



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – ALIMENTOS**

**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 PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTAN:**

**p. Q.F.B. ANDREA CORTEZ RODRÍGUEZ**

**p Q.F.B. TALINA PERALES LARA**

**DIRECTOR**

**D. C. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO**

**ASESOR**

**M. C. MARÍA DE LA CRUZ MENESES SÁNCHEZ**

## ÍNDICE

	Contenido	Página
	Índice de figuras	I
	Índice de cuadros	II
	Abreviaturas	III
	RESUMEN	IV
1.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2.	<b>ANTECEDENTES</b>	2
2.1	Efectos indeseables de los agroquímicos	2
2.2	Utilización de extractos de plantas como antifúngicos	2
2.3	Extractos vegetales	4
2.4	Especies botánicas de estudio	4
2.4.1	<i>Aloysia Triphylla</i>	5
2.4.2	<i>Equisetum hyemale</i>	6
2.4.3	<i>Anagallis arvensis</i>	7
2.5	Hongos fitopatógenos	8
2.5.1	Especies fúngicas de importancia agrícola	9
2.5.1.1	<i>Aspergillus flavus</i>	9
2.5.1.2	<i>Fusarium spp</i>	9
2.5.1.3	<i>Rhizopus spp</i>	10
2.5.1.4	<i>Mucor spp</i>	11
2.6	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	12
2.7	Método de Bioautografía	13
3.	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	14
4.	<b>OBJETIVOS</b>	15
4.1	Objetivo general	15
4.2	Objetivos particulares	15

5.	<b>DIAGRAMA DE TRABAJO</b>	16
6.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
7.	<b>METODOLOGÍA</b>	19
7.1	Obtención del material vegetal	19
7.2	Secado y molienda	19
7.3	Obtención de los extractos vegetales	19
7.4	Aislamiento de hongos y microcultivo	19
7.5	Identificación de hongos	20
7.6	Ensayo preliminar de actividad antifúngica	20
7.7	Preparación del inóculo microbiano	20
7.8	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	21
7.9	Bioensayo e Índice de actividad antifúngica (IA)	21
7.10	Método de Bioautografía	22
8.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	23
8.1	Rendimientos de extracción	23
8.2	Aislamiento e identificación de cepas fúngicas	23
8.3	Ensayo preliminar	27
8.4	Determinación de la CMI	28
8.5	Bioensayo e Índice de actividad antifúngica	29
8.6	Bioautografía	31
9.	<b>CONCLUSIONES</b>	34
10.	<b>RECOMENDACIONES</b>	35
11.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	36
12.	<b>ANEXOS</b>	42
Anexo A	Conteo de esporas con la cámara de Neubauer	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Título	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Tallos y hojas de <i>Aloysia triphylla</i>	5
<b>Figura 2.</b>	<i>Equisetum hyemale</i> tallos y esporangios	7
<b>Figura 3.</b>	Flor de <i>Anagallis arvensis</i>	8
<b>Figura 4.</b>	<i>Fusarium</i> spp afectando diferentes etapas de desarrollo en diferentes plantas	10
<b>Figura 5.</b>	Micromorfología de <i>Aspergillus flavus</i>	25
<b>Figura 6.</b>	Micromorfología de <i>Fusarium</i> spp	25
<b>Figura 7.</b>	Micromorfología de <i>Mucor</i> spp	26
<b>Figura 8.</b>	Micromorfología de <i>Rhizopus</i> spp	26
<b>Figura 9.</b>	Bioensayo preliminar	27
<b>Figura 10.</b>	Comparación de las zonas de inhibición del extracto etanólico de <i>A. arvensis</i> contra el control positivo químico (Dithane®)	30
<b>Figura 11.</b>	Revelado del cromatofolio	32
<b>Figura 12.</b>	Bioautografía	32

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Espectro de acción de plantas contra géneros de hongos fitopatógenos	3
<b>Cuadro 2.</b>	Cuadro de equipos	17
<b>Cuadro 3.</b>	Cuadro de métodos	18
<b>Cuadro 4.</b>	Rendimientos de extracción de las diversas plantas con etanol, éter de petróleo y agua	23
<b>Cuadro 5.</b>	Bioensayo antifúngico preliminar	28
<b>Cuadro 6.</b>	Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos	28
<b>Cuadro 7.</b>	Índice de actividad antifúngica	30
<b>Cuadro 8.</b>	Fracciones obtenidas en la CCF	32
<b>Cuadro 9.</b>	Resultados de la bioautografía	33

## Abreviaturas

---

<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>TLC</b>	Thin layer chromatography
<b>IA</b>	Índice de actividad
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>CE</b>	Concentración efectiva
<b>Rf</b>	Ratio front
<b>ZI</b>	Zona de inhibición

---

## RESUMEN

En este estudio se determinó la actividad biológica de extractos vegetales de plantas endémicas del Estado de Puebla a las cuales se les atribuye popularmente un efecto antifúngico. Se evaluó la actividad antifúngica de *Equisetum hyemale*, *Aloysia triphylla* y *Anagallis arvensis*, de las cuales se produjeron nueve extractos vegetales utilizando agua, etanol y éter de petróleo como disolventes de extracción, sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*, *Rhizopus spp*, *Mucor spp* y *Fusarium spp*.

La obtención de los extractos etanólicos y oleosos se realizó por el método de Soxhlet mientras que los extractos acuosos se prepararon por la técnica de decocción. Para evaluar la actividad antifúngica de los diferentes extractos vegetales se utilizaron las técnicas de Difusión en agar y bioautografía directa y se determinó únicamente en los extractos con mayor actividad biológica el IA y CMI, se utilizó agua estéril como control negativo y Dithane® como control positivo.

Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus spp*, (CMI: 2.4mg/pozo; IA: 1.11) *Mucor spp* (CMI: 2.4mg/pozo; IA: 0.93), y *Aspergillus flavus* (CMI: 1.8mg/pozo; IA 0.99). Mientras que el extracto oleoso de *Aloysia triphylla* mostró acción antifúngica frente a *Rhizopus spp*. Ningún extracto inhibió el crecimiento de *Fusarium spp*, por otra parte los extractos de *Equisetum hyemale* no tuvieron actividad sobre ninguna cepa fúngica evaluada en esta investigación. Se realizó bioautografía directa al extracto etanólico de *Anagallis arvensis* y se encontró que la fracción orgánica V, es la zona que presentó inhibición del crecimiento micelial sobre *Mucor spp*. Se concluyó que de todas las especies estudiadas solo el extracto etanólico de *Anagallis arvensis* a menores concentraciones presenta mayor actividad antifúngica con respecto a Dithane® y el extracto oleoso de *Aloysia triphylla* solo es efectivo a altas concentraciones. La bioautografía permitió observar la fracción orgánica donde se presenta la zona de inhibición del crecimiento de *Mucor spp*. Este trabajo es importante ya que permite la realización de investigaciones futuras para el aislamiento, purificación y caracterización de la o las moléculas responsables de dicha actividad.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos atacan todos los cultivos y todas las partes de la planta, y causan considerables pérdidas económicas, tanto por el daño que causan como por el costo en que se incurre para combatirlos. Algunos hongos son muy importantes no por una enfermedad en un cultivo particular, sino porque atacan una gran variedad de cultivos. Tal es el caso de algunos hongos que causan enormes daños a las cosechas agrícolas como *Fusarium* spp, que se encuentra en los vegetales antes de la cosecha, es persistente en los productos almacenados (si la actividad del agua lo permite) crecerán causando alteraciones y a veces produciendo toxinas. Otros hongos importantes como *Rhizopus* spp y *Mucor* spp, causante de podredumbres en almacenamiento de muchas especies de frutas y hortalizas, y *Aspergillus flavus*, que ataca granos almacenados y los contamina con aflatoxinas, sustancias tóxicas a humanos (Lacey, 1989; Arauz, 1998).

Las plantas, tanto en su ambiente natural como en ambientes de cultivo, necesitan defenderse de condiciones adversas y enemigos naturales. Sin embargo, los cultivos agrícolas se han especializado en la producción de sustancias energéticas, reduciendo su capacidad para defenderse. De esta manera se genera una dependencia de recursos externos para su protección contra animales, malezas y microorganismos fitopatógenos (FAO, 2004).

En la búsqueda de nuevos controladores de enfermedades, los productos naturales pueden llegar a ser fuente de compuestos fungicidas o fungistáticos amigables con el ambiente. Los extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios son una fuente botánica de compuestos alternativos a los fungicidas usados actualmente (Lee *et al.*, 2007; Abad *et al.*, 2007).

Considerando la importancia de los extractos vegetales como alternativa para el control de hongos fitopatógenos, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antifúngico de los diferentes extractos de *Equisetum hyemale*, *Aloysia triphylla* y *Anagallis arvensis* sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Fusarium* spp.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Efectos indeseables de los agroquímicos

Los plaguicidas son compuestos químicos utilizados extensivamente en todo el planeta, lo que resulta en una exposición continua de la población a partir de diferentes fuentes tales como alimentos, el agua y el suelo. Aún cuando el efecto tóxico de los plaguicidas está dirigido a organismos específicos, estos compuestos se encuentran en gran cantidad en el ambiente, lo que constituye una amenaza grave a la salud pública (Alavanja *et al.*, 2004).

Es común que cuando comienza a usarse un nuevo pesticida, los resultados obtenidos sean muy prometedores, consiguiéndose controlar a las plagas con poca cantidad de producto. Sin embargo, al cabo de un cierto tiempo suelen empezar a surgir problemas, tales como resistencia genética, alteraciones en los ecosistemas, inducción de la aparición de nuevas plagas, acumulación en la cadena trófica (bioacumulación), movilidad en el ambiente, riesgos para la salud humana, entre otros (Enriquez, 2003).

Por estas razones se han considerado a las plantas como un campo apropiado para la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y con potencial para el control de plagas agrícolas, dando origen a nuevas e interesantes líneas de investigación en los países de América Latina (Kumul, 1983).

### 2.2 Utilización de extractos de plantas como antifúngicos

Las plantas producen compuestos como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos (fundamentalmente ácidos fenólicos y sus esteres y algunos flavonoides, como la catequina), con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades como antracnosis, mildew polvoso, royas entre otras, la obtención de los extractos vegetales y el estudio de los compuestos activos propician su empleo contra diferentes fitopatógenos y plagas incluyendo thrips, *Colaspis* sp, *Collaria* sp, ácaros, nemátodos, hongos y bacterias. En condiciones *in vitro* los extractos inhiben el crecimiento del patógeno, así como la

esporulación y germinación de esporas de modo que ayudan a controlar algunas enfermedades de frutos y hortalizas *in vivo*. El efecto fungicida de los extractos vegetales varía en función a la metodología de preparación (solvente, seco, fresco, hojas, semillas, etc.) fecha de cosecha etc. Sin embargo la combinación de extractos vegetales con algún otro compuesto natural puede potenciar su actividad fungicida (Hernández *et al.*, 2007).

Investigaciones han demostrado actividad biológica de extractos de algunas especies de plantas sobre el crecimiento de microorganismos patógenos (Cuadro 1), gran parte de estas evaluaciones se basan en el uso de extractos crudos (Ficker *et al.* 2003).

**Cuadro 1.** Espectro de acción de plantas contra géneros de hongos fitopatógenos.

Especie de planta	Géneros de hongos	Principios activos
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Alternaria, Botrytis, Colletotrichum, Helminthosporium, Cladosporium, Dreschlera, Fusarium, Monilia, Pyricularia, Pseudoperonospora, Claviceps, Glomerella, Ustilago, Uromyces.</i>	Alicina (dialiltiosulfinato)
<i>Allium cepa</i> L	<i>Alternaria, Botrytis, Ceratocystis, Colletotrichum, Fusarium, Verticillium, Uromyces.</i>	n-propil disulfuro
<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Ceratocystis, Cladosporium, Claviceps, Diplodia, Fusarium, Fusicladium, Giberella, Lentinus, Lenzites, Polyporus, Verticillium, Ustilago.</i>	Timol, carvacrol, á-pineno, limoneno, 1-8 cineol, linalol
<i>Avena sativa</i> L.	<i>Alternaria, Bipolaris, Ceratocystis, Colletotrichum, Ophiobolus, Rhizoctonia, Verticillium.</i>	Avenacina
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	<i>Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Dreschlera, Fusarium, Lentinus, Lenzites, Polyporus.</i>	Aldehido cinnámico, eugenol, camfor, ometilcinamaldehido
<i>Ricinus communis</i> L.	<i>Colletotricum, Fusarium, Rhizoctonia, Pythium, Sphaerotheca.</i>	Alcaloide (ricina)

(Grainge y Ahmed, 1988; Rai y Mares, 2003)

Estudios realizados por Ribeiro y Bendendo (1999) demuestran que extractos acuosos de bulbos de *Allium sativum*, hojas de *Mentha piperita*, hojas de *Ricinus communis* y frutos de *Capsicum* spp, mostraron actividad antifúngica en colonias aisladas de *C. gloeosporioides*. Otros experimentos sobre el uso de extractos vegetales, demuestran que los extractos de *Copaifera langsdorfii* produjeron un efecto inhibitorio del crecimiento de *C. gloeosporioides* y *Bipolaris sorokiniana* (Amorim *et al.*, 2004). *B. sorokiniana* constituye la fase anamórfica de *Cochliobolus sativus*, hongo causante del tizón o mancha foliar en trigo y cebada (Gilchrist *et al.*, 2005).

### 2.3 Extractos vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o las partes de una planta fresca o seca ( Ruiz y Susunaga, 2000).

Los extractos de muchas plantas contienen compuestos de bajo peso molecular, que inhiben el crecimiento de hongos *in vitro*. Estos compuestos se pueden encontrar en plantas sanas (compuestos preformados o fitoanticipinas) o se pueden encontrar en extractos de plantas que han estado expuestas a patógenos (fitoalexinas) (Osbourn, 1999). Dichos compuestos están involucrados en una multitud de funciones ecológicas entre ellas las interacciones planta-microorganismos (Kutchan, 1995).

### 2.4 Especies botánicas de estudio

México es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo, estimándose que tiene entre 23,000 y 30,000 especies de plantas de las cuales, se utiliza una mínima cantidad. Se presentan plantas a las cuales empíricamente se les ha dado una utilidad medicinal, en algunos casos contra problemas infecciosos de origen fúngico (Montes *et al.*, 2000).

En el Estado de Puebla, las plantas medicinales son utilizadas por sus habitantes principalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Hernández et al, 2003). Varias especies del género *Lantana* y *Lippia* se utilizan en la medicina popular en afecciones gastrointestinales, dermatológicas y respiratorias. Estudios realizados por Hernández et al., (2008) dan a conocer que *Lantana achyranthifolia* y *Lippia graveolens* presentan actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani*. Entre otras plantas que se han utilizado en la medicina tradicional contra algunos hongos de importancia médica se encuentran *Aloysia triphylla*, *Anagallis arvensis* y *Equisetum hyemale*. Por ello se plantea en esta investigación evaluar su actividad biológica contra otros hongos de importancia agrícola.

#### 2.4.1 *Aloysia Triphylla*

La *Aloysia triphylla*, pertenece a la familia de las Verbenáceas y es también conocida botánicamente con los nombres de *Lippia citriodora* Kunth, *Lippia triphylla* Kuntze, *Aloysia citriodora* Ortega. Es un arbusto pequeño que alcanza hasta 2 m de altura. Sus hojas son lanceoladas y rugosas, desprenden un intenso aroma a limón cuando se trituran, las flores son de color violeta pálido, que crecen en ramilletes (Chiej, 1983) (Figura 1). Popularmente, se le conoce como “Cidrón”, “Cedrón”, “Hierba Luisa”, “María Luisa” y “Hierba de la princesa” (Muñoz, 2002).



**Figura 1.** Tallos y hojas de *Aloysia triphylla* (Universidad de Antioquia, 2011).

Es cultivada en México; los cultivos pueden durar hasta 15 años y se ubican en lugares soleados o en semisombra; se ha observado, que la concentración de aceite esencial en las hojas aumenta con iluminación solar alta; y disminuye en las plantas que crecen bajo la sombra (Pomilio *et al.*, 1985). Los siguientes son los componentes presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, que muestran actividad biológica:

- Citral: antibacterial, fungicida.
- Linalol: antibacterial.
- Canfeno: antioxidante.
- $\alpha$ -Terpineol: antibacterial.
- trans- $\beta$ -Cariofileno: antibacterial.
- Limoneno: antibacterial.

La acción farmacológica de esta especie está relacionada fundamentalmente al aceite esencial, habiéndose informado actividad antiespasmódica, eupéptica, carminativa, antimicrobiana y analgésica local, entre otras (Gupta, 1995).

#### 2.4.2 *Equisetum hyemale*

El género *Equisetum*, perteneciente a la familia Equisetaceae, está constituido en la actualidad por 15 especies conocidas vulgarmente como “colas de caballo” (Hauke, 1993).

Las especies *Equisetum* pertenecen a las *Pteridophytes*, división que comprende plantas vasculares que se reproducen sólo por esporas, ya que carecen de semillas, flores y frutos (Figura 2).



**Figura 2.** *Equisetum hyemale* tallos y esporangios (Vasishta, 2006).

Una de las sustancias utilizadas por muchos agricultores para el combate de hongos fitopatógenos, es el extracto de *Equisetum* spp (conocido como platero, rabo de mula, equisetum o cola de caballo). Esta planta contiene ácido silícico en proporciones hasta de 65 % lo cual le confiere al extracto, propiedades fungicidas e insecticidas. El *Equisetum* aplicado foliarmente penetra la epidermis aumentando la resistencia a hongos como tizones y cenicillas (Solórzano, 1989).

#### 2.4.3 *Anagallis arvensis*

Es una hierba anual, de 10-70 cm de alto; tallos decumbentes, tetraédricos, hojas opuestas, decusadas, algunas veces verticiladas, sésiles, ovadas a escasamente lanceoladas. Flores axilares, solitarias, pedicelos inclinados, recurvados y acrescentes en los frutos, pétalos connados en la base, caducos, de color anaranjado con la base azul, o azules, obovados, estambres con filamentos azulosos en la parte superior y blanquecinos en la inferior, filiformes (Figura 3). Fruto de color moreno claro, de 2-6 mm de diámetro, con 5 valvas; semillas numerosas, de 0.8-1 mm de largo de color moreno oscuro (Hernández, 1987).



**Figura 3.** Flor de *Anagallis arvensis*  
(DiTomasi y Healy, 2007).

Esta especie está ampliamente distribuida en todas las zonas templadas del mundo; en México está bien representado en casi todo el Territorio Nacional (Hernández, 1987).

De la planta completa se han realizado estudios para determinar algunos de sus compuestos químicos de los cuales se han aislado los triterpenos beta-amirina, anagalligenina, anagalligenona, *Anagallis arvensis* saponina 2, anagallósidos A, B y C, arvenín I, II, III y IV, y cucurbitacina B, D, E, J, L y R; los esteroides estigmasterol y beta-sitosterol y el flavonoide rutín (Heitz, 1969).

### 2.5 Hongos fitopatógenos

Más de 8 000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótropos. Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose

tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (como por ejemplo los parásitos no obligados) (Agris, 1996).

#### 2.5.1 Especies fúngicas de importancia agrícola

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año. El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. En cuanto a las pérdidas económicas, éstas pueden ser de tipo cuantitativo y/o cualitativo (sabor, textura, color y forma) (Ashworth *et al.*, 1981).

Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una variedad de productos, siendo los más comunes especies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (Juárez *et al.*, 2010).

##### 2.5.1.1 *Aspergillus flavus*

La mayoría de las pudriciones o deterioro de los granos y leguminosas después de la cosecha, durante su almacenamiento y transporte, son causados por varias especies del hongo *Aspergillus* (Agris, 1996).

*Aspergillus*, en particular *A. flavus* infecta con frecuencia a los cacahuates y granos de maíz cuando están aún en el campo, *A. flavus* y otros hongos de almacén, al invadir los embriones de las semillas, hacen que disminuya notablemente el porcentaje de germinación de las semillas infectadas que se utilizan para siembra o en cebada maltera (Agris, 1996).

##### 2.5.1.2 *Fusarium* spp

Las especies del género *Fusarium*, son un importante grupo de agentes fitopatógenos que afectan a todo tipo de hortalizas, tanto anuales como perennes, árboles frutales, flores e incluso malezas (Agris, 1996).



Los síntomas que producen las especies del género *Fusarium* pueden confundirse con otros agentes fitopatógenos tanto fungosos como bacterianos (Alexopoulos *et al.*, 1996). *Fusarium* puede afectar en distintas etapas del desarrollo de la planta y en distintas zonas de ella (Figura 4). En la emergencia de la plántula, los representantes de éste género pueden interferir taponando el cuello de la planta, produciendo la falla de la emergencia. En la planta ya desarrollada, los problemas más comunes son la marchitez vascular y la pudrición seca de túberos (Agrios, 1996).



**Figura 4.** *Fusarium* sp, afectando diferentes etapas de desarrollo en diferentes plantas. A) espiga de gramínea afectada. B) cultivo de cereal dañado. C) mazorca afectada con toxinas. D) hojas de maíz anormales. E) comparación entre plántula normal y enferma. F) planta de algodón con marchitez vascular (Almonacid, 2005).

#### 2.5.1.3 *Rhizopus* spp

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza por lo común, vive como un organismo saprofita y en ocasiones como parásito débil de órganos almacenados de plantas. El micelio del hongo carece de septas y produce esporangióforos largos aéreos que en sus puntas forman esporangios esféricos

pequeños. Cuando el micelio se desarrolla sobre una superficie produce estolones, es decir, hifas que se adaptan a la superficie y en el siguiente punto de contacto con la superficie, produce tanto hifas en forma de raíz (denominadas rizoides) que se desarrollan en dirección de esa superficie, como un mayor número de esporangióforos aéreos que producen esporangios (Agrios, 1996).

*Rhizopus* y en ocasiones *Mucor*, afectan a las hortalizas y frutos carnosos después de haberlos cosechado y también a los granos y leguminosas (Agrios, 1996).

#### 2.5.1.4 *Mucor* spp

*Mucor* es un género muy común y extendido en la naturaleza, que se producen en los suelos, vegetación en descomposición, el estiércol y muchos otros hábitats húmedos donde rápidamente los hongos en crecimiento tienen una ventaja. A diferencia de *Absidia*, los esporangios de *Mucor* tienen la columela totalmente dentro de la pared del esporangio. A diferencia de las especies de *Rhizopus*, *Mucor* no produce rizoides. Las esporangiosporas miden más de 5 µm y disponen de paredes lisas o espinosas, pero no estriadas. Esto está en contraste con las especies de *Rhizopus*, que comúnmente producen esporangiosporas con paredes estriadas. Al menos 20 especies de *Mucor* se han registrado en los alimentos. Cinco parecen ser más significativos: *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. piriforme*, *M. plumbeus* y *M. racemosus* (Pitt y Hocking, 2009).

Estos hongos disminuyen considerablemente los cultivos agrícolas y una alternativa para su control es el uso de compuestos de extractos vegetales como control biológico. Para evaluar la eficacia de un extracto se utilizan algunas técnicas como son el método de bioautografía directa, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), fraccionamiento biodirigido entre otras, destaca el método de bioautografía por su rapidez y confiabilidad.

## 2.6 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se llama concentración mínima inhibitoria a la cantidad mínima de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. A continuación se enlistan algunos métodos disponibles actualmente para evaluar que permiten determinar la CMI:

- a. *Métodos de dilución en caldo*: constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad in vitro, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden CIM a distintos fármacos antifúngicos, como anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol.
- b. *Método de difusión en disco*: este método consiste en el cultivo de los agentes patógenos en medios apropiados para su crecimiento, en el cual se colocan antibióticos en discos dependiendo de la concentración del antibiótico en este y de la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano, da como resultado zonas donde el crecimiento es inhibido luego de varias horas de incubación.
- c. *Métodos comerciales (Etest®)*: Es un método simple, que involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite determinar la CIM.
- d. *Otros métodos disponibles para medir susceptibilidad antifúngica*: determinación de curvas de muerte, citometría de flujo y cuantificación de ergosterol, los cuales, debido a su mayor complejidad, se realizan en laboratorios de referencia o altamente especializados en el tema (Tapia, 2009)

## 2.7 Método de Bioautografía

La bioautografía ha sido considerada como el ensayo más eficiente para la detección de componentes antimicrobiales, porque esta permite la localización de la actividad en un complejo matriz y por lo tanto permite la separación de los constituyentes activos. El ensayo de bioautografía puede dividirse en tres grupos:

- a. *bioautografía directa*: Donde los microorganismos crecen directamente sobre la capa fina cromatográfica.
- b. *bioautografía de contacto*: Donde los componentes antimicrobiales son transferidos de la fina capa cromatográfica y son inoculados en una caja de agar a través de contacto directo.
- c. *bioautografía cubierta de agar o inmersión de bioautografía*: Es donde el medio de agar sembrado es aplicado encima de la fina capa cromatográfica (Manrique y Mosquera, 1997).

Este método consiste en incluir los cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa fina en un medio de cultivo. Para ello se utilizan placas cromatográficas de sílica gel o de celulosa las cuales se colocan en las cajas petri correspondientes. Previamente se procede a eliminar el disolvente para evitar falsas bandas de inhibición (Manrique y Mosquera, 1997).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, la mayor parte de la población rural se dedica a la agricultura y es de ella de la que obtienen los ingresos para subsistir. Los hongos fitopatógenos constituyen una de las causas más importantes de pérdidas económicas para este sector, ya sea que infecten las plantas antes de la cosecha o durante el almacenamiento de frutas y granos.

El uso de los agroquímicos puede acarrear diferentes problemas, entre los que destacan la toxicidad en humanos, detenciones de exportaciones por residuos en productos, daños al medio ambiente y efectos perjudiciales en organismos benéficos. Además, los fitopatógenos podrían desarrollar resistencia a ingredientes activos de los fungicidas sintéticos, requiriendo el uso de altas dosis y la búsqueda de nuevos agroquímicos para reemplazar a los que han mostrado resistencia en hongos.

Por todo esto es necesario desarrollar alternativas naturales para el control de enfermedades. Una de estas estrategias es el uso de extractos vegetales y/o aceites esenciales. Además de que son de origen biológico, son biodegradables y manifiestan un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el ambiente. De tal manera, en el presente trabajo se consideraron aspectos para buscar una alternativa de manejo utilizando insumos de menor impacto ambiental, pero con alta efectividad, para integrarla a las prácticas del manejo de diferentes hongos fitopatógenos de interés agrícola como son *Fusarium* spp, *Rhizopus* spp, *Mucor* spp y *Aspergillus flavus*.

## 4. OBJETIVOS

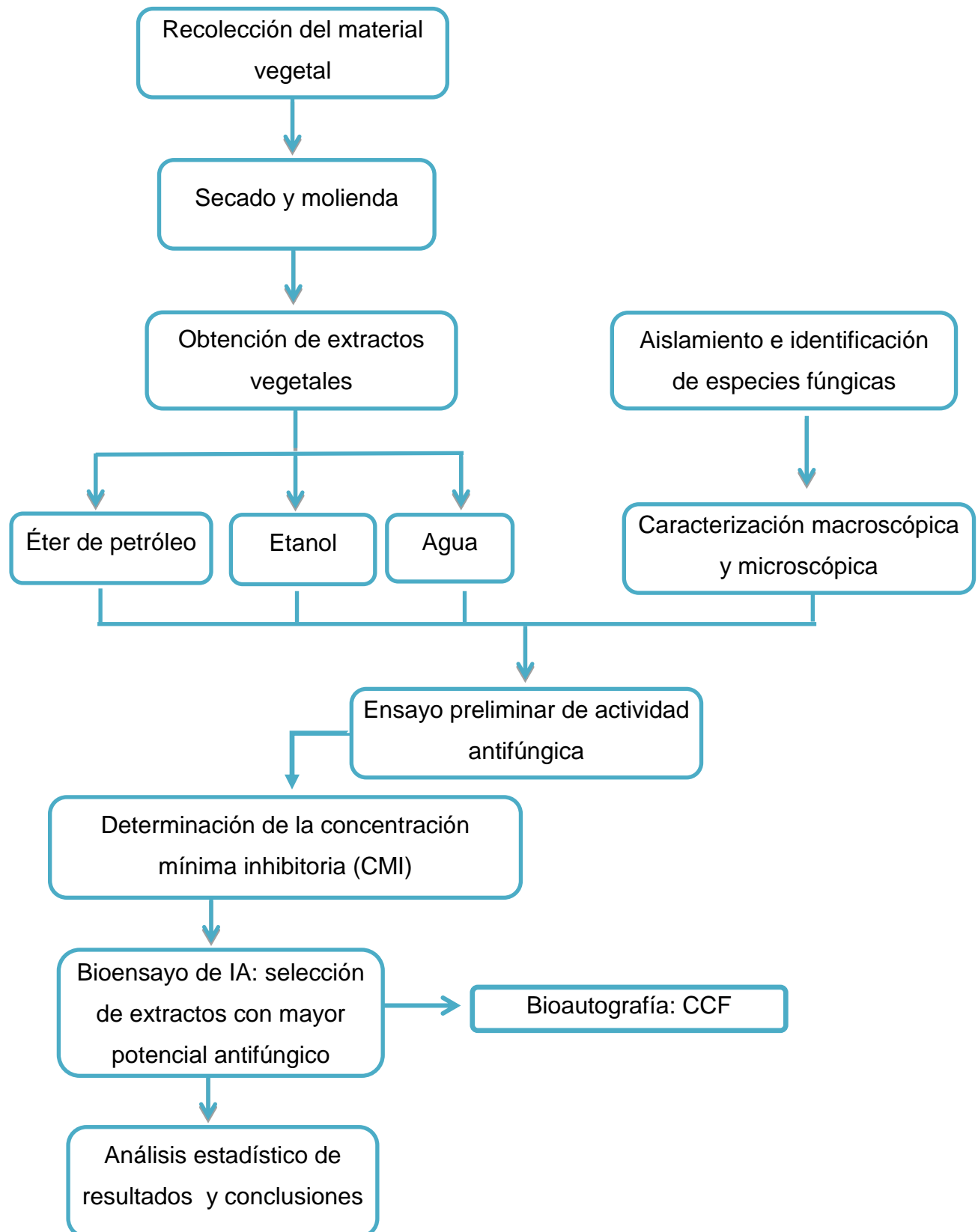
### 4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos crudos de *Anagallis arvensis*, *Aloysia triphylla* y *Equisetum hyemale* frente a *Fusarium* spp, *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp, hongos de interés agrícola.

### 4.2 Objetivos particulares

- I. Obtener extractos crudos de las plantas de estudio empleando diferentes solventes.
- II. Aislamiento e identificación de especies fúngicas.
- III. Determinar los extractos que presenten actividad antifúngica mediante una prueba preliminar.
- IV. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos.
- V. Evaluar el índice de actividad antifúngica de los extractos obtenidos por medio de bioensayos con las técnicas de difusión en agar con discos y pozos sobre *Fusarium* spp, *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp.
- VI. Realizar un ensayo biodirigido para el extracto que presente mayor actividad antifúngica por el método de bioautografía.

## 5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

- Material de vidrio y reactivos de grado analítico necesarios para cada determinación.
- Los ensayos se realizarán en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

### Material biológico

- Cepas puras de: *Fusarium* spp, *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp.
- Material vegetal: *Aloysia triphylla*, *Anagallis arvensis* y *Equisetum hyemale*.

**Cuadro 2.** Cuadro de equipos

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	Explorer E001140
Estufa	Boekel	CCC 1.4 <sup>a</sup>
Molino	KRUBS	GX4100
Microscopio	Carl Zeiss	1061-030 (40x)
Autoclave	único	Turbo Mixer
Vortex	Cisa	3558
Lámpara de luz UV	Steren	SEG-050
Campana de flujo laminar vertical	SEV	CFLV-102



**Cuadro 3.** Cuadro de métodos

Determinación	Método	Referencia
Obtención del extracto vegetal	Soxhelt	Sanabria, 1983; Villar <i>et al.</i> , 1990.
	Decocción	González, 2004.
Evaluación de la actividad antifúngica	Difusión en agar con discos y pozos	Sen y Batra, 2012.
	Bioautografía	Moreno, 2011.
Conteo de esporas	Cámara de Neubauer	Cañedo y Ames, 2004.
Aislamiento e identificación de hongos	Microcultivo	Agrios, 1996. Prats, 2005.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Obtención del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó en el municipio de Vicente Guerrero en la parte sureste del Estado de Puebla, en donde se obtuvieron tallos de *E. hyemale*, hojas de *A. triphylla* y planta completa de *A. arvensis*. Se envió un ejemplar de cada especie al Herbario Botánico de la BUAP para su identificación taxonómica.

### 7.2 Secado y molienda

Se dejó secar el material vegetal en el sol durante cinco días, posteriormente se retiró el resto de la humedad con la ayuda de una estufa a una temperatura de 40°C durante 4 horas y después se pulverizaron en un mortero de porcelana, para tener una mejor superficie de contacto y llevarla al proceso de extracción.

### 7.3 Obtención de los extractos vegetales

A partir de 20 g de la muestra seca y molida se sometió a extracción en un equipo Soxhlet, con etanol como solvente orgánico polar (Sanabria, 1983). Se utilizaron 200 ml de disolvente, el extracto obtenido se concentró y secó en el Soxhlet, de igual forma se obtuvo el extracto con éter de petróleo.

En relación a los extractos acuosos se obtuvieron con la técnica de decocción, cuya preparación consiste en añadir el tejido vegetal fresco o seco al agua hervida (caliente) y evaporar el solvente para concentrarlo. La preparación se filtró para separar los sólidos y conservar únicamente los líquidos.

### 7.4 Aislamiento de hongos y microcultivo

El aislamiento de las cepas fúngicas se realizó a partir de muestreos ambientales (Agrios, 1996). El microcultivo se realizó con la técnica descrita por Prats (2005).

### 7.5 Identificación de hongos

La identificación se llevó a cabo por el aspecto de las colonias y, fundamentalmente, por la morfología microscópica del micelio, de las esporas y de las estructuras en las que se forman, que suelen ser características de género o incluso especie (Prats, 2005).

### 7.6 Ensayo preliminar de actividad antifúngica

Se realizó un ensayo preliminar utilizando la técnica de difusión en agar con disco. Se utilizaron placas de agar papa dextrosa (PDA) a las cuales se inocularon masivamente con la suspensión de esporas de las especies fúngicas. En la superficie del medio se colocaron cuatro discos de papel filtro impregnados con 20µL del extracto concentrado. Se uso Dithane® como control químico positivo (principio activo etilenbisditiocarbamato) debido a que es un fungicida de amplio espectro, con acción de contacto y que es utilizado para el combate de diversos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* entre otros (Doubrava y Blake 2007).

Se incubaron durante cinco días a una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La evaluación se realizó después del periodo de incubación y se seleccionaron aquellos extractos en los cuales se observaron halos de inhibición. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

### 7.7 Preparación del inóculo microbiano

Se emplearon las cepas: *Aspergillus flavus*, *Mucor* spp y *Rhizopus* spp. Todos los hongos fueron cultivados en PDA a una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por cinco días. Posteriormente se preparó una suspensión de esporas, 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 (Cañedo y Ames, 2004).

### 7.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para esta determinación se utilizaron únicamente los extractos en los cuales se presentó inhibición del crecimiento micelial de las especies fungicas. Se prepararon placas de PDA, para los extractos polares se uso la técnica de difusión en agar con pozos y para los extractos no polares se realizó la técnica de difusión en disco a las que se les agregó 20µL de los extractos a diferentes concentraciones de 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 mg/ml equivalentes a 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.6, 4.8, 6 y 7.2 mg/pozo. Se utilizaron testigos del crecimiento del hongo en placas con PDA a las que se les agregó 20 µL de agua destilada estéril en cada pozo y 20 µL de éter de petróleo en cada disco. Cada placa fue inoculada con 10 µL de una solución de esporas (para la concentración véase Anexo A) y se incubaron a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 5 días, y se determinó la CMI evaluando el crecimiento o la ausencia del crecimiento del hongo. Para determinar la concentración efectiva (CE) de Dithane® contra cada cepa fúngica se prepararon soluciones a concentraciones de 10, 30, 50, 70, 100, 300, 500 y 800 mg/ml y se agregó en cada pozo 20µL de cada solución equivalentes a 0.2, 0.6, 1, 1.42, 6, 10 y 16 mg/pozo; se consideró como Concentración Efectiva (CE) la menor concentración que presentó inhibición.

### 7.9 Índice de actividad antifúngica (IA)

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 estas placas. En cada pozo se agregaron 20µL de la CMI del extracto correspondiente y las placas se incubaron a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se realizó la misma técnica utilizando como control químico Dithane® en su CE para cada hongo. El diámetro de la zona de inhibición (mm) se midió y se calculó el índice de actividad antifúngica. Para los extractos oleosos esta determinación se realizó por el método de difusión en disco. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey para un nivel de significancia  $P \leq 0.05$ , usando el programa estadístico Minitab® 15.1.30.0.

#### 7.10 Bioautografía en cromatografía en capa delgada

Para realizar la bioautografía directa en capa delgada, se utilizaron cromatofolios de TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Aluminium sheets 20 x 20 cm Merk®, las cuales se dividieron en fragmentos de 10 x 4 cm y fueron sembrados con el extracto a una concentración de 180 mg/ml. Para correr la cromatografía se utilizó una mezcla de solventes (Cloroformo-etilacetato-metanol-agua: 15:10:22:10). Los cromatofolios fueron secados a temperatura ambiente para remover los solventes y el revelado se hizo mediante luz UV. Se eligió *Mucor* spp para inocular la placa debido a que su micelio crece muy uniforme y abundante lo que permite mejor la observación de los halos de inhibición. Se preparó una suspensión de esporas de *Mucor* spp siguiendo la metodología descrita por Moreno-López en 2011. Los cromatofolios se incubaron en cámara húmeda durante 5 días. Concluido este tiempo se realizó la evaluación por medio de la observación de la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición sobre los cromatofolios. El ensayo se realizó por triplicado.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Rendimientos de extracción

Los rendimientos para los distintos extractos por cada 100 gramos de muestra seca fueron diferentes para cada extracto. La extracción con etanol fue más eficiente que la extracción con agua y éter de petróleo. El rendimiento obtenido en los extractos etanólicos fue superior a los oleosos y de agua (Cuadro 4). Cabe destacar que estos resultados pueden variar en función de la planta, morfología, región de cultivo, condiciones ambientales tipo de disolvente empleado (Lizcano y Vergara, 2008).

**Cuadro 4.** Rendimientos de extracción de las diversas plantas con etanol, éter de petróleo y agua

Extractos	Etanol (mg/100g)	Éter de petróleo (mg/100g)	Agua (ml/100g)
<i>A. triphylla</i>	2727.3	807.6	5.2
<i>A. arvensis</i>	2498.9	154.9	5
<i>E. hyemale</i>	1858.8	264.8	5

### 8.2 Aislamiento e identificación de cepas fúngicas

A partir de placas con PDA de muestreos ambientales se seleccionaron las colonias cuya morfología colonial coincidiera con las reportadas para *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp, *Mucor* spp y *Fusarium* spp. Se aislaron e identificaron las cepas de interés para este trabajo comparando las características macroscópicas y microscópicas observadas con los criterios expuestos por Bonifaz en 2012 y Arenas en 2011.

## ***Aspergillus flavus***

- Características macroscópicas de la colonia: Crecimiento lento, color verde amarillento, con un halo micelial blanco; plana, polvosa y aterciopelada. Reverso no pigmentado
- Micromorfología: micelio macrosifonado, septado y hialino, microconidios redondos; cabeza aspergilar compuesta por conidióforos largos, vesícula redonda de donde nacen las fiálides (Figura 5).

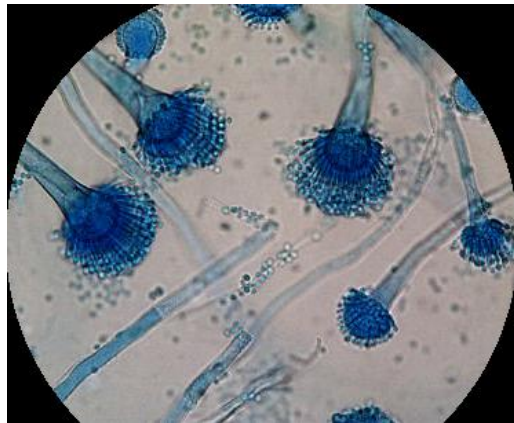


Figura 5. Micromorfología de *Aspergillus flavus*. (Azul de algodón, 40X)

La cepa de *Aspergillus flavus* fue perdiendo la pigmentación con cada resiembra. En las primeras resiembras presentó un color verde-amarillento y en las posteriores se observó una tonalidad amarillo claro. Debido a esto se realizó una observación microscópica de las colonias no pigmentadas con azul de algodón en la que se apreció la misma micromorfología de la cepa original. Esto se debe a que con cada transferencia incrementa la posibilidad de mutación con pérdida de las características del organismo (Ángel- Alarcón, 2006).

## ***Fusarium spp***

- Características macroscópicas de la colonia: crecimiento rápido, en un inicio es blanca, después de cinco días se torna color rosa claro,

vellosa-seca, se adhiere a las paredes del tubo; presenta pigmento violeta.

- Micromorfología: micelio macrosifonado, septado y hialino; macroconidios y microconidios fusiformes, presenta conidióforos delgados (Figura 6).



Figura 6. Micromorfología de *Fusarium* spp. (Azul de algodón, 40X).

### ***Mucor* spp**

- Características macroscópicas de la colonia: crecimiento rápido, tamaño ilimitado, tiende a llenar los tubos y cajas Petri; en un inicio es blanca, posteriormente toma una tonalidad blanco-grisácea; vellosa-algodonosa, seca; no presenta pigmentos.
- Micromorfología: micelio macrosifonado, cenocítico y hialino; esporangiosporas o endosporas. Presenta esporangióforos ramificados, esporangios grandes, esféricos y sin apófisis, con columela bien desarrollada; las esporangiosporas son color café y globosas (7).





Figura 7. Micromorfología de *Mucor* spp.  
(Azul de algodón, 40X).

### ***Rhizopus* spp**

- Características macroscópicas de la colonia: crecimiento rápido, tamaño ilimitado, tiende a llenar los tubos y cajas Petri; en un inicio es blanco, tiempo después toma un color gris oscuro; vellosa-algodonosa y seca; reverso sin pigmentos.
- Micromorfología: micelio macrosifonado, cenocítico y hialino; presenta rizoides y estolones, esporangiosporas o endosporas redondas; esporangióforos largos, que nunca se ramifican y tiene una columela pequeña de forma ovoide; el esporangio es globoso con apófisis y columela muy marcados; las esporangiosporas son globosas u ovoides, hialinas (Figura 8).

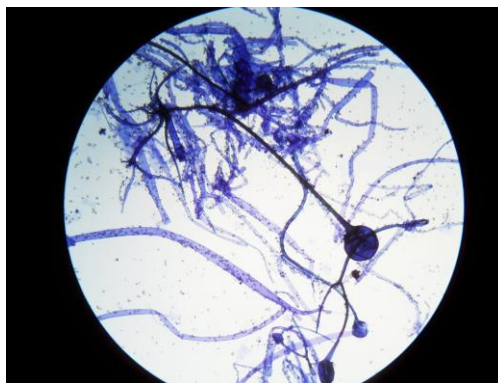
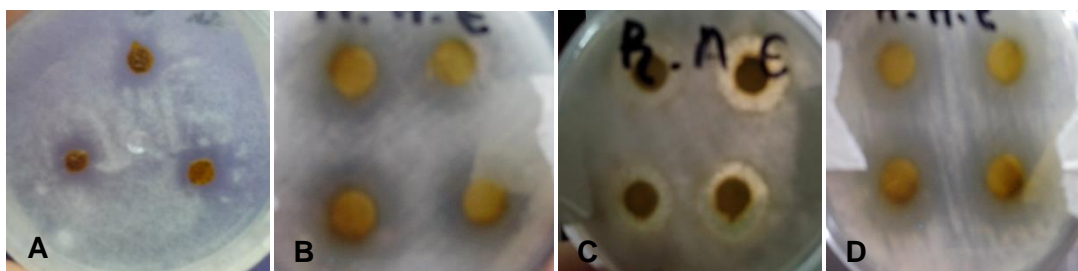


Figura 8. Micromorfología de *Rhizopus* spp.  
(Azul de algodón, 10X).

### 8.3 Ensayo preliminar

Usando los extractos concentrados solo el extracto etanólico de *A. arvensis* y el oleoso de *A. triphylla* presentaron efecto antifúngico. Como se observa en el cuadro 5, el extracto oleoso de *A. triphylla* presenta actividad contra *Rhizopus* spp. Por otra parte, se observó que el extracto etanólico de *A. arvensis* tiene actividad contra *Mucor* spp, *Rhizopus* spp y *Aspergillus flavus* (Figura 9). Según Montes en 2009 *A. arvensis* exhibe actividad contra los géneros *Fusarium* y *Rhizopus* sin embargo en este trabajo solo se observó inhibición con *Rhizopus* spp. Hasta la fecha no existen reportes de que *A. arvensis* tenga actividad contra *Mucor* spp y *Aspergillus flavus*, no obstante en esta investigación se encontró que estos hongos son sensibles al extracto etanólico. El género *Fusarium* comprende varias especies y estas presentan algunas diferencias en su genoma que pueden conferirle cierta resistencia a determinados compuestos. De esta forma algunas especies pueden tener diferentes grados de sensibilidad. Existen reportes de que el género *Equisetum* es utilizado para el control de tizones (*Phytophthora infestans* y *Alternaria solani*) y cenicillas (*Oidium* sp, etc.) (Solórzano, 1989). Sin embargo *E. hyemale* no presentó acción antifúngica contra las cepas estudiadas en esta investigación.



**Figura 9:** Bioensayo preliminar. Placas con inhibición positiva: A) extracto oleoso de *A. triphylla* contra *Rhizopus* spp; B) extracto etanólico de *A. arvensis* contra *Mucor* spp; C) extracto etanólico de *A. arvensis* contra *Rhizopus* spp y D) extracto etanólico de *A. arvensis* contra *Aspergillus flavus*

Con base en los resultados obtenidos se puede deducir que los compuestos responsables de las propiedades antifúngicas son polares para el caso de *A.*

*arvensis* y no polares para *A. triphylla*. Debido a que ningún extracto tuvo actividad contra *Fusarium* spp, ya no se realizaron las siguientes pruebas con esta cepa.

**Cuadro 5.** Bioensayo antifúngico preliminar

MICROORGANISMO	<i>A. triphylla</i>			<i>A. arvensis</i>			<i>E. hyemale</i>		
	Etanol	Agua	Éter	Etanol	Agua	Éter	Etanol	Agua	Éter
<i>Mucor</i> spp	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i> spp	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> spp	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- no hay inhibición del crecimiento micelial  
+ Inhibición del crecimiento micelial

#### 8.4 Determinación de la CMI

El extracto etanólico de *A. arvensis* presenta una mayor acción contra *A. flavus* mostrando una CMI menor (1.8 mg/pozo) a diferencia de *Mucor* spp y *Rhizopus* spp que tuvieron la misma CMI (2.4 mg/pozo). Por otra parte, a pesar de que el extracto oleoso concentrado de *A. triphylla* presentó inhibición contra *Rhizopus* spp, a una concentración máxima de 7.2 mg/pozo no se observó inhibición del crecimiento micelial. Es posible que el compuesto responsable de la actividad se encuentre en proporciones muy bajas y debido a esto solo es eficiente cuando el extracto está concentrado. El producto químico Dithane® no contiene dosis recomendada para el control de estos de tal manera que se tuvo que determinar su CE (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos.

MICROORGANISMO	CMI (mg/pozo)		CE (mg/pozo)
	<i>A. arvensis</i> (etanol)	<i>A. triphylla</i> (éter)	Dithane®
<i>Mucor</i> spp	2.4	-----	1.4
<i>Rhizopus</i> spp	2.4	(-)	10
<i>Aspergillus flavus</i>	1.8	-----	1

(-) No presentó CMI a una concentración máxima de 7.2 mg/pozo

----- No se evaluó con esta cepa

Entre las plantas que presentan actividad contra *A. flavus* se encuentra gobernadora (*Larrea tridentata* L.) cuyo extracto hidroalcohólico tiene una CMI de 7 mg/ml (Moreno-Limón *et al*, 2011). *Phyllanthus amarus* inhibe el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* con CMI muy bajas (45.4 a 53.5 µg/ml) para extractos con diferentes solventes que van desde agua hasta éter de petróleo (Sen y Batra, 2012). El extracto etanólico de las hojas de *Satureja khuzestanica* tiene una CMI de 625 µg/ml contra *Mucor* (Sadeghi-Nejad *et al*, 2010). *A. arvensis* tiene una CMI menor a la gobernadora pero mayor a *Phyllanthus amarus* y *Satureja khuzestanica*, sin embargo cualquiera de estas plantas puede ser una alternativa prometedora para el control biológico de estos hongos fitopatógenos.

Cabe mencionar que en las placas testigo no se observó inhibición del crecimiento micelial en ningún caso, indicando que el éter de petróleo no interfiere con el crecimiento de los hongos.

### 8.5 Bioensayo e Índice de actividad antifúngica

Como se observa en el cuadro 7 el extracto etanólico de *A. arvensis* presenta una actividad menor a la del control químico en el caso de *Mucor* spp (IA: 0.93) y *Aspergillus flavus* (IA: 0.99). Estos resultados son esperados, pues el etilenbisditiocarbamato (compuesto activo del Dithane®) es un producto químicamente puro con cualidades antifúngicas y el extracto vegetal es un producto natural donde el compuesto activo con actividad antifúngica se encuentra diluido, mezclado con gran cantidad de otras sustancias que están presentes en la planta, por lo que su acción debe ser menor. Sin embargo, analizando los IA estos son muy cercanos a 1 lo que indica que la actividad antifúngica del extracto es equiparable a la del control químico. Con *Rhizopus* spp el extracto (IA: 1.11) es más eficiente que el control químico a pesar de estar a una concentración menor.

**Cuadro 7.** Índice de actividad antifúngica

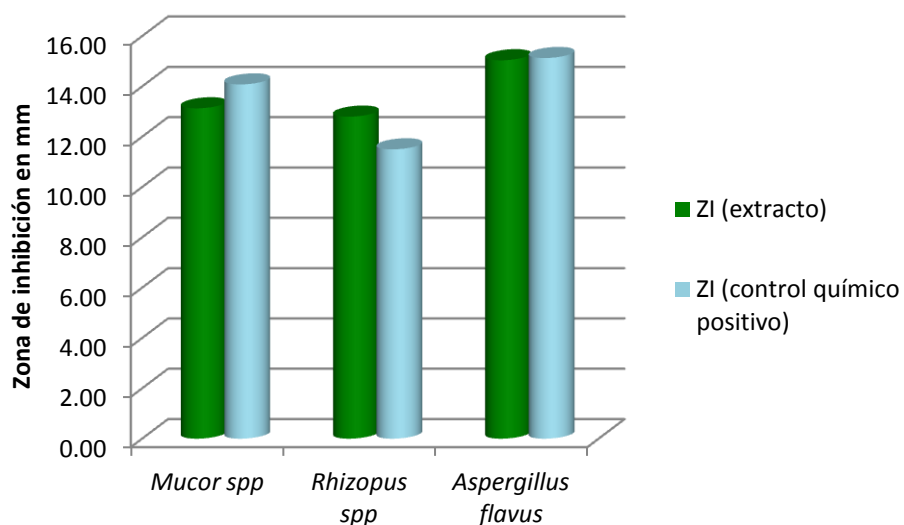
MICROORGANISMO	ZI (extracto)	ZI (control)	IA
<i>Mucor</i> spp	13.13	14.08	0.93
<i>Rhizopus</i> spp	12.80	11.50	1.11
<i>Aspergillus flavus</i>	15.04	15.13	0.99

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

Esto se observa mejor en el figura 10 que muestra la comparación de la media de las zonas de inhibición del control químico con el extracto.



**Figura 10.** Comparación de las zonas de inhibición del extracto etanólico de *A. arvensis* contra el control químico (Dithane®).

Existen en el mercado otros agroquímicos para el control de *A. flavus* como son de Carboxin, Captan, Pentacloronitrobenceno (PCNB) y Metiltiofanato (Smith *et al.*, 2000). El estudio realizado por Cavallo en 1993 indican que los agroquímicos Carboxin+Tiram y PCNB son eficaces para el control de *Rhizopus* sp., mientras que Tebuconazole y Carbendazim disminuyen la presencia de *A. flavus*. De acuerdo a los resultados presentados por Cavallo (2005), *A. flavus* y *A. niger* son totalmente controlados por Carboxin-Tiram + Carbendazim y Fosetil-Al-Folpet +

Carbendazim, mientras que *Rhizopus* sp. es inhibido ante la aplicación de Carboxin-Tiram+ Tolclofós metil y Carboxin-Tiram +PCNB además encontró que el fungicida Tebuconazole presenta un efecto desfavorable sobre la emergencia de plántulas de maní, ya que si bien ejerce cierto control de las colonias fúngicas presentes disminuye la calidad potencial de las semillas. Los antifúngicos sintéticos han producido contaminaciones que afectan al suelo, agua, aire y productos agrícolas, por la acumulación de residuos potencialmente dañinos a la salud humana y de los animales (Dinham y Malik, 2003). El uso del extracto etanólico de *A. arvensis* puede ser una alternativa viable para el control de estos hongos ya que al ser un producto natural no presenta los inconvenientes generados por los productos sintéticos.

Cada ensayo fue realizado por sextuplicado y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y no se observaron diferencias significativas entre cada repetición. Los resultados fueron confirmados con la prueba de comparación de medias de Tukey.

#### 8.6 Bioautografía

Esta prueba se realizó con el extracto etanólico de *A. arvensis* el cual presentó mayor actividad antifúngica. Para desarrollar la cromatografía se eligieron diferentes disolventes, los cuales fueron escogidos teniendo en cuenta la polaridad del disolvente utilizado para realizar el procedimiento de extracción. De esta forma se eligieron disolventes que van desde una polaridad media hasta el más polar.

Una vez separada la muestra en el cromatofolio se reveló mediante luz UV se pudieron apreciar cinco fracciones orgánicas (Figura 11). Los RF de cada fracción se presentan en el cuadro 8.

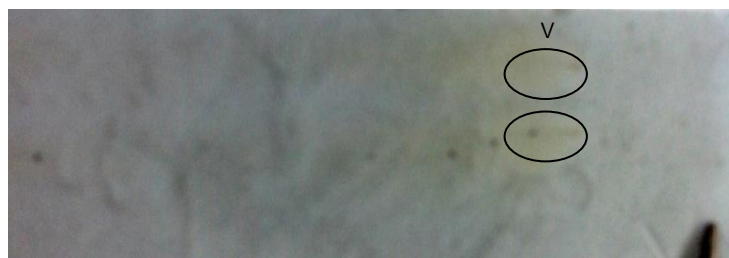
**Cuadro 8.** Fracciones orgánicas obtenidas en la CCF

Fracción	RF
I	0.19
II	0.67
II	0.75
IV	0.83
V	0.89



**Figura 11:** Revelado del cromatofolio donde se observan las 5 fracciones orgánicas obtenidas del extracto etanólico de *A. arvensis*

Una vez finalizados los días de incubación se observó inhibición del crecimiento micelial en la fracción orgánica V (Rf= 0.89) determinándose que es en esta fracción donde se encuentran los compuestos responsables de la actividad antifúngica sobre *Mucor* spp (Figura 12 y Cuadro 9). Para visualizar mejor la zona de inhibición se realizó un revelado con vapores de Yodo el cual permitió observar el micelio con una tonalidad amarillo tenue. Aunque se presentó un halo de inhibición con *Mucor* spp, no es una prueba concluyente de que esta sea la única fracción responsable de la actividad antifúngica sobre *A. flavus* y *Rhizopus* spp.



**Figura 12:** Bioautografía. Obsérvese la zona de inhibición en la fracción orgánica V.

**Cuadro 9.** Resultados de la bioautografía

Fracción	RF
I	-
II	-
II	-
IV	-
V	+

- no hay inhibición del crecimiento micelial  
+ Inhibición del crecimiento micelial

Entre los compuestos polares que se han aislado de los extractos metanólicos de *A. arvensis* se encuentran saponinas, alcaloides y compuestos fenólicos (Khoshkholgh-Pahlaviani *et al*, 2013). Posiblemente alguno de estos compuestos sea responsable de la actividad biológica con *Mucor* spp.



## 9. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Anagallis arvensis* tiene la mayor actividad antifúngica siendo efectivo con 3 de las 4 cepas estudiadas con una CMI de 1.8 mg/pozo para *Aspergillus flavus* y 2.4 mg/pozo para *Mucor* spp y *Rhizopus* spp.
- El extracto oleoso de *Aloysia triphylla* solo presenta actividad antifúngica contra *Rhizopus* spp utilizando el extracto puro.
- El extracto etanólico de *Anagallis arvensis* tiene una eficiencia equiparable al producto químico Dithane® al presentar un índice de actividad cercano a 1 para *Mucor* spp y *Aspergillus flavus* en el caso de *Rhizopus* spp el IA es mayor a 1 lo que indica que el extracto es más efectivo para el control de esta cepa.
- La bioautografía reveló que la fracción V contiene el o los compuestos responsables de la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* sobre *Mucor* spp.

## 10.RECOMENDACIONES

- Evaluar los extractos con cepas diferentes a las estudiadas en esta investigación.
- Evaluar los extractos contra bacterias fitopatógenas.
- Utilizar otros disolventes para extracción para comparar y optimizar rendimientos.
- Obtener extractos de *Anagallis arvensis* de diferentes partes de la planta para identificar en cuál de ellas se encuentran en mayor cantidad los compuestos activos.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vivo* del extracto etanólico de *Anagallis arvensis*.
- Utilizar otro control químico para evaluar los extractos.
- Aplicar el método de Bioautografía con *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* spp.
- Analizar la fracción V del extracto etanólico de *Anagallis arvensis* para identificar los compuestos activos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M; Ansuategui, M; Bermejo, P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. ARKIVOC. p. 116-145.
- Agrios, G. 1996. Fitopatología. 2 ed. México: Limusa. pp. 273, 285-290, 334, 458, 459, 838.
- Alavanja, M; Hoppin, J; Kamel, F. 2004. Health effect of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. Annu. Rev. Public Health 25: 155-197.
- Alexopoulos, C; Blackwell, M; Mims, C. 1996. Introductory mycology. 4ta Ed. USA: John Wiley and Sons. pp. 869.
- Almonacid, P. 2005 Identificación de cepas patógenas de *Fusarium* causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Agrarias Escuela De Agronomía. pp. 12
- Ángel, D. 2006. Evaluación de técnicas de conservación para hongos Filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. pp. 22.
- Amorim, A; Cardoso, M; Pinto, J; Souza, P; Filho, N. 2004. Fungitoxic activity avaluation of the hexane and methanol extracts of copaiba plant leaves *Copaifera langsdorffi* Desfon. Ciência e Agrotecnologia 28(2): 316-324.
- Arauz, L. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 1ª edición. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. pp. 105.
- Arenas, R. 2011. micología médica ilustrada. 4 ed. México: McGraw-Hill. pp. 254, 326-328 y 269.
- Ashworth, L; Huisman, O; Weinhold, A; Hancock, J. 1981. Estimating Yield Losses Caused by Soil-Borne Fungi. In: Crop Loss Assessment Methods. Supplement 3. Chiarappa, L. (ed.) p. 91-95. FAO. CAB. England, U. K.
- Bonifaz, A. 2012. Micología médica básica. 4 ed. México: McGraw-Hill. pp. 62, 63, 68, 70 y 71.

- Cañedo, V; Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).pp. 62.
- Cavallo, A. 1993. Flora Fúngica transportada por semilla de maní (*Arachis hypogaea* L.). Su efecto sobre la calidad y su control. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. pp. 83.
- Cavallo, A; Novo R; Pérez, M. 2005. Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) en la Argentina. AGRISCIENTIA. VOL. XXII (1): 9-16.
- Chiej, R. 1983. Guía de plantas medicinales. Barcelona: Grijalbo. pp. 456.
- Doubrava, N; Blake H; Keinath A. 2007. Cucumber, squash, melon and other cucurbit diseases. Consultado el 22 de julio de 2014. Disponible en: [http://www.clemson.edu/extension/hgic/pests/plant\\_pests/veg\\_fruit/hgic2206.html](http://www.clemson.edu/extension/hgic/pests/plant_pests/veg_fruit/hgic2206.html)
- Dinham, B; Malik, S. 2003. Pesticides and human rights. Int. J. Occup. Environ. Health. 9: 40-52.
- Enriquez, P. 2003. Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de pesticidas. Laboratorio de Ecotoxicología, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). <http://cedoc.cies.edu.ni/digitaliza/t295/seccionc3.pdf>. (consultado el 10 de noviembre de 2013).
- FAO. 2004. El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad (en línea). Disponible en <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/index.html>. (consultado el 5 de julio de 2014).
- Ficker, C; Smith, M; Akpagana, K; Gbeassor, M; Zhang, J; Durst, T; Assabgui, R. 2003. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. Phytotherapy Research 17:897-902.
- Gilchrist, L; Fuentes, G; Martínez, C; López, R; Duveiller, E; Singh, R; Henry, M; García, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.

<http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/56185/2/guiaTrigoCebada.pdf>.

(consultado el 12 de noviembre de 2013).

- González, A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. pp.7.
- Grainge, M; Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & Sons Limited.
- Gupta, M. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia: CYTED. pp. 61.
- Hauke, R. 1993. *Equisetaceae*. In: Flora of North America Editorial Committee (Editors), Flora of North America North of Mexico, 2. Oxford University Press, New York, NY, USA.
- Heitz, S. *et al.* *Anagallis arvensis* triterpenes, C R Acad Sci Ser D, núm. 268, 1969, 2279-2281.
- Hernández, A; Bautista, S; Velazquez, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortifrutícolas. Revista fitotecnia Mexicana, vol. 30, núm. 2, abril-junio, 2007, pp. 119-123, Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. México.
- Hernández, S. 1987. Flora de Veracruz. Xalapa, Veracruz, México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. pp. 4-5.
- Hernández, T; Canales, M; Ávila, J; Duran, A; Caballero, J; Romo de Vivar, A; Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). J. Ethnopharmacol. 88:181-188.
- Hernández, T; Canales, M; García, A; Durán, A; Meráz, S; Dávila, P; Ávila J. 2008. Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 7 (4): 203 – 207.

- Juárez, G; Sosa, M; López, A. 2010. Hongos fitopatógenos de importancia económica: descripción y métodos de control. Temas selectos de ingeniería en Alimentos. 4-2:14-23.
- Khoshkholgh, M; Massiha, A; Issazadeh, K; Bidarigh, S; Giahi, M; Ramtin, M. (2013). Evaluation of Antifungal Activity of Methanol Extract of Acacia (*Anagalis arvensis*) Leaves and Nystatin against *Candida albicans* in Vitro. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 15(8): 39-41.
- Kumul, D. 1983. Búsqueda de plantas silvestres del Estado de Veracruz con propiedades tóxicas contra gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* a J. E. Smith y mosquito casero *Culex quinquefasciatus*. Tesis México, Universidad Autónoma de Chapingo. pp.76.
- Kutchan, T. 1995. Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. The Plant Cell. 7: 1059-1070.
- Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. Journal of Applied Bacteriology, Simposium Supplement: 11S - 25S.
- Lee, S; Choi, G; Jang, K; Lim, H; Cho, K; Kim, J. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. Plant Pathol. J. 23, 97-102.
- 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. 53,54.
- Manrique, E; Mosquera, O. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia murilloi* cuatr. Y *Espeletopsis guacharaca*. Carrera Bacteriología. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C. p. 15, 16.
- Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología. 29:73-82.

- Moreno, S; González, L; Salcedo, S; Cárdenas, M; Perales, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotanica*. 32: 193-205.
- Moreno, J. 2011. Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eriopodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. pp. 27, 28.
- Muñoz, L. 2002. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. 4a Ed. Madrid: Mundi-Prensa. p. 175-179.
- Osborn, A. 1999. Antimicrobial Phytoprotectants and Fungal Pathogens: A Commentary. *Review. Fungal Genetics and Biology*. 26: 163–168.
- Pitt, J; Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York, USA. Ed. Springer p. 151
- Pomilio, A; Seldes, A; Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Washington, D.C.: Monografías OEA. pp. 1-3.
- Prats, G. 2005. *Microbiología Clínica*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana. pp. 97.
- Rai, M; Mares, D. 2003. *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. Food Products Press.
- Ribeiro, L; Bedendo, I. 1999. Efecto inhibitor de extractos de plantas sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal de la pudrición de la fruta de la papaya. *Scientia Agricola*.v. 56, p.1267-1271.
- Ruiz, M; Susunaga, C. 2000. Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (*Burseraceas*) frente a microorganismos como *Agrobacterium tumefaciens*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. pp. 40.

- Sadeghi, B; Shiravi, F; Ghanbari, S; Alinejadi, M; Zarrin, M. 2010. Antifungal activity of *Satureja khuzestanica* (Jamzad) leaves extracts Jundishapur. Journal of Microbiology. 3(1): 36-40.
- Sanabria, A. 1983. Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de familia *Compositae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. pp. 46-49.
- Sen, A; Batra, A. 2012. Determination of antimicrobial potentialities of different solvent extracts of the medicinal plant: *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. International Journal of Green Pharmacy, 6(1): 50.
- Smith, D; Black, M; Grichar, W; Jaks, A. 2000. Economic assessment and fungicide use on peanut seed in the southwestern United States. Peanut Science. 27: 39-44.
- Solórzano, R. 1989. Alternativa técnica. Guatemala: ALTERTEC. p. 1.
- Tapia, P; Cecilia V. 2009. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev. chil. Infectol. 26 (2): 144-150 .
- Universidad de Antioquia. Herbario Universidad de Antioquia, Medellin Colombia 2011. Cidrón *Aloysia triphylla* (L'He'r.) Britton.
- Vasishta, P. 2006. Botany For Degree Students *Pteridophyta*. Schan. pp. 3.
- Villar, M; Ayala, O; Rodríguez, H; Lagunes, T1990. Utilización de infusiones y extractos acuosos vegetales en el combate del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) en San Luis Potosí. Revista Chapingo. 15: 105-107.



## 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 = 30 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 18 esporas

Total = 48 esporas

**Aplicando las fórmulas:**

$$\text{Esporas/ml} = (48)(25,000) \left( \frac{1}{10} \right)$$

$$\text{Esporas/ml} = 120,000$$

$$\text{Esporas totales} = (120,000)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 1,200,000 / 10 \text{ ml}$$

$$120,000 \text{ esporas/ml}$$

#### ◆ *Rhizopus spp.*

Cámara #1 - 5 Cuadros = 18 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 24 esporas

Total = 42 esporas

**Aplicando las fórmulas:**

$$\text{Esporas/ml} = (42)(25,000) \left( \frac{1}{10} \right)$$

$$\text{Esporas/ml} = 105,000$$

$$\text{Esporas totales} = (105,000)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 1,050,000/10 \text{ ml}$$

$$105,000 \text{ esporas/ml}$$

*Mucor spp.*

Cámara #1 - 5 Cuadros = 116 esporas

Cámara #2 - 5 Cuadros = 130 esporas

Total = 246 esporas

**Aplicando las fórmulas:**

$$\text{Esporas/ml} = (246)(25,000) \left( \frac{1}{10} \right)$$

$$\text{Esporas/ml} 615,000$$

$$\text{Esporas totales} = (615,000)(10 \text{ ml})$$

$$\text{Esporas totales} = 6,150,000/10 \text{ ml}$$

$$615,000 \text{ esporas/ml}$$