrado actividad antimicrobiana frente a 13 de 15 aislamientos bacterianos a una concentración de 20 mg / mL (Akinpelu D. 2010).

## 1.9 *Thymus vulgaris*

### 1.9.1 Nombres populares

*Thymus vulgaris:* Tomillo, tomillo común, tomello, tremoncillo, estremoncillo
(Cañigueral F S, Vanaclocha V B. 2000)

Figura 2.Luis Santiago (n.d.) planta de tomillo

### 1.9.2 Taxonomía

Reino: plantae
División: magnoliophyta
Clase: magnoliopsida
Orden: lamiales
Familia: lamiaceae
Género: *Thymus*
(Estrada Orozco, S P. 2010)

### 1.9.3 Descripción

El Tomillo pertenece a la familia de las labiadas alcanza de 15 a 30 cm. de altura, muestra hojas opuestas, lanceo-ladas, con los bordes enrollados y densamente pilosas.
Las flores del Tomillo son diminutas, agrupadas en racimos terminales muy densas, rosadas o blanquecinas. Cáliz de color rojizo vinoso, con la garganta obstruida por pelitos blancos. El labio superior muestra tres dientecitos cortos y el inferior dos largas y estrechas lacinias. La corola mide entre 7 y 8 mm y aparece dividida en dos labios: el superior escotado y en inferior subdividido en tres lóbulos divergentes. Toda la planta desprende un fuerte aroma al estar provista de glándulas esenciales. Se recolectan primordialmente el *Thymus vulgaris* y el Tomillo salsero o blanco. Los romanos lo introdujeron en la cocina, perfumando vinos y quesos (Estrada Orozco, S P. 2010).

### 1.9.4 Usos medicinales

El tomillo presenta los siguientes usos medicinales: espasmolítico y expectorante, antitusivo, antiséptico (antibacteriano y antimicrobiano), antiinflamatorio, para problemas estomacales y como antioxidante (Cañigueral F S, Vanaclocha V B. 2000).

## 1.10 *Ruta chalepensis*

### 1.10.1 Nombres comunes

Ruda, hierba piojera, ruda pestosa

### 1.10.2 Taxonomía

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Sapindales
Familia: Rutaceae
Género: Ruta
Especie: chalepensis
(Honduras silvestre, n.d)

Figura 3 De la cruz E, J. (2014). Ruda

### 1.10.3 Descripción

*Ruta chalepensis* es una planta herbácea, rizomatosa, de tallos ramosos que alcanzan alturas de 2 m. Hojas pecioladas grandes, palminervadas, quinquilobadas, cordadas en la base, incisas, lisas, de matiz verde pálido por el haz y grisáseo por el envés; olor especialmente fuerte, sabor amargo; flores pequeñas pedunculadas, de color amarillo y bracteadas, están reunidas en ramilletes terminales; florece entre primavera y verano dando lugar a un fruto capsular valvoso, rugoso e indehicente (Aguilar S, LL. 1995).

**1.10.4 Usos**: En medicina tradicional es utilizado para tratar el dolor de estómago, ayuda al parto, diarrea, para combatir lombrices y amibas y purifica el aire. El extracto tiene actividad antibacteriana y antifúngica. El aceite esencial presenta toxicidad en ratones a una dosis letal media. El principio activo es la rutina que le da a la planta propiedades venotónicos y vasoprotectoras (Herbario Universidad de Antioquia, 2008).

## 2. Planteamiento del problema

Diversos estudios han mostrado el crecimiento que ha tenido la producción de hongos comestibles en todo el mundo en los últimos 30 años ha aumentado alrededor de 14 veces su producción (Ancona M.P, Ancona M.L, Flores N.A, Pech M.V.C. 2005). Aun así, el número de especies de macromicetos investigados en nuestro país son bajas y los que existen son de origen asiático y europeo (Juárez Luna, M. A. 2012).

Por otra parte, en México, el diagnóstico de las diferentes plantas productoras de hongos comestibles realizado por Ortega-Garrido (2002) permitió identificar a los principales agentes biológicos contaminantes, concluyendo que *Trichoderma spp*, fue el más peligroso. Ocasionando la pérdida de la producción, la cual se tiene registrado que ha sido desde un 30% hasta un 100%(Reyes Quintanar C.K, 2013). En el país, la problemática sobre el "moho verde" *Trichoderma* radica principalmente en que no existen cepas en el mercado que sean resistentes, debido a la falta de conocimiento o de aplicación oportuna de medidas de manejo, prevención, control y erradicación. Provocando así un gran problema para mantener una adecuada producción de hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus* (Ramírez Carrasco, A. P. 2010).

Los problemas de contaminación por el "moho verde" *Trichoderma* han tomado relevancia entre los agricultores ya que provoca una baja significativa en la producción de hongos comestibles, provocando una gran pérdida económica en todo el mundo, resultando en la actualidad una enfermedad muy frecuente y difícil de erradicar. En la actualidad se utilizan agroquímicos como el benomil, sustancias químicas como yeso y cal, pero debido a la capacidad de los hongos de absorber todo tipo de sustancias y nutrientes, resulta perjudicial tratarlos con lo antes menciono ya que no sería del todo comestible.

# 3. Justificación

En la actualidad existe una problemática en la utilización indiscriminada de los fungicidas y fumigantes, como el benomil para el control de *Trichoderma* en el cultivo de hongos comestibles; sin embargo, su uso es cada vez más restringido por la sociedad debido a que conlleva a una contaminación ambiental y posee una alta toxicidad. Por lo que hay que evitar dicha contaminación ambiental y alta toxicidad mediante la implementación de alternativas de inhibición *Trichoderma* mediante extractos naturales, los cuales pueden proporcionar a los basidiocarpos algunos compuestos que dan propiedades a estas plantas, generando así una propuesta ecológica

Los hongos comestibles tienen del 19 al 35% de proteínas aprovechables en peso seco, contienen tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), cobalamina (vitamina B12) y ácido ascórbico (vitamina C), entre otros; además de minerales como el fósforo, hierro, calcio y potasio (Gaitán H. R. n.d.). Tienen alto contenido de ácido glutámico -aminoácido que entre otras funciones inmunitarias ayuda a combatir las infecciones, estas propiedades los hace un alimento de alto valor dietético. Son bajos en glucosa para la prevención de la diabetes; bajos en purinas, para prevenir la gota; bajos en grasas para evitar problemas cardiovasculares; bajos en sodio para prevenir la presión arterial alta; ricos en fibra, para evitar el estreñimiento y bajos en calorías para disminuir la obesidad (Gaitán H. R. n.d.).

Por tal motivo es de suma importancia poder evaluar extractos naturales de diversas plantas con características fungicidas, para poder controlar, inhibir o eliminar el crecimiento del “moho verde” *Trichoderma*, ayudando así a la industria agrícola a un mayor control y producción de hongos comestibles dentro de los cuales se encuentra *Pleurotus ostreatus*.

## 4. Objetivo general

Desarrollar una alternativa para la inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante los extractos de *Ruta chalepensis, Thymus vulgaris y Anacardium occidentale* que afecte lo menos posible la productividad eficiente de *Pleurotus ostreatus*.

## 4.1 Objetivos específicos

- Obtener extractos de *Ruta chalepensis*, *Thymus vulgaris* y *Anacardium occidentale*
- Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos de ruda, tomillo y marañón sobre *Trichoderma aggresivum in vitro.*
- Probar los extractos de *Ruta chalepensis*, *Thymus vulgaris* y *Anacardium occidentale* sobre *Trichoderma aggresivum* en cultivos de *Pleurotus ostreatus* a nivel piloto.

## 5. Hipótesis general

Los extractos de *Ruta chalepensis*, *Thymus vulgaris* y *Anacardium occidental* son capaces de inhibir crecimiento del "moho verde" *Trichoderma aggresivum*, afectado al mínimo el crecimiento óptimo de *Pleurotus ostreatus*.

# 6. Diseño del estudio

## 6.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental "*in vitro*" y tipo experimental "*in vivo*" cada uno con sus respectivos controles

## 6.2 Material biológico

Para este trabajo de investigación se ocupó una cepa de *Trichoderma aggresivum*, así como la cepa de hongo comestible *Pleurotus ostreatus CP-50,* ambos provenientes del Colpos *Campus* Puebla

## 6.3 Medios de cultivo

Se utilizó medio de cultivo agar con dextrosa y papa (PDA), marca Bioxon.

## 6.4 Sustrato

Para la obtención del inóculo primario de *Pleurotus ostreatus* se utilizó trigo (Mercado Zapata) y para la producción de las setas se utilizó paja (municipio de San Pedro Cholula)

## 6.5 Procedencia del material vegetal

Con base a las investigaciones sobre extractos vegetales con propiedades antifúngicas se seleccionaron plantas de marañón (*Anacardium occidentale*), ruda (*Ruta chalepensis*) provenientes de la localidad de santo domingo ingenio, Oaxaca con coordenadas 94º46' longitud oeste, 16°35' latitud norte, (figura 4.) y tomillo(*Thymus vulgaris*) proveniente del estado de Puebla.

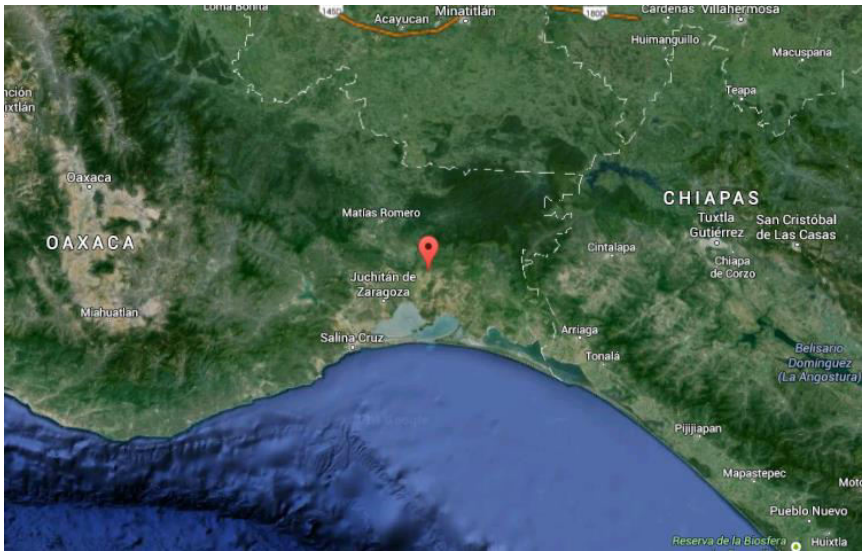
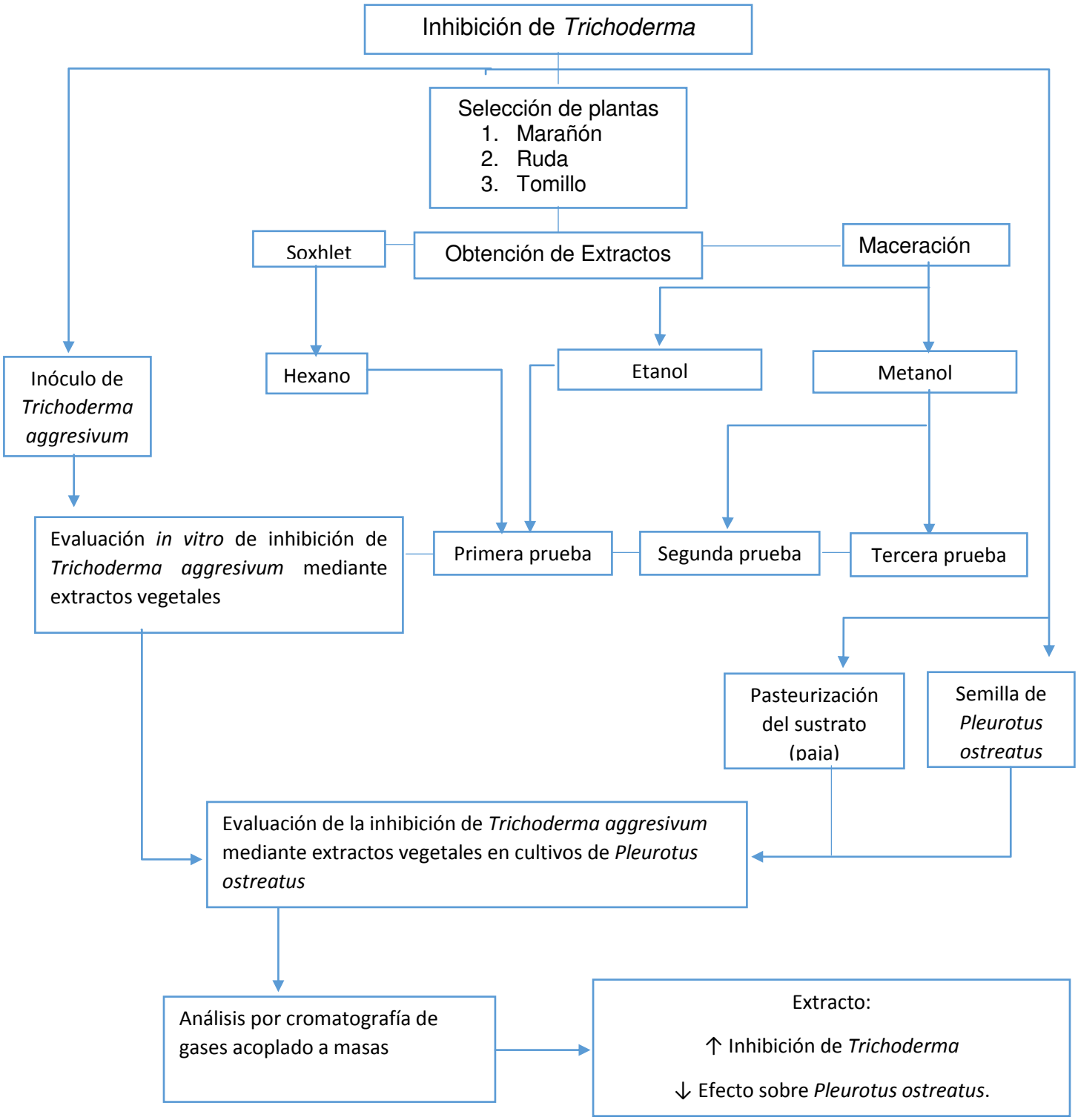



Figura 4. Localización santo domingo ingenio Oaxaca

# 7. Metodología

## 7.1 Diagrama general de trabajo



## 7.2 Obtención de extractos

Se seleccionaron plantas con poder fungicida "*Ruta chalepensis* (ruda), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Anacardium occidentale* (marañón)", se trituraron las plantas para obtener un mayor contacto de superficie, para la ruda se tomaron las hojas, se hizo lo mismo con el tomillo, mientras que para el marañón se tomaron las hojas, corteza de los troncos y la corteza de la semilla, se obtuvieron 3 tipos de extractos; por maceración con etanol, maceración con metanol y mediante soxhlet con hexano. Para la técnica de maceración se colocaron las plantas trituradas en recipientes de vidrio y se les colocó el solvente hasta cubrir las plantas se dejó macerar en refrigeración durante una semana. Para la extracción mediante soxhlet se usaron plantas de ruda y marañón hoja, se prepararon cartuchos con papel filtro y se obtuvo los extractos mediante la técnica de reflujo.

## 7.3 Preparación del inóculo de *Trichoderma aggresivum*

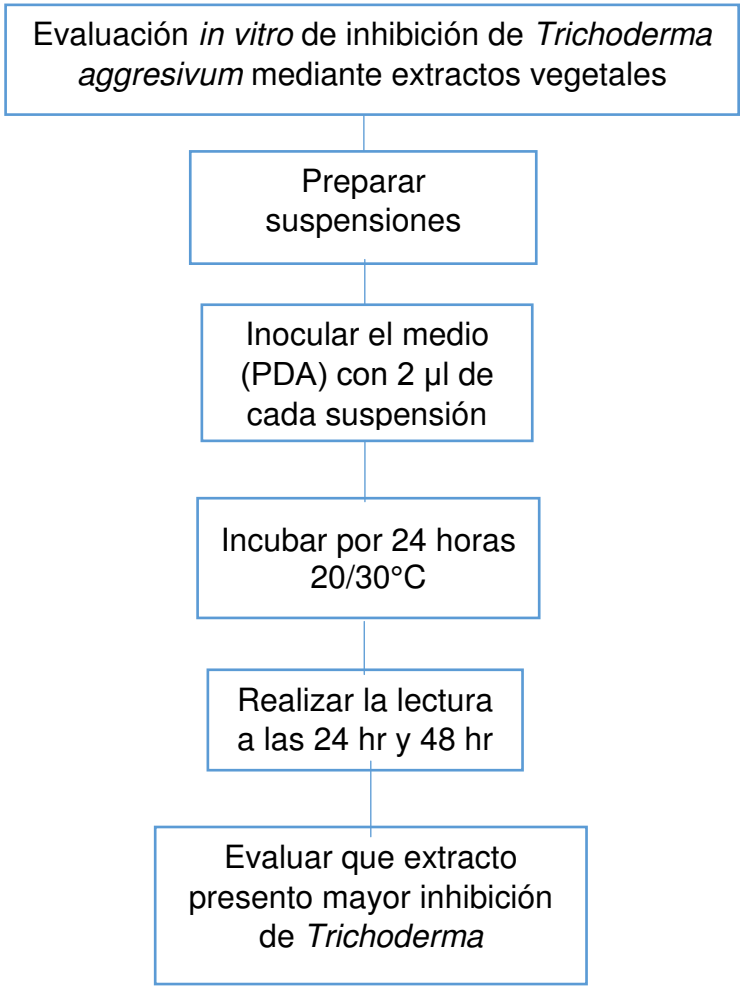
Se preparó un estándar de 0.5 del nefelómetro de McFarland (ver tabla 1)

Tabla 1. Estándar 0.5 nefelómetro de McFarland

| | |
|---|---|
| McFarland Standard No. | 0.5 |
| 1,0% de cloruro de bario ( mL) | 0.05 |
| 1,0% de ácido sulfúrico ( mL) | 9.95 |
| Aprox. densidad celular (1X10 ^ 8 UFC / mL) | 1.5 |
| Absorbancia | 0.08 a 0.1 |

Mediante comparación con el estándar se obtuvo el inóculo de *Trichoderma aggresivum* en solución salina isotónica.

## 7.4 Evaluación *in vitro* de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales




Se realizaron tres pruebas de inhibición *in vitro* de *Trichoderma aggresivum*, la primera prueba se realizó con extractos obtenidos mediante maceración con etanol y extractos obtenidos mediante soxhlet con hexano. Se prepararon diferentes suspensiones que se describen a continuación en la tabla 2. Se inoculó por triplicado placas de agar papa dextrosa divididas en 5 secciones con 2 µl de cada suspensión, ver figura 5.

Tabla 2. Suspensiones para la evaluación *in vitro* de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales

| | |
|---|---|
| Control negativo | 100 µl del extracto |
| Control positivo | 100 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Solvente + inóculo | 100 µl del solvente + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Directo | 100 µl del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:1 | 100 µl de la dilución 1:1 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:2 | 100 µl de la dilución 1:2 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:4 | 100 µl de la dilución 1:4 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:8 | 100 µl de la dilución 1:8 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:16 | 100 µl de la dilución 1:16 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |
| Dilución 1:32 | 100 µl de la dilución 1:32 del extracto + 10 µl del inóculo de *Trichoderma aggresivum* |

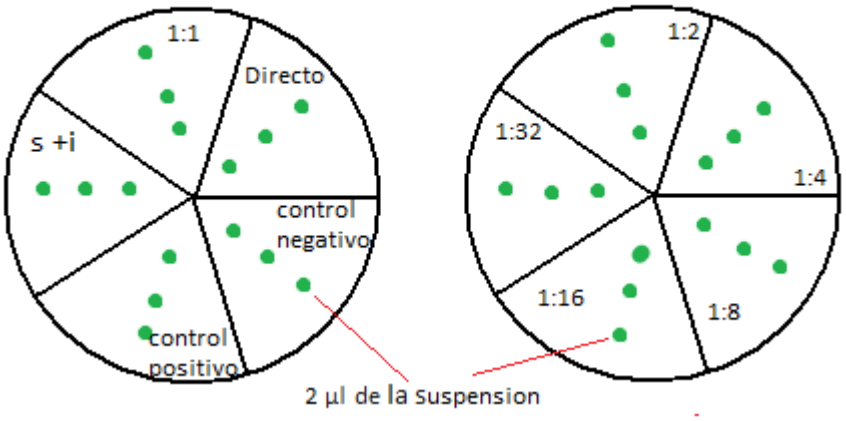
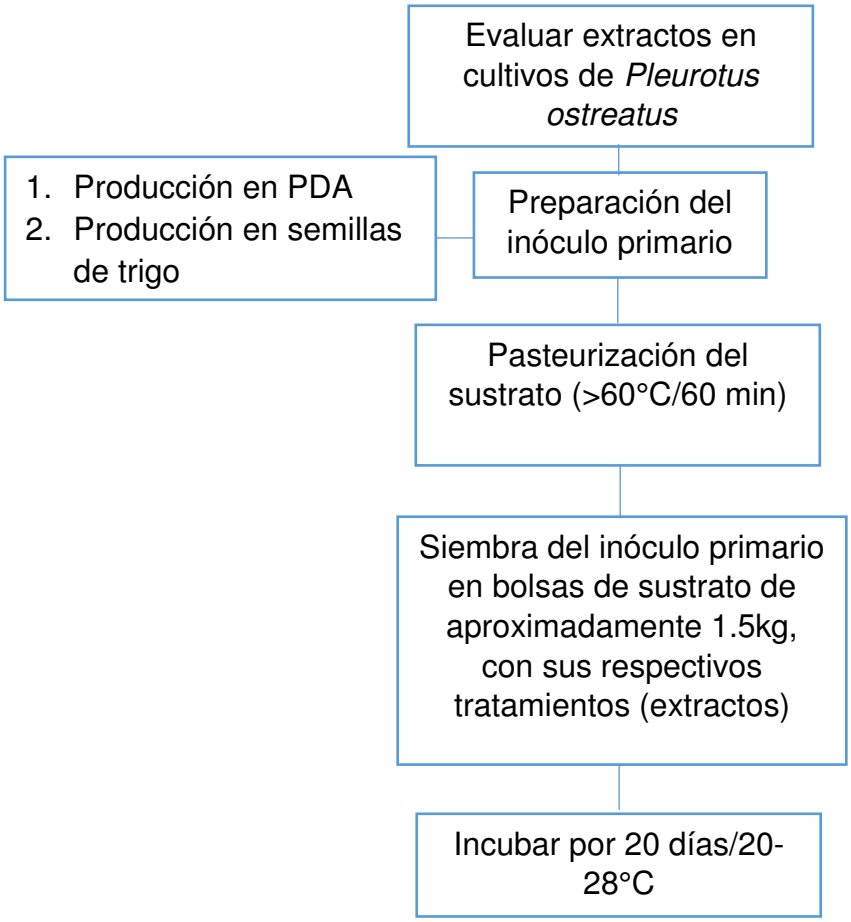



Figura 5. Siembra de las suspensiones para la evaluación *in vitro* de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales

## 7.5 Evaluación de los extractos contra *Trichoderma* en cultivos de *Pleurotus ostreatus*




## 7.6 Preparación de semilla de *Pleurotus ostreatus*

La producción de semilla de *Pleurotus ostreatus*, se llevó en 2 etapas, la primera producción en PDA (En un ambiente estéril, se colocó el hongo, libre de tierra e insectos. Se corta longitudinalmente con una navaja; con la ayuda de unas pinzas estériles y frías, se tomaron fragmentos del micelio y se colocaron sobre el medio de cultivo PDA, se incubó entre 25-28°C, en la obscuridad, durante una dos semanas). La segunda etapa fue la producción en semilla de trigo (las semillas de trigo se hirvieron con cal y yeso durante una hora, una vez frías y escurridas, se colocaron en recipientes de vidrio, se inocularon con el micelio obtenido en las placas de PDA, se cerraron los frascos, no herméticamente, se llevó a incubación entre 25- 28 °C / 20 días.

## 7.7 Pasteurización del sustrato (paja)

Se hirvió el sustrato (paja) durante una hora, para el caso del tratamiento con cal y yeso, se le agrego las sales descritas en una proporción de: cal 1% yeso 4% se dejó enfriar y escurrir.

## 7.8 Siembra de las semillas de *Pleurotus ostreatus* con sus respectivos tratamientos (extractos)

El cultivo de *Pleurotus ostreatus* se llevó de la siguiente manera, en bolsas transparentes de plástico con agujeros muy pequeños para permitir la entrada de oxígeno, se fue intercalando el sustrato pasteurizado, extractos (rociado) y semillas de *Pleurotus ostreatus*, se cerraron las bolsas, se llevó a incubación a una temperatura de 20-28°C. ver figura 6.

Figura 6. Bolsas cultivadas de *Pleurotus ostreatus*

## 7.9 Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas

Después de haber realizado la cosecha de las setas de *Pleurotus ostreatus* se llevaron a una estufa para secar las setas, se registró el peso seco, posteriormente se trituraron con la ayuda de una licuadora, se obtuvieron sus extractos mediante la técnica de soxhlet utilizando hexano, en el caso de los extractos de marañón, ruda y tomillo, se tomó 1 mL de cada extracto, para el caso del marañón se llevó a cabo una extracción liquido-liquido con acetona, estos extractos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

## 7.10 Efecto de inhibición (%)

El efecto de inhibición se calculó en base a la siguiente formula (Reyes Quintanar C.K, 2013)

$$\% \text{ inhibición} = \frac{C-T}{C} x\ 100$$

Donde:
C = promedio de tres réplicas del crecimiento micelial (mm) de los controles.
T = promedio de tres réplicas del crecimiento micelial (mm) de los tratamientos con extracto.

## 7.11 Eficiencia biológica

La eficiencia biológica se calculó mediante la siguiente formula (Viveros Flores y col, n.d)

$$eficienciabiologica = \frac{peso\ fresco\ de\ produccion\ en\ gramos}{peso\ seco\ del\ sustrato}$$

# 8. Resultados

## 8.1 Evaluación *in vitro* de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales

### 8.1.1 Primera prueba *in vitro*

Los extractos obtenidos de marañón (hojas y corteza), ruda, tomillo mediante el método de maceración con etanol se muestran en tabla 3, así también de los extractos de marañón y ruda extraídos por soxhlet usando hexano, se muestra la concentración obtenida en la tabla 4.

Tabla 3 Concentración obtenida de los extractos de las diferentes plantas en etanol

| Extracción por maceración con etanol | | | |
|---|---|---|---|
| Planta | Peso (g) | Cantidad del solvente ( mL) | Concentración (g/ mL) |
| Marañón hoja | 24.298 | 15 | 1.62 |
| Marañón corteza | 6.652 | 13 | 0.51 |
| Ruda | 27.842 | 11 | 2.53 |
| Tomillo | 11.153 | 50 | 0.22 |

Tabla 4 Concentración obtenida de los extractos de las diferentes plantas en hexano

| Extracción por soxhlet (hexano) | | | |
|---|---|---|---|
| Planta | peso (g) | Cantidad del solvente ( mL) | Concentración (g/ mL) |
| Marañón hoja | 21.663 | 5 | 4.33 |
| Ruda | 22.491 | 6 | 3.75 |

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición en placa de *Trichoderma aggresivum* con los extractos (maceración con metanol y soxhlet hexano) se presenta en la figura 7.

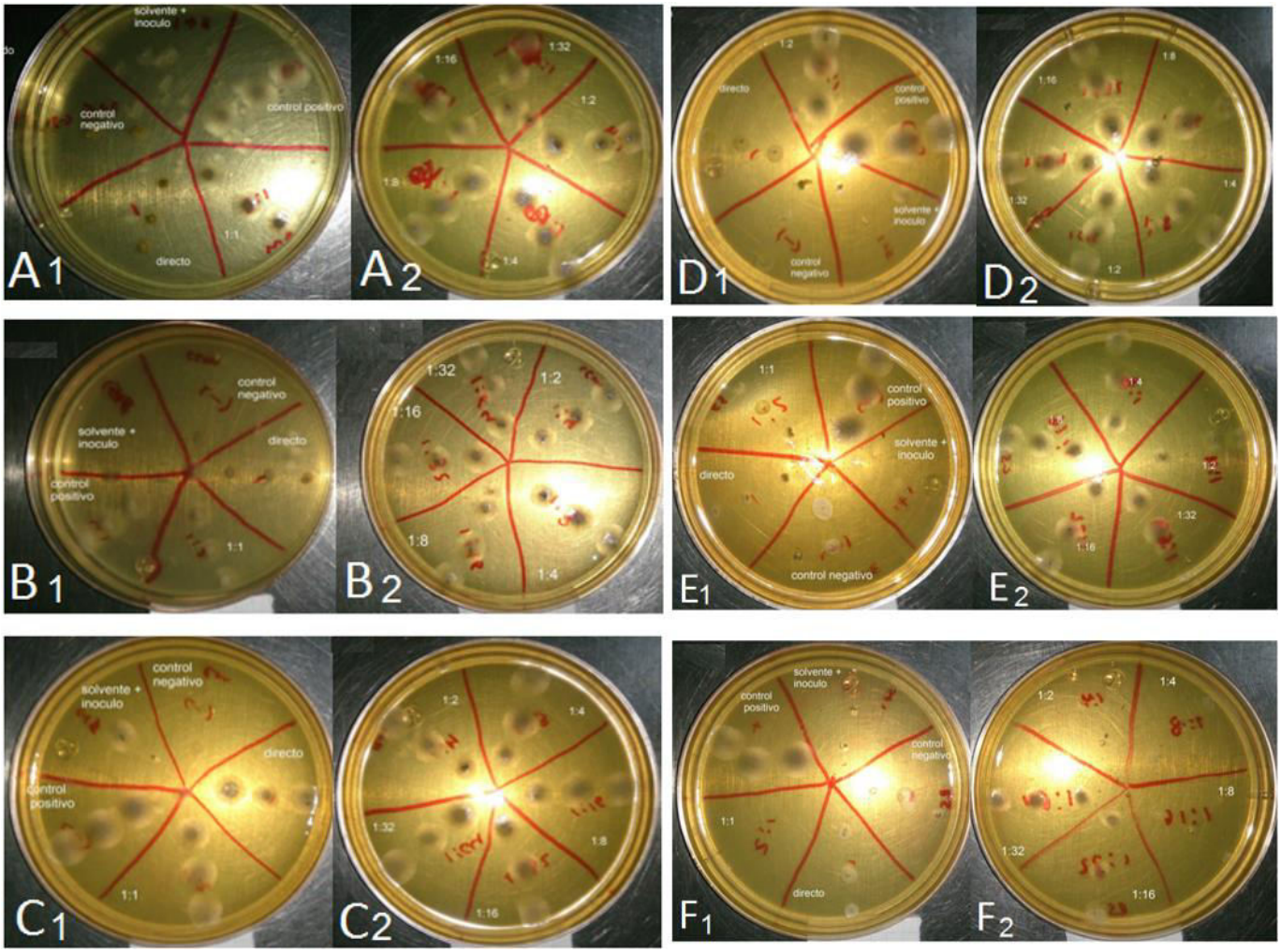



Figura 7. Crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con diferentes extractos vegetales en 48 horas.

En la imagen A1 y A2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón hoja obtenido mediante maceración con etanol. En la imagen B1 y B2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón corteza obtenido mediante maceración con etanol. Las imágenes C1 y C2 muestran el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de ruda obtenido mediante maceración con etanol. En la imagen D1 y D2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de tomillo obtenido mediante maceración con etanol. La imagen E1 y E2 muestran el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón hoja obtenido mediante soxhlet con hexano. En la imagen F1 y F2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de ruda obtenido mediante soxhlet con hexano. En las imágenes A1, B1, C1, D1, E1, F1 se

aprecian los controles positivos, negativos y solvente, la confrontación directa (extracto sin diluir) y la dilución 1:1, las imágenes A2, B2, C2, D2, E2, F2 se muestran las confrontaciones de *Trichoderma aggresivum* y diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. La descripción de la confrontación se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Crecimiento micelial (mm) de *Trichoderma aggresivum* en 48 horas

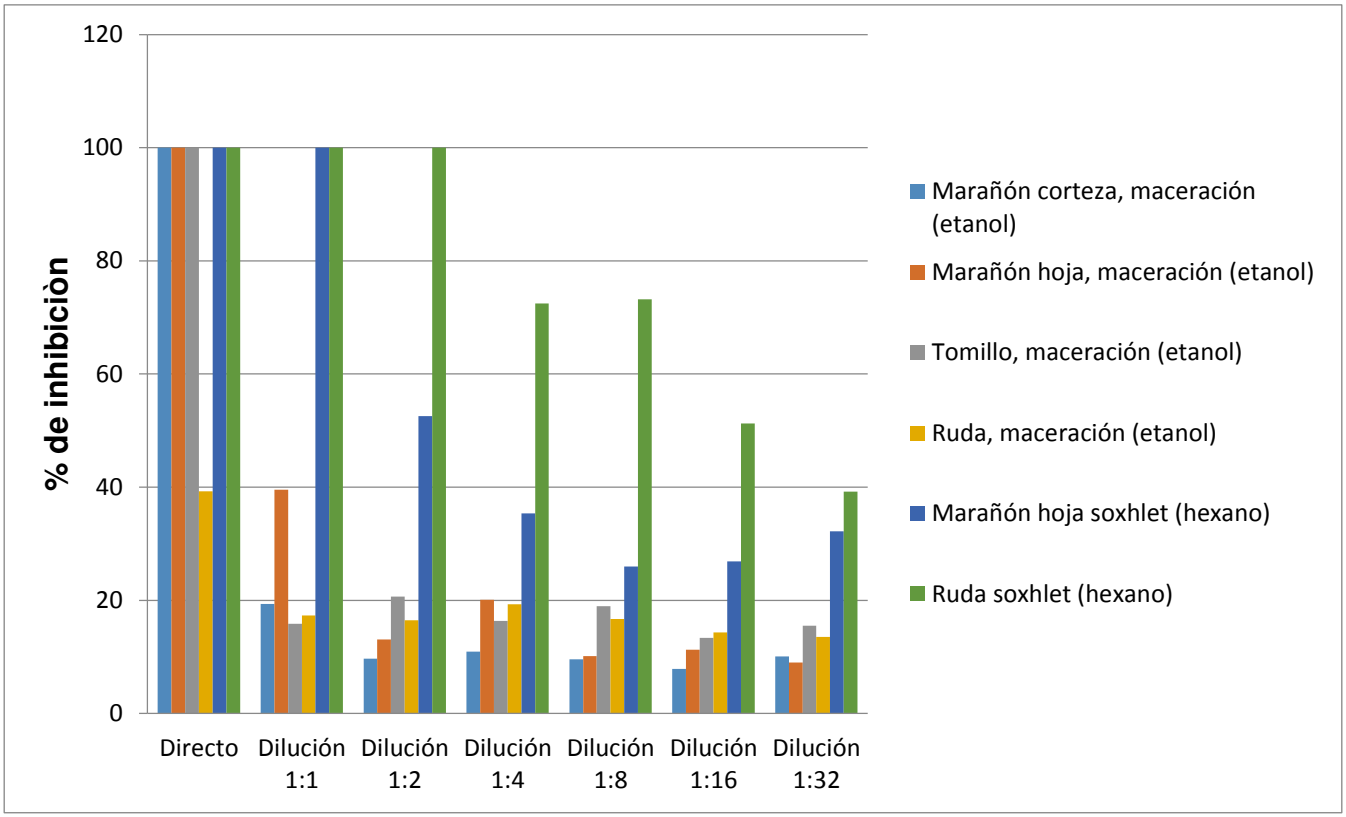
| | | | | Dilución del extracto | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Control (+) | Control (-) | Directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| Marañón corteza (etanol) | 11.4 | - | - | 6.9 | 9.9 | 9.1 | 10.2 | 10.1 | 10.4 |
| Marañón hoja (etanol) | 11.4 | - | - | 9.2 | 10.3 | 10.2 | 10.3 | 10.5 | 10.3 |
| Tomillo (etanol) | 12.6 | - | - | 10.6 | 9.9 | 10.5 | 10.2 | 10.9 | 10.6 |
| Ruda (etanol) | 11.9 | - | 7.2 | 9.8 | 9.9 | 9.6 | 9.9 | 10.2 | 10.3 |
| Marañón hoja soxhlet (hexano) | 12.0 | - | - | - | 5.7 | 7.7 | 8.8 | 8.7 | 8.1 |
| Ruda soxhlet (hexano) | 11.8 | - | - | - | - | 3.3 | 3.2 | 5.8 | 7.2 |

### 8.1.1.1 Efecto de inhibición (%)

Conforme a los resultados obtenidos en la gráfica de % de inhibición (gráfica 1) muestra que el extracto de ruda soxhlet presenta el mayor porcentaje de inhibición, seguido de marañón hoja obtenida mediante soxhlet y como el de menor % de inhibición al extracto de marañón corteza obtenido por maceración con etanol.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición presentado por los diferentes tratamientos

| | | Dilución del extracto | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| Marañón corteza, maceración (etanol) | 100.00 | 19.36 | 9.68 | 10.9 | 9.54 | 7.86 | 10.06 |
| Marañón hoja, maceración (etanol) | 100.00 | 39.55 | 13.07 | 20.06 | 10.15 | 11.24 | 8.98 |
| Tomillo, maceración (etanol) | 100.00 | 15.86 | 20.63 | 16.36 | 18.95 | 13.37 | 15.51 |
| Ruda, maceración (etanol) | 39.24 | 17.29 | 16.49 | 19.3 | 16.68 | 14.31 | 13.5 |
| Marañón hoja soxhlet (hexano) | 100.00 | 100.00 | 52.57 | 35.38 | 25.99 | 26.9 | 32.17 |
| Ruda soxhlet (hexano) | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 72.46 | 73.20 | 51.25 | 39.22 |




Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante los diferentes extractos

### 8.1.2 Segunda prueba *in vitro*

Se obtuvieron extractos de marañón (hoja y corteza), ruda, tomillo mediante el método de maceración, utilizando como solvente metanol (Ver tabla 7).

Tabla 7. Concentración obtenida de los extractos de las diferentes plantas en metanol

| Extracción por maceración con metanol | | | |
|---|---|---|---|
| Planta | Peso (g) | Cantidad del solvente ( mL) | Concentración (g/ mL) |
| Marañón hoja | 76.000 | 50 | 1.52 |
| Marañón corteza | 33.852 | 45 | 0.75 |
| Ruda | 115.627 | 75 | 1.54 |
| Tomillo | 16.786 | 45 | 0.37 |

El resultado obtenido de la prueba de inhibición en placa de *Trichoderma* con los extractos metanólicos se presenta en la figura 8.

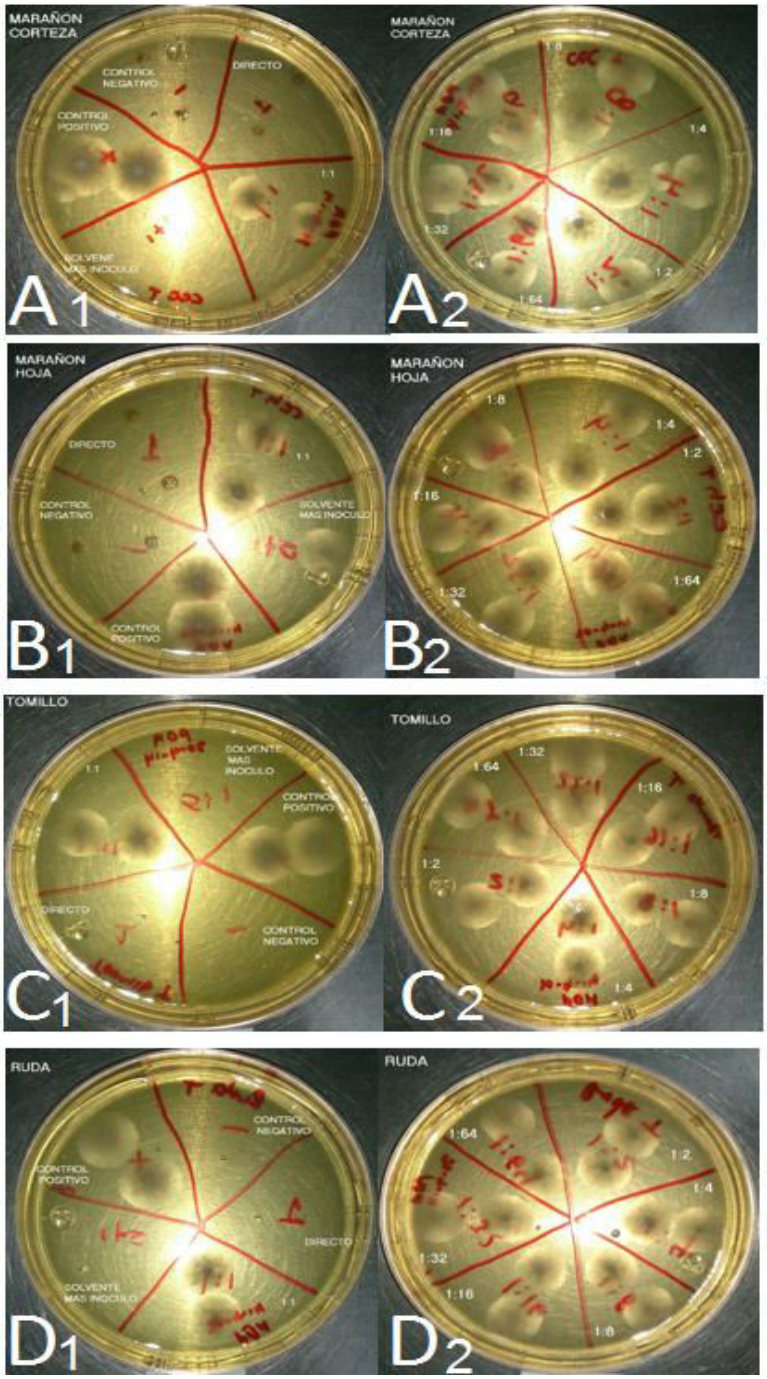



Figura 8. Crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con diferentes extractos vegetales en 48 horas.

En la imagen A1 y A2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón corteza obtenido mediante maceración con metanol. En la imagen B1 y B2 se muestra el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* frente al extracto de marañón hoja obtenido mediante maceración con metanol. Las imágenes C1 y C2 muestran el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* con extracto de tomillo obtenido mediante

maceración con metanol. En la imagen D1 y D2 se tiene el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de ruda obtenido mediante maceración con metanol. En las imágenes A1, B1, C1, D1, se aprecian los controles positivos, negativos y solvente, la confrontación directa (extracto sin diluir) y las dilución 1:1 y 1:2, en las imágenes A2, B2, C2, D2, se muestran las confrontaciones de *Trichoderma aggresivum* y diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. La descripción de la confrontación se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.** Crecimiento micelial (mm) de *Trichoderma aggresivum* en 48 horas

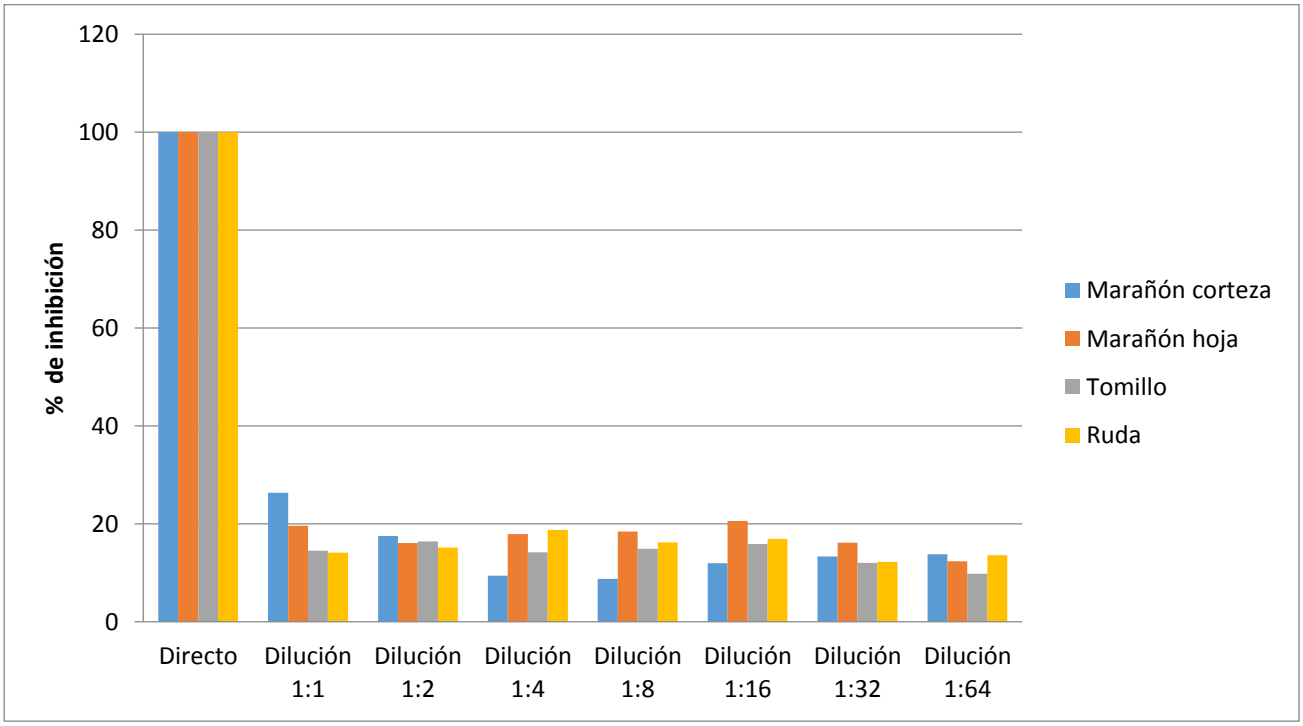
| | | | | Dilución del extracto | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Control (+) | Control (-) | directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| Marañón corteza | 16.6 | - | - | 12.2 | 13.6 | 15.0 | 15.1 | 14.6 | 14.3 | 14.3 |
| Marañón hoja | 17.0 | - | - | 13.6 | 14.2 | 13.9 | 13.8 | 13.5 | 14.2 | 14.9 |
| Tomillo | 16.7 | - | - | 14.2 | 13.9 | 14.3 | 14.2 | 14.0 | 14.7 | 15.1 |
| Ruda | 16.8 | - | - | 14.4 | 14.2 | 13.6 | 14.1 | 13.9 | 14.7 | 14.5 |

### 8.1.2.1 Efecto de inhibición (%)

El gráfico de porcentaje de inhibición (gráfica 2) nos muestra que los extractos al ser aplicados de forma directa presentan un porcentaje de inhibición del 100%, mientras que las diluciones presentaron un porcentaje de inhibición por debajo del 20%, a excepción de la dilución 1:1 de marañón corteza que presentó un porcentaje de inhibición de 26.43%

Tabla 9. Porcentaje de inhibición presentado por los diferentes tratamientos

| | | Dilución del extracto | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| Marañón corteza | 100 | 26.34 | 17.49 | 9.36 | 8.73 | 11.93 | 13.30 | 13.80 |
| Marañón hoja | 100 | 19.57 | 16.06 | 17.88 | 18.40 | 20.55 | 16.13 | 12.35 |
| Tomillo | 100 | 14.52 | 16.41 | 14.19 | 14.90 | 15.89 | 11.98 | 9.78 |
| Ruda | 100 | 14.07 | 15.15 | 18.73 | 16.22 | 16.88 | 12.21 | 13.55 |




Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante los diferentes extractos

### 8.1.3 Tercera prueba *in vitro*

Se obtuvieron extractos de marañón (hojas, corteza y semilla), mediante el método de maceración, utilizando como solvente metanol (Ver tabla 10). El resultado obtenido de la prueba de inhibición en placa de *Trichoderma* con los extractos metanólicos en 24 horas se presenta en la figura 9. El resultado obtenido de la prueba de inhibición en placa de *Trichoderma* con los extractos metanólicos en 48 horas se presenta en la figura 10.

Tabla 10. Concentración obtenida de los extractos obtenidos de las diferentes plantas en metanol

| Extracción por maceración con metanol | | | |
|---|---|---|---|
| Planta | Peso (g) | Cantidad del solvente ( mL) | Concentración (g/ mL) |
| Marañón hoja | 175.80 | 300 | 0.59 |
| Marañón corteza | 146.00 | 300 | 0.49 |
| Marañón semilla | 154.00 | 200 | 0.77 |

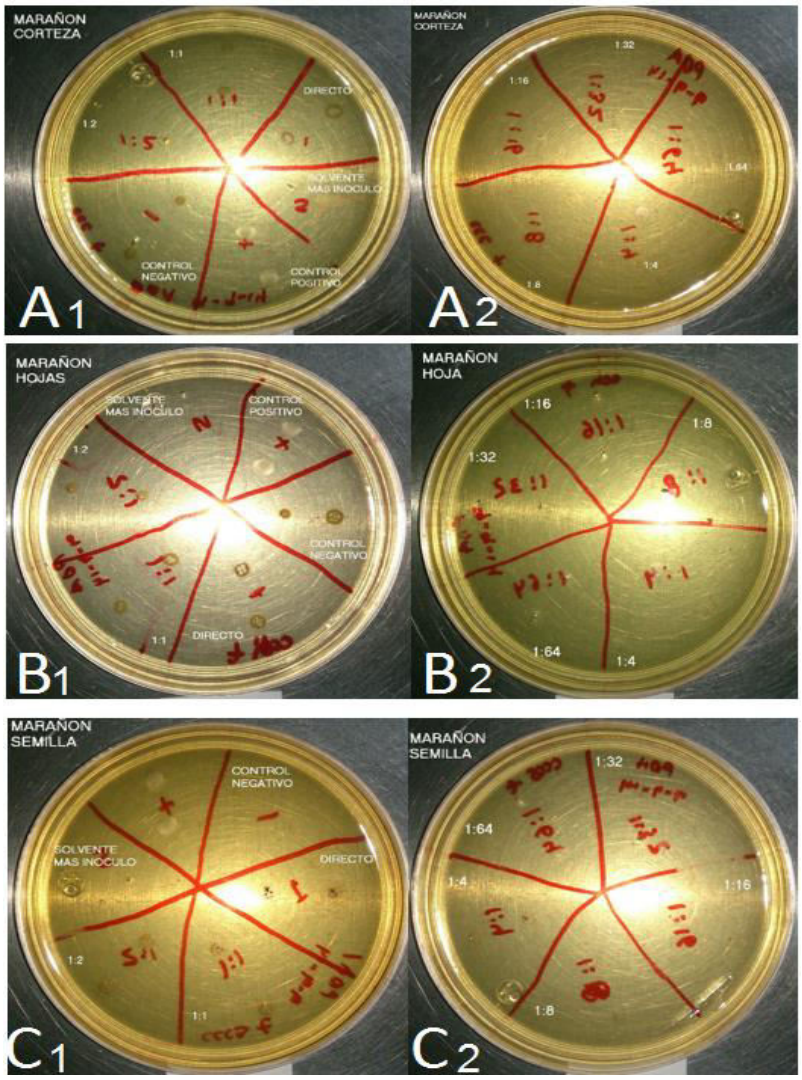



Figura 9. Crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con diferentes extractos vegetales en 24 horas.

En la imagen A1 y A2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón corteza obtenido mediante maceración con metanol. Las imágenes B1 y B2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón hoja obtenido mediante maceración con metanol. En la imagen C1 y C2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón semilla obtenido mediante maceración con metanol. En las imágenes A1, B1, C1, se aprecian los controles positivos, negativos y solvente, la confrontación directa (extracto sin diluir), la dilución 1:1 y 1:2, en las imágenes A2, B2, C2, se muestran las confrontaciones de *Trichoderma aggresivum* y diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. La descripción de la confrontación se muestra en la tabla 11.

Tabla no.11. Crecimiento micelial (mm) de *Trichoderma aggresivum* en 24 horas

| | | | | Dilución del extracto | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Control (+) | Control (-) | directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| Marañón corteza | 4.6 | - | - | - | - | 1.5 | - | - | - | - |
| Marañón hoja | 4.7 | - | - | - | - | 1.7 | - | - | - | - |
| Marañón semilla | 4.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

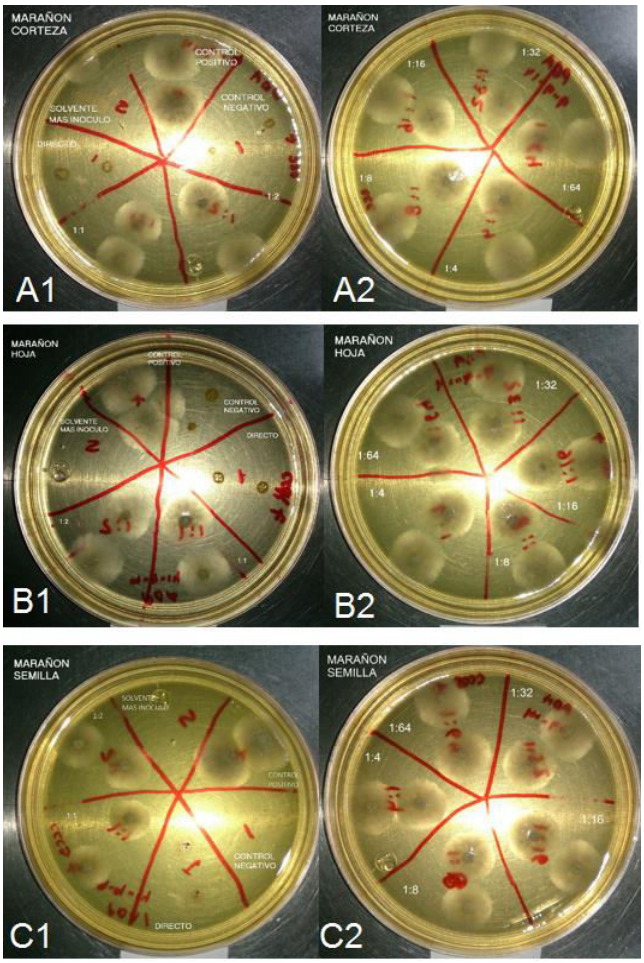


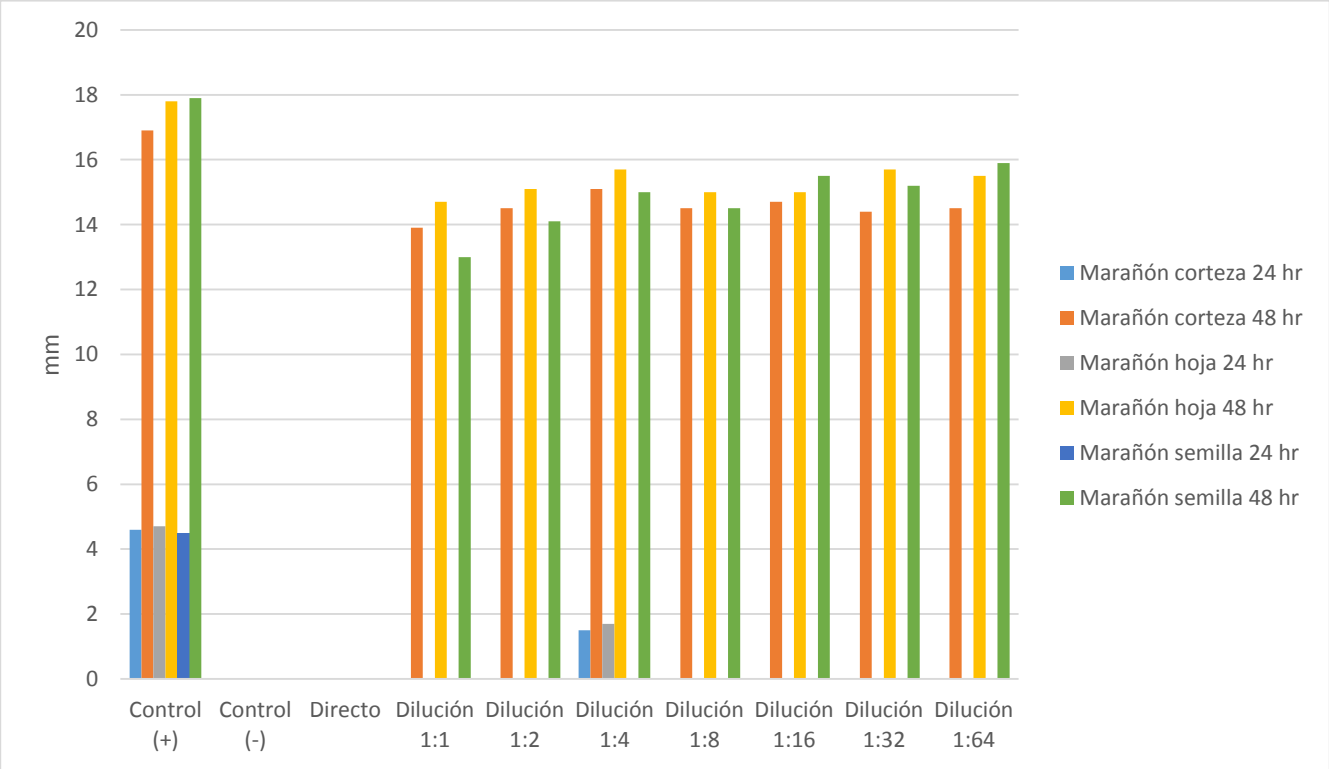

Figura 10. Crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con diferentes extractos vegetales en 48 horas.

En la imagen A1 y A2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón corteza obtenido mediante maceración con metanol. En la imagen B1 y B2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón hoja obtenido mediante maceración con metanol. En la imagen C1 y C2 se observa el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extracto de marañón semilla obtenido mediante maceración con metanol. En las imágenes A1, B1, C1, se aprecian los controles positivos, negativos y solvente, la confrontación directa (extracto sin diluir), la dilución 1:1 y 1:2, en las imágenes A2, B2, C2, se muestran las confrontaciones de *Trichoderma aggresivum* y diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. La descripción de la confrontación se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Crecimiento micelial (mm) de *Trichoderma aggresivum* en 48 horas

| | | | | Dilución del extracto | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Control (+) | Control (-) | directo | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| Marañón corteza | 16.9 | - | - | 13.9 | 14.5 | 15.1 | 14.5 | 14.7 | 14.4 | 14.5 |
| Marañón hoja | 17.8 | - | - | 14.7 | 15.1 | 15.7 | 15.0 | 15.0 | 15.7 | 15.5 |
| Marañón semilla | 17.9 | - | - | 13.0 | 14.1 | 15.0 | 14.5 | 15.5 | 15.2 | 15.9 |

Gráfica 3. Comparativa del crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con extractos vegetales en 24 y 48 horas



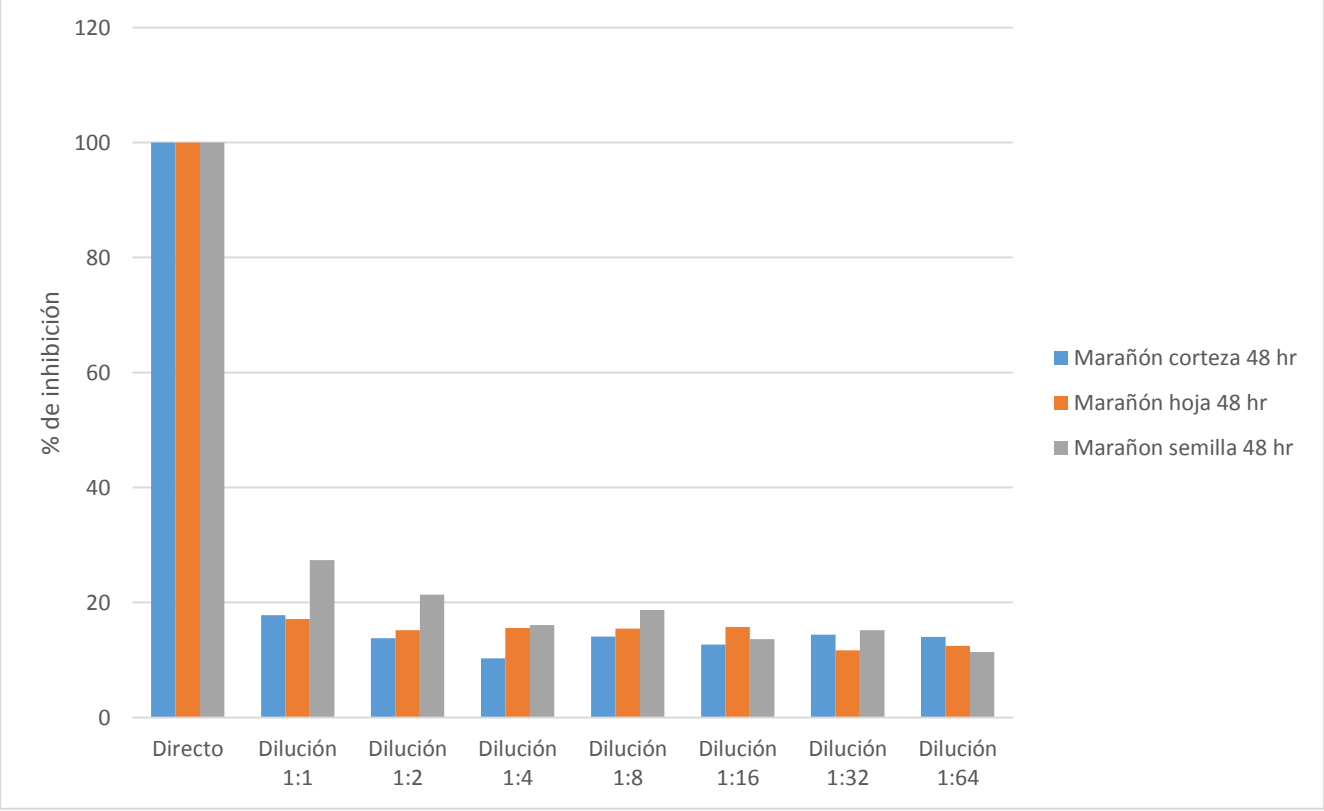

En la gráfica se puede observar que en el tratamiento directo no hay crecimiento de *Trichoderma aggresivum,* en la lectura de las 24 horas el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en contacto con las diluciones es casi nulo, al no ser por la dilución 1:4 que presentó crecimiento para los tratamientos de marañón corteza y marañón hoja.

### 8.1.3.1 Efecto de inhibición (%)

El la gráfica de porcentaje de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante los diferentes extractos en 48 horas (gráfica 4), muestra en el tratamiento directo, presento una inhibición del 100 %, mientras que las diluciones están por debajo del 30%.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición presentado a las 48 horas

| | | Dilución del extracto | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extracto | Directo | Dilución 1:1 | Dilución 1:2 | Dilución 1:4 | Dilución 1:8 | Dilución 1:16 | Dilución 1:32 | Dilución 1:64 |
| Marañón corteza | 100 | 17.77 | 13.80 | 10.27 | 14.08 | 12.68 | 14.42 | 13.99 |
| Marañón hoja | 100 | 17.12 | 15.19 | 15.54 | 15.46 | 15.72 | 11.69 | 12.44 |
| Marañón semilla | 100 | 27.39 | 21.34 | 16.08 | 18.67 | 13.63 | 15.2 | 11.39 |




Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante los diferentes extractos en 48 horas.

## 8.2 Resultados de la evaluación de la inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales en cultivos de *Pleurotus ostreatus*

### 8.2.1 Primera prueba

Se cultivaron 11 bolsas de *Pleurotus ostreatus* (CP50) con diferentes tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 14. Utilizando como sustrato paja, el peso de las bolsas es de aproximadamente 1.5kg, el detalle de la cosecha se muestra en la tabla 15.

Tabla 14. Bolsas cultivadas

| N° bolsas | Tratamiento |
|---|---|
| 4 | Yeso y cal |
| 2 | Ruda + yeso y cal |
| 2 | Marañón corteza + yeso y cal |
| 2 | Marañón hoja + yeso y cal |
| 1 | Tomillo + yeso y cal |

Tabla15. Pesos y porcentaje de humedad de la cosecha

| Tratamiento | peso húmedo (g) | peso seco (g) | (%) humedad |
|---|---|---|---|
| Yeso y cal | 99.608 | 36.395 | 47.597 |
| Ruda | 34.098 | 12.432 | 63.530 |
| Marañón corteza | 180.544 | 56.231 | 68.875 |
| Marañón hoja | 85.640 | 37.446 | 52.175 |
| Tomillo | 90.688 | 16.634 | 81.650 |

Figura 11. Primordios de *Pleurotus ostreatus*

En la figura 11. Se pueden apreciar la aparición de los primordios en la bolsa con el tratamiento yeso y cal de los cultivos de *Pleurotus ostreatus*, el tiempo de aparición del primordio fue de 26 días.

Figura 12. Bolsas contaminadas

De las 11 bolsas cultivadas, se contaminaron 2 que fueron los tratamientos de yeso y cal 1 y ruda 2, por lo que los tratamientos presentan un bajo índice de contaminación, las dos bolsas contaminadas me indica que no es del todo efectivo la alternativa, por lo que necesita montar más experimentos, agregando más extractos.

Figura 13. Fructificación de *Pleurotus ostreatus*

### 8.2.2 Segunda prueba

Se cultivaron 23 bolsas de *Pleurotus ostreatus* (CP50) con diferentes tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 16. Utilizando como sustrato paja, el peso de las bolsas es de aproximadamente 1.5 kg, el detalle de la cosecha se muestra en la tabla 17

Tabla 16. Bolsas cultivadas

| N° | Tratamiento |
|---|---|
| 4 | Marañón corteza |
| 3 | Marañón hoja |
| 3 | Marañón semilla |
| 3 | Ruda |
| 3 | Tomillo |
| 3 | Yeso y cal |
| 2 | Fugol |
| 2 | Sin tratamiento |

Tabla 17. Pesos y porcentaje de humedad de la cosecha

| Tratamiento | Peso húmedo (g) | Peso seco (g) | humedad (%) |
|---|---|---|---|
| Marañón corteza | 78.642 | 20.549 | 75.005 |
| Marañón hoja | 18.868 | 6.452 | 62.695 |
| Marañón semilla | 44.532 | 12.071 | 70.566 |
| Ruda | 36.157 | 11.382 | 64.371 |
| Tomillo | 28.423 | 7.778 | 66.938 |
| Yeso y cal | 57.425 | 10.176 | 70.310 |
| Fugol | 9.520 | 2.911 | 69.177 |
| Sin tratamiento | 53.712 | 13.248 | 77.027 |

Figura 14. Bolsas cultivadas de *Pleurotus ostreatus*

Figura 15. Bolsas cultivadas de *Pleurotus ostreatus* con crecimiento micelial

En las figuras 14 se muestran bolsas recién cultivadas de *Pleurotus ostreatus*, mientras que la figura 15. Se muestran las mismas bolsas cultivadas pero con un notable crecimiento micelial de color blanco de *Pleurotus ostreatus.*

Figura 16. Fructificación de *Pleurotus ostreatus*

### 8.2.3 Tercera prueba

Esta prueba se realizó en un cuarto ventilado y con mayor exposición a la luz solar.

Se cultivaron 10 bolsas de *Pleurotus ostreatus* (CP50) con diferentes tratamientos, los cuales se muestran en la tabla 18. Utilizando como sustrato paja, el peso de las bolsas es de aproximadamente 1.5 kg, el detalle de la cosecha se muestra en la tabla 19.

Tabla18. Bolsas cultivadas

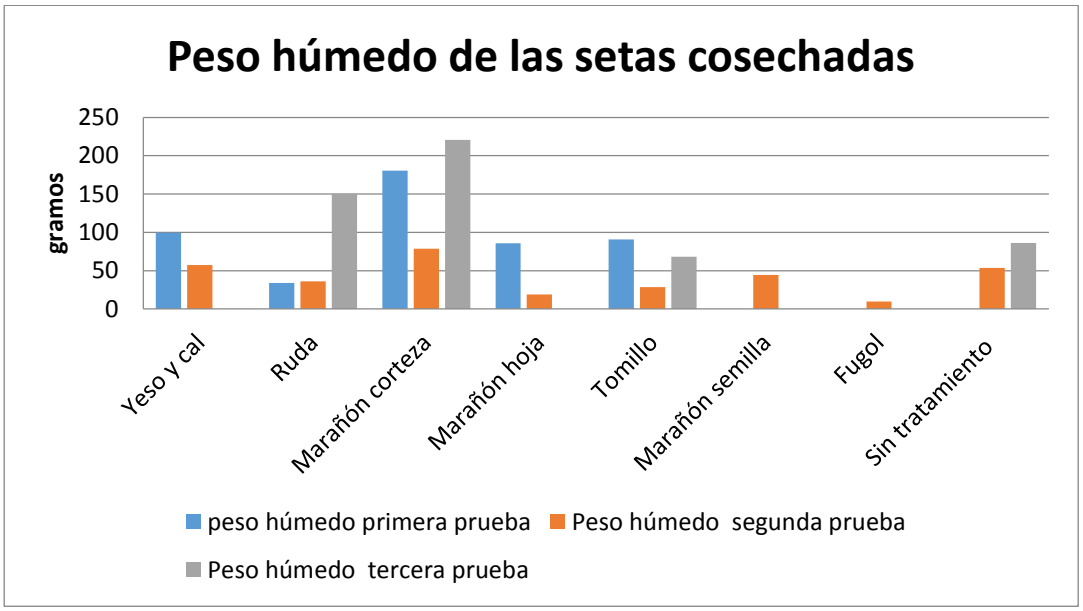
| N° bolsas | Tratamiento |
|---|---|
| 3 | Marañón corteza |
| 3 | Ruda |
| 3 | Tomillo |
| 1 | Sin tratamiento |

Tabla 19. Pesos y porcentaje de humedad de la cosecha

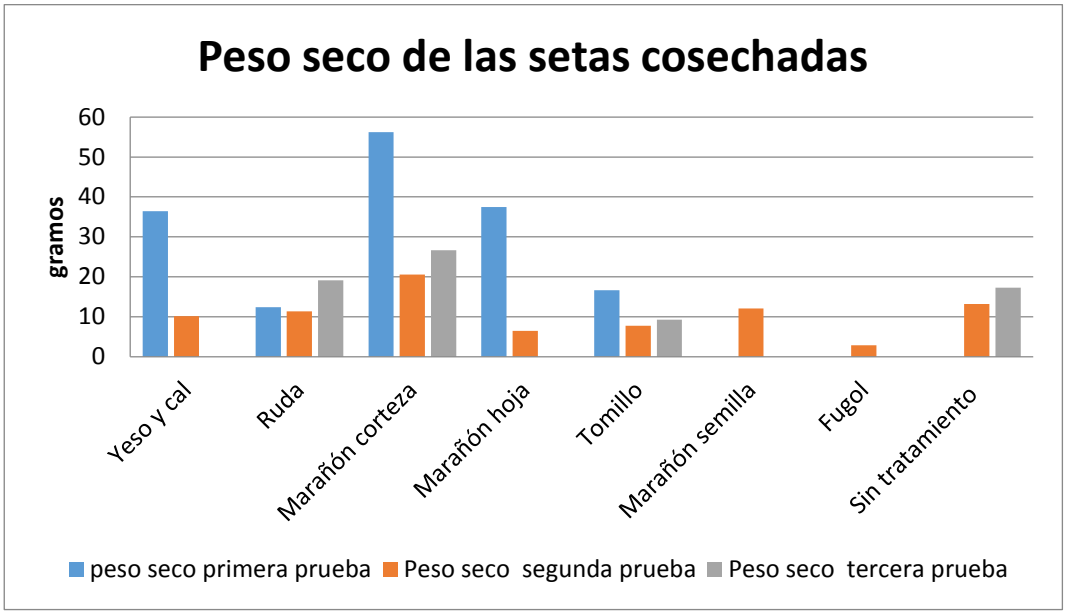
| Tratamiento | Peso húmedo (g) | Peso seco (g) | humedad (%) |
|---|---|---|---|
| Marañón corteza | 220.559 | 26.694 | 86.600 |
| Ruda | 150.329 | 19.127 | 86.873 |
| Tomillo | 68.169 | 9.316 | 85.370 |
| Sin tratamiento | 86.143 | 17.263 | 79.961 |

Figura 17. Fructificación de *Pleurotus ostreatus*

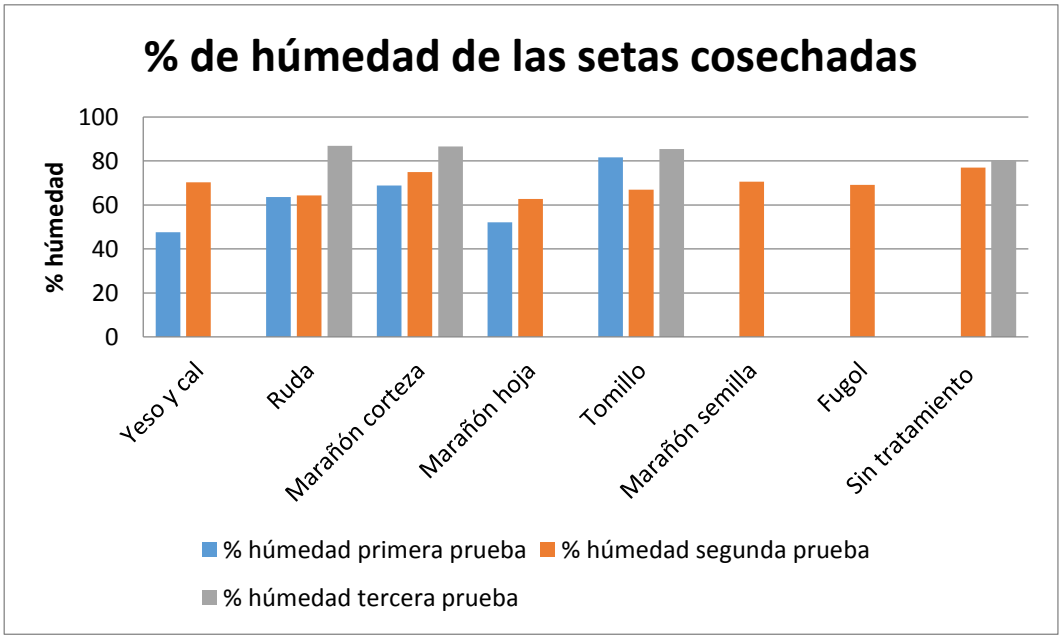
Figura 18. Bolsas contaminadas.




Gráfica 5. Peso húmedo de las setas cosechadas




Gráfica 6. Peso seco de las setas cosechadas




Gráfica 7. Porcentaje de humedad de las setas cosechadas

En las gráficas 5, 6 y 7 se comparan las cosechas presentadas por las tres pruebas, se aprecia que en la última prueba con respecto a peso fresco y % de humedad, es mayor está a las dos anteriores, esto se debe principalmente a las condiciones de incubación de esta repetición, mientras que la mayor producción en peso seco se dio en la prueba número 1, esto se puede apreciar en la gráfica 6.Lo que indica que si la cosecha tuviera un mayor porcentaje de humedad, la producción en peso húmedo se viera beneficiada presentando un mayor gramaje.

### 8.2.4 Eficiencia biológica (EB)

La eficiencia biológica de la evaluación de la inhibición de *Trichoderma aggresivum* mediante extractos vegetales en cultivos de *Pleurotus ostreatus* se muestran a continuación en las tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. Eficiencia biológica de la primera prueba *in vivo*

| Tratamiento | peso húmedo(g) | paja seca (g) | EB% |
|---|---|---|---|
| Yeso y cal | 99.608 | 712.200 | 13.986 |
| Ruda | 34.098 | | 4.788 |
| Marañón corteza | 180.544 | | 25.350 |
| Marañón hoja | 85.640 | | 12.025 |
| Tomillo | 90.688 | | 12.733 |

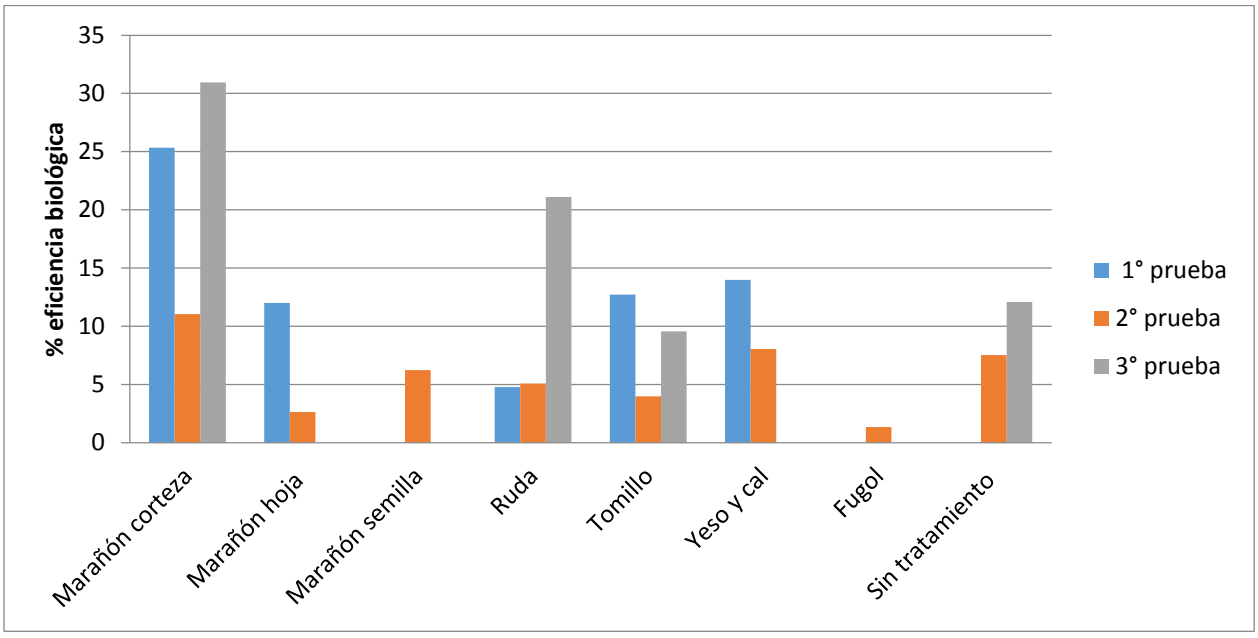
Tabla 21. Eficiencia biológica de la segunda prueba *in vivo*

| Tratamiento | Peso húmedo (g) | Paja seca (g) | EB% |
|---|---|---|---|
| Marañón corteza | 78.642 | 712.200 | 11.042 |
| Marañón hoja | 18.868 | | 2.649 |
| Marañón semilla | 44.532 | | 6.252 |
| Ruda | 36.157 | | 5.076 |
| Tomillo | 28.423 | | 3.990 |
| Yeso y cal | 57.425 | | 8.063 |
| Fugol | 9.52 | | 1.336 |
| Sin tratamiento | 53.712 | | 7.541 |

Tabla 22. Eficiencia biológica de la tercera prueba *in vivo*

| Tratamiento | Peso húmedo (g) | Peso seco (g) | EB% |
|---|---|---|---|
| Marañón corteza | 220.559 | 712.200 | 30.968 |
| Ruda | 150.329 | | 21.107 |
| Tomillo | 68.169 | | 9.571 |
| Sin tratamiento | 86.143 | | 12.095 |

Gráfica 8.Comparativa de la eficiencia biológica con los tratamientos marañón, ruda y tomillo de las tres pruebas



## 8.3 Resultado de análisis por cromatografía de gases acoplada a masas de *Pleurotus* cultivadas con diferentes tratamientos

A continuación se muestran los compuestos encontrados en los extractos de los hongos cosechados mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a masas. Estos compuestos se describen en las siguientes tablas. El compuesto mayoritario que presentaron todos los extractos de los hongos cultivados fue el D-limoneno.

Tabla 23. Compuestos del hongo cultivado con el tratamiento cal y yeso.

| Hongo yeso y cal | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| 4-Metil pentanoato | 035852-47-2 |
| 2-metil-1-penten-3 ol | 002088-07-5 |
| 1,2-butanodiol | 000584-02-1 |
| 5-metoxi-2-metil-2-pentanol | 055724-04-4 |
| 2,5-Dimetil-4-hidroxi-3-hexanona | 000815-77-0 |
| 3-Hexen-2-ona | 000763-93-9 |
| D-Limoneno | 005989-27-5 |
| 4-Benzil-1,2,-dihidro-1-oxophthalazina | 032003-14-8 |

Tabla 24. Compuestos del hongo cultivado con el tratamiento de marañón corteza

| Hongo marañón corteza | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| dihidro-2-metil- 3(2H)-Furanona | 003188-00-9 |
| 2-metil-1-penten-3 ol | 002088-07-5 |
| 2,3-dimetil- 3-Buten-2-ol | 010473-13-9 |
| 4-metil-3-Heptanol | 014979-39-6 |
| ácido 2-etil-2-metil-butanoico | 019889-37-3 |
| 3-Hexen-2-ona | 000763-93-9 |
| 4,4-dimetil-2-Pentano | 026232-98-4 |
| D-Limoneno | 005989-27-5 |

Tabla 25. Compuestos del hongo cultivado con el tratamiento de fugol

| Hongo fugol | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| 4-metilpentilo pentanoato | 035852-47-2 |
| 2-metil-1-Pentan-3-ol | 002088-07-5 |
| 4-metil- 3-Heptanol | 014979-39-6 |
| 2- (2-hidroxipropoxi) -1-propanol | 000106-62-7 |
| 3-Heptanol | 000589-82-2 |
| Oxalato de isobutilociclohexilo | 1000309-30-4 |
| 4- (hexiloxi) -1-butanol | 004541-13-3 |
| 3-Hexen-2-ona | 000763-93-9 |
| 4,4-dimetil- 2-Pentano | 026232-98-4 |
| D-Limoneno | 005989-27-5 |

Tabla 26. Compuestos del hongo cultivado con el tratamiento de ruda

| Hongo ruda | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| D-Limoneno | 005989-27-5 |
| 2,5-dimetil- 1,5-Heptadieno-3,4-diol | 022607-16-5 |
| 2-metil-1-Penten-3-ol | 002088-07-5 |
| Z-1-metoxi-2-penteno | 1000279-59-4 |
| 3-Hexen-2-ona | 000763-93-9 |
| 2-(2-hidroxipropoxi)- 1-Propanol | 000106-62-7 |
| 2,2-dimetil-Pentanoico, éster etílico | 044970-05-0 |
| 2-cloro-1,1,3-trimetil-ciclopropano | 098485-99-5 |
| 2,5-Dimetil-4-hidroxi-3-hexanona | 000815-77-0 |
| Ciclohexilohexilo oxalato | 1000309-30-8 |
| 4,4-dimetil-2-Pentano | 026232-98-4 |

Tabla 27. Compuestos del hongo cultivado con el tratamiento de marañón corteza

| Hongo tomillo | |
|---|---|
| COMPUESTO | CAS# |
| 2-metil-1-Penten-3-ol | 002088-07-5 |
| 3-Hexen-2-ona | 000763-93-9 |
| D-Limoneno | 005989-27-5 |
| Metil 2-isotiocianatoacetato | 021055-37-8 |
| 3-etil-2,2-dimetil- Oxirano | 001192-22-9 |
| 3-Metil-6-etil--2,4-dioxadecano | 1000334-83-2 |
| 4-metil-3-Hexanol | 000615-29-2 |
| 1-Ciclohexil-3-nitropentano-1-ol | 103077-91-4 |
| 2,4-dimethyl- 2-Penteno | 000625-65-0 |

## 8.4 Resultado de análisis por cromatografía de gases acoplada a masas de los extractos vegetales

En las siguientes tablas se describen los compuestos encontrados en los extractos mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

Tabla 28. Compuestos del extracto de marañón hoja obtenido por maceración con metanol

| MARAÑÓN HOJA METANOL | |
|---|---|
| COMPUESTO | CAS# |
| 3-metil-2-Ciclohexen-1-one | 001193-18-6 |
| 1-metil-2- (fenoxi) benceno | 003991-61-5 |
| 4-[(4-Metoxibenciliden) amino] benzonitrilo | 013036-19-6 |
| trans,trans-Dibencilideneacetona | 035225-79-7 |
| 1H, 3H-nafto [1,8-cd] pirano | 000203-84-9 |

Tabla 29. Compuestos del extracto de marañón hoja obtenido con acetona

| MARAÑON HOJA ACETONA | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| Fenol | 000108-95-2 |
| 2-Oxabiciclo [3,2,0] hepta-3,6-dieno | 013920-54-2 |
| Resorcinol | 000108-46-3 |
| Ácido salicílico | 000069-72-7 |
| 1,2,3-Bencenotriol | 000087-66-1 |
| Ácido Undecanoico | 000112-37-8 |
| Ácido Heptadecanoico | 000506-12-7 |

La tabla número 29 muestra los compuestos de marañón hoja obtenido por maceración con metanol, a éste extracto posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetona, con la finalidad de poder obtener el compuesto característico del marañón, el resorcinol (cardol).

Tabla 30. Compuestos del extracto de marañón corteza obtenido por maceración con metanol

| MARAÑÓN CORTEZA METANOL | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| triciclo [4.2.1.1 (2,5)] deca-3,7-dien-9,10-diacetato | 076853-18-4 |
| 1,4,5,8-Tetrametilnaftaleno | 002717-39-7 |
| 2,3-Dihidro-8-metilfuro(2,3-b)quinolina | 064124-82-9 |
| 2-Imino-5-fenil-1,2-dihidro-3H-1,3,4-benzotriazepina | 143869-34-5 |
| trans,trans-Dibencilideneacetona | 035225-79-7 |
| 1H,3H-Nafto[1,8-cd]pirano | 000203-84-9 |

Tabla 31. Compuestos del extracto de ruda obtenido por maceración con metanol

| RUDA METANOL | |
|---|---|
| COMPUESTO | # CAS |
| 2-Nonanona | 000821-55-6 |
| 2-Undecanona | 000112-12-9 |
| 4-fenil- (E)- 3-Buten-2-ona | 001896-62-4 |
| 1- (3-aminopropil) azacyclotridecan-2-ona | 064414-61-5 |
| 4 - [(4-Metoxibenciliden) amino] benzonitrilo | 013036-19-6 |
| 14-isopropil-13-methoxypodocarpa-8,11,13-trien-3-ona | 018326-16-4 |

Tabla 32. Compuestos del extracto de tomillo obtenido por maceración con metanol

| TOMILLO METANOL | |
|---|---|
| COMPUESTO | CAS# |
| 2-metil-5-(1-metiletil)fenol | 000499-75-2 |
| 2-[[S-Bencil]tiometil]imidazol | 1000211-92-7 |
| 5-Metil-2-(N-metil-p-metoxifenilamino)-2-tiazolina | 075220-52-9 |

Tabla 32. Compuestos del extracto de tomillo obtenido por maceración con etanol

| TOMILLO ETANOL | |
|---|---|
| COMPUESTO | CAS# |
| 1-metil-2-(1-metilletil)- benceno | 000527-84-4 |
| timol | 000089-83-8 |
| ácido hexadecanoico, etilester | 000628-97-7 |
| 9,12- ácido octadecadienoico, etilester | 007619-08-1 |
| etil 9,12,15-octadecatrienoato | 1000336-77-4 |

# 9. Discusión.

Los ensayos se repitieron durante tres ocasiones, en el ensayo de inhibición en placa (*in vitro*) los tratamientos de ruda y la hoja de marañón extraídos por soxhlet con hexano presentaron la mayor inhibición de *Trichoderma aggresivum* durante el primer y segundo ensayo, en el último la semilla y hoja de marañón extraídos con metanol presentaron la mayor inhibición en ese orden respectivamente, en general los extractos presentaron mayor inhibición cuando fueron probados en forma directa, así también las diluciones 1:1, 1:2 de ruda y 1:1 de hoja de marañón extraídas con hexano del primer experimento, el resto de las diluciones solo promovieron la disminución en la velocidad del desarrollo micelial, los resultados mencionados de ruda difieren de lo obtenido por Reyes Quintanar C.K (2013), que evaluó la inhibición de *Trichoderma aggresivum* también con ruda extraída con hexano observando solo disminución en la velocidad de crecimiento micelial al primer día, existiendo la diferencia que Reyes Quintanar deshidrató las plantas antes de la extracción, en este ensayo se tomó el material vegetal fresco, evitando la perdida de compuestos volátiles por el proceso de deshidratación, otra diferencia importante a considerar es que Reyes Quintanar extrajo por maceración y en este trabajo se utilizó extracción por soxhlet, siendo una técnica de mayor eficiencia de extracción de compuestos.

La eficiencia de Inhibición en el crecimiento micelial de *Trichoderma aggresivum* en contacto con los extractos de marañón (corteza, hojas y semilla) a las 24 horas es alta, disminuyendo en los extractos de marañón corteza y hoja a la dilución 1:4, esto nos indica que dichos extractos tienen la capacidad de inhibir o disminuir el crecimiento de *Trichoderma aggresivum* en 24 horas. El mayor efecto de inhibición fue de un 100%, esto se presentó en todos los extractos en forma directa, lo que sugiere que la aplicación del extracto concentrado presenta un incremento de los compuestos inhibitorios. La ruda extraída con etanol presentó un efecto de inhibición de 39%.

Mientras que la inhibición en los cultivos de *Pleurotus ostreatus*, se podría decir que se obtuvieron buenos resultados ya que solo hubo contaminación del 18.18% en el primer experimento y 20 % en el tercer experimento, teniendo un promedio total de 9% por los tres experimentos, las bolsas contaminadas fueron con los tratamiento de ruda y cal/yeso del primer experimento, mientras que las bolsas contaminadas del tercer experimento fueron con

el tratamiento tomillo y sin tratamiento. Obteniendo un alto índice de eficiencia de inhibición contra *Trichoderma*.

Por otra parte la cosecha de los hongos no fue la esperada, debido a algunos factores, como la perdida de humedad en los basidiocarpos, obteniendo los siguientes porcentajes.

La humedad en la primera prueba fue de 62.76 %, la segunda 69.51% y la tercera prueba de 84%, resultando una baja humedad, en comparación con lo obtenido por Juárez Luna (2012), que fue de 90.66%, esto generó un retraso en la aparición de los primordios, para la primera prueba fue en un tiempo promedio de 31 días, para la segunda de 27 días y para la tercera 17 días, en comparación con lo obtenido por Juárez Luna (2012) que fue a los 15 días, la primera y segunda prueba están retrasados en su aparición mientras que la tercera prueba aparecieron en un tiempo similar, ahora comparado con los 25.5 días obtenido por Ramírez Carrasco (2010), estos tiempos son similares en ambos trabajos. Fue necesario estimular la aparición de primordios por cambio de temperatura al día número 23 dejándolo todo una noche a la intemperie. Otro factor que pudo retardar la aparición de primordios puede ser que los extractos pudieron causar un retraso en la aparición de estos.

Comparando nuestra eficiencia biológica con lo obtenido por (Ramírez, 2010) y Juárez Luna (2012), que fue de 32.92 % y 27.6 % respectivamente, los únicos tratamientos que alcanzaron los niveles de eficiencia biológica presentada anteriormente fueron marañón corteza (primera prueba) 25.35 % y marañón corteza (tercera prueba) 30.96%. La baja producción se debió principalmente a la perdida de humedad.

Por otra parte el análisis por cromatografía de gases detecto compuestos importantes presentes en las plantas de marañón, tomillo y ruda, como es el caso del cardol, timol y 2-undecanona.

El método de extracción con mejores resultados para recuperar los compuestos importantes de estas plantas fue la extracción con acetona para el marañón, pudiendo recuperar el ácido salicílico y resorcinol (cardol) responsables de la inhibición, en especial la actividad antimicrobiana (Medina R y col. N.d.). En el caso de tomillo la extracción más eficiente fue con etanol, donde se recuperó el timol que es el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana del tomillo (García G. R.M., Palou G. E., 2008) y para la ruda la extracción con metanol, recuperando 2-undecanona, 2-Nonanona (García L. C. y col., 2010).

## 10. Conclusiones

- Las técnicas de extracción por soxhlet y maceración resultaron ser técnicas, fáciles y prácticas de realizar.
- Los compuestos importantes característicos de estas plantas se encontraron presentes en los extractos utilizados en este trabajo
- Todos los extractos concentrados presentaron inhibición *in vitro* sobre *Trichoderma aggresivum*.
- Los extractos obtuvieron un alto porcentaje de inhibición de *Trichoderma aggresivum* en cultivos de *Pleurotus ostreatus*.
- La humedad presente en la incubación fue el principal factor para obtener una adecuada producción
- El extracto que inhibió *Trichoderma aggresivum* sin afectar la producción de *Pleurotus ostreatus* fue el extracto de marañón corteza.

## 11. Perspectivas

- Realizar extracciones con otros solventes
- Utilizar otros métodos de confrontación de los extractos contra *Trichoderma aggresivum*.
- Aumentar las concentraciones de los extractos, para aumentar la inhibición y evaluar que este incremento de concentraciones no afecte el cultivo de *Pleurotus ostreatus*
- Mantener una adecuada humedad en el cultivo ya que es uno de los principales factores para obtener una adecuada producción.

# 12. Bibliografía


1. Ramírez Carrasco, A. P. (2010). recursos genéticos de los “hongos del maguey” (*Pleurotus* sp.) de la región central de México: caracterización y selección de genotipos con potencial para la producción rural (tesis inédita de doctorado) Colegio de postgraduados. Puebla, Puebla

2. Reyes Quintanar C.K, (2013). propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del “moho verde” (*Trichoderma* spp.) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula, Pleurotus*) (Tesis inédita de doctorado) Colegio de postgraduados. Puebla, Puebla
3. Juárez Luna M.A., (2012). Propiedades funcionales del hongo comestible *Pleurotus* y su relevancia en la alimentación regional. (tesis inédita de maestría) Colegio de postgraduados. Puebla, Puebla

4. Ancona M.P, Ancona M.L, Flores N.A, Pech M.V.C. (2005). Estimación de la demanda de *Pleurotus ostreatus* en el estado de Yucatán. Revista mexicana de agronegocios, 2. .[fecha de consulta: 05-06-2014] Recuperado de http://www.redalyc.org/pdf/141/14101712.pdf

5. Romero Jiménez, A. M., Rodríguez García, A. S., Pérez Marchena R. (N.D.). [fecha de consulta: 05-06-2014] recuperado de:http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r45173.PDF

6. Mora V. M., Martínez C. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotu*s) en México.[fecha de consulta: 05-06-2014] Recuperado de: http://www.hongoscomestibleslatinoamerica.com/Mexico/UAEM/P.pdf

7. Gaitán H. R.(n.d.) *“*La importancia nutricional y medicinal de los hongos cultivados*”*.[fecha de consulta: 28-06-2014]recuperado del sitio web del instituto de ecología: http://www.inecol.edu.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/234-la-importancia-nutricional-y-medicinal-de-los-hongos-cultivados

8. Sánchez Vázquez J. E., Martínez Carrera D., Mata G., Leal Lara H. (2007). *El cultivo de setas Pleurotus spp en México.* (1ª. ed.)Tapachula, Chiapas, México: Ecosur

9. Alfaro Ramos A., Nambo Sánchez G.S. (2008) Producción de setas *Pleurotus ostreatus* variedad rosa en tres sustratos. (tesis inédita de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán

10. Chávez García M. P. (2006) Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) (Tesis de licenciatura, Pontifica Universidad Javeriana). [fecha de consulta: 28-06-2014]Recuperado de: http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf

11. Luna Geller L.A., Lara Acevedo G. (n.d.) Alelopatía y extractos vegetales: alternativa para el manejo de insectos, plagas y enfermedades en cultivos, [fecha de consulta: 28-06-2014] recuperado de http://www.horticulturaalternativa.com/docuweb/alelopatia2.pdf

12. Blanco yaisys. (2006). la utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. Cultivos Tropicales, 27(3) 5-16. [fecha de consulta: 28-06-2014] Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215825001

13. Vit, P. *Anacardium occidentale L*. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 6 Merey. revista de la facultad de farmacia. [en línea]. Vol. 45 (1), 2003.[fecha de consulta: 13-10-2014] disponible en :http://www.bidi.uam.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=62:citar-recursos-electronicos-normas-apa&catid=38:como-citar-recursos&Itemid=65#8

14. Tello, V J. (2011) Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio *in vitro*. (Tesis de licenciatura, Universidad

Nacional Mayor de San Marcos). [fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2760/1/tello_vj.pdf)

15. Anacardium occidentale (s.f.) en conabio.gob.mx. [fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/1-anaca1m.pdf

16. David A Akinpelu(2000) Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark. Fitoterapia 72 (2001), 286-287.[fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de: http://ac.els-cdn.com/S0367326X00003105/1-s2.0-S0367326X00003105-main.pdf?_tid=40db4776-53d3-11e4-affe00000aab0f02&acdnat=1413312932_76dbef671a5aa197109f03efd182fe02

17. Estrada Orozco, S P. (2010) Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de romero (*rosmarinus officinalis*) y tomillo (*thymus vulgaris*). (Tesis de licenciatura, escuela superior politécnica de chimborazo) .[fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de : http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf

18. Cañigueral F S, Vanaclocha V B. (2000). Usos terapéuticos del tomillo. Revista de Fitoterapia 2000; I: 5-13. .[fecha de consulta: 13-10-2014] Recuperado de http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF1_1_Thymus.pdf

19. Taxonomía de *Ruta chalepensis* (s.f.) en Honduras silvestre. [fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de: http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=29001

20. Aguilar S, LL. (1995). Evaluación de los Efectos Sedante y Anticonvulsionante de los Extractos Integros de las Especies Vegetales *Ternstroemiapringlei rose* y *Ruta*

*chalepensis* L.(Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana) .[fecha de consulta: 13-10-2014] recuperado de: http://148.206.53.84/tesiuami/UAM0799.pdf

21. Herbario Universidad de Antioquia. (2008). Ruda, Ruda Macho, Arruda - *Ruta chalepensis* L.[fecha de consulta: 13-10-2014]Recuperado de http://aprendeenlinea.udea.edu.co/ova/?q=content/ruda-ruda-macho-arruda-ruta-chalepensis-l

22. Ruda (s.f.) en Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [fecha de consulta: 13-10-2014] Recuperado en : http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ruta_chalepensis&id=7463

23. Mena P. J., Herrera F. S., Mercado S. A., (n.d) Estrategia para la conservación de la diversidad fúngica en cuba. [Consultado:20-09-2014] recuperado de :http://www.cybertruffle.org.uk/cubacons/Editores%20y%20Colaboradores.ht mL

24. Cortés Sánchez A.J, Mosqueda Olivares T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. Revista Química Viva - Número 2, año 12, agosto 2013 [fecha de consulta: 20-09-2014] recuperado de: http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n2/cortes.pdf

25. Viveros Flores y col. (n.d) El uso y manejo integral del hongo (*Pleurotus* spp.) en Calpan, Puebla. [fecha de consulta 03-12-2014] recuperado de: http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/MORELOS/Extenso/CB/EO/CBO-19.pdf

26. Medina R y col. (N.d.) Actividad antimicrobiana del Líquido de la Cáscara de la Nuez del Marañón– *Anacardium occidentale*(LCNM) sobre *Streptococcus mutans* [fecha de consulta: 13-01-2015] recuperado de: http://www.odontologia-online.com/posters/rma/rma01/rma01.pdf

27. García G. R.M., Palou G. E. (2008) mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas selectos de ingeniería en alimentos, 41-51. [fecha de consulta: 13-01-2015] recuperado de:http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2%282%29-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf

28. García L. C. y col, (2010).Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Revista Química Viva - Número 2, año 9, [fecha de consulta: 13-01-2015] recuperado de: http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n2/garcia.ht mL