



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – ALIMENTOS

TESIS PARA OBTENER EL TITULO EN:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *Anagallis arvensis* Y EVALUACIÓN DE LAS
PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS Y DEGRADATIVAS DEL AZUL DE
METILENO.

PRESENTA
p.QFB LILIANA GUTIERREZ GONZALEZ

DIRECTOR
D. C. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

ASESOR
D.C. ULISES ANGEL PEÑA ROSAS

Julio, 2015.

ÍNDICE

No.	Contenido	Página
I.	Dedicatorias	4
II.	Agradecimientos	5
III.	Índice de figuras	6
IV.	Índice de tablas	7
V.	Abreviaturas	8
1.	Resumen	9
2.	Introducción	10
3.	Antecedentes	12
3.1	Generalidades de <i>Anagallis arvensis</i>	14
3.2	Propiedades medicinales de <i>Anagallis arvensis</i>	14
3.3	Composición química de <i>Anagallis arvensis</i>	15
3.3.1	Saponinas	15
3.3.2	Taninos	16
3.4	Estudios fitoquímicos en <i>Anagallis arvensis</i>	16
3.5	Métodos de separación de extractos vegetales y caracterización de sus compuestos activos	17
3.6	Degradación de colorantes por extractos vegetales	18
4.	Justificación	20
5.	Objetivos	21
5.1	Objetivos generales	21
5.2	Objetivos particulares	21
6.	Hipótesis	22
7.	Diagrama general de trabajo	23
8.	Materiales y métodos	24
8.1	Materiales	24
8.1.1	Materiales biológicos	24
8.2	Métodos	24
9	Metodología	25
9.1	Obtención del extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i>	25
9.2	Degradación de azul de metileno con el extracto por agitación continua	26
9.2.1	Prueba 1: Degradación de azul de metileno:	26
9.2.2	Prueba 2: Degradación de azul de metileno	26
9.3	Separación de fracciones por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna	27
9.3.1	Cromatografía en capa fina	27
9.3.2	Cromatografía en columna: separación de los compuestos	27
9.4	Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones en hongos fitopatógenos	28
9.4.1	Preparación del inóculo microbiano	28
9.4.2	Bioensayo de actividad antifúngica	28
9.5.	Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del compuesto de interés.	29
9.6	Espectroscopía de ¹³ C-RMN: Determinación estructural del	

	compuesto de interés	29
9.7	Espectrometría de masas: Determinación estructural del compuesto de interés	29
9.8	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	29
9.9	Índice de actividad antifúngica	30
10	Resultados y discusiones	31
10.1	Rendimiento del extracto	31
10.2	Degradación de azul de metileno con el extracto por agitación continua	31
10.3	Separación de fracciones por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna	33
10.3.1	Cromatografía en capa fina	33
10.3.2	Cromatografía en columna: separación de las fracciones	34
10.3.3	Cromatografía en capa fina: comprobación de la pureza de las fracciones	36
10.3.4	Cromatografía en columna: purificación de los compuestos	36
10.3.5	Cromatografía en capa fina: comprobación de la pureza de los compuestos	37
10.4	Evaluación de la actividad antifúngico de las fracciones en hongos fitopatógenos	38
10.4.1	Preparación del inóculo microbiana	38
10.4.2	Bioensayo de la actividad antifúngica	38
10.5	Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del compuesto de interés	39
10.6	Espectroscopía de ¹³ C-RMN Determinación estructural del compuesto de interés	40
10.7	Espectrometría de masas: Determinación estructural del compuesto de interés	43
10.8	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	45
10.9	Índice de actividad antifúngica	47
11	Conclusiones	49
12	Recomendaciones	50
13	Bibliografía	51
14	Anexos	55

I. Dedicatorias

Este trabajo lo dedico a las personas que más amo en mi vida y que gracias a ellas logre una de mis metas, esta tesis se las dedico con todo el corazón a ustedes que son el pilar de mi vida:

A dios, por permitirme vivir, crecer y llegar hasta este momento tan importante en mi vida, por la paciencia y la sabiduría que me brinda, por protegerme y estar a mi lado en todo el camino de mi vida y darme fuerzas para seguir adelante, y sobre todo por darme una familia hermosa.

A mi papá Leobardo, por apoyarme siempre tanto económicamente como moralmente, por darme la formación académica y las herramientas para llegar hasta este momento, enseñándome que todo se puede lograr con esfuerzo y dedicación, por cuidar de mí y estar siempre a mi lado cuando más te he necesitado, por confiar en mí a pesar de tus dudas, te amo con todo el corazón papi.

A mi mamá Pilar por estar en cada momento con migo apoyándome, echándome porras a pesar de mi carácter, ayudándome a estudiar, por esas palabras de aliento que me das cada vez que siento que no puedo, por tus consejos, por llevarme de la mano en cada paso de mi vida acompañándome, cuidándome y ayudando a levantarme cada vez que caigo, por llevarme por el camino de bien y hacer de mí una mujer de principios, también te doy gracias por soportar mi carácter cada vez que estaba estresada, te amo con todo el corazón mami.

A mis hermanos Fer por cuidarme siempre desde que estábamos pequeños y Gus por hacerme reír cuando estaba enojada, gracias a los dos por apoyarme en este camino, por estar con migo los amo con todo mi corazón.

Al amor de mi vida que sé que cuando formemos una vida juntos le entregare todo lo que soy, lo cual incluye mi formación académica.

II. Agradecimientos

A mis directores de tesis, Dr. Ulises y Dra. Sandra por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por brindarme todo el material y conocimientos necesarios, por estar al pendiente de mi trabajo siempre.

A mis sinodales Dra. Laura, M. C. Leticia, M. C. Armando, quienes estudiaron mi tesis, aportando sus puntos de vista para la aprobación de la misma, gracias por el tiempo dedicado para leer mi tesis.

III. Índice de figuras

	Título	Pág.
Figura 1.	Planta de <i>Anagallis arvensis</i> .	14
Figura 2.	Estructuras de las saponinas.	16
Figura 3.	Posibles estructuras de los triterpenos encontrado en <i>Anagallis arvensis</i> (Shashi et al., 1991).	17
Figura 4.	Estructura química del azul de metileno	20
Figura 5.	Prueba 2.Espectro de absorción de AM a diferentes tiempos.	31
Figura 6.	Concentración de azul de metileno a diferentes tiempos después de la degradación.	32
Figura 7.	CCF del extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> .	34
Figura 8.	Fracciones obtenidas en la CC.	35
Figura 9.	Purificación de fracciones por CC.	37
Figura 10.	CCF de las fracciones del extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> totalmente puras.	37
Figura 11.	Evaluación de las fracciones del extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> frente a tres cepas de hongos.	39
Figura 12.	Espectro IR de grupos funcionales presentes en el compuesto.	40
Figura 13.	Espectro de ^{13}C -RMN de la fracción 15.	41
Figura 14.	Estructura encontrada a partir de la resonancia magnética nuclear perteneciente a un esteroles encontrado en la fracción 15 del extracto.	41
Figura 15	Comparación estructura de compuestos.	
Figura 16.	Espectro de masas del esteroles activo del extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> .	43
Figura 17.	Patrón de fragmentación, posibles fragmentaciones del esteroles.	44
Figura 18.	CMI del esteroles para <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Mucor</i> spp, <i>Rhizopus</i> spp.	45
Figura 19.	Comparación de las zonas de inhibición del esteroles presente en el extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> y el control químico Dithane.	48

IV. Índice de tablas

No	Titulo	Pág.
Tabla 1.	Plantas con metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas.	13
Tabla 2.	Plantas que inhiben el crecimiento de <i>Mucor</i> spp, <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Rhizopus</i> spp.	14
Tabla 3.	Diversos usos en la medicina tradicional de <i>Anagallis arvensis</i>	15
Tabla 4.	Métodos de separación de extractos vegetales y caracterización de compuestos activos	18
Tabla 5.	Equipos.	24
Tabla 6.	Métodos.	25
Tabla 7.	Concentraciones de AM en los diferentes tiempos en la degradación por el extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> .	32
Tabla 8.	Solventes utilizados para la cromatografía.	34
Tabla 9.	Fracciones obtenidas en cada solvente a partir de CC.	35
Tabla 10.	Fracciones puras obtenida por medio de CC.	36
Tabla 11.	Concentración de esporas en <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Mucor</i> spp y <i>Rhizopus</i> spp.	38
Tabla 12.	Bioensayo de la actividad antifúngica de las fracciones.	39
Tabla 13.	CMI del esterol presente en el extracto etanólico de <i>Anagallis arvensis</i> y del control químico Dithane.	46
Tabla 14.	Índice de actividad antifúngica.	47

V. Abreviaturas

AM	Azul de metileno
PDA	Agar papa dextrosa
FT-IR	Infrarrojo de transferencia de Fournier
¹³CRMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
EMIE	Espectrometría de masas de Impacto electrónico
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
Uv	Ultravioleta
Ppm	Partes por millón
M	Molar
G	Gramos
μl	Microlitros
Nm	Nanómetros
mL	Mililitros
min	Minutos
h	Horas
°C	Grados Celsius
CMI	Concentración mínima inhibitoria
PM	Peso molecular
IA	Índice de actividad
ZI	Zona de inhibición

1. RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la actividad biológica del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*, planta perteneciente a la flora del estado de Puebla, asociada con efectos antifúngicos, pocos estudios se han realizado para determinar el o los compuestos activos de la actividad biológica. El objetivo del trabajo fue evaluar el extracto etanólico en la degradación de azul de metileno (AM), así como la actividad antifúngica contra diversos fitopatógenos como: *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp además de determinar el compuesto activo. El extracto etanólico de *Anagallis arvensis* se obtuvo mediante el método Soxhlet, la degradación de AM se realizó por el método de agitación continua. La purificación del componente activo del extracto se realizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y columna (CC). La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar en pozos, y se determinó el IA y la CMI, el etanol fue utilizado como control negativo y el Dithane el control positivo.

La fracción con actividad antifúngica obtenida se sometió a diferentes métodos espectroscópicos como RMN, IR y métodos espectrométricos como masas IE para su identificación. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el extracto etanólico no degrada totalmente al azul de metileno, también mostraron tener actividad frente al crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* (CMI: 1.76, IA: 0.54), *Mucor* spp (CMI: 1.76, IA: 0.46) y *Rhizopus* spp (CMI: 2.2, IA: 0.60). Se concluye que el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* puede ser utilizado como un degradante de azul de metileno, aunque no lo degrada al 100%. La fracción responsable de la actividad biológica fue elucidada estructuralmente y el compuesto fue identificado como un esterol. El compuesto encontrado, es responsable de la actividad del extracto, por lo que puede ser una alternativa de control biológico contra los organismos evaluados.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas así como los seres humanos llevan a cabo procesos metabólicos en los cuales producen compuestos que les sirven para su desarrollo, en el caso de las plantas los compuestos que éstas producen son llamados metabolitos, de los cuales se caracterizan dos tipos, los metabolitos primarios que son aquellos esenciales para que la planta lleve a cabo ciertas funciones, como las proteínas, la glucosa, entre otros, y los metabolitos secundarios son aquellos que no son esenciales para el desarrollo de la planta pero que le sirven a esta como mecanismo de defensa como las saponinas, taninos, alcaloides, entre otros (Avalos y Pérez, 2009). En la actualidad los metabolitos secundarios se han estudiado, debido a que estos ejercen una importante actividad frente a diferentes microorganismos, como son los hongos fitopatógenos, que afectan grandes cantidades de cultivos provocando la pérdida de las cosechas y consecuentemente pérdidas económicas muy grandes.

Hoy en día el estudio de extractos vegetales es un campo abierto de investigación, ya que la mayoría de los extractos estudiados posee características y propiedades benéficas, por lo que se investiga cuáles son los compuestos responsables de esta importante actividad. El conocer los constituyentes químicos de las plantas que exhiben actividad biológica es deseable, no sólo para descubrir nuevos agentes terapéuticos, o justificar la acción terapéutica de una planta en particular, sino que esta información permite detectar nuevas fuentes de materiales para la síntesis de sustancias químicas útiles al hombre y a los animales. Estos constituyentes pueden ser usados directamente como fármacos o materia prima para la síntesis de medicamentos y también pueden servir como modelos para la síntesis de sustancias biológicamente activas de importancia económica. El conocimiento sobre los usos de las plantas es considerado actualmente un campo abierto a las nuevas tecnologías y a los enfoques transdisciplinarios, que son necesarios para poder desentrañar los secretos encerrados en las diferentes especies de plantas y por medio de ellas evitar o resolver ciertos problemas como la contaminación de cultivos con hongos, para así evitar la pérdida económica y de productos que se cosechan.

México es un país dedicado a la agricultura, cada año invierte miles de pesos para poder obtener cosechas de buena calidad, sin embargo, estos cultivos muchas veces se ven deteriorados por diferentes plagas de hongos fitopatógenos entre los cuales destacan *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp, y *Mucor* spp.(Juárez y Sosa, 2010). En la actualidad se ha estudiado el uso del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* contra los hongos mencionados anteriormente para prevenir la contaminación de cultivos (Cortez y Perales, 2014). Sin embargo, estos estudios no han sido suficientes para encontrar el compuesto capaz de inhibir a dichos hongos, es posible que dentro del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* se encuentren componentes con otras propiedades importantes tal como la degradación de aquellos colorantes utilizados en la industria.

La industria textil es importante a nivel económico. Esta industria genera grandes cantidades de aguas residuales, que contaminan el medio ambiente. El uso del agua en la industria en México, representa aproximadamente el 5% de la extracción del agua en el país. Los colorantes son los indicadores más obvios de la contaminación del agua, y la descarga de efluentes con alta concentración de colorantes sintéticos causa gran daño a los cuerpos receptores de agua (Nawar et al., 1989), por lo cual es necesario un tratamiento antes de ser vertidos. Estas aguas contienen compuestos altamente tóxicos para los seres vivos, como los colorantes, que son diseñados para ser resistentes ante la degradación con métodos convencionales o con microorganismos.

En la actualidad se están desarrollando diferentes métodos de tratamiento para la remoción de compuestos recalcitrantes, cuando no pueden ser eliminados por un solo tratamiento físico, químico o biológico; esto mediante el uso de sistemas acoplados: Biológicos, Químico-Biológicos, Químicos, entre otros. En 2011, Gutierrez estudió el uso del extracto de alcachofa como alternativa natural, obteniendo resultados favorables al observar la degradación del colorante. En este trabajo de investigación se evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico en *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp y *Mucor* spp, y se caracterizó el compuesto activo utilizando diferentes métodos analíticos además de evaluar la degradación del azul de metileno (AM) por medio del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.

3. ANTECEDENTES

Desde tiempos antiguos las plantas se han caracterizado por ser un recurso al alcance de los seres humanos, para su alimentación y la cura de enfermedades. Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos para la vida celular y para la planta de manera general. Estos procesos constituyen el metabolismo primario. Además de estos procesos metabólicos primarios, se pueden desarrollar rutas que conducen a la formación de compuestos denominados metabolitos secundarios (Lang, 2003). Se denomina metabolito secundario de las plantas a los compuestos químicos que cumplen con funciones no esenciales en ella, ya que no intervienen en el metabolismo primario, pero les confieren claras ventajas selectivas, interviniendo en las interacciones de esta con su medio ambiente y ecología (Badajos, 2011). A estas sustancias generadas también se les llama “principio activo” y se define como la sustancia responsable de acción y efectos, ya sean terapéuticos o medicinales. Los principios activos en las plantas son en general los metabolitos secundarios, aquellos compuestos que la planta produce por medio de su metabolismo pero que no son fundamentales para el funcionamiento de estas. Los metabolitos secundarios no tienen una funcionalidad específica, ya que son diferentes para todas las plantas y las personas los han utilizado como: venenos, somníferos, perfumes, alucinógenos, analgésicos, antimicrobianos, antimicóticos. Los metabolitos más comunes en las plantas son terpenos, saponinas, alcaloides, fenoles, taninos, entre otros (Tabla 1) (Avalos y Pérez 2009).

Es importante mencionar que muchas de las plantas utilizan a los metabolitos secundarios como mecanismo de defensa, un ejemplo de ellos es *Phaseolus vulgaris* (planta del frijol), que produce un metabolito secundario llamado Faseolina 1 que le sirve como mecanismo de defensa frente a microorganismos patógenos (García y Pérez, 2003). Una estrategia de defensa es el mecanismo de atracción e inhibidor de crecimiento de hongos y bacterias (González, 2011).

Tabla 1. Plantas con metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas.

Especie de planta	Metabolitos secundarios	Actividad
<i>Artemisa annua</i>	Artemisina	Antimalaria
<i>Beta vulgaris</i>	Betalainas	Colorante
<i>Salvia miltiorhizina</i>	Ácido rosmarinico	Antioxidante
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)	Hemigossipol	Antimicótico en plantas
<i>Pisum savitum</i> (chícharo)	Pisantina	Antimicótico, antibacteriano en la planta
<i>Anagallis arvensis</i>	No se conoce	Antimicótico

(Arias et al., 2009; García y Pérez, 2003; Cortez y Perales, 2014)

Se han estudiado miles de plantas que tienen actividad contra hongos, una de ellas es *Plantago major* (Rodríguez et al., 1996) describen a esta planta como un potente inhibidor de hongos. Se han realizado otros estudios para observar la actividad antimicótica de diferentes plantas sobre *Mucor* spp, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp, en la tabla 2 se muestran diferentes plantas estudiadas que han presentado actividad antimicótica frente a los hongos mencionados anteriormente (Cárdenas et al., 2005; Barrera et al., 2009; Cortez y Perales 2014). Sin embargo, aún no hay estudios concluyentes de los compuestos activos responsables de dicha actividad, siendo de gran importancia determinar y realizar estudios más profundos para detectarlos y caracterizarlos, sobre todo porque dichos hongos son los que mayormente afectan a los plantíos de importancia agrícola, tal es el caso de *Anagallis arvensis* que en estudios recientes se observó la actividad del extracto de esta planta y se reportó su actividad antimicótica frente a *Mucor* spp, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp. De este modo, el extracto de *Anagallis arvensis* inhibió el crecimiento de estos, por lo tanto la afectación en plantíos pudiera ser nula o mínima (Cortes y Perales, 2014).

Tabla 2. Plantas que inhiben el crecimiento *Mucor* spp, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp.

Hongo	Planta que la inhibe
<i>Mucor</i> spp	<i>Anagallis arvensis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Casimiroa pringle</i> <i>Decatropis bicolor</i> <i>Heliopsis longipes</i> <i>Chrysactinia mexicana</i> <i>Flourensia cernua</i> <i>Brickellia veronicaefolia</i> <i>Anagallis arvensis</i>
<i>Rhizopus</i> spp	<i>Cestrum nocturnum</i> <i>Anagallis arvensis</i>

(Cárdenas et al., 2005; Barrera et al., 2009; Cortez y Perales 2014)

3.1. Generalidades de *Anagallis arvensis*

Es una planta anual o bianual, glabra, de tallos tendidos con sección cuadrangular, a veces algo alado, de 10-50 cm de largo. Hojas opuestas, a veces ternadas, sésiles, ovadas, íntegras, de 5-15 mm de largo. Flores anaranjadas, solitarias, con pedúnculos más largos que las hojas, de 4-10 mm (Figura 1), cáliz profundamente dividido, sépalos lanceolados. *Anagallis arvensis* es ampliamente distribuida en todas las zonas templadas del mundo; en México se encuentra en todo el Territorio Nacional (Hernández, 1987; Manns y Anderberg, 2005).



Figura 1. Planta de *Anagallis arvensis*

3.2. Propiedades medicinales de *Anagallis arvensis*

Anagallis arvensis se le ha asociado con propiedades medicinales las cuales se mencionan en la Tabla 3. Su uso debe limitarse a preparados farmacéuticos, ya que es una planta tóxica por su contenido en saponinas

hemolíticas que irritan la mucosa intestinal. Uno de los usos que se le daba a la planta era como jabón (Hernández, 1987; Manns y Anderberg 2005; López et al., 2008). Dentro de las investigaciones realizadas acerca de esta planta, existen reportes en los cuales se describe la acción de una saponina triterpeno aislado de *Anagallis arvensis* la cual inhibe la unión del adenovirus de tipo 6 con la célula del huésped evitando el desarrollo de la infección (Amoros et al., 1987).

Tabla 3. Diversos usos en la medicina tradicional de *Anagallis arvensis*

Diversos usos en la medicina tradicional de <i>Anagallis arvensis</i>		
Astringente	Hemorroides	Erupciones
Anti fúngico	Faringitis	Artritis
Estreñimiento	Inflamaciones	Dermatitis

3.3. Composición química de *Anagallis arvensis*

Actualmente no se han establecido cuántos y cuáles son los componentes que se encuentran en el extracto de esta planta, los componentes que se han determinado de acuerdo a lo reportado por Shashi et al en 1991 son:

- ✓ Saponinas triterpenicas
- ✓ Taninos
- ✓ Aceite esencial

3.3.1. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios de las plantas, estructuralmente son compuestos orgánicos formados por una porción carbonada policíclica llamada aglicona de origen terpénico o esteroidal, unida a una o varias unidades de monosacáridos (Anaya, 2003)(Figura 2) (Díaz, 2009; Gennaro, 2003).

Las saponinas tienen propiedades biológicas y fisicoquímicas, dentro de las propiedades biológicas se encuentran la hemólisis de glóbulos rojos, antimicrobianos y anticancerígenos, dentro de las propiedades fisicoquímicas se encuentra la formación de espuma y jabones.

Las saponinas también son una defensa química para las plantas, estas defensas son una compleja y extensa red con diversos niveles de acción, que responden de forma sincrónica ante la presencia de estrés biótico o abiótico, estos compuestos son antifúngicos (Díaz, 2009).

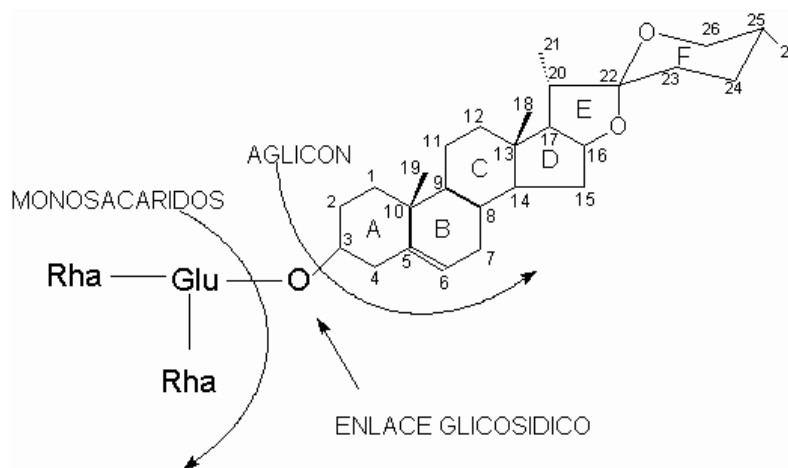


Figura 2. Estructura de las saponinas

3.3.2. Taninos

Son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, poco solubles en éter, de sabor astringente. Los taninos, dada su composición, dan por hidrólisis total una molécula de hidrato de carbono y un número más o menos grande de moléculas de ácido gálico. Los taninos no son uniformes en su composición y están formados por una mezcla de combinaciones muy semejantes entre sí, poseen propiedades antiinflamatorias, antisépticas, antioxidantes, hemostáticas y antidiarreicas. Se clasifican en 2, los taninos hidrolizable y los no hidrolizables o condensados (Deanna, 2002; Rodríguez, 2008).

3.4. Estudios fitoquímicos de *Anagallis arvensis*

Se ha analizado la composición de *A. arvensis*, pocos artículos mencionan las estructuras de los componentes presentes en esta planta, Shashi et al. en 1991, mencionan el descubrimiento de cuatro nuevos terpenoides caracterizando las

estructuras por distintas técnicas espectroscópicas, concluyendo que las estructuras encontradas pertenecen a saponinas con importantes propiedades, sin embargo no se mencionan las propiedades que estas tienen (Figura 3).

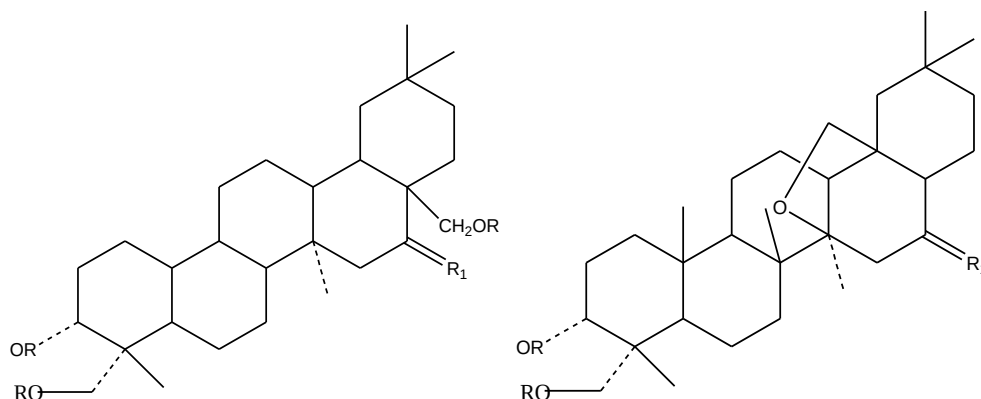


Figura 3. Posibles estructuras de triterpenos presentes en *Anagallis arvensis* (Shashi et al., 1991)

Napoli et al., 1992, reportan el descubrimiento de dos oligosacáridos triterpenoides presentes en esta planta, similares a los reportados por Shashi (1991), el estudio se realizó por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo no menciona sus funciones.

Dentro de las funciones que tiene el extracto etanólico de *Anagallis arvensis*, se comprobó que este actúa frente al crecimiento de hongos, según Cortes y Perales en 2014.

3.5. Métodos de separación de extractos vegetales y caracterización de sus compuestos activos

La separación y purificación de compuestos presentes en extractos vegetales se realiza mediante cromatografía, que se fundamenta en la separación de compuestos de una mezcla, con respecto a la afinidad de las sustancias por un medio móvil (gas o líquido) y un medio estacionario (papel, alúmina o sílice) a través del cual circulan. Las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía se pueden someter a análisis tales como: Espectroscopía IR, espectrometría de masas y RMN para poder caracterizar estructuralmente los compuestos.

De acuerdo a lo reportado por Stella en 2007, se realizó la separación y purificación en *Rumex conglomeratus* por medio de cromatografía en columna, o *Taxus globosa* un potente anticancerígeno en el cual se utilizó cromatografía en columna, HPLC y RMN (Soto, 2000).

Tabla 4. Métodos de separación de extractos vegetales y caracterización de sus compuestos activos

Métodos de separación de extractos vegetales	Métodos para caracterización de compuestos presentes en extractos vegetales
Cromatografía en columna	RMN
Cromatografía en capa fina	Espectrometría de masas
HPLC	IR

(Stella, 2007; Soto, 2000)

3.6. Degradación de colorantes por extractos vegetales

La industria textil es importante en nuestro país. Sin embargo, es la industria con mayor consumo de agua y las aguas residuales que se generan contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes y se caracterizan por ser sustancias recalcitrantes y tóxicas, resistentes a la degradación, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento debido a que los tintes contienen estructuras moleculares aromáticas complejas, que los hacen estables en el ambiente (Cortazar, 2007; Liu et al., 2006). Se han empleado diferentes procesos físicos y químicos para eliminar o remover la carga colorante, sin embargo se presentan inconvenientes entre ellos: altos costos de tratamiento, los contaminantes químicos no son degradados sino simplemente removidos y relocalizados en otro sitio donde el problema persiste, en procesos donde se utiliza el cloro para la decoloración, se pueden producir compuestos organoclorados que son altamente tóxicos y recalcitrantes, en ciertos tratamientos químicos se produce ruptura del anillo aromático del colorante generando sustancias aún más tóxicas (Cardona et al., 2009).

Uno de los colorantes más utilizados en la industria textil es el azul de metileno (Figura 4), este colorante es soluble en agua y etanol, en concentraciones altas como las utilizadas en la industria es toxico, ya que puede provocar envenenamiento por cianuro y acumulación de serotonina, lo cual, provoca alteraciones en el SNC.

La remoción de estos colorantes se lleva a cabo a través de procesos, tales como adsorción, precipitación, degradación química, electroquímica, fotodegradación, filtración por membranas, entre otros (Saratale et al., 2009). Algunas de estas presentan serias restricciones por no ser consideradas métodos económicamente factibles, además generan residuos acumulados en forma de lodos concentrados, lo que representa un problema posterior, por lo que se buscan métodos que sean amigables con el medio ambiente y que tengan resultados efectivos y no tóxicos para los seres humanos.

Actualmente para la bioremediación de aguas contaminadas con colorantes se han utilizado organismos aislados así como extractos de plantas, Gutiérrez et al., 2011 reportó el uso del extracto de alcachofa para la degradación de colorantes utilizados en la industria textil.

Los procesos biotecnológicos para la eliminación de contaminantes ambientales están en pleno proceso de investigación y son muy promisorios gracias a que se pueden alcanzar altas eficiencias de remoción de contaminantes, además poseen un costo competitivo respecto a tratamientos físico-químicos equivalentes y son amigables con el medio ambiente. Estos procesos emplean hongos o bacterias en tecnologías aerobias y anaerobias y son conocidos como procesos de Bioremediación.

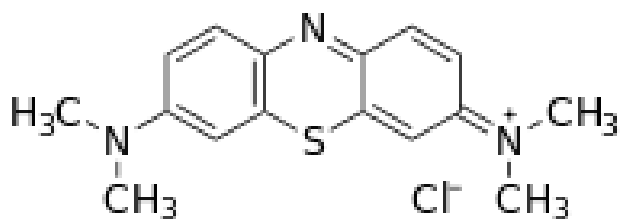


Figura 4. Estructura química del azul de metileno

4. JUSTIFICACIÓN

Existen escasos reportes acerca de los componentes de *Anagallis arvensis*, de acuerdo a las investigaciones realizadas, se han determinado la presencia de compuestos que le confieren propiedades benéficas para cultivos agrícolas frente a ciertos hongos, sin embargo, no se han identificado el o los compuestos responsable de esta propiedad en el extracto de la planta, por tal razón se emplea el extracto total de la planta como antifúngico. Sin embargo, sería de mucha utilidad identificar el o los componentes de este extracto que lleva acabo esta importante actividad y así poder caracterizarlo y evaluarlo frente a *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp, pues podrían ser alternativas naturales contra plagas de interés agrícola. *Anagallis arvensis* puede contribuir a la degradación de azul de metileno y ser una alternativa en la disminución de la contaminación con colorantes que genera la industria textil, que son desechados en ríos, contaminando el medio ambiente, existen muchos métodos para limpiar estas aguas, pero desafortunadamente, esos métodos dejan residuos que son dañinos o tóxicos para el ser humano, por ello se busca evaluar el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* en la degradación de azul de metileno.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar estructuralmente el compuesto activo del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* y evaluar las propiedades antifúngicas y/o degradativas de azul de metileno.

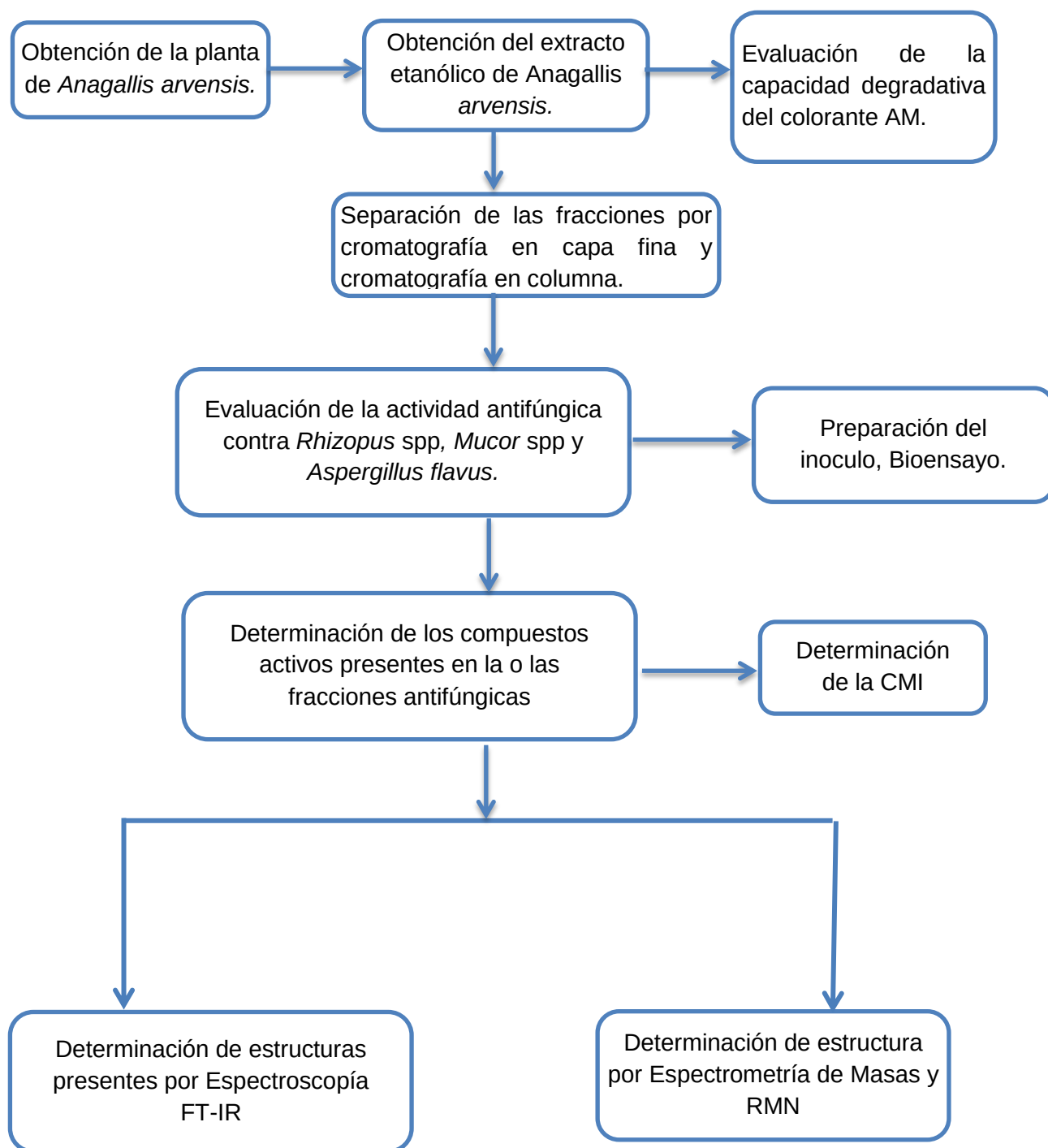
5.2. Objetivos particulares

- ✓ Obtener el extracto etanólico de *Anagallis arvensis*
- ✓ Evaluar la capacidad del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* para degradar el azul de metileno.
- ✓ Separar las fracciones del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* mediante cromatografía en capa fina y cromatografía en columna.
- ✓ Evaluar la actividad antifúngica de las fracciones separadas frente a *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp. para determinar el compuesto activo.
- ✓ Determinar y caracterizar el compuesto antifúngico por Espectroscopía FT-IR, RMN, y espectrometría de masas (EMIE)
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto antifúngico

6. HIPÓTESIS

El extracto de *Anagallis arvensis* es un degradante del azul de metileno, y sirve contra el crecimiento de las cepas de *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp, por lo tanto, con las fracciones del extracto y el uso de métodos analíticos se caracteriza el compuesto activo, este se obtiene en mayor concentración teniendo mayor efecto frente a los hongos fitopatógenos.

7. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

- Material de vidrio y reactivos de grado analítico necesarios para cada determinación.
- Los ensayos se realizaron en los laboratorios de Bromatología, Química Orgánica, Química Analítica y Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

8.1.1. Material biológico

- Cepas puras de: *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp.
- Material vegetal: *Anagallis arvensis*

8.2. Métodos

El equipo necesario se muestra en la tabla 5 y los métodos se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Equipos.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	Explorer E001140
Estufa	Boekel	CCC 1.4 ^a
Microscopio	Carl Zeiss	1061-030 (40x)
Autoclave	Único	Turbo Mixer
Lámpara de luz UV	Steren	SEG-050
Campana de flujo laminar vertical	SEV	CFLV-102
Uv vis	Excalibur	Serie 11
RMN	Varian	Mercury-400 VNMR 6.1 software
IR	Nicolet	Magna 700
Masas	JOEL	JMS-SX 102A

Tabla 6. Métodos.

Determinación	Método	Referencia
Obtención del extracto vegetal	Soxhelt	Sanabria, 1983; Villar <i>et al.</i> , 1990
Degradación de colorante	Agitación UV visible	Alarcón <i>et al.</i> , 2014; Bautista, 2011Saavedra, <i>et al.</i> 2010
Separación de las fracción del extracto	Cromatografía en capa fina Cromatografía en columna	Pereira <i>et al.</i> , 2013 Barrera y Bautista.2008
Determinar grupos funcionales	Espectroscopía IR	Saavedra <i>et al.</i> , 2010
Caracterización de compuesto	RMN Espectrometría Masas	Gómez <i>et al.</i> , 2010
Conteo de esporas	Cámara Neubauer	Cañedo y Ames, 2004
Bioensayo	Suspensión de esporas Difusión en agar con pozos	Rodríguez <i>et al.</i> , 2000; Wyatt y Parish, 1995 y López-Malo, 1995. Sen y Batra, 2012.
Determinación de CMI	Difusión en agar con pozos	Rodríguez <i>et al.</i> , 2000; Wyatt y Parish, 1995 y López-Malo, 1995; Sen y Batra, 2012

9. METODOLOGÍA

9.1. Obtención del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*

La recolección del material vegetal se realizó en el municipio de Vicente Guerrero localizado en el sureste del estado de Puebla, donde se colectaron plantas completas de *Anagallis arvensis*. Se dejó secar el material vegetal al sol durante cinco días, posteriormente se retiró el resto de la humedad en la estufa, a una temperatura de 40°C durante 4 h y después se pulverizó en un mortero de porcelana, para tener una mejor superficie de contacto y llevarla al proceso de extracción, se sometió a extracción en un equipo Soxhlet, con etanol como solvente orgánico polar. Por cada 20 g de muestra se utilizaron 200 mL de disolvente. El extracto obtenido se concentró y se secó en un rotavapor (Sanabria, 1983; Villar *et al.*, 1990).

9.2. Degradación de azul de metileno con el extracto por agitación continua

Se realizaron 2 pruebas para la degradación de este colorante, a diferentes cantidades de AM y del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.

9.2.1. Prueba 1 de la degradación de AM

Se realizó una preparación previa del extracto, se colocó 0.5 g de extracto con 10 mL de etanol y 10 μ L de azul de metileno (AM) a una concentración de 0.07 M en un matraz de bola y se le agregó una barra magnética, se colocó en un microondas a 400 watts, a 40 °C por 5 min y se retiró del microondas. Posteriormente, el matraz de bola que contenía la mezcla previamente preparada se colocó por 24 horas a agitación continua y se tomaron muestras de 0.5 ml cada 0, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 24 h. Después se dejaron evaporar las muestras y se hicieron diluciones de ellas con 10 mL de etanol, se adicionaron 3 mL de cada dilución en celdas de 1 cm de ancho y se realizó la lectura en el equipo UV visible a una absorbancia de 660 nm, se usó como blanco etanol (Alarcón et al., 2001; Saavedra et al., 2010).

9.2.2. Prueba 2 de la degradación de AM

Se realizó una preparación previa del extracto, se colocó 1 g de extracto con 10 mL de etanol y 5 μ L AM a una concentración de 0.07 M en un matraz de bola, se le agregó una barra magnética, se colocó en un microondas a una potencia de 400 watts, a 40 °C por 5 min y se retiró del microondas. Posteriormente, al matraz de bola que contenía la mezcla previamente preparada se le agregó una barra magnética, se colocó por 24 horas a agitación continua y se tomaron muestras de 0.5 ml cada 0, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 24 h.

Después se dejaron evaporar las muestras, se hicieron diluciones de ellas con 10 mL de etanol, se adicionaron 3 mL de cada dilución en celdas de 1 cm de ancho y se leyeron en el equipo UV visible a una absorbancia de 660 nm, se usó como blanco etanol (Alarcón et al., 2014; Bautista, 2011; Saavedra et al., 2010).

9.3. Separación de las fracciones por Cromatografía en capa fina (CCF) y Cromatografía en columna (CC)

9.3.1. Cromatografía en Capa Fina

En la CCF se emplearon placas sílica gel de 2 x 5 cm y 2 mm de espesor. Se marcó un extremo de la placa con una línea en donde se depositó la muestra a una distancia del borde inferior de la placa y se introdujo en un vaso que contenía la fase móvil (mezclas de solventes de n-hexano: acetato de etilo, hexano, AcOEt, MeOH, etc.), empezando desde el solvente menos polar hasta llegar al más polar, cuando el disolvente se encontró próximo al extremo superior de la placa se retiró y reveló con una lámpara UV (Pereira, 2013).

9.3.2. Cromatografía en Columna

Se colocó una columna de sílica gel, la cual se corrió con diferentes solventes, se utilizó como sistema de elución volúmenes de solventes puros (mezclas de solventes de n-hexano: acetato de etilo en orden creciente de polaridad, n-hexano, AcOEt, MeOH, etc.) con el fin de arrastrar la mayor cantidad de metabolitos secundarios activos en la muestra (Barrera y Bautista, 2008). Las fracciones resultantes fueron recolectadas de forma individual en frascos y/o viales.

Las cromatografías realizadas en los puntos 9.3.1 y 9.3.2 para realizar la separación de las fracciones del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* se llevaron a cabo en 5 etapas bajo las siguientes condiciones y en el siguiente orden:

1. Cromatografía en capa fina, en la cual se corrió una muestra del extracto etanólico completo, para observar el número de compuestos que posiblemente están presentes en el extracto.
2. Se corrió una cromatografía en columna de sílica gel de aproximadamente 60 cm, en ella se colocaron 2 g del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* con sulfato de sodio, las fracciones obtenidas se recolectaron en viales.

3. Una vez obtenidas las fracciones a partir de la CC, se realizaron las CCF, se corrió una cromatografía por fracción para identificar aquellas fracciones que se obtuvieron puras y aquellas que no lo estaban.
4. Las fracciones impuras se corrieron en CC, para lo cual se utilizó una columna de sílica gel de aproximadamente 30 cm por cada fracción, para purificar los compuestos presentes en el extracto.
5. En la última etapa se realizaron las cromatografías en capa fina para evidenciar la pureza de los compuestos o fracciones obtenidos a partir de la CC.

9.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones en hongos Fitopatógenos

9.4.1. Preparación del inóculo microbiano

Se emplearon las cepas: *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp. Todos los hongos se cultivaron en placas de PDA a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por cinco días. Posteriormente se preparó una suspensión de esporas de cada hongo, agregando a cada placa de cultivo 10 mL de agua destilada estéril. Las esporas se desprendieron del micelio rotando ligeramente la placa y la suspensión obtenida se transfirió a otro tubo de ensayo estéril y se determinó su concentración en la cámara de Neubauer por cada mL (Cañedo y Ames, 2004).

9.4.2. Bioensayo de la actividad antifúngica

Las placas de PDA se inocularon con la suspensión de esporas, de las respectivas cepas de hongos. Se realizaron 6 pozos (5 mm de diámetro y aproximadamente 2 cm de distancia) en cada una de las placas. En cada pozo se agregaron 20 μL de cada fracción del extracto de *Anagallis arvensis* y después 20 μL de la solución de esporas y se sembraron masivamente, después las placas se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco días, posteriormente se midió el halo de inhibición. Se utilizó como control positivo químico Dithane y como control negativo etanol.

9.5. Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del compuesto de interés.

La fracción del extracto de *Anagallis arvensis* que inhibió el crecimiento de los hongos, se sometió a un equipo IR Nicolet Magna 700, se colocó una gota de la fracción en la pastilla de KBr y se colocó en el equipo de IR (Saavedra et al., 2010).

9.6. Espectroscopía de RMN ¹³C: Determinación estructural del compuesto de interés.

Se llevaron 0.025 g de la fracción que inhibió el crecimiento de hongos al equipo de RMN Varian Mercury-400 software VNMR 6.1 usando solventes deuterados, los espectros que se obtuvieron se leyeron.

9.7. Espectrometría Masas: Determinación estructural del compuesto de interés.

Se colocó 0.01 g de la fracción que inhibió a los hongos en un equipo de Espectrometría de masas JOEL JMS-SX 102A operado con dispositivos a 70 ev, interpretando los Espectros obtenidos (Gómez et al., 2010).

9.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para esta determinación se utilizó únicamente la fracción del extracto que presentó inhibición del crecimiento micelial de las especies fúngicas. Se prepararon placas de PDA, se usó la técnica de difusión en agar con pozos a las que se les agregó 20 µL de extracto a diferentes concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% equivalente a 0.44, 0.88, 1.32, 1.76 mg/pozo. Se utilizó Dithane como control químico positivo y etanol como control negativo. Cada placa se inoculó con 20 µL de una solución de esporas, las cuales se extendieron masivamente, se incubó cada placa a 22 ± 2°C por cinco días, y se determinó la CMI evaluando el crecimiento o la ausencia del crecimiento del hongo.

9.9. Índice de actividad antifúngica

En esta determinación, el diámetro de la zona de inhibición (mm) se midió y se calculó el índice de actividad antifúngica, el cual se determinó con la siguiente fórmula (Lizcano y Vergara, 2008; Rodríguez et al., 2000; Wyatt y Parish, 1995 y López-Malo, 1995):

$$IA = \frac{D_m}{D_c}$$

D_m: diámetro de halo de inhibición de la muestra

D_c: diámetro del halo de inhibición del control positivo

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Rendimiento del extracto

El rendimiento para el extracto por cada 100 gramos de muestra seca con etanol fue de 2496.2 mg, este resultado fue similar al reportado por Cortez y Perales en 2014, quienes obtuvieron un rendimiento de 2498.8 mg.

10.2. Degradación de azul de metileno por el extracto mediante agitación continua

Se realizaron 2 pruebas a diferentes cantidades de azul de metileno (AM) y extracto etanólico de *Anagallis arvensis*, las muestras recolectadas de ambas pruebas a los diferentes tiempos, se evaluaron con un equipo Uv-vis, obteniendo en la prueba 2 mayor disminución de AM a las 24 h, lo cual se observa en el espectro de absorción que se muestra en la Figura 5.

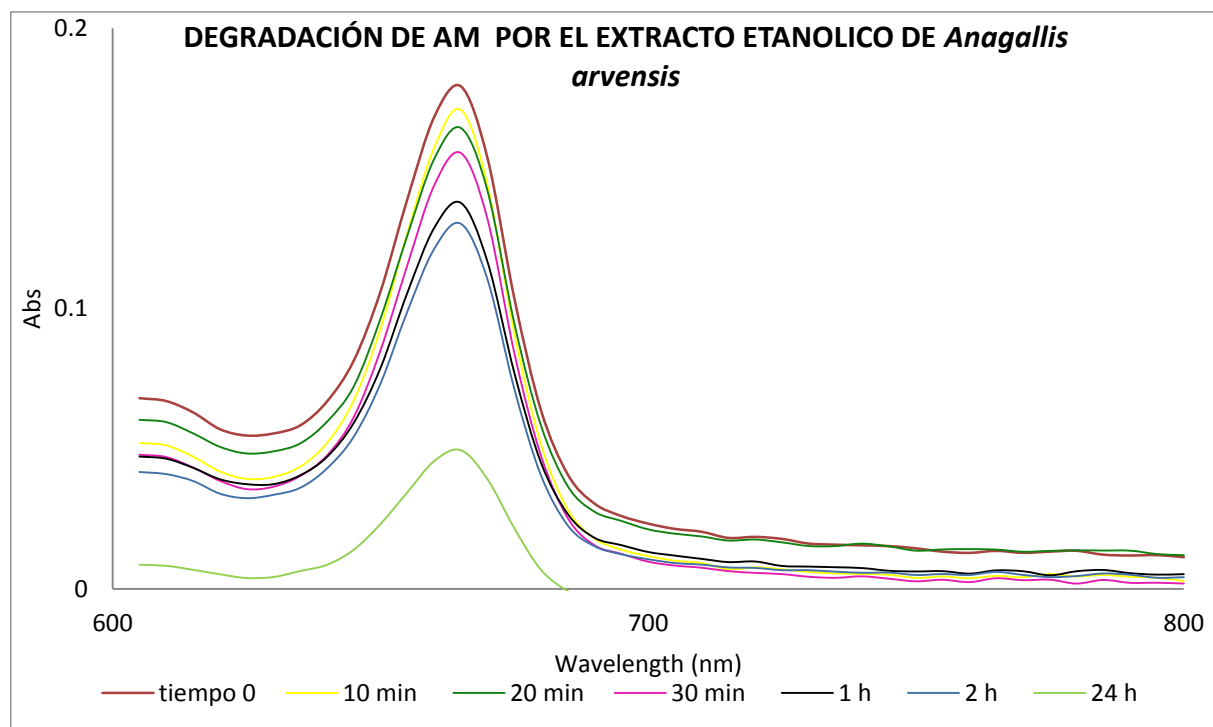


Figura 5. Prueba 2. Espectro de absorción de AM a diferentes tiempos (0 min, 10 min, 20 min, 1h, 2 h, 24 h) en donde se utilizó 5 μ l de AM a 0.07 M y 1 g del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*

A partir de las absorbancias obtenidas en el espectro se calculó la concentración de AM a los diferentes tiempos, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 7 y Figura 6, en la prueba 1 se determinó la degradación del AM utilizando 10 µL del mismo a una concentración de 0.07 M con 0.5 g del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* y se observó disminución del AM. En la prueba 2 se observó una mayor disminución de AM, ya que la cantidad del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* fue de 1 g. En ambas pruebas la mayor disminución se alcanzó a las 24 h, destacando en la prueba 2 aún más la disminución del azul de metileno.

Tabla 7. Concentraciones de AM en los diferentes tiempos en la degradación por el extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.

Tiempo	Prueba 1 Concentraciones de AM (M)	Prueba 2 Concentraciones AM (M).
0	2.4×10^{-6}	1.97×10^{-6}
10 min	2.29×10^{-6}	8.10×10^{-7}
20 min	2.21×10^{-6}	8.105×10^{-7}
30 min	2.09×10^{-6}	7.69×10^{-7}
1 h	1.85×10^{-6}	6.07×10^{-7}
2 h	1.75×10^{-6}	5.80×10^{-7}
24 h	6.20×10^{-7}	6.10×10^{-8}

Nota: *Prueba 1: 10 µL de AM a una concentración de 0.07 M y 0.5 g de extracto etanólico.

**Prueba 2: 5 µL a una concentración de 0.07 M de AM y 1 g de Extracto etanólico

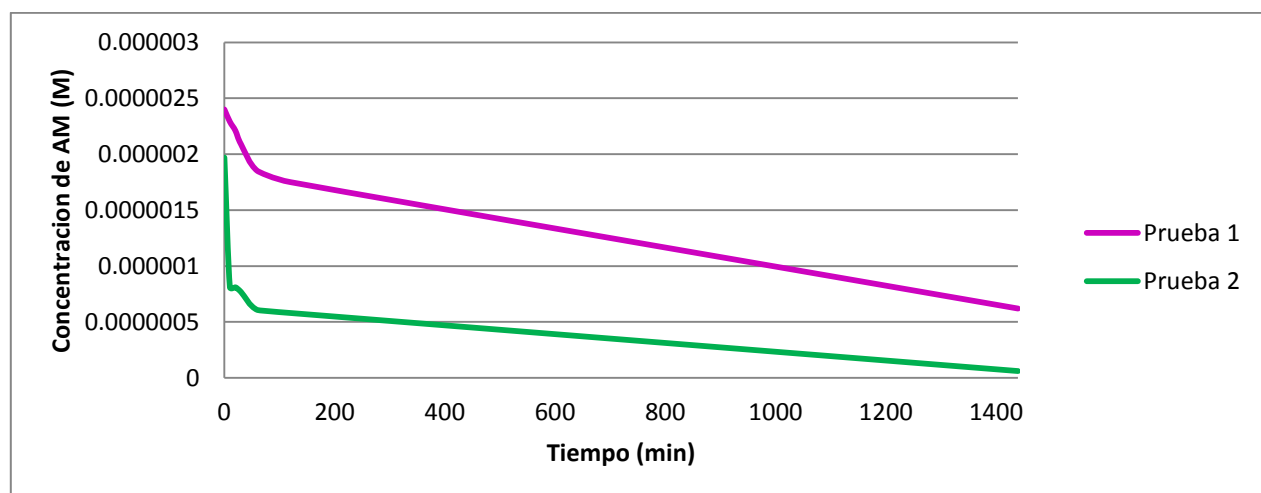


Figura 6. Concentraciones de AM a diferentes tiempos después de la degradación.

Sin embargo el AM no se degradó totalmente en ninguna de las dos pruebas, en la prueba 2 la concentración de AM en el tiempo 0 fue de 1.97×10^{-6} M, en el tiempo de 10 min la concentración empieza a disminuir lentamente, en el tiempo 20 min la concentración disminuyó un poco más que las anteriores, y así continúa en el tiempo 30 min, 1 h, 2 h, hasta llegar a las 24 h, este último tiempo presenta la mayor disminución del AM observando una concentración de AM de 6.10×10^{-8} M (Figura 6).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el azul de metileno solo disminuyó un 25%, se han realizado estudios de otros extractos frente a colorantes tal como el extracto de alcachofa, el cual se evaluó frente a rojo reactivo 141 y se observó que degradó este colorante pero no totalmente solo el 40%, se reportó que la degradación del colorante fue provocado por la presencia de enzimas peroxidasas presentes en el extracto de alcachofa (Gutierrez, 2011).

10.3. Separación de las fracciones por Cromatografía en capa fina y Cromatografía en Columna.

10.3.1. Cromatografía en capa fina

En esta etapa se corrió la muestra con diferentes mezclas de solventes (Tabla 8), se preparó una placa de sílica y el corrimiento se inició con el solvente menos polar (hexano) hasta llegar al solvente más polar (etanol), en cloruro de etileno se observó la separación de una fracción o mancha, en acetona la separación de 2 fracciones y en etanol se observaron 3 fracciones, por lo que en total se separaron 6 fracciones, las cuales evidencian que posiblemente corresponde a 6 diferentes compuestos presentes en el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* (Figura 7).

Tabla 8. Solventes utilizados para la cromatografía

Solvente	Nº de fracciones o manchas separadas
Hexano	0
Mezcla de hexano- acetato de etilo (9:1)	0
Mezcla de hexano- acetato de etilo (7:3)	0
Mezcla de hexano- acetato de etilo (5:5)	0
Mezcla de hexano- acetato de etilo (3:7)	0
Mezcla de hexano- acetato de etilo (1:9)	0
Acetato de etilo	0
Cloruro de metileno	1
Acetona	2
Etanol	3

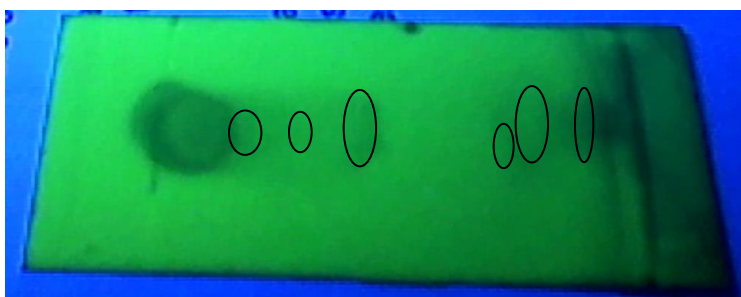


Figura 7. CCF del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.

10.3.2. Cromatografía en columna: separación de las fracciones

A partir del extracto etanólico se realizó la separación mediante una cromatografía en columna que contenía sílica, se utilizaron los mismos solvente que en la tabla 8, se inició adicionando a la columna de sílica hexano y se fue aumentando la polaridad del solvente hasta llegar al etanol, cabe mencionar que los solventes fueron adicionados a la misma columna, se separaron las diversas fracciones obtenidas en cada solvente, las cuales se recolectaron en viales y se etiquetaron con la letra F seguido de numero asignado a la fracción, como se muestra en la Tabla 9, el solvente en el que se obtuvieron más fracciones fue en etanol, en este se separaron 7 fracciones etiquetadas como F19, F20, F21, F22, F23, F24, F25.

Tabla 9. Fracciones obtenidas en cada solvente a partir de la CC.

Solvente	Nº de fracciones separadas
Hexano (200 ml)	1 (F1)
Mezcla de hexano- acetato de etilo (9:1)(200 ml)	1 (F2)
Mezcla de hexano- acetato de etilo (7:3)(200ml)	1 (F3)
Mezcla de hexano- acetato de etilo (5:5)(200 ml)	2 (F4, F5)
Mezcla de hexano- acetato de etilo (3:7)(200 ml)	2 (F6, F7)
Mezcla de hexano- acetato de etilo (1:9)(200 ml)	3 (F8, F9)
Acetato de etilo (200 ml)	2 (F10, F11)
Cloruro de metileno (300 ml)	2 (F12, F13)
Acetona (450 ml)	5 (F14, F15, F16, F17, F18)
Etanol (600 ml)	7 (F19, F20, F21, F22, F23, F24, F25)



Figura 8. Fracciones obtenidas en la CC

a) Fracciones no polares b) Fracciones polares

En total se obtuvieron 25 fracciones, de las cuales 11 fueron obtenidas de los solventes no polares y 14 fueron obtenidas de solventes medianamente polares a polares (Figura 8). De acuerdo a los estudios de Cortes y Perales (2014) las fracciones con los compuestos activos responsables de la actividad antifúngica se presentaron en las fracciones medianamente polares a polares. Por esta razón se evaluaron las 14 fracciones (F12-F25) mediante cromatografía en capa fina para corroborar si se encontraban puras.

10.3.3. Cromatografía en capa fina: comprobación de la pureza de las fracciones

Las 14 fracciones polares obtenidas en el punto 10.3.2, se colocaron en cromatografía de capa fina utilizando los solventes descritos en la tabla 9, se realizó 1 cromatografía por fracción, en total se realizaron 14 corrimientos, para corroborar si cada una de ellas estaba totalmente pura, sin embargo, no se observaron fracciones puras, por lo cual, para poder purificar cada fracción se llevó a cabo la cromatografía en columna.

10.3.4. Cromatografía en columna: purificación de los compuestos

Las fracciones polares obtenidas (F12-F25) no se encontraron puras de acuerdo a los resultados de la cromatografía en capa fina (punto 10.3.3), por lo que se purificaron una vez más en CC (Figura 9) utilizando los solventes de la tabla 8 para verificar la pureza, para cada fracción se utilizó una columna. Se obtuvieron en total 24 compuestos aparentemente puros (tabla 10).

Tabla 10. Fracciones puras obtenidas por medio de CC.

Fracción sometida a CC para purificarlas	Fracciones obtenidas en la purificación
F12	2 (F12, F12a)
F13	2 (F13, F13a)
F14	1 (F14)
F15	2 (F15, F15a)
F16	2 (F16, F16a)
F17	2 (F17, F17a)
F18	2 (F18, F18a)
F19	2 (F19, F19a)
F20	2 (F20, F20a)
F21	2 (F21, F21a)
F22	2 (F22, F22a)
F23	1 (F23)
F24	1 (F24)
F25	1 (F25)



Figura 9. Purificación de fracciones por CC.

10.3.5. Cromatografía en capa fina: comprobación de la pureza de los compuestos

De acuerdo a las manchas obtenidas en la cromatografía en capa fina, se observó que de la fracción F12-F22 son compuestos diferentes al igual que de la fracción F12a-F22a, todas estas fracciones estaban totalmente puras, en la figura 10 se muestran algunas de las cromatografías en capa fina realizadas. Las fracciones F23, F24 y F25 presentaban las mismas manchas por lo que se evidenció que se trata del mismo compuesto. Por lo tanto las fracciones que se evaluaron en el bioensayo fueron las; F12, F12a, F13, F13a, F14, F15, F15a, F16, F16a, F17, F17a, F18, F18a, F19, F19a, F20, F20a, F21, F21a, F22, F22a, F23, F24, F25.

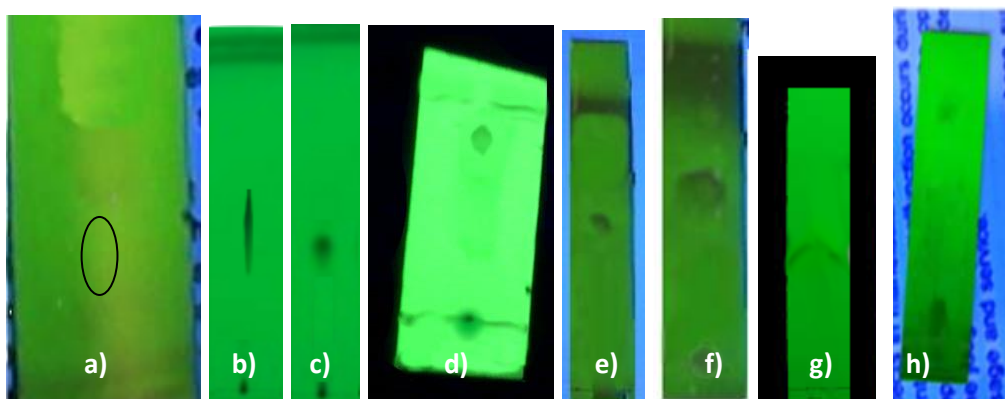


Figura 10. CCF de las fracciones del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* totalmente puras, a) F12 b) F13 c) F14 d) F15 e) F16 g) F17 h) F18.

10.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones en hongos Fitopatógenos

10.4.1. Preparación del inóculo microbiano

Se prepararon 10 mL de solución de esporas, de cada hongo, y se realizó el conteo de las esporas de cada solución obteniendo las siguientes concentraciones (tabla 11):

Tabla 11. Concentración de esporas en *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp. (Anexo A)

Hongo	Esporas totales en 10 mL
<i>Aspergillus flavus</i>	1,425,000
<i>Mucor</i> spp	7,925,000
<i>Rhizopus</i> spp	1,500,000

10.4.2. Bioensayo de la actividad antifúngica

En el bioensayo de la actividad antifúngica de *Anagallis arvensis* frente a los hongos fitopatógenos solo se utilizaron las fracciones polares ya que se partió de los resultados obtenidos por Cortez y Perales en 2014, en donde reportan la realización de una Bioautografía que se corrió con solventes polares, en la cual se observó un halo de inhibición frente a *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp.

Se determinó que la fracción 15 del extracto de *Anagallis arvensis* inhibió a *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp y *Mucor* spp, destacando mayor actividad en *Aspergillus flavus* al presentar un halo de inhibición mayor comparado con *Rhizopus* spp y *Mucor* spp (Figura 11 y tabla 12).

En 2014 Cortez y Perales reportaron la actividad de *A. arvensis* sobre *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp, observando mayor actividad sobre *Aspergillus flavus*, similar a lo obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, previas investigaciones reportan el descubrimiento de saponinas triterpénicos del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*, pero no reportan la evaluación de estas frente a hongos fitopatógenos (Napoli et al; 1998).

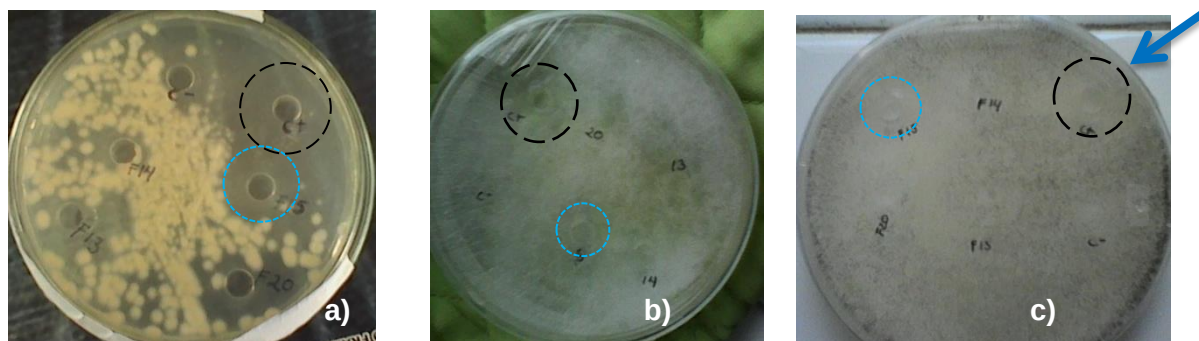


Figura 11. Evaluación de las fracciones del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* frente a tres cepas de hongos a) *Aspergillus flavus* b) *Mucor* spp c) *Rhizopus* spp.

Nota: (•••) = F15, (---) =control Dithane

Tabla 12. Bioensayo de la actividad antifúngica de las fracciones

Microorganismo	Inhibición del extracto etanólico de <i>A. arvensis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	+++
<i>Rhizopus</i> spp	++
<i>Mucor</i> spp	+

+++ Inhibición del crecimiento micelial
 ++ Poca Inhibición del crecimiento micelial
 + Escasa Inhibición del crecimiento micelial

10.5. Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del compuesto de interés.

La Espectroscopía de IR es una técnica que se utiliza para la identificación de ciertos grupos funcionales presentes en un compuesto para llegar a una estructura, se basa en la producción de vibraciones en la zona del infrarrojo del Espectro electromagnético, en donde cada grupo funcional tiene una rango de absorbancia que lo caracteriza (Vásquez, 2000).

La fracción 15 del extracto de *Anagallis arvensis* que inhibió el crecimiento de hongos se preparó para realizar la Espectroscopía de IR (Saavedra et al., 2010), el cual, presento el espectro de absorción que se muestra en la Figura 12, en la

región 3397 y 3735 se observa la presencia de un pico de absorción perteneciente a O-H, en la región 1526 se observa un pico característico de C=C, a una longitud de 1000-1300 se observa un pico característico de C-O, también se perciben vibraciones de C-C a 1200-800, lo cual evidencia que en la estructura del compuesto activo presente en *Anagallis arvensis* se encuentran los grupos funcionales mencionados anteriormente (Gómez, 2009; Bailey, 1998).

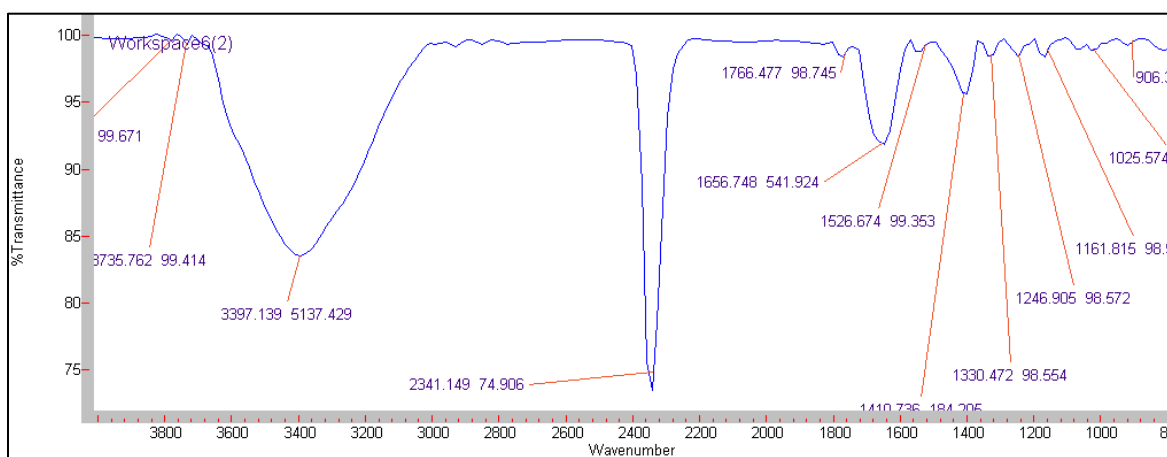


Figura 12. Espectro IR de grupos funcionales presentes en el compuesto.

10.6. Espectroscopía de ^{13}C -RMN: Determinación estructural del compuesto de interés.

Es utilizada para la determinación de estructuras de compuestos, esta se basa en la absorción de energía por un núcleo y el cambio de orientación del mismo, existe ^{13}C RMN en la cual, identifica el número de carbonos que tiene la estructura molecular (López, 2012). De acuerdo a la ^{13}C -RMN se obtuvo el siguiente espectro (Figura 13).

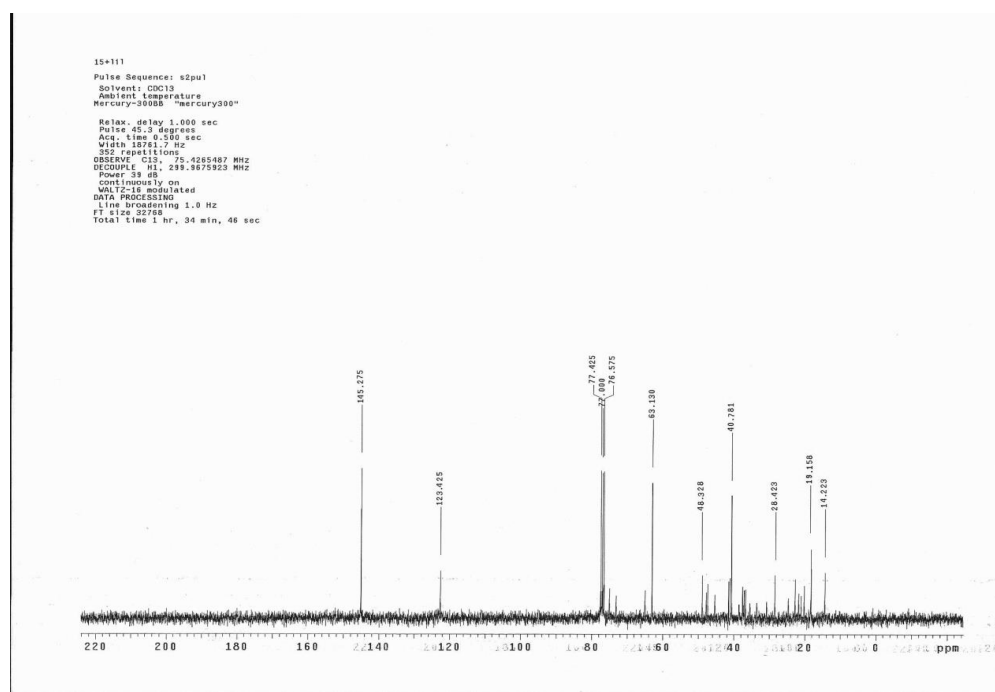


Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN de la fracción 15.

De acuerdo a las señales de la ^{13}C -RMN se propone la siguiente estructura (Figura 14). Se observa que el compuesto presente en la fracción 15 de extracto etanólico pertenece a un estero.

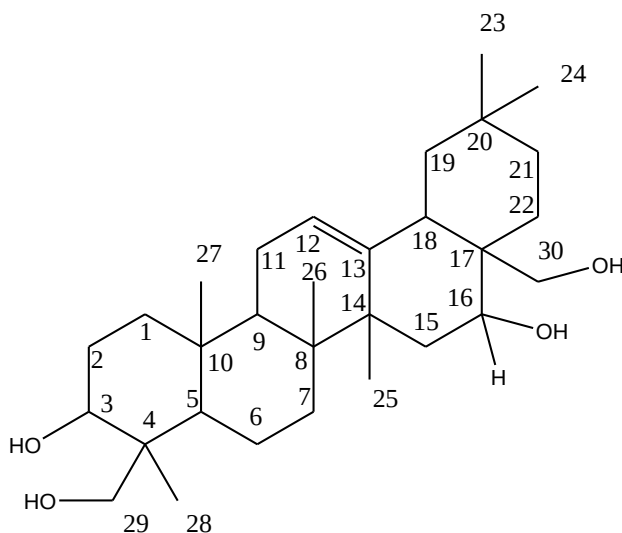


Figura 14. Estructura encontrada a partir de la resonancia magnética nuclear perteneciente a un estero encontrado en la fracción 15 del extracto.

En el espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) se observaron el número de señales esperadas para el compuesto. Dos señales a 14.22 y a 19.1 ppm asignada a C-26, C-28; seis señales a 20.8, 21.7, 21.9, 23.9, 25.6, y 28.4 ppm asignadas a C-6, C-25, C-27, C-22, C-11 y C-2, C-23, C-24 respectivamente; siete señales a 31.4, 33.8, 35.9, 36.7, 36.9, 37.6, 38.6 ppm asignadas a C-20, C-1, C-7, C-14, C-18, C-15 y C-10 respectivamente; siete señales a 40.7, 41.2, 41.8, 45.9, 47.7, 47.9, 48.3 ppm asignadas a C-8, C-17, C-21, C-4, C-19, C-5, C-9; cuatro señales asignadas a 63.1, 65.6, 73.4, 74.9 ppm asignadas a C-30, C-29, C-16, C-3 respectivamente; finalmente dos señales a 123.4 y 145.2 ppm asignadas a C-12 y C-13, lo cual indica que la estructura del compuesto aislado y caracterizado pertenece a un esteroide, comparando la estructura encontrada por Shashi en 1991 que se observa en el inciso a) con la estructura del esteroide encontrado en este trabajo inciso b), se observa que ambas estructuras son similares, denotando pequeñas diferencias estructurales como; los radicales, grupos hidroxilo, y ciertos enlaces dobles (Figura 15).

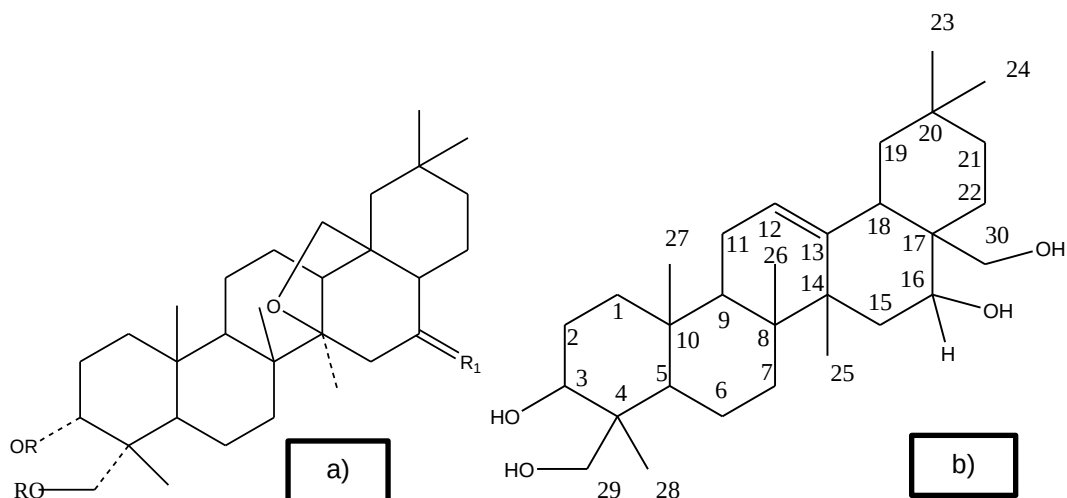


Figura 15. Comparación estructural de los compuestos

10.7. Espectrometría de Masas: Determinación estructural del compuesto de interés.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite la medición de la masa de moléculas. El espectrómetro de masas es un equipo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación carga-masa (z/m). Además de determinar el peso molecular de un compuesto (Geissman 1973).

En el espectro de masas (Figura 16) se observa un pico ion molecular a 474 z/m que coincide con el peso molecular del compuesto propuesto anteriormente, además, de acuerdo al espectro se observan diferentes picos que indican el patrón de fragmentación de la molécula del estero (Figura 17).

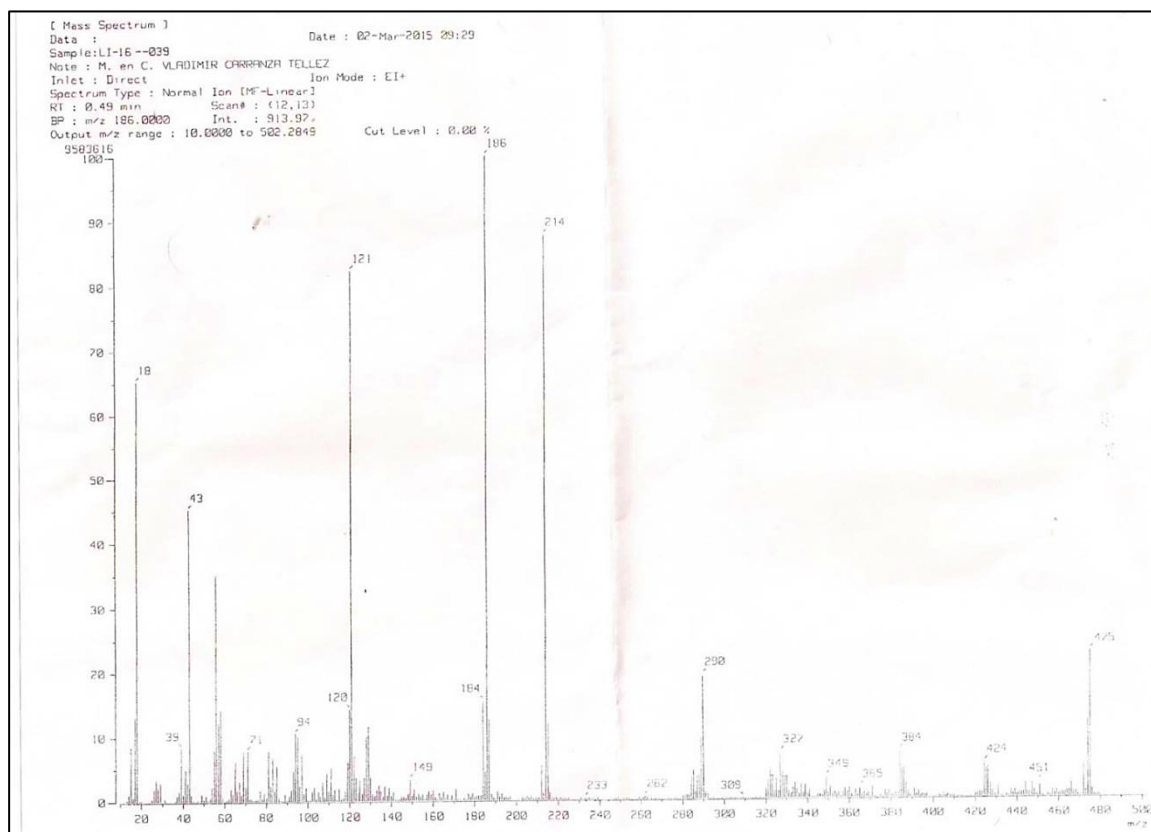


Figura 16. Espectro de masas del estero activo del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.

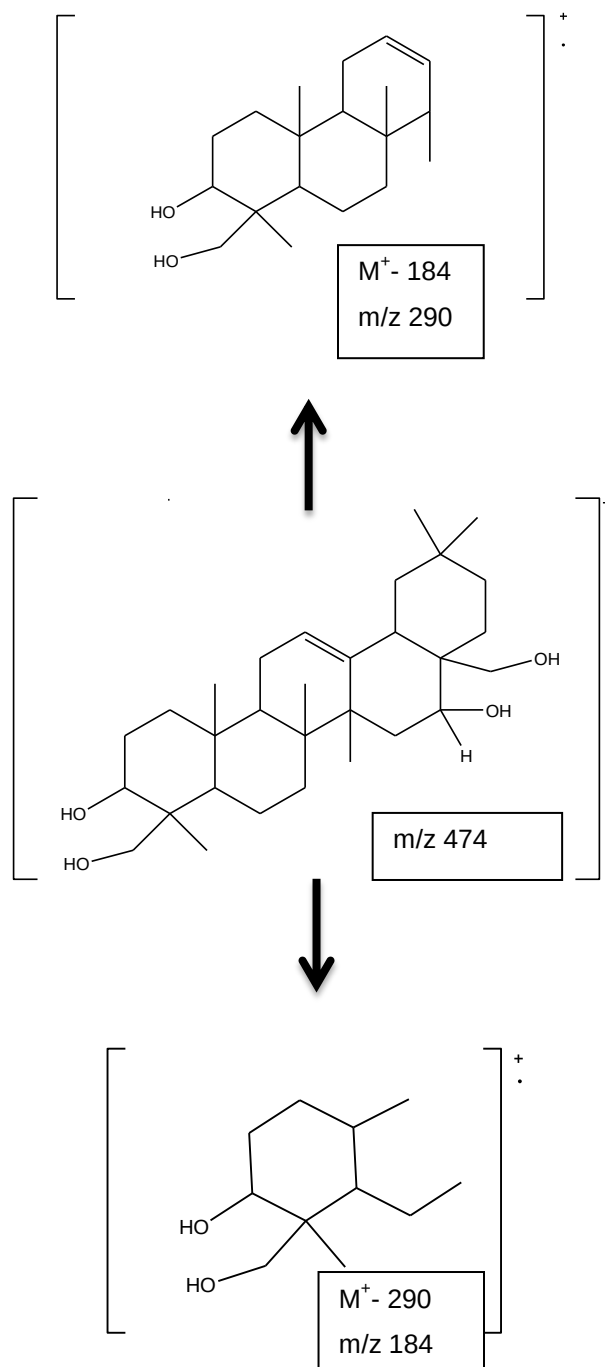


Figura 17. Patrón de fragmentación, posibles fragmentaciones del esteroi.

En la figura 17 se observa la fragmentación del compuesto (esteroi), uno de los fragmentos tuvo un peso molecular de 290 g/mol, el cual corresponde a la señal del Espectro de masas de 290 m/z, por otra parte se observa otro fragmento con

un peso molecular de 184 g/mol correspondiente a la señal de 184 m/z en el espectro (Figura 16).

10.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Al evaluar el compuesto de la fracción 15, identificado como esterol del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* a diferentes concentraciones, 20%, 40%, 60%, 80% equivalente a 0.44, 0.88, 1.36, 1.76 mg/pozo, se observó que la concentración que inhibió a *Aspergillus flavus* y *Mucor* spp fue al 80% (1.76 mg/pozo) y para *Rhizopus* spp solo fue el 100% (2.2 mg/pozo), ya que no se observó actividad en ninguna de las otras concentraciones (Figura 18).

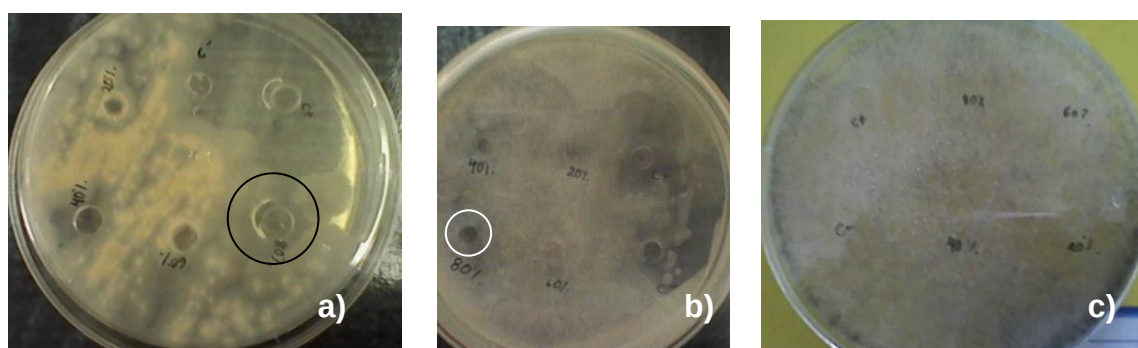


Figura 18. CMI del esterol para a) *Aspergillus flavus* y b) *Mucor* spp. c) *Rhizopus* spp.

El compuesto activo que se encuentra en esta fracción, es un esterol, el cual, tiene mayor actividad antifúngica frente a *Aspergillus flavus* y *Mucor* spp, e inhibe el crecimiento de *Rhizopus* spp pero utilizando concentraciones muy altas. Para el control químico Dithane, se utilizaron las concentraciones que describen Cortez y Perales en 2014 (Tabla 13).

Se han realizado estudios con otros extractos etanólicos de plantas que inhiben a estos hongos fitopatógenos, para *Aspergillus flavus*, se describió que la planta *Larrea tridentata* tuvo acción antifúngica frente a este hongo a una concentración mínima inhibitoria de 7 mg/mL (Moreno y González, 2011). En cambio el extracto metanolico de la planta *Cestrum nocturnum* inhibió a *Rhizopus* spp con una concentración mínima inhibitoria de 5 mg/mL (Barrera et al., 2008)

Tabla 13. CMI del esteroles presente en el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* y del control químico Dithane

Microorganismo	CMI (mg/pozo)	
	Esterol de <i>A. arvensis</i>	Dithane
<i>Mucor</i> spp	1.76	1.4
<i>Rhizopus</i> spp	2.2	10
<i>Aspergillus flavus</i>	1.76	1

La literatura científica-medica describe a los esteroides vegetales como fitoesteroides, a los cuales se les atribuye propiedades antibacteriales, antitumorales y antifúngicas (Ling, 2011). De acuerdo a lo reportado por Mbambo en 2012, se realizó el análisis de la planta *Bulbine natalensis*, en la que se encontró stigmasterol y sitoesterol, dos esteroides presentes en algunas plantas, se evaluó la actividad antifúngica de estos esteroides contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* y *Penicillium digitalium*, presentando halos de inhibición frente a los 3 hongos, el halo de inhibición más grande fue observado en *Aspergillus flavus* (18 mm), e incluso fue mayor al halo presentado por el control positivo utilizado, el cual fue Anfotericina B (14mm).

El mecanismo de acción del esteroles encontrado en la fracción 15 de *Anagallis arvensis* no se conoce aún, sin embargo, es posible que sea igual al mecanismo que llevan a cabo los triterpenos, ya que estos son precursores del esteroles, por lo tanto, el mecanismo de acción probablemente será inhibir la síntesis del glucano, un compuesto importante que le da rigidez a la pared celular de los hongos (Romero et al., 2005).

10.9. Índice de actividad antifúngica

El índice de actividad más alto fue el de *Rhizopus* spp, el más bajo fue para *Mucor* spp, a pesar de ello, el IA para los 3 hongos fue menor a 1, lo que indica que la actividad de la fracción 15 (esterol) del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* es menor al IA del control químico Dithane, sin embargo *Aspergillus flavus* presentó la zona de inhibición más grande seguido de *Rhizopus* spp, y *Mucor* spp (Figura 19 y Tabla 14), la zona de inhibición del control químico Dithane fue mayor a la que presentó el esterol, lo cual indica que la actividad del esterol presente en el extracto etanólico no es equiparable con el control químico Dithane.

De acuerdo a lo reportado en 2014 por Cortez y Perales, el IA fue de 0.93 para *Mucor* spp y 0.99 para *Aspergillus flavus* al evaluar todo el extracto, comparando con los resultados obtenidos en este trabajo se observó que para *Mucor* spp el IA fue de 0.46, mientras que para *Aspergillus flavus* fue de 0.54 evaluando solo la fracción 15 (esterol), lo que indica que al usar todo el extracto se obtiene mayor efecto.

Tabla 14. Índice de actividad antifúngica

Microorganismo	ZI (extracto)	ZI (control)	IA
<i>Mucor</i> spp	4.6	10	0.46
<i>Rhizopus</i> spp	9.2	15.2	0.60
<i>Aspergillus flavus</i>	12	22	0.54

Nota. IA<1 Menor actividad del extracto con respecto al control

IA=1 Actividad del extracto igual a la del control

IA>1 Mayor actividad del extracto respecto al control

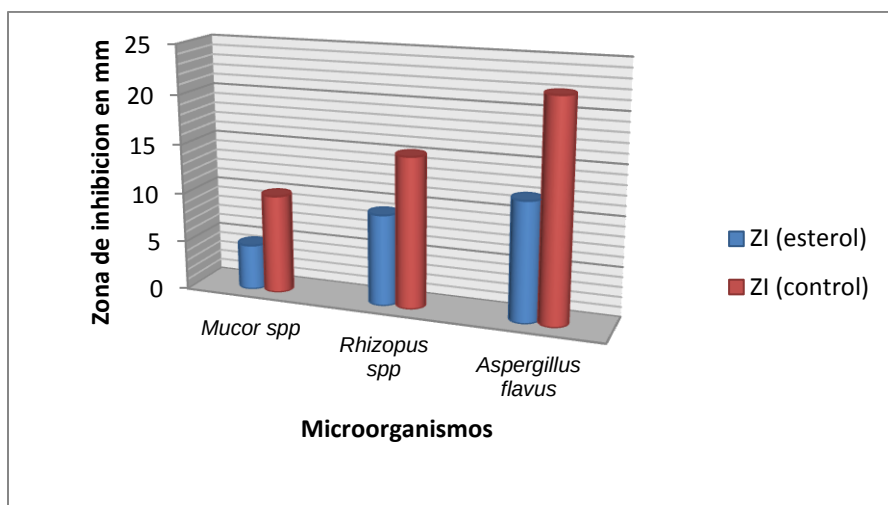


Figura 19. Comparación de las zonas de inhibición del esteroles presente en el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* y el control químico Dithane.

11. Conclusiones

- El extracto etanólico de *Anagallis arvensis* no degrada totalmente al AM, sin embargo si degrado aproximadamente el 25% del colorante, por lo cual, podría ser de utilidad para la degradación.
- La fracción 15 del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* es la responsable de la actividad antifúngica, siendo efectivo contra las 3 cepas estudiadas con una CMI de 1.76 mg/pozo para *Aspergillus flavus* y *Mucor* spp, y de 2.2 mg/pozo para *Rhizopus* spp.
- El compuesto encontrado en la fracción 15 del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* corresponde a un estero, uno de los compuestos responsables de la actividad.
- El estero, identificado en el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* tiene una eficiencia como antifúngico menor al producto químico Dithane al presentar un índice de actividad menor a 1 para *Mucor* spp, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp.

12.Recomendaciones

- Buscar el compuesto responsable de la degradación del AM.
- Evaluar la degradación del AM con otros métodos, utilizando bacterias o enzimas.
- Evaluar la degradación de otro tipo de colorantes.
- Evaluar el esterol con otras especies de hongos.
- Evaluar el esterol con especies de bacterias Fitopatógenas.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vivo* del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.
- Utilizar otro control químico para comparar su efecto.
- Identificar el mecanismo de acción del esterol frente a los hongos.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, J. Miguel Á. López V. Jairo H., Restrepo M. Diego A. (2014). Efecto de la inclusión de fibra dietaria sobre la degradación lipídica de productos cárnicos. *Revista Chilena de Nutrición*. 4(1).
- Anaya, L. A. (2003). *Ecología química. Metabolismo secundario*, Pp 45.
- Amoros, M. Fauconnier B. Girre R. (1987). In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus, *Antiviral Research*. 8(1):13-25.
- Arias, M. (2009). Aspectos ingenieriles de cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Dyna*. 109-112.
- Badajos, A. (2011). Variación en el metabolismo secundario de acuerdo a su fenotipo genotipo. 14-19.
- Bailey S. 1998. *Química orgánica*. Pearson education. Pp 426.
- Barrera, L. Bautista S. (2008). Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Obregón. 26 (1): 27-31.
- Bautista, S L. (2011). Degradación de colorante AMs por métodos electroquímicos. Facultad de Ciencias Químicas Veracruz. Ingeniera química. 1-75.
- Cardona, M. Osorio, J. Quintero, J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos lignolíticos. *Revista de la facultad de Ingeniería Universidad De Antioquia*. Medellín. Pp 27-37.
- Cañedo, V. Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). Pp 62.
- Cortazar, M. A. (2007). Contaminación generada por colorante de la industria textil. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pp 46.
- Cortes, A. Perales, T. (2014). Obtención y evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos vegetales de *Equisetum hyemale*, *Aloysia triphylla* y *Anagallis arvensis* en plagas de interés agrícola (*Aspergillus*

flavus, *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Fusarium* spp). Tesis de licenciatura en QFB. BUAP. Pp.1-27.

- De Napoli, L. Piccialli G. Piccialli V. Santacroce C. Carolla R.(1992). Two oleanane triterpenes from *Anagallis arvensis*. dipartimento di chimica organica e biologica, universita' di napoli.phytochemistr. Great Britain. 31(11):3965-3968.
- Díaz, Puentes N. (2009). Interacción molecular entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y tolerancia a los microorganismos. Red de revistas científicas de América latina. Pp 32 – 55. Venezuela.
- Franco, León M. (2012). Evaluación fitoquímica, actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae) de la Localidad de Guaranache. Cumaná, Estado Sucre. Departamento de bioanálisis. Venezuela.
- García, A. Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal. 2 (3):119-145.
- Gennaro, A. R. (2003). Remington farmacia. Editorial panamericana. Pp 477.
- Geissman T. A. (1973) Principios de química orgánica Reverte. Pp 834.
- Gómez, S. Sierra, M. Análisis instrumental 1. Editorial netbiblo. Pp 75-77
- Gómez, Flores R. (2010). Aislamiento y caracterización de compuestos de *Gymnosperma Glutinosum* y evaluación de su actividad citotóxica contra la línea tumoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Pp.7.
- Kallersjo, M. Anderberg A. (2000). Generic realignment in primuloid families of the Ericales a phylogenetic analysis based on DNA sequences from three chloroplast genes and morphology. American Journal of Botany. Stockholm. Pp. 1325- 1341

- Juárez B. P. Sosa M. E. López M. A. (2010). Hongos fitopatógenos de amplia importancia económica: descripción y métodos de control. Universidad de las Américas Puebla. Pp. 15.
- Ling, W. (2011) Dietary phytosterols: a review of metabolism benefits effects. 57(3): 195-206.
- Liu, J. Z. (2006). Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. Water Research. 40(2): 283-290.
- Lizcano, A; Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. pp. 165.
- López E. (2012). RMN como herramienta en el estudio y control en la vinificación.
- Marcano, D. (2003). Fitoquímica orgánica. Compuestos aromáticos. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Venezuela. 177-185.
- Mbambo B. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). Department of Biotechnology and Food Technology, Faculty of Applied Science, Durban University of Technology. Pp 8.
- Moreno S., González L.N., Salcedo S. Cárdenas M.L y Perales A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) Sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. Revista polibotanica 193(32):203.
- Morrissey, J. P. Osbourn A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Pp. 708.
- Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología. 29:73-82.
- Nawar S.S. y Doma H. S. (1989). Removal of dyes from effluents using low cost agricultural by-products, Science total Environ., 79(1):271-279.

- Mosquera, P. 2007. Actividad controladora de hongos de suelo sobre organismos fitopatógenos. Pp 36.
- Pereira, C. S. (2013). Actividad antimicrobiana in vitro de *Cederla adorata* L. (cedro). Revista Cubana de Plantas Medicinales.18 (4)
- Rodríguez, Rivera M. (2008). Bases de la alimentación humana. Compuestos percibidos por la vista. España. 257-260.
- Romero, M. Canton, E. Peman, J. Gobernador, M. (2005) Antifúngicos inhibidores de glucano. Revista española. 18(4):281
- Stella, L.(2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) Ruibarbo. Perea. 397-400.
- Saavedra. F. Borja N. Rocha Gloria G. (2010) Análisis por Espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller. Interacción con sales inorgánicas. Revista de la Sociedad Química del Perú. Lima.76 (3).
- Saratale, R.G. (2009). Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigeli* NCIM-3326. Journal of Hazardous Materials, Vol. 166, 2(3): 1421–1428.
- Sanabria, A. (1983). Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de familia *Compositae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 46-49.
- Shashi, B. (1991). Structure elucidation of four we triterpenoid oligoglycosides from *Anagallis arvensis*. Indian Institute of Chemical Biology. Great Britain. 47(28): 5215-5230.
- Soto, Hernández M. (2000). *Taxus globassa* potencial en taxol. Red de revistas científicas de América latina. 7(3).
- Unrika, Manns and Anderberg. (2005). Molecular phylogeni *Anagallis* base on ITS trnLF and secuencia data. International Journal Of Plants Science Stockhol. 166(6): 1019-1028.
- Vázquez D. (2000).ciencias Oxford complutense. Pp 397.

12. ANEXOS

Anexo A. Conteo de esporas con la cámara de Neubauer

◆ *Aspergillus flavus*

$$\text{Esporas/ml} = (\text{esporas contadas})(25,000)(\text{factor de dilución})$$

$$\text{Esporas totales} = \left(\text{Esporas/ml} \right) (\text{Volumen de suspensión original})$$

Cámara #1 - 5 Cuadros = 37 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 20 esporas

Total = 59 esporas

Aplicando las fórmulas:

$$\text{Esporas/ml} = (57)(25,000) \left(\frac{1}{10} \right)$$

$$\text{Esporas/ml} = 142,500$$

$$\text{Esporas totales} = (142,00)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 1,425,000 / 10 \text{ ml}$$

◆ *Rhizopus* spp.

Cámara #1 - 5 Cuadros = 36 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 24 esporas

Total = 60 esporas

Aplicando las fórmulas:

$$\text{Esporas/ml} = (60)(25,000) \left(\frac{1}{10} \right) 150,000$$

$$\text{Esporas totales} = (150,000)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 1,500,000 / 10 \text{ ml}$$

***Mucor* spp.**

Cámara #1 - 5 Cuadros = 157 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 160 esporas

Total = 317 esporas

Aplicando las fórmulas:

$$\text{Esporas} / \text{ml} = (317)(25,000) \left(\frac{1}{10} \right)$$

$$\text{Esporas} / \text{ml} = 792,500$$

$$\text{Esporas totales} = (792,500)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 7,925,000 / 10 \text{ ml}$$