



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**METABOLITOS DE *Passiflora foetida* CONTRA
Pseudocercospora fijiensis, PATÓGENO DEL
BANANO**

Tesis que presenta:

Diobel González Stewart

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México.

Julio 2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Diobel González Stewart titulado: Metabolitos de *Passiflora foetida* contra *Pseudocercospora fijiensis*, patógeno del banano, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de julio de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Diobel González Stewart

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto CONACYT clave 164458 “Las plantas de la duna costera y el manglar de la Península de Yucatán son fuente potencial de metabolitos contra hongos patógenos de cultivos de importancia económica” bajo la dirección de la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca otorgada 935001.

Al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY, por su apoyo con equipos, materiales y reactivos.

A mi asesora, la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García, por haberme aceptado en su grupo de investigación invirtiendo tiempo en la planificación, desarrollo y revisión de la tesis, además por sus consejos, recomendaciones y ser mi guía académica.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y el Dr. Ignacio Islas Flores, por sus aportaciones y consejos para la realización y mejora de la tesis.

A la Dra. Leticia Peraza Echeverría, por su constante apoyo en todas las técnicas biológicas, sus consejos y ayuda en todas las esferas de mi proyecto.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, por enseñarme y apoyarme en las extracciones orgánicas, así como en las técnicas cromatográficas VLC y HPLC.

A mi compañera de laboratorio, M. en C. Erika Esquivel Salazar, por sus consejos y ayuda incondicional en todo momento.

A la Dra. Blanca Marina Vera Ku, por sus consejos y apoyo en las técnicas de extracción e identificación y la realización de la bioautografía HPTLC.

A la Biol. María Silvia Hernández Aguilar, por su apoyo en los trabajos en el herbario y a los técnicos Alfredo Dorantes Euan y Felipe Barredo Pool por su apoyo en las colectas de material vegetal.

Al colectivo de doctores de la Unidad de Biotecnología que me impartieron clases.

DEDICATORIAS

A mi familia, por estar siempre apoyándome en todos mis proyectos.

A mi esposa, por mantenerse junto a mí en todo momento y acompañarme en esta aventura.

A los amigos y compañeros viejos y nuevos.

ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Cultivo del banano	3
1.2 Hongos fitopatógenos	4
1.2.1 <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	5
1.2.1.1 Ciclo de vida de <i>P. fijiensis</i>	6
1.3 Control de la enfermedad y su impacto global	8
1.4 Plantas con actividad fungicida	9
1.4.1 <i>Passiflora foetida</i> Killip	10
1.5 Extractos vegetales	15
1.6 Obtención del extracto e identificación de compuestos activos	16
1.7 Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad fungicida del extracto	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
CAPÍTULO II	21
EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO CRUDO ACUOSO DE <i>P. foetida</i> EN EL CRECIMIENTO DEL HONGO <i>P. fijiensis</i>	21
2.1 INTRODUCCIÓN	21
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.2.1 Material Biológico	21
2.2.2 Colecta y procesamiento del material vegetal	21
2.2.3 Obtención del extracto crudo acuoso	22
2.2.4 Bioensayos de actividad antifúngica (BAA)	22
2.3 RESULTADOS	23
2.3.1 Bioensayo de actividad antifúngica	23
2.4 DISCUSIÓN	26
CAPÍTULO III	29

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS	29
3.1 INTRODUCCIÓN	29
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.2.1 Separación de metabolitos del ECA por filtración	29
3.2.1.1 Material Biológico	30
3.2.1.2 Establecimiento del protocolo	30
3.2.1.3 Bioensayo de actividad antifúngica	30
3.2.2 Extracción y fraccionamiento del extracto	31
3.2.3 Cuantificación de la concentración de sólidos totales presentes en el ECA 35	
3.2.4 Análisis fitoquímico de los extractos y fracciones activas	35
3.2.5 Cuantificación de la viabilidad de las esporas para validar la actividad fungicida de los extractos y fracciones activas	36
3.3 RESULTADOS	39
3.3.1 Separación de metabolitos del ECA por filtración	39
3.3.2 Extracción y separación	41
3.3.3 Exploración cromatográfica de las fracciones F5 y F6 por CCD	48
3.3.4 Separación cromatográfica de las fracciones F5 y F6 por HPLC	49
3.3.5 Análisis cromatográfico en capa delgada de alta resolución	54
3.3.6 Bioautografía	57
3.3.7 Análisis fitoquímico de los extractos	57
3.3.8 Cuantificación de la actividad antifúngica de los extractos	60
3.4 DISCUSIÓN	63
CAPÍTULO IV	71
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	71
4.1 CONCLUSIONES	71
4.2 PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72

LISTADO DE ABREVIATURAS

AB: alamarBlue

ACN: acetonitrilo

AU: unidad de absorbancia

BAA: bioensayo de actividad antifúngica

CCD: cromatografía en capa delgada

CICY: Centro de Investigación Científica de Yucatán

cm: centímetro

conc.: concentración

DC: disolución conidial

DCM: diclorometano

DMSO: dimetilsulfóxido

EAB: extracto acuoso de Bokesch *et al.* 2004

ECA: extracto crudo acuoso

e.g.: ejemplo

F: fracción

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

g: gramo

g: gravedades

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

HPTLC: *High Performance Thin Layer Chromatography* (Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución)

i.e.: es decir

Kg: kilogramo

L: litro

m: metro

mAU: mili absorbancia

mbar: milibar

MeOH: metanol

min: minutos

mL: mililitro

m/v: masa/volumen

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

N: nitrógeno

NADH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* [Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)]

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* [Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)]

nm: nanómetro

O: oxígeno

OH: hidroxilo

ONU: Organización de Naciones Unidas

PDA: *Potato Dextrose Agar Medium* (Medio de cultivo de papa, dextrosa, agar)

PDB: *Potato Dextrose Broth* (Caldo de papa, dextrosa)

P. fijiensis: *Pesudocercospora fijiensis*

P. foetida: *Passiflora foetida*

Rf: *Retention factor* (Factor de retención)

rpm: revoluciones por minuto

T: tratamiento

VLC: *Vacuum Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida al Vacío)

Vol.: volumen

°C: grados Celsius

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Plantación de plátano.....	3
Figura 1.2 Conidios de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	6
Figura 1.3 Hoja de plátano infectado con <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	7
Figura 1.4 Ciclo de vida de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	7
Figura 1.5 Fumigación aérea de una plantación de plátano.....	9
Figura 1.6 <i>Passiflora foetida</i>	11
Figura 1.7 Estrategia experimental.....	20
Figura 2.1 Diagrama de obtención del ECA de <i>Passiflora foetida</i>	22
Figura 2.2 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación.....	24
Figura 2.3 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 302 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación.....	24
Figura 2.4 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación observada bajo microscopio óptico.....	25
Figura 2.5 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 302 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación observada bajo microscopio óptico.....	25
Figura 3.1 Diseño de la placa de 96 pocillos.....	38
Figura 3.2 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> fraccionado por filtración después de 30 días de incubación.....	40

Figura 3.3 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de <i>Passiflora foetida</i> fraccionado por filtración después de 30 días de incubación observado bajo microscopio óptico.....	41
Figura 3.4 Inhibición micelial de la cepa C-1233 expuesta a extractos de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	42
Figura 3.5 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 en contacto con el EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	43
Figura 3.6 Fracciones obtenidas en la VLC del EAB.....	44
Figura 3.7 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 en contacto con F5 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	45
Figura 3.8 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 en contacto con F5 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	45
Figura 4.9 Crecimiento micelial de la cepa C-1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 15 días de incubación.....	46
Figura 5.10 Crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 8 días de incubación.....	46
Figura 6.11 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	47
Figura 3.12 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de <i>Passiflora foetida</i> después de 30 días de incubación.....	47
Figura 3.13 Perfil cromatográfico obtenido en placas cromatográficas de fase reversa reveladas con ácido fosfomolibdico de las fracciones F5 y F6.....	48
Figura 3.14 Perfiles cromatográficos en HPLC, empleando una columna de fase reversa C18.....	50

Figura 3.15 Perfiles cromatográficos de las fracciones F5 obtenidos en HPLC semipreparativa empleando una columna de fase reversa C18.....	53
Figura 3.16 Perfiles cromatográficos por triplicado de las fracciones F5 y F6 obtenidos por HPTLC.....	54
Figura 3.77 Perfil de picos de las fracciones F5 y F6.....	55
Figura 3.18 Detección de alcaloides en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch <i>et al.</i> , 2004: EAB, DCM-MeOH y MeOH.....	57
Figura 3.19 Detección de taninos en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch <i>et al.</i> , 2004: EAB, DCM-MeOH y MeOH.....	58
Figura 3.20 Detección de saponinas en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch <i>et al.</i> , 2004: EAB, DCM-MeOH y MeOH.....	58
Figura 3.21 Detección de flavonoides en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch <i>et al.</i> , 2004: EAB, DCM-MeOH y MeOH.....	59
Figura 3.22 Detección de terpenos en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch <i>et al.</i> , 2004: EAB, DCM-MeOH y MeOH.....	60
Figura 3.23 Cuantificación de la viabilidad celular por la técnica de alamarBlue® para evaluar la actividad fungicida.....	61
Figura 3.24 Gráficos de comparación entre las medianas de tratamientos más activos evaluados empleando el programa GraphPad Prism versión 8.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Características taxonómica del hongo <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	5
Cuadro 1.1 Ejemplos de plantas con actividad biológica contra hongos.....	10
Cuadro 1.2 Clasificación taxonómica de la planta <i>Passiflora foetida</i>	12
Cuadro 1.3 Ejemplos de familias químicas con actividad fungicida aislados de especies vegetales.....	14
Cuadro 1.5 Actividad antimicrobiana de algunas especies del género <i>Passiflora</i>	15
Cuadro 2.1 Cálculos para las diluciones del ECA de <i>Passiflora foetida</i>	23
Cuadro 3.1 Fracciones obtenidas por filtración utilizando membranas.....	31
Cuadro 3.2 Concentraciones de extractos evaluados en los bioensayos.....	32
Cuadro 3.3 Concentraciones de las fracciones activas evaluadas en los bioensayos.....	32
Cuadro 3.4 Proporciones de los disolventes de los sistemas formados para separar los compuestos.....	33
Cuadro 3.5 Concentración de F5 y F6.....	33
Cuadro 3.6 Concentraciones por tratamiento para cuantificar la actividad fungicida.....	37
Cuadro 3.7 Volúmenes obtenidos en el proceso de separación de metabolitos del ECA.....	39
Cuadro 3.8 Equivalencias de las diluciones del ECA de <i>Passiflora foetida</i>	43
Cuadro 3.9 Datos de R _f de fracciones evaluadas.....	49
Cuadro 3.10 Picos mayoritarios de F5 y F6 a 214 nm y 254 nm	52
Cuadro 3.11 División del cromatograma en zonas para coleccionar la elución	54

Cuadro 3.12 Datos de cada pico del cromatograma obtenido por el programa CAMAG para cada muestra por aplicación	56
Cuadro 3.13 Determinaciones fitoquímicas.....	60
Cuadro 3.14 Resumen estadístico de los datos de la cuantificación de la actividad fungicida.....	62

RESUMEN

El cultivo del plátano enfrenta una serie de problemas que conlleva a la disminución de los rendimientos de la producción, como el cambio climático, la contaminación ambiental y el ataque de organismos fitopatógenos. Entre estos últimos se encuentran los hongos fitopatógenos cuyo control es mediante la aplicación de fungicidas sintéticos de forma irracional, lo que ha provocado un impacto negativo en el ambiente, en la salud humana y en organismos benéficos como la abeja. Asociado a esto, los hongos patógenos han generado resistencia a los fungicidas sintéticos, por lo cual diversas investigaciones se han dirigido en buscar alternativas naturales como los metabolitos de las especies vegetales. La bioprospección de plantas nativas de la duna costera en Yucatán ha permitido la identificación de especies que presentan propiedades fungicidas como *Passiflora foetida*. El extracto crudo acuoso de hojas de esta especie presentó actividad inhibitoria contra el hongo *Pseudocercospora fijiensis* a partir de la concentración de 2.5%. Al realizar la extracción siguiendo el protocolo de Bokesch *et al.* (2004) se comprobó que el extracto acuoso fue activo a la concentración de 6.25 mg/mL, mientras que en las fracciones obtenidas por cromatografía líquida al vacío las fracciones cinco y seis presentaron actividad a partir de 125 y 137 µg/mL respectivamente. El análisis cromatográfico demostró que ambas fracciones presentan varios compuestos, pero se desconoce la naturaleza de los compuestos activos pues aún no se han identificado.

ABSTRACT

The cultivation of plantain or banana faces a series of problems that lead to a decrease in production yields, such as climate change, environmental pollution, the attack of phytopathogenic organisms. Among the latter are phytopathogenic fungi whose control is through the application of synthetic fungicides in an irrational way has caused many impacts on the environment, human health, beneficial organisms such as bees. Associated with this, pathogenic fungi have generated resistance to synthetic fungicides, which is why various investigations have been directed at looking for natural alternatives such as the metabolites of plant species. The bioprospecting of native plants of the coastal dune in Yucatan has allowed the identification of species that have fungicidal properties such as *Passiflora foetida*. The aqueous crude extract of leaves of the species showed inhibitory activity against the fungus *Pseudocercospora fijiensis* from a concentration of 2.5%. When performing the extraction following the protocol of Bokesch *et al.* (2004) it was found that the aqueous extract was active at a concentration of 6.25 mg/mL while in the fractions obtained by vacuum liquid chromatography, fractions five and six presented activity from 125 and 137 µg/mL, respectively. Chromatographic analysis showed that both fractions present several compounds, but the nature of the active compounds is unknown as they have not yet been identified.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la agricultura enfrenta una serie de problemas que se deben solucionar en los próximos años a fin de eliminar el desequilibrio alimentario mundial. Entre los principales problemas se encuentran la contaminación ambiental, el déficit de recursos para realizar una correcta explotación de los recursos agrícolas y el impacto negativo de los organismos patógenos. Los expertos mundiales indican que para contrarrestar el déficit de alimentos para el año 2050, la producción debe aumentar un 70% en relación con la producción actual (FAO, 2018).

Los patógenos agrícolas causan la disminución e incluso la pérdida de producciones completas después de toda una inversión de tiempo y recursos, lo que se traduce en una disminución de ingresos económicos y aumento del hambre, además del desequilibrio de los precios en el mercado, influyendo en el aumento de la pobreza. El actual sistema de producción consume un 70% del agua dulce, genera contaminantes debido a los aditivos que emplea para el control de plagas y enfermedades, sin solucionar el principal problema: brindar a la población una dieta balanceada y nutritiva. Por eso una de las demandas principales es encontrar vías alternativas que minimicen estos efectos y brinden un producto de calidad y seguro para el ecosistema y el hombre (Banco Mundial, 2017), como mantener cobertura permanente de los suelos, el laboreo mínimo de las tierras y la diversificación de especies vegetales (ONU, 2018).

La producción de plátano es un rubro importante para países productores y consumidores, donde el control de enfermedades como la Sigatoka negra provocada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* (*P. fijiensis*), demanda grandes recursos económicos. *P. fijiensis* es un hongo ascomiceto patógeno que infecta a las plantas de banano desde edades tempranas, provocando la destrucción foliar y disminución del rendimiento del racimo. Actualmente esta enfermedad, controlada principalmente por fungicidas sintéticos, es un objetivo importante para diversos grupos de investigación que dedican esfuerzos para encontrar alternativas de control que minimicen los impactos negativos del control químico (Campo-Arana *et al.*, 2020; Orozco-Santos *et al.*, 2013).

Una de las alternativas al control químico es el estudio y empleo de biofungicidas obtenidos a partir de extractos vegetales. Diversos estudios han revelado la actividad fungicida de

Passiflora foetida (*P. foetida*), planta perteneciente a la familia Passifloraceae. De acuerdo con lo reportado por Rodríguez-García *et al.* (2016), el extracto crudo acuoso (ECA) de hojas de *P. foetida* presentó actividad fungicida contra esporas de *P. fijiensis*, marcando el antecedente para la realización de este estudio.

Por todo lo anterior, este proyecto tuvo como objetivo identificar los metabolitos presentes en las hojas de *P. foetida* responsables de la actividad inhibitoria contra el hongo *P. fijiensis*.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1.1 Cultivo del banano**

El plátano o banana es un fruto comestible de plantas herbáceas perennes de gran tamaño, pertenecientes al género *Musa*. Su tronco no es leñoso y presenta hojas largas y grandes. Sus frutos son de diferente tamaño y color; presentan forma alargada, curva, carnosos, verdes o amarillos (Figura 1.1). El crecimiento de la planta es en meses, pudiéndose cultivar en cualquier época del año. Casi todos los plátanos producen frutos sin semillas y provienen de dos principales especies silvestres: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Se conoce un gran número de variedades que son fuente de alimento y se consumen en forma de postre, fruta y vianda cocida como el plátano macho (FAO, 2018; INFOCOM, 2016; Zhang *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2004).



Figura 1.8 Plantación de plátano.

El plátano es apreciado por su contenido nutricional: carbohidratos (mayor cantidad), vitaminas y minerales entre los que se destaca el potasio, magnesio, vitaminas tipo B1, B2, B3, B5 y B6 mayoritariamente (United States Department of Agriculture, 2016). Además, diversos estudios como el de Singh *et al.* (2016) han reportado sus beneficios en la salud humana como agente antioxidante y reductor de la glucosa en sangre.

El banano es considerado una fuente importante de alimento junto a los cereales como el arroz, razón por la cual está entre los alimentos con importancia económica. Los países de Latinoamérica, África, Asia y el Pacífico son los principales productores, mientras que los países del norte son los que mayormente lo importan. Actualmente, la producción anual se estima superior a los 100 millones de toneladas al año, destacándose países como India, Brasil, Colombia, México, Filipinas y China (FAO, 2018; INFOCOM, 2016; Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2004).

1.2 Hongos fitopatógenos

Las enfermedades en el banano constituyen la principal causa de pérdidas de la cosecha, las mismas están provocadas por desajustes en las funciones orgánicas de las plantas. Estos desequilibrios pueden estar dados por agentes abióticos (*e.g.* sequía, lluvias abundantes, heladas) y bióticos (insectos, bacterias, virus, hongos y nematodos). Según el concepto del triángulo de la enfermedad de una planta, la enfermedad se presenta cuando existe una planta hospedera susceptible, un patógeno y un ambiente favorable para su desarrollo, lo que significa que si falta alguno de estos elementos la enfermedad no ocurre. La propagación de los patógenos puede darse por diversas vías como la lluvia, el viento, suelo, animales, el hombre, etc. (University of Kentucky Department of Entomology, 2016).

Los hongos son los organismos que mayor número de enfermedades causa a las plantas. Estos organismos, además de provocar enfermedades que afectan tanto a las plantas como las cosechas, producen una serie de sustancias químicas altamente tóxicas, alucinógenas y cancerígenas denominadas micotoxinas. Estos compuestos son los causantes de la disminución de las propiedades nutritivas y la afectación de las propiedades organolépticas de los productos agrícolas (Williams *et al.*, 2017; Leonberger *et al.*, 2016).

Los hongos son organismos eucariotas que obtienen su alimento del huésped donde vive, esté vivo o muerto. Estos organismos desarrollan ramificaciones tubulares para alimentarse, conocidas como hifas y producen esporas asexuales, sexuales o ambas. También, pueden infestar por completo tejidos u órganos específicos de la planta como hojas, frutos y tallos hasta provocar su muerte (Williams *et al.*, 2017; Leonberger *et al.*, 2016; University of Kentucky Department of Entomology, 2016) .

1.2.1 *Pseudocercospora fijiensis*

El hongo *P. fijiensis* es el causante principal de la Sigatoka negra, una enfermedad que daña a los cultivos de plátano. Se clasifica como un hongo hemibiótrofo debido a que presenta un ciclo de vida dividido en dos etapas. En la primera etapa se comporta como un parásito biotrófico colonizando los espacios intercelulares sin formar haustorios. Una vez colonizado el tejido cambia su estrategia de ataque volviéndose un patógeno necrotrófico y posteriormente en su ciclo de vida se transforma en un organismo saprófito (Campo-Arana *et al.*, 2020; Churchill, 2011; Rodríguez-Gaviria y Crayón, 2008; Gonzalo-Galileo *et al.*, 2004).

Pseudocercospora fijiensis es un hongo ascomiceto patógeno que produce conidios en su forma asexual y ascosporas en su forma sexual, recibiendo el nombre de *Mycosphaerella fijiensis* en esta última. Las principales características taxonómicas se muestran en el Cuadro 1.1 (Promusa, 2017).

Cuadro 4.1 Características taxonómicas del hongo
Pseudocercospora fijiensis

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Capnodiales
Familia:	Mycosphaerellaceae
Género:	<i>Pseudocercospora</i>
Especie:	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>

Sus esporas o conidios son de un color pálido a un ligero olivo-carmelitoso, de forma lisa, alargada y tienen tres o más septas (Figura 1.2). Su germinación, depende de una elevada humedad relativa (>90%).



Figura 1.9 Conidios de *Pseudocercospora fijiensis* (<http://www.promusa.org/Pseudocercospora+fijiensis>).

1.2.1.1 Ciclo de vida de *P. fijiensis*

La Sigatoka negra es una enfermedad del banano que se caracteriza por producir rayas de color pardo oscuro en etapas tardías que aparecen sobre las hojas de la planta. Estas lesiones causan necrosis en la hoja eliminando la capacidad de realizar la fotosíntesis (Figura 1.3), afectando el rendimiento de la cosecha (FAO, 2013; Chillet *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2006). Las esporas sexuales y asexuales del hongo son transportadas por acción de los agentes naturales como la lluvia y el viento, logrando dispersarse desde varios centímetros hasta kilómetros, por lo que llegan a contaminar plantaciones sanas que se encuentren lejos del lugar afectado (Rodríguez-Gaviria y Cayón, 2008; Sánchez *et al.*, 2005; Bennett y Arneson, 2003). Las esporas germinan y sus hifas entran por los estomas e invaden la cámara subestomática, por lo que las hifas emergen por los estomas y crecen a lo largo de la superficie de la hoja, penetrando por otros estomas, lo que aumenta el número de lesiones. En los primeros días después de la contaminación aparecen manchas pequeñas que van aumentando hasta convertirse en rayas que paulatinamente destruyen la hoja completa (Figura 1.4) (Vega-Torres, 2009; Manzo-Sánchez *et al.*, 2005; Stover, 1980).



Figura 2.3 Hoja de plátano infectada con *Pseudocercospora fijiensis* (<https://elpregonerodeldarien.blogspot.com/2016/10/Sigatoka-negra-arruina-parceleros.html>).

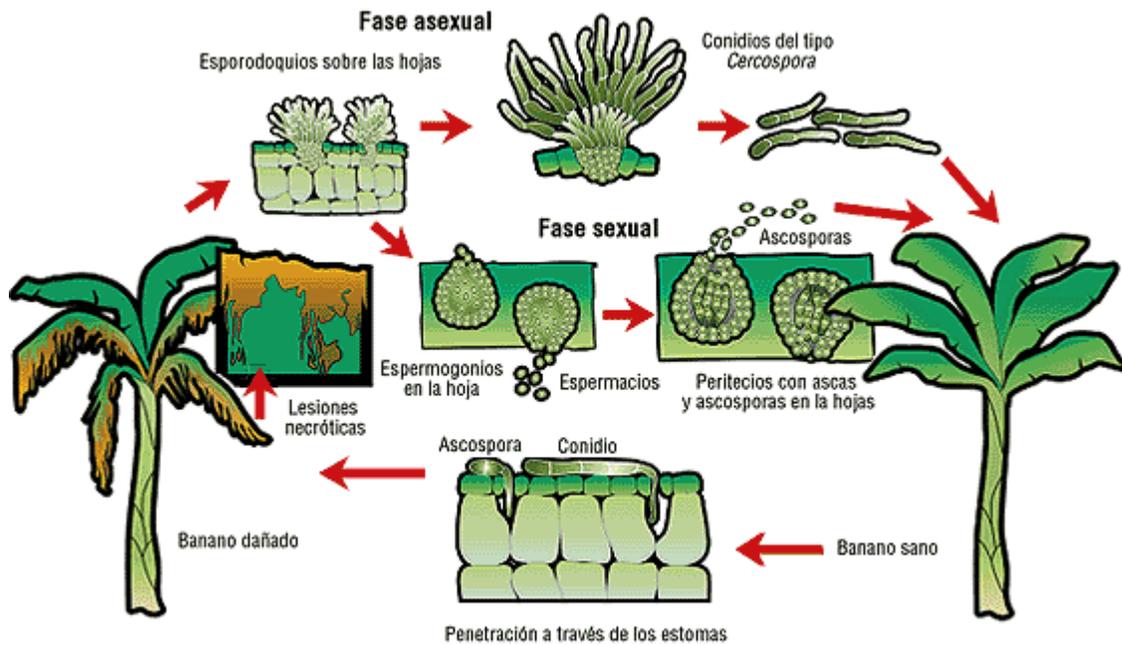


Figura 1.4 Ciclo de vida de *Pseudocercospora fijiensis* (<https://pmolina59.blogspot.com/2017/01/la-sigatoka-negra-ecuador.html>).

1.3 Control de la enfermedad y su impacto global

Las técnicas de control de la Sigatoka negra son el deshoje, la fertilización, la cuarentena, la eliminación de la maleza, el drenaje, la ventilación de la plantación y el control químico mediante el uso de fungicidas como Mazcoden, Clorotalonil, Propineb, entre otros. También se ha utilizado el control biológico mediante el empleo de microorganismos patógenos del hongo como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* y las variedades resistentes (Guzmán, 2012; Bennett y Arneson, 2006). El control químico de los hongos fitopatógenos ha sido el principal método utilizado en la agroindustria. Los fungicidas sintéticos agrícolas son una fuente de contaminación ambiental y un peligro para la salud humana y animal (Darçın y Darçın, 2017; Salhi *et al.*, 2017; Aktar *et al.*, 2009). Entre las diversas formas de aplicar el compuesto fungicida se encuentra la aspersion, que puede ser manual o mediante el empleo de avionetas de fumigación como se muestra en la Figura 1.5. La aplicación de fungicidas sintéticos ha sido analizada y diversos estudios muestran el impacto negativo que presentan en animales, plantas y humanos. La población de mayor riesgo son los trabajadores agrícolas y las personas que manipulan dichos compuestos, desde la producción hasta su comercialización. El contacto prolongado provoca afectaciones respiratorias y cardíacas, daño a las mucosas, el sistema digestivo, circulatorio y nervioso, debido a que los compuestos químicos presentan un tiempo de descomposición largo y muchas veces durante el proceso de degradación producen otros compuestos de mayor toxicidad (Darçın y Darçın, 2017; Shelton *et al.*, 2014).



Figura 1.5 Fumigación aérea de una plantación de plátano
(<https://www.wur.nl/es/news/adn-banano-black-Sigatoka.htm>).

1.4 Plantas con actividad fungicida

Muchos compuestos producidos por las especies vegetales presentan propiedades fungicidas, por lo que su estudio y aislamiento ha brindado una herramienta importante en la búsqueda de nuevos compuestos químicos para combatir a los hongos patógenos (Šernaitė, 2017; De Lucca *et al.*, 2005). Diversos compuestos con acción fungicida se han aislado de diversas especies vegetales, empleándose en la medicina animal, vegetal y humana. Éstos se han aislado de raíces, hojas, tallos, flores, frutos y semillas a través de técnicas de extracción líquido-sólido y líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad. Además, muchos son inocuos para el ambiente y la vida, lo que les proporciona una ventaja sobre los fungicidas sintéticos. Por otra parte, la unión del conocimiento generado con los adelantos de los procesos biotecnológicos a escala industrial hace posible que la industria de los biopesticidas sea una alternativa sostenible, económica y ecológica (De Lucca *et al.*, 2005; Vivanco *et al.*, 2005).

En el Cuadro 1.2 se muestran algunos ejemplos de diversas especies vegetales con acción biológica sobre hongos fitopatógenos.

Cuadro 1.5 Ejemplos de plantas con actividad biológica contra hongos.

Especie vegetal	Hongo patógeno	Referencia
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> , <i>Macrophammina phaseolina</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Rhizoctania solani</i>	Ozbek <i>et al.</i> , 2020
<i>Piper auritum</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. vanillae</i>	Fernández <i>et al.</i> , 2020
<i>Allium sativum</i> , <i>Azadirachta indica</i> y <i>Tithonia diversifolia</i>	<i>Phaeosariopsis griseola</i>	Obila <i>et al.</i> , 2020
<i>Origanum compactum</i>	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Alternaria alternata</i> y <i>Helminthosporium sativum</i>	Ez-Zriouli <i>et al.</i> , 2020
<i>Monodora myristica</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Obidiebube <i>et al.</i> , 2020
<i>Cymbopogon martini</i> y <i>Ocimum tenuiflorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Verticillium</i> spp.	Angelini <i>et al.</i> , 2019
<i>Tectona grandis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Alternaria solani</i>	Hamad <i>et al.</i> , 2019
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Fusarium solani</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> ,	Ma <i>et al.</i> , 2019
<i>Cinnamomum burmanni</i> Blume	<i>Pseudocercosporas fijiensis</i>	Darmadi <i>et al.</i> , 2019
<i>Coscinium fenestratum</i> , <i>Syzygium aromaticus</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	Dethoup <i>et al.</i> , 2018

1.4.1 *Passiflora foetida* Killip

Entre las especies vegetales que se han identificado compuestos con propiedades fungicidas se encuentra la familia de las Passifloras (Nicolls, 1970). El género *Passiflora* vegetal agrupa a más de 400 especies, distribuidas en las zonas cálidas del planeta. Aunque se reporta que es originaria de la zona sur de América, se ha diseminado por el resto del mundo y sus propiedades medicinales se emplean en diversas latitudes. Dentro de este grupo se encuentra *P. foetida*, una planta trepadora caracterizada por tener un tallo no leñoso ramificado de longitud entre 1 y 6 m, flores blancas y frutos globosos entre 2 a 3 cm de diámetro con abundantes semillas incrustadas en la pulpa (Patil *et al.*, 2015). En la Figura

1.6 se observan ejemplares de *P. foetida* que crecen en la zona costera del puerto de Chuburná, en el estado de Yucatán.



Figura 1.6 *Passiflora foetida*. Foto tomada en la zona costera del puerto de Chuburná.

Esta especie vegetal es ampliamente empleada en la medicina tradicional en diferentes partes de México (e.g. Veracruz y Tabasco), para tratar enfermedades del sistema nervioso e infecciones de la piel. Para el tratamiento se emplean las hojas en forma de infusión o como compresa sobre la zona afectada (Álvarez-Quiroz *et al.*, 2017; Domínguez-Barradas *et al.*, 2015). También en la India se utiliza para tratar diversas dolencias como diarreas o infecciones intestinales, en la garganta o el oído. Investigaciones científicas validan el uso farmacéutico de compuestos con actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos como *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes*. Reportes recientes indican el empleo de *P. foetida* como relajante del sistema nervioso central, siendo los metabolitos alcaloides y flavonoides los constituyentes más mencionados según la revisión bibliográfica de Patil *et al.* (2015).

En el Cuadro 1.3 se muestran los datos taxonómicos de la variedad que crece en la zona costera de Yucatán.

Cuadro 1.6 Clasificación taxonómica de *Passiflora foetida*.

Reino	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia	Passifloraceae
Género	<i>Passiflora</i>
Epíteto específico	<i>foetida</i>
Epíteto infraespecífico	subpalmata
Nombre Científico	<i>Passiflora foetida</i> Killip
Autor del nombre	Killip
Determinador	J.M. MacDougal

En estudios anteriores se determinó que el extracto crudo acuoso (ECA) de *P. foetida* tiene propiedades fungicidas frente al hongo *P. fijiensis*. Durante ese estudio se encontró que las condiciones climáticas influyen en la concentración de los metabolitos que provocan la actividad antifúngica. Para ello se realizaron colectas en dos fechas, febrero (época seca) y agosto (época lluvias) encontrándose que en el período seco es donde mejor actividad fungicida (5%) hubo (Rodríguez-García *et al.*, 2016). También se halló que la fracción proteica fue la que indicó una mejor actividad fungicida, sin embargo, el estudio no fue concluyente debido a que se detectaron señales de metabolitos secundarios en los cromatogramas de las muestras proteicas analizadas por HPLC (Medina-Dzib, 2016).

En el proyecto 164458 del grupo de investigación de la Dra. Cecilia Rodríguez-García se escogió la duna costera para la bioprospección de las especies vegetales nativas, partiendo de la premisa de que la producción de los compuestos de la planta y su actividad fungicida están relacionadas con las condiciones climatológicas y edáficas imperantes de la zona. La vegetación de la duna costera se caracteriza por ser resistente al impacto de vientos fuertes, a la alta incidencia de radiación solar, sequía y al alto contenido de sales solubles. Este tipo de comunidad vegetal se extiende por todas las playas del Caribe y el Golfo de México, representando un 60% aproximadamente en la zona costera de la Península de Yucatán (Espejel *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2010; Martínez y Valverde, 1992). La duna costera y el matorral de costa es un ecosistema caracterizado por la acumulación de arena en las proximidades de la playa, variando su altura desde varios centímetros hasta decenas de metros. Éstos son formados por la acción eólica y presentan gran importancia para la vida vegetal y vida

animal que dependen de ella. La vegetación presente tiene un gran nivel de endemismo y heterogeneidad en sus especies, impactando positivamente en el control de la erosión, pues brinda protección y soporte al manto fértil de la zona costera.

En las últimas décadas se han aislado diversos metabolitos con actividad tóxica para el desarrollo de los hongos. Estos compuestos están involucrados en las respuestas de la planta a diferentes estímulos externos (Taiz y Zeiger, 2010; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Castro y Fontes, 2005) y se clasifican en dos grupos:

- **Metabolitos primarios**

Los compuestos del metabolismo primario se obtienen de los diferentes procesos bioquímicos que realizan las plantas para su desarrollo. Estos procesos les permiten obtener alimento, respirar, crecer y reproducirse, entre los que se encuentran: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, transaminación, síntesis de proteínas, enzimas y coenzimas, síntesis de materiales estructurales, duplicación de material genético, reproducción de células (crecimiento) y absorción de nutrientes, entre otros. Ejemplo de estos compuestos son los aminoácidos, proteínas, lípidos y azúcares (Allué, 2013; Castro y Fontes, 2005). Asimismo, las plantas producen compuestos primarios como los péptidos de bajo peso molecular (e.g. defensinas, tioninas, heveínas, knotinas) que intervienen en la defensa de la planta frente a ataques de patógenos como los hongos y bacterias (Cardillo *et al.*, 2017).

- **Metabolitos secundarios**

Los compuestos secundarios de las rutas metabólicas de las plantas intervienen en los procesos de defensa a las condiciones bióticas y abióticas, dividiéndose en compuestos constitutivos e inducidos (Salhi *et al.*, 2017; Castro y Fontes, 2005). Los primeros se encuentran en las plantas sanas y están conformados por compuestos como los taninos, fenoles, flavonoides y terpenos (compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales) (Ávalos y Pérez, 2009; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003), mientras que los inducidos son los que la planta produce ante el ataque de un patógeno (Salhi *et al.*, 2017; Castro y Fontes, 2005). Además, una vez que se da la infección en la planta, se activa una serie de mecanismos que incrementan y/o sintetizan

compuestos como alcaloides, flavonoides, quinonas y compuestos fenólicos (fitoalexinas) (Domingo y López-Brea, 2003; García-Mateos y Pérez-Leal, 2003; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Montañó-Pérez y Vargas-Albores, 2002).

Ejemplos de compuestos que se han identificado en extractos vegetales con actividad biológica contra hongos patógenos se presentan en el Cuadro 1.4 donde se presenta una muestra del resultado de estudios de los últimos años.

Cuadro 1.7 Ejemplos de familias químicas con actividad fungicida aislados de especies vegetales.

Especie vegetal (Familia)	Parte empleada	Familia química	Hongo patógeno	Referencia
<i>Piper auritum</i> (Piperaceae)	Toda la planta	Compuestos fenólicos y terpenos	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	Fernández <i>et al.</i> , 2020
<i>Origanum compactum</i> (Lamiaceae)	Hojas	Terpenos	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Alternaria alternata</i>	Ez-Zriouli <i>et al.</i> , 2020
<i>Tectona grandis</i> (Verbenaceae)	Hojas, flores y ramas	Terpenos	<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Alternaria solani</i>	Hamad <i>et al.</i> , 2019
<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Bulbos	Compuestos organosulfurados	<i>Colletotrichum capsici</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>capsici</i> , y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Khairan <i>et al.</i> , 2019
<i>Cinnamomum cassia</i> (Lauraceae)	Tallo	Derivados de aldehídos	<i>Fusarium solani</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ma <i>et al.</i> , 2019
<i>Artemisia herba alba</i> (Asteraceae), <i>Asphodelus tenuifolius</i> (Asphodelaceae)	Tallos, hojas, flores	Taninos, flavonoides, alcaloides	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Salhi <i>et al.</i> , 2017

A partir del estudio realizado en la década de 1970 por Nicolls, dentro del género *Passiflora* se ha identificado un gran número de especies con propiedades biológicas contra hongos

fitopatógenos. Esto marcó el inicio de una exploración por parte de investigadores con el propósito de identificar compuestos bioactivos de interés para la industria biotecnológica. En el Cuadro 1.5 se mencionan algunos ejemplos.

Cuadro 1.8 Actividad antimicrobiana de algunas especies del género *Passiflora*.

Especie vegetal	Parte empleada	Familia química	Patógeno	Referencia
<i>Passiflora caerulea</i>	Hojas	No identificados	<i>Aspergillus flavus</i>	Al-Rubaey <i>et al.</i> , 2019
<i>Passiflora foetida</i>	Hojas	Terpenos y compuestos fenólicos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Candida albicans</i>	De Melo <i>et al.</i> , 2018
<i>Passiflora foetida</i>	hojas	Terpenos y compuestos fenólicos	Células cancerígenas de hígado y cervicouterino	Sisin <i>et al.</i> , 2017
<i>Passiflora quadrangularis</i> <i>Passiflora maliformis</i> <i>Passiflora edulis</i>	Hojas y tallos	Compuestos fenólicos	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i> ,	Ramaiya <i>et al.</i> , 2014
<i>Passiflora alata</i>	Planta completa	Flavonoides y taninos	17 bacterias y 10 hongos	Vasić <i>et al.</i> , 2012
<i>Passiflora alata</i>	Semillas	Péptidos tipo albúminas 2S	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2011
<i>Passiflora foetida</i>	Hojas y frutos	No identificados	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Shigella flexneri</i>	Mohanasundari <i>et al.</i> , 2007
<i>Passiflora edulis</i>	Semillas	Péptidos tipo albúminas 2S	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	Pelegriani <i>et al.</i> , 2006

1.5 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son mezclas de compuestos a diferentes concentraciones, extraídos de alguna parte de la planta o de la planta completa, empleando diversos métodos de extracción. Entre los diferentes métodos se encuentran:

- Extracción líquido-sólido: como la extracción por maceración en diferentes variantes, arrastre de vapor, extracción continua (Soxhlet).
- Extracción líquido-líquido: empleada para separar compuestos disueltos en una mezcla líquida compleja, fraccionamiento del extracto.

Existen mecanismos físicos para mejorar el proceso obteniendo métodos más específicos y eficientes de extracción como la extracción por fluidos supercríticos, extracción por sonicación y microondas (Ateminmi *et al.*, 2017; Swami *et al.*, 2008). Sin embargo, entre las extracciones sólido-líquido la maceración sigue siendo la forma más empleada para obtener los extractos vegetales, donde el material vegetal seco y pulverizado se pone en contacto con el disolvente de interés. Los disolventes utilizados son agua o compuestos orgánicos como etanol, hexano, acetona, acetato de etilo, etc. La elección de estos últimos se hace en función de las características de los compuestos de interés a extraer (Sasidharan *et al.*, 2011).

El empleo de extractos acuosos representa una ventaja sobre el costo del proceso y el equipamiento necesario para la extracción y producción en general. Por su parte, los extractos con disolventes orgánicos presentan la desventaja de ser más caros, tóxicos, además de que se necesitan técnicas más complejas para eliminar el disolvente y su tratamiento para evitar impactos ambientales (Rodríguez *et al.*, 2006).

1.6 Obtención del extracto e identificación de compuestos activos

La selección de las especies vegetales para el estudio se realiza a partir de las referencias de la medicina tradicional o estudios previos de las plantas de interés. Una vez obtenido el extracto se debe fraccionar para aislar e identificar el principio activo a través de técnicas de separación. El fraccionamiento se realiza a través de una separación líquido-líquido mientras que la identificación y aislamiento es a través de técnicas cromatográficas. Entre las técnicas cromatográficas se encuentra la cromatografía en capa delgada (CCD), que es una herramienta analítica para identificar los compuestos presentes en la mezcla y se utiliza de forma explorativa para definir cuáles son las mejores relaciones de disolventes. La cromatografía en columna y el fraccionamiento con disolventes de diferentes polaridades es la vía más común para fraccionar y purificar un extracto de interés. A esta etapa se le une la cromatografía líquida de alta presión o resolución (HPLC por sus siglas en inglés),

para la purificación, aislamiento e identificación de los compuestos activos después de fraccionar. Por último, se emplean las técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa, espectrometría infrarroja como técnicas para elucidar la estructura química de los compuestos y determinar si son conocidos o novedosos. Paralelo al proceso descrito se realizan ensayos de actividad inhibitoria del desarrollo del hongo y el análisis de la composición fitoquímica de los extractos para identificar la familia de compuestos que puede estar involucrada en la actividad biológica (Robles-García *et al.*, 2016; Sasidharan *et al.*, 2011; Aqil *et al.*, 2010).

1.7 Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad fungicida del extracto

Para evaluar la actividad del extracto se realiza un análisis cualitativo de la actividad inhibitoria. Entre las técnicas empleadas se encuentran: difusión en agar, dilución en medio de cultivo y la bioautografía por CCD. El resultado de este tipo de técnicas sólo indica cual extracto es activo (Aqil *et al.*, 2010).

La cuantificación de la toxicidad de un extracto sobre un hongo se puede realizar por técnicas colorimétricas empleando compuestos indicadores redox de actividad celular (Silva *et al.*, 2016; Martín-Mazuelos *et al.*, 2007). Estas técnicas son sencillas y su resultado se aprecia a través del cambio de coloración que es monitoreado por mediciones de absorbancia o fluorescencia. Una de las técnicas empleadas para determinar la actividad celular es el ensayo alamarBlue®. El principio de este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la resazurina a resorufina, a través de la acción de las enzimas deshidrogenasas como las dependientes de NADPH y NADH en los procesos de respiración celular que ocurre en las mitocondrias. La reducción de este indicador es proporcional a la cantidad de células vivas en la muestra analizada. Para utilizarla como herramienta de cuantificación de la actividad inhibitoria, se deben obtener valores de reducción bajos que corresponde a la inhibición de la germinación de los conidios del hongo (Silva *et al.*, 2016; Martín-Mazuelos *et al.*, 2007; Acosta-Montes *et al.*, 2004). Los factores que pueden afectar los resultados son la coloración del extracto, el pH del medio y la luz durante la manipulación, lo cual provoca variaciones en el color del compuesto indicador (AbD Serotec, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de plátano representa un renglón importante en la economía de muchos países como México. Enfermedades como la Sigatoka negra, provocada por el hongo *P. fijiensis*, causa numerosas pérdidas anuales, lo que demanda numerosos recursos económicos con el fin de controlarla. Actualmente, esta enfermedad es controlada principalmente por fungicidas sintéticos, lo que se traduce en fuente de contaminación ambiental y un peligro para la salud animal y humana puesto que su contacto prolongado provoca afectaciones respiratorias, cardíacas, daño a las mucosas y al sistema digestivo, entre otros. Por tales motivos, en diversos grupos de investigación, la búsqueda de alternativas menos dañinas es de extrema necesidad. Entre estas alternativas se encuentran los compuestos producidos por las plantas en sus procesos biológicos, como una fuente de fungicidas orgánicos que sustituyan a los actuales. Estudios previos señalan que el ECA de hojas de *P. foetida* contra esporas de *P. fijiensis* logró inhibir su crecimiento, sin embargo, se desconoce qué metabolitos son los responsables de dicha actividad. Por tales motivos en este estudio se pretende determinar cuál o cuáles son los compuestos responsables de la actividad biológica como una alternativa verde para el tratamiento de la Sigatoka negra del banano.

HIPÓTESIS

La actividad inhibitoria del ECA de *P. foetida* contra *P. fijiensis* es producida por la interacción entre compuestos de diferentes familias químicas.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las familias químicas presentes en las hojas de *P. foetida* responsables de la actividad inhibitoria contra el hongo *P. fijiensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad inhibitoria del ECA de *P. foetida* de la colecta 2018 contra esporas de *P. fijiensis*.
2. Determinar cuál es la familia química de los compuestos con actividad inhibitoria de hojas de *P. foetida* contra el hongo fitopatógeno *P. fijiensis*.

3. Cuantificar la actividad fungicida de los extractos activos de hojas de *P. foetida* contra conidios de *P. fijiensis*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 1.7 se muestra el diagrama de las actividades realizadas en este estudio, las cuales se efectuaron en las instalaciones del CICY bajo la supervisión y/o asesorías de la Dra. Cecilia M. Rodríguez García, la Dra. Leticia Peraza Echeverría y el M. en C. Luis W. Torres Tapia.

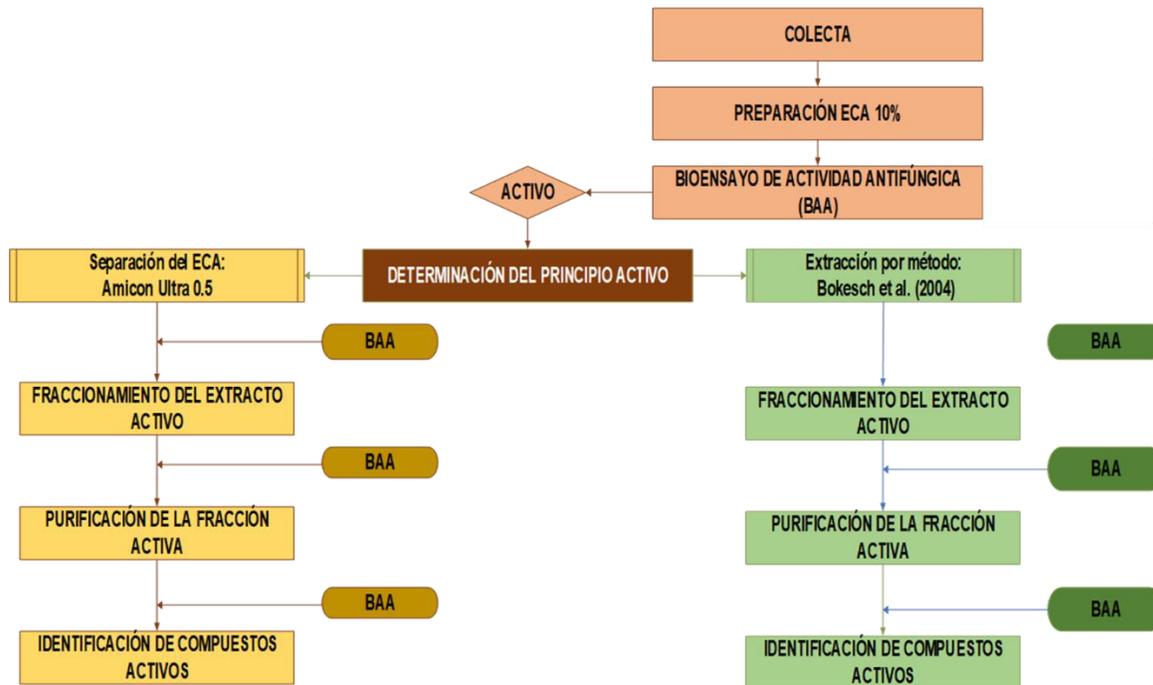


Figura 1.7 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO CRUDO ACUOSO DE *P. foetida* EN EL CRECIMIENTO DEL HONGO *P. fijiensis*

2.1 INTRODUCCIÓN

El empleo de extractos crudos acuosos es una estrategia para evaluar la actividad biológica de los metabolitos producidos por las plantas. En estudios realizados por Medina-Dzib (2016) y Rodríguez-García *et al.* (2016) se encontró que el ECA de *P. foetida* presentó actividad inhibitoria sobre la germinación de los conidios de *P. fijiensis* así como de su crecimiento micelial. Esta actividad se evaluó con extractos de hojas colectadas en dos épocas del año y se comprobó que dicha actividad estaba correlacionada con la abundancia de los metabolitos y la época de la colecta. Los extractos de hojas colectadas en los períodos de lluvia fueron activos al 10% (p/v), por lo que se realizó una colecta en agosto de 2018 (época de lluvia) y un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto inhibitorio del ECA en las esporas asexuales de *P. fijiensis*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material Biológico

Material vegetal: Hojas secas de *P. foetida* colectadas en agosto de 2018 (época de lluvias) en la duna costera de Chuburná Puerto, Yucatán.

Material fúngico: Esporas asexuales de *P. fijiensis* cepa C-1233 obtenidas *in vitro* por la Dra. Leticia Peraza Echeverría y la cepa 302 aisladas de la plantación de plátano de INIFAB, en Uxmal y obtenidas *in vitro* por la Dra. Leticia Peraza Echeverría y el M. en C. Fernando Barreto.

2.2.2 Colecta y procesamiento del material vegetal

Se colectaron 2 Kg de hojas de la especie *P. foetida* de la duna costera, se lavaron con agua potable y el exceso de agua se eliminó con una centrífuga manual. Posteriormente se secaron empleando una estufa a 50 °C por 12 h, hasta obtener hojas con textura

crujiente manteniendo el color verde. Por último, se almacenaron en doble bolsas de plástico herméticamente selladas para su posterior uso.

2.2.3 Obtención del extracto crudo acuoso

Para la preparación del ECA se tomaron 10 g de hojas secas, se pulverizaron en una licuadora de laboratorio y se maceraron con 100 mL de agua destilada por 2 min, obteniendo una mezcla al 10% de relación m/v. Luego se realizó una separación de los residuos sólidos empleando técnicas de centrifugación y filtración (Figura 2.1), comenzando por una primera centrifugación: 3,220 g durante 30 min a 20 °C. Posteriormente, el sobrenadante recuperado se distribuyó en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 18,213 g durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante recuperado se esterilizó por filtración utilizando un filtro esterilizante de 0.22 µm de tamaño de poro. El permeado obtenido se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

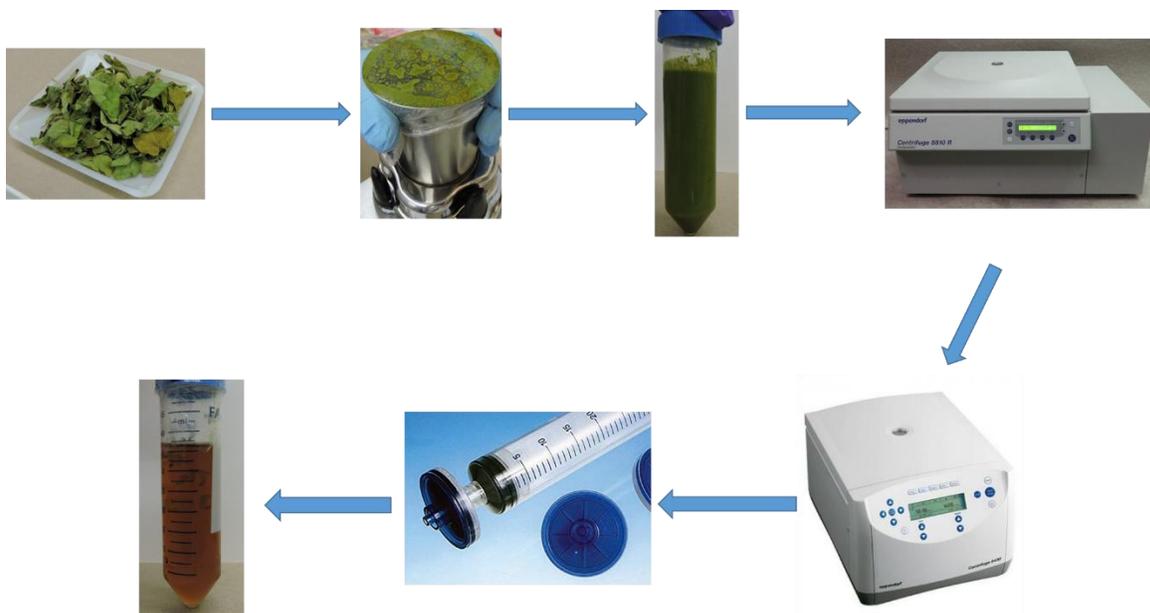


Figura 2.1 Diagrama de obtención del ECA de *Passiflora foetida*.

2.2.4 Bioensayos de actividad antifúngica (BAA)

Se realizaron diluciones del ECA al 10% con agua destilada estéril para obtener las concentraciones de trabajo requeridas (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Cálculos para las diluciones del ECA de *Passiflora foetida*.

Cont. %	Vol. ECA (µL)	Vol. DC (µL)	Vol. H ₂ O (µL)	V final con DC	Viales
9	450	50	0	500	4
5	250	50	200	500	4
3.75	187.5	50	262.5	500	4
2.5	125	50	325	500	4
1.25	62.5	50	387.5	500	4

Para la preparación del bioensayo se procedió según protocolo realizado por Rodríguez-García *et al.* (2019). Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL de volumen, donde se mezcló el ECA con la disolución conidial (DC) a la concentración de 200 c/µL, obteniendo un volumen final de 125 µL en cada vial (112.5 µL de ECA + 12.5 µL de DC) con 2,500 conidios en cada tubo. Se empleó una disolución de nitrato de miconazol al 2% como control positivo y como control negativo medio PDB, ambos con conidios. Los tubos se incubaron por 72 h en oscuridad a la temperatura del cuarto (25 °C). Pasado este período, se sembró una alícuota de 50 µL en cajas Petri con medio PDA y se incubaron por 30 días en condiciones de fotoperíodo (12 h de luz y 12 h de oscuridad) a la temperatura del cuarto (25 °C). Se realizaron evaluaciones cada cinco días empleando el microscopio óptico (Axioplan Zeiss).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Bioensayo de actividad antifúngica

En las imágenes presentadas (Figura 2.2 y Figura 2.3) se comprueba que el extracto evaluado provocó la inhibición en el crecimiento micelial a partir de la concentración 2.5% (T2) en las cepas 1233 y 302, resultado similar al obtenido con el fungicida empleado de control en el ensayo.

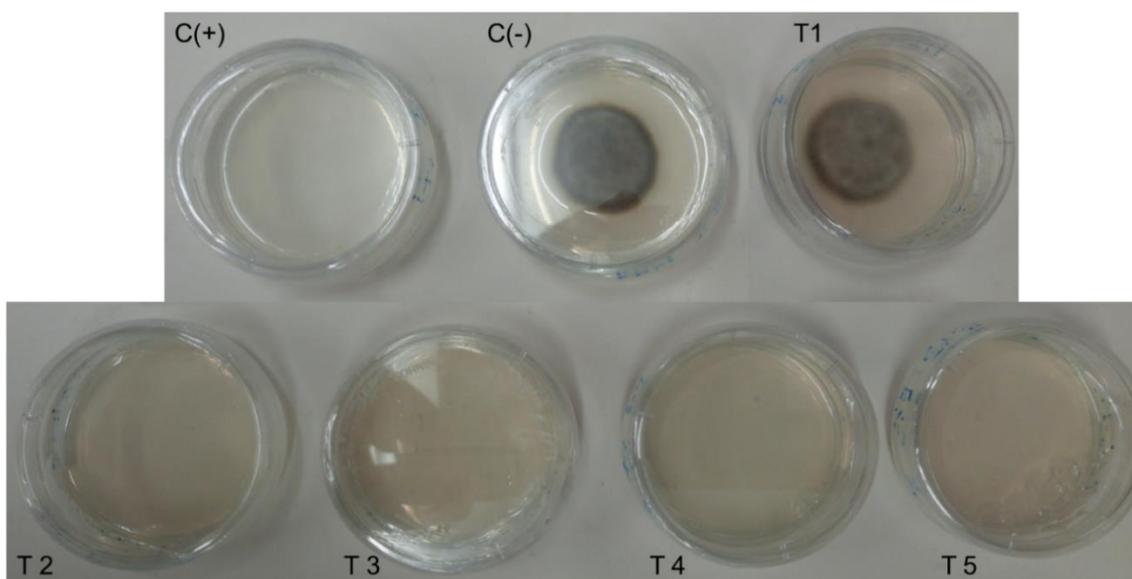


Figura 2.2 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación. C (+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C (-): Control negativo, PDB. T1: ECA 1.25%, T2: ECA 2.5%, T3: ECA 3.75%, T4: ECA 5% y T5: ECA 9%.

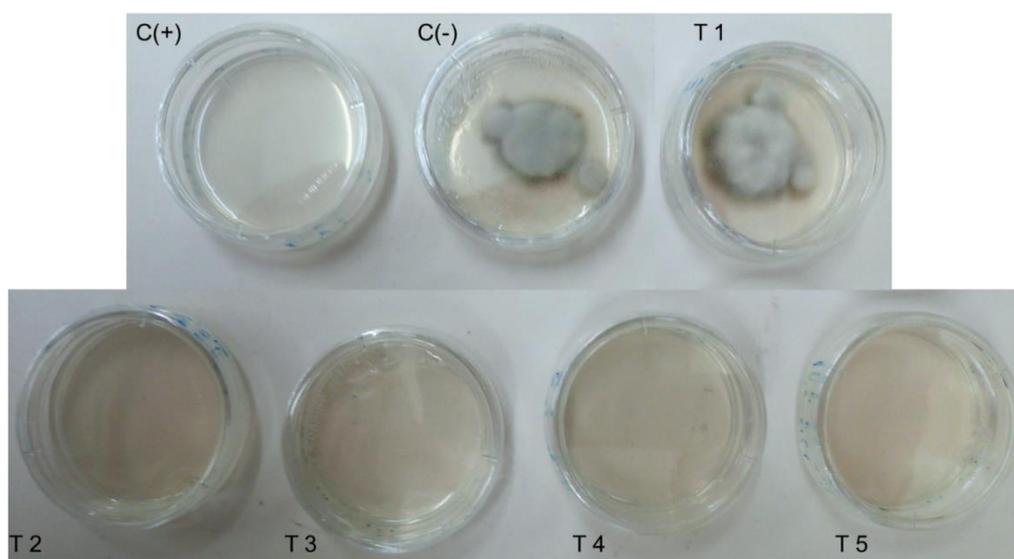


Figura 2.3 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 302 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación. C (+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C (-): Control negativo, PDB. T1: ECA 1.25%, T2: ECA 2.5%, T3: ECA 3.75%, T4: ECA 5% y T5: ECA 9%.

La observación bajo el microscopio óptico (Figuras 2.4 y 2.5) comprobó que a partir de la concentración de 2.5% se presenta la actividad inhibitoria del extracto, siendo la concentración 9% la que presenta una actividad similar al control.

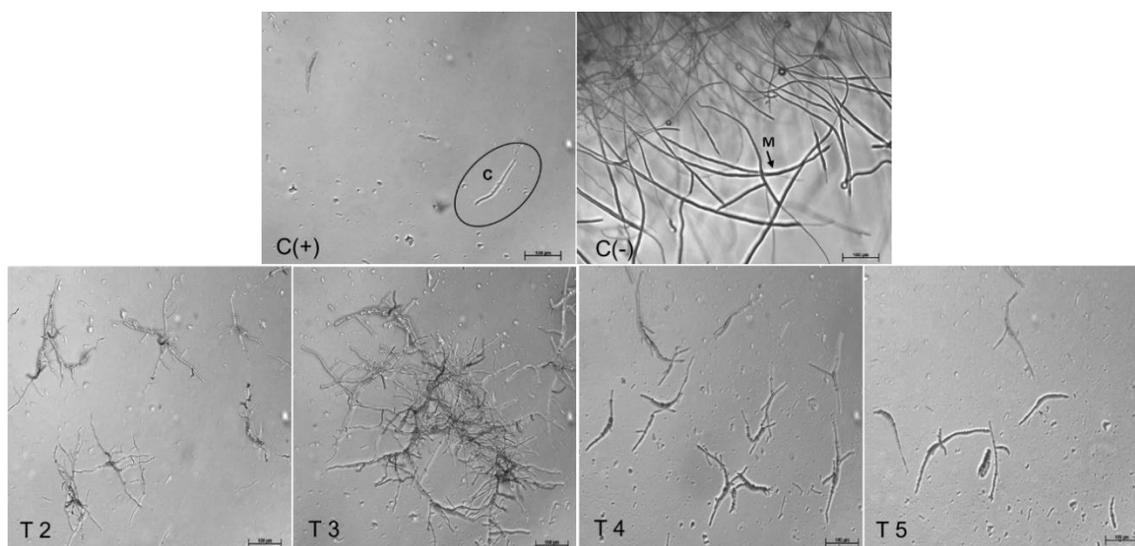


Figura 2.4 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa C-1233 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación observada bajo microscopio óptico. C (+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C (-): Control negativo, PDB. T2: ECA 2.5%, T3: ECA 3.75%, T4: ECA 5% y T5: ECA 9%. Escala: 100 µm.

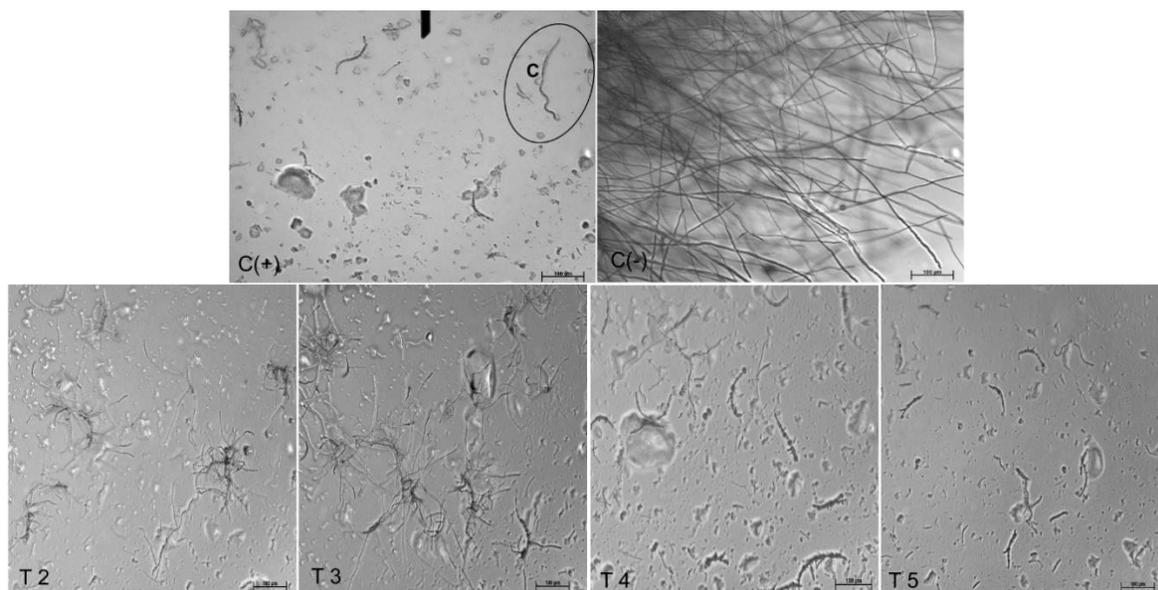


Figura 2.5 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 302 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* a partir de 2.5% a los 30 días después de incubación observada bajo microscopio óptico. C

(+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C (-): Control negativo, PDB. T2: ECA 2.5%, T3: ECA 3.75%, T4: ECA 5% y T5: ECA 9%. Escala: 100 μ m.

2.4 DISCUSIÓN

Se comprobó que el ECA de hojas de *P. foetida* colectadas en la época de lluvias inhibió el crecimiento micelial a partir de la concentración de 2.5%, siendo la de 9% la que inhibió de forma similar que el C (+). En estudios anteriores, se observó una actividad inhibitoria similar pero a partir de 5% y 10% con extractos de hojas de *P. foetida* colectadas en secas y lluvias, respectivamente (Medina-Dzib, 2016). Esto sugiere que las hojas de esta especie producen compuestos que inhiben el crecimiento del hongo, independientemente de la época en que son colectadas.

La actividad antifúngica del ECA de la colecta en la época de lluvias de 2018, fue dos veces superior a la del ECA de la época de secas y cuatro veces superior a la de lluvia del 2012 reportada por Medina-Dzib (2016). Analizando estos datos, el ECA de la época de lluvias fue más activo. Aunque en el presente estudio no se colectaron hojas en la época de secas se esperaría un resultado similar al observado por Medina-Dzib, es decir, que el ECA de la época de secas sería más activo. Una posible explicación de la diferencia de actividad antifúngica entre los extractos de 2012 y 2018 de la época de lluvias (*i.e.* agosto) podría ser ocasionada por las precipitaciones y temperaturas a las cuales estuvieron expuestas las plantas antes de ser colectadas. En cuanto a temperatura máxima y precipitación total, en 2012 fue 37.5 °C y 140.7 mm, mientras que en 2018 fue de 34 °C y 63 mm (CONAGUA, 2021), resultado que indica que el mes de agosto de 2018 fue más fresco y seco, revelando que en 2018 la especie vegetal de interés estuvo sometida a un estrés por sequía mayor que en 2012.

La variación en la actividad antifúngica es afectada por la variación metabólica que presentan las plantas ante diversas condiciones del clima, como el estrés hídrico, por déficit o exceso. Selmar y Kleinwächter (2013) mencionan que el estrés hídrico por sequía produce una alteración en las rutas metabólicas para lo cual las plantas producen compuestos reducidos, *i.e.* fenólicos. Para el estudio actual esta conclusión obtenida por estos investigadores coincide con lo observado en el período de colecta (año 2018), donde

la especie en estudio se desarrolló en una etapa más seca que en el mismo período del año 2012.

Por otra parte, el aumento de las precipitaciones provoca otro tipo de estrés hídrico, no por sequía sino por exceso de agua denominado hipoxia (YENTZENT Group, 2016). Este tipo de condición provoca en la planta la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la variación en el metabolismo celular, lo cual también provoca el aumento de compuestos fenólicos y tocoferoles para contrarrestar el efecto nocivo de estas especies (Jiménez *et al.*, 2012).

Ambos estudios indican la importancia de los compuestos fenólicos en los procesos de estrés hídrico de las plantas, pero al comparar los resultados obtenidos en el estudio del período seco entre los años, se destaca que en 2018 se observó una mejor actividad inhibitoria. Aunque directamente no se puede afirmar que la concentración de los compuestos fenólicos sea la responsable de la actividad, nos indica hacia donde se puede dirigir la investigación, debido al gran número de metabolitos que presentan un anillo fenólico en su estructura, para lo cual se debe de realizar una determinación de la concentración de estos compuestos en el ECA y un bioensayo de actividad antifúngica (BAA) para identificar relación entre la concentración, la actividad y el período de colecta.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS

3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la sección 1.5 es necesario realizar extracciones y fraccionamientos de los extractos para purificar compuestos involucrados en la actividad fungicida y así determinar si el origen del principio activo es un metabolito primario, secundario o la sinergia de ambos. En el caso del ECA de hojas de *P. foetida* se ha utilizado la tecnología de filtración por membrana para separar los compuestos proteicos de los metabolitos secundarios a través de microconos Amicon Ultra 0.5 (Medina-Dzib, 2016; Millipore, 2009). Igualmente, para aislar el metabolito responsable de la actividad antifúngica del ECA de *P. foetida* se ha seguido el protocolo de Bokesch *et al.* (2004), quienes obtuvieron un péptido con actividad anti-VIH del extracto acuoso de hojas de *Dorstenia contrajerva* y *Treculia obovoidea*, a través de extracciones secuenciales utilizando disolventes de polaridad diferente y fraccionando el extracto activo.

Se realizaron determinaciones fitoquímicas con el objetivo de detectar algunas familias de metabolitos secundarios que están presentes en los extractos (*i.e.* ECA, EAB, DCM/MeOH, MeOH). Además de los BAA, se cuantificó la actividad fungicida empleando una técnica colorimétrica de viabilidad celular.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Separación de metabolitos del ECA por filtración

Se procedió a separar los metabolitos por peso molecular con una alícuota de 4.5 mL de ECA (10%). Los microconos utilizados presentan una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 3,000 uma en donde se retienen las proteínas/péptidos (*i.e.* fracción retenida), mayores o iguales a dicho tamaño. Lo que se permea corresponde a los metabolitos secundarios (*i.e.* fracción permeada), menores de 3,000 uma.

3.2.1.1 Material Biológico

Material fúngico: Para realizar los ensayos *in vitro* y la cuantificación de la actividad inhibitoria de los extractos se utilizó la cepa C-1233 proporcionados por la Dra. Leticia Peraza Echeverría.

3.2.1.2 Establecimiento del protocolo

Se estableció el protocolo para concentrar proteínas centrifugando a 12,000 × *g* (Eppendorf 5810 R; rotor F45-30-11), 500 µL de volumen (tubos de 1.5 mL), por 30 min a 4 °C para evitar la desnaturalización de las proteínas por temperatura y 12 ciclos máximo para cada microcono (Millipore, 2009). Además, se realizaron cinco lavados con agua destilada para eliminar los metabolitos secundarios.

El proceso de separación consistió en realizar un ciclo de lavado de los microconos con 500 µL de agua destilada a las condiciones de trabajo descritas, así, 500 µL del ECA en cada microcono se centrifugaron (12,000 *g* por 30 min a 4 °C), hasta completar el volumen total a separar. En cada ciclo se midió el volumen obtenido en el retenido y el permeado empleando micropipetas. Finalmente, la concentración de las fracciones se ajustó a la inicial completando con agua destilada hasta el volumen inicial (4.5 mL).

Con el propósito de eliminar trazas de metabolitos secundarios en la fracción de compuestos proteicos, se realizaron cinco lavados con agua destilada a una alícuota de 1.5 mL de la fracción proteica después de ajustar la concentración. El procedimiento anterior se repitió cinco veces.

3.2.1.3 Bioensayo de actividad antifúngica

Se realizó como se describe en la sección 2.2.4 evaluando la concentración de 9%, que fue la que mejores resultados mostró al compararlo con el control positivo y cinco tratamientos que corresponden a las fracciones obtenidas por filtración utilizando membranas Amicon (Cuadro 3.1), a partir de lo obtenido en el permeado y el retenido de cada etapa de separación del ECA. Además, se tomó una alícuota del retenido y se lavó con agua para obtener una fracción retenida libre de metabolitos secundarios y su permeado correspondiente. Por último, se mezclaron ambas fracciones separadas del

ECA para identificar si la actividad biológica se mantenía similar al ECA sin separar. El experimento se realizó considerando tres repeticiones por tratamiento.

Cuadro 3.1 Fracciones obtenidas por filtración utilizando membranas.

Fracciones	Tratamientos
Concentrado de proteínas	T1
Concentrado de metabolitos secundarios	T2
Concentrado de proteínas después de lavar	T3
Concentrado de metabolitos secundarios después de lavar	T4
Mezcla de proteínas y metabolitos	T5

3.2.2 Extracción y fraccionamiento del extracto

Se realizó una extracción sucesiva de acuerdo con el protocolo de Bokesch *et al.* (2004), usando tres sistemas de disolventes: diclorometano-metanol (DCM/MeOH) 1:1, metanol (MeOH) 100% y agua destilada, obteniéndose en este caso el extracto acuoso de Bokesch (EAB). De esta forma se realizó una separación de los metabolitos con relación a su polaridad. Posteriormente se monitoreó la actividad inhibitoria de cada extracto y se fraccionó el extracto que tuvo dicha actividad.

Material vegetal: Se utilizaron 1.2 Kg de hojas secas almacenadas de la colecta de agosto 2018, las cuales se trituraron hasta obtener un polvo fino.

Material fúngico: Se emplearon conidios viables de la cepa C-1233.

El material vegetal previamente pulverizado se puso en contacto con 8 L de DCM/MeOH (1:1) por un período de 24 h a 25 °C con agitación manual cada 6 h. Se decantó el sobrenadante y se evaporó el disolvente empleando un evaporador rotatorio a 218 mbar de presión. El extracto obtenido se almacenó a 4 °C y el material vegetal recuperado se secó para eliminar el disolvente residual. Este proceso se repitió empleando MeOH 100%. Por último, se realizó una tercera extracción con agua destilada empleando 13 L de agua destilada macerando por 36 h, 12 h a la temperatura del cuarto (25 °C) y 24 h a 4 °C, con agitación manual cada 6 h. El sobrenadante obtenido se liofilizó (-44°C por 96 h a una presión de 0.08 mbar) y el EAB obtenido se almacenó a -20°C.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.2.4, se realizó el ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de cada extracto a las concentraciones mostradas en el Cuadro 3.2, realizando el estudio por triplicado. El ensayo se realizó utilizando el nitrato de miconazol al 2% como control positivo y como controles negativos el disolvente (DMSO al 4%, Tween 20 al 0.6%) y el medio de cultivo PDA. El ensayo se monitoreó por 30 días a través de inspección visual y observación bajo microscopio óptico (Axioplan, Carl Zeiss, Alemania)

Cuadro 3.2 Concentraciones de extractos evaluados en los bioensayos.

Extracto	Concentraciones por evaluar (mg/mL)				
DCM/MeOH	50	25	12.5	6.125	3.175
MeOH	50	25	12.5	6.125	3.175
EAB	50	25	12.5	6.125	3.175

El EAB liofilizado se fraccionó en seis partes empleando cromatografía líquida al vacío (VLC, por sus siglas en inglés), utilizando una fase estacionaria de gel de sílice en fase reversa C-18. El sistema de elución fue metanol-agua (MeOH/H₂O) y se empleó una elución en gradiente ascendente de MeOH desde 0% hasta 100% con incremento del 20%. La fase estacionaria se empacó en una columna de vidrio utilizando MeOH como disolvente de empaque. Se procesaron 200 g de EAB liofilizado distribuidos en cuatro columnas con 50 g de carga cada una.

La fase estacionaria utilizada se recuperó realizando dos lavados, uno con MeOH 100% y otro con acetonitrilo (ACN) 100%. Se secó y se almacenó para su posterior uso.

Siguiendo el esquema descrito en la sección 2.2.4 se realizó el ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de las fracciones activas: fracción cinco y seis (F5 y F6) conocidas previamente en estudios anteriores. El bioensayo se realizó por triplicado a las concentraciones mostradas en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3 Concentraciones de las fracciones activas evaluadas en los bioensayos.

Fracción	Concentraciones por evaluar (µg/mL)				
5	1,000	500	250	125	62.5
6	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39

Se realizó un análisis cromatográfico comparativo entre las fracciones F5 y F6 empleando la cromatografía en capa delgada, para lo cual se empleó una matriz de sílice en fase reversa C-18, sobre un soporte de aluminio. Se utilizaron tres disolventes: agua, MeOH y ACN que se mezclaron en proporciones diferentes formando sistemas binarios y terciarios, buscando separar los compuestos de las fracciones. En el Cuadro 3.4 se muestran los sistemas utilizados.

Cuadro 3.4 Proporciones de los disolventes de los sistemas formados para separar los compuestos.

Sistema	H ₂ O	ACN	MeOH
1	35	30	35
2	30	35	35
3	40	30	30
4	-	50	50
5	50	50	-
6	50	-	50

Para el ensayo se prepararon disoluciones de cada fracción en MeOH-H₂O logrando una concentración de 2.4% para la F5 y 2% para la F6. Se utilizó una micropipeta de 20 µL para tomar volúmenes exactos, garantizando colocar la misma cantidad de las muestras en el punto de aplicación. En el Cuadro 3.5 se resumen los datos de la aplicación de cada muestra.

Cuadro 3.5 Concentración de F5 y F6.

Fracción	Concentración (%)	Volumen (µL)	Concentración (µg/mL)
5	2.4	1	24
6	2	1.2	24

Para realizar la purificación cromatográfica en HPLC se emplearon dos columnas de fase reversa, una analítica para la exploración de la muestra y otra semi-preparativa para la purificación. Ambas columnas fueron de 250 mm de largo, empacadas con gel de alúmina C-18 con un tamaño de poro de 5 µm. Se empleó un equipo cromatográfico (HPLC) de la marca *Agilent Technologies* de la serie 1260 *Infinity*. Para la cromatografía analítica con un diámetro interno de 4.6 mm, se empleó un flujo volumétrico de 1 mL/min y la muestra a una concentración de 1 mg/mL, mientras que la semi-preparativa presentó un diámetro interno de 10 mm y un flujo de 3 mL/min y una concentración de la muestra de 5 mg/mL,

manteniendo el tiempo de retención constante al cambiar la escala. El sistema de disolventes utilizados fue ACN/MeOH/H₂O en diferentes proporciones a partir de los resultados de la exploración por CCD y para la detección de las señales se realizaron lecturas a diferentes longitudes de ondas: 214, 254, 270, 330 y 365 nm.

En la purificación semi-preparativa, los picos se colectaron individualmente, se concentraron en un evaporador rotatorio y se liofilizaron para cuantificar las cantidades obtenidas. Finalmente, se evaluó la actividad inhibitoria de cada muestra obtenida para determinar dónde se encontraba la actividad, empleando el protocolo descrito en la sección 2.2.4.

Para la separación por HPTLC se empleó una placa igual a la empleada en el análisis exploratorio en CCD descrito anteriormente y el sistema de disolventes ACN/MeOH/H₂O (3:3.5:3.5). La corrida cromatográfica se realizó de manera automática empleando el equipo CAMAG (*Automatic TLC Sampler 4*) de cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés). La corrida constó de tres etapas: aplicación de la muestra, desarrollo de la corrida y revelado. Se empleó una disolución de las fracciones F5 y F6 del EAB al 5% de concentración que equivale a 50 µg/mL. La cromatografía se realizó por triplicado aplicando alícuotas de 5, 10 y 20 µL de cada muestra. La placa se inspeccionó a luz UV a longitudes de 254 nm, 366 nm y luz blanca.

Después del desarrollo de la placa se procedió a realizar la bioautografía siguiendo el protocolo desarrollado por la Dra. Leticia Peraza Echeverría a partir de lo descrito por Dewanjee *et al.* (2015). Primeramente, la placa sin revelar se depositó en una caja Petri estéril y se cubrió con una disolución conidial del hongo a una concentración de 50 conidios/µL. La disolución conidial se preparó diferente a la de los BAA, pues se adicionó 2 µL de amikacina como antibacteriano para obtener una concentración de 250 µg/mL en la disolución. La placa se incubó en oscuridad a 25 °C por 72 h y el control positivo empleado fue nitrato de miconazol al 2%. Finalizada la incubación, se reveló con un compuesto que pertenece a la familia de las sales de tetrazolio, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para identificar la zona de inhibición.

3.2.3 Cuantificación de la concentración de sólidos totales presentes en el ECA

Una alícuota (7 mL) del ECA al 10% se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizó a $-44\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h a una presión de 0.08 mbar. La muestra seca se pesó (189.4 mg) y se calcularon las concentraciones del ECA, *i.e.* en m/v equivalentes a 10, 5, 2.5 y 1.125%.

3.2.4 Análisis fitoquímico de los extractos y fracciones activas

Para detectar en los extractos y fracciones activas la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas y terpenos (Robles-García *et al.*, 2016; Sasidharan *et al.*, 2011), se utilizaron técnicas colorimétricas. Se analizó 1 mL del ECA al 10% para cada ensayo (*i.e.* 27 mg) y 1 mg por separado de los extractos obtenidos por el método de Bokesch *et al.* (2004), utilizando 100 μL del disolvente correspondiente a cada extracto. Se realizaron las determinaciones fitoquímicas por triplicado utilizando tubos de ensayo. Para el control negativo se utilizó agua destilada mientras que para el control positivo una disolución de un compuesto de cada tipo de metabolito secundario a detectar.

Detección de alcaloides: prueba de Dragendorff

Se tomó un volumen de 0.5 mL de muestra y se agregaron seis gotas de ácido clorhídrico (HCl) al 10%. Se homogeneizó en vórtex y se calentó en baño por 20 min. Posteriormente se enfrió hasta temperatura del cuarto ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), se añadió tres gotas del reactivo de Dragendorff y se agitó. La respuesta positiva es una coloración naranja brillante o la formación de un precipitado. Para el control positivo se utilizó una muestra de café rico en cafeína.

Detección de taninos: prueba de Braemer

A un volumen de 0.5 mL de muestra se agregaron tres gotas de una disolución de cloruro férrico al 3% y se comprobó si la coloración obtenida era azul oscuro o verde. El control positivo fue vino tinto comercial rico en taninos (1 mL).

Detección de saponinas: prueba de la espuma

A un volumen de 0.5 mL de muestra se agregó 1 mL de agua destilada, se agitó por 1 min en vórtex determinando la cantidad de espuma y el tiempo que se mantuvo presente. El control positivo fue 1 g de hojas secas de *Agave lechuguilla* en 2 mL de H₂O destilada.

Detección de flavonoides: prueba de Shinoda

Para este ensayo se agregaron unos fragmentos de magnesio a 0.5 mL de muestra disuelta en metanol, seguidamente se agregaron cuatro gotas de ácido clorhídrico (HCl). La reacción obtenida en presencia de flavonoides es efervescente y se colorea débilmente de naranja. El control positivo fue 1 mL de cirsimarina a una concentración de 2 mg/mL.

Detección de terpenoides: prueba de Liebermann-Burchard

Se partió de una alícuota de 0.5 mL de muestra, a la cual se agregaron cuatro gotas de cloroformo y se homogeneizó. Posteriormente, se agregaron tres gotas de anhídrido acético y tres gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una vez finalizada la reacción se comprobó la presencia de un precipitado color morado. El control positivo fue 1 mL de betulina a una concentración de 2 mg/mL.

3.2.5 Cuantificación de la viabilidad de las esporas para validar la actividad fungicida de los extractos y fracciones activas

Como se describió anteriormente, la actividad fungicida de un extracto puede ser validada cuantificando el porcentaje de viabilidad celular (*i.e.* esporas) por la técnica colorimétrica descrita en la sección 1.7. En estudios anteriores se demostró que 10,000 conidios/mL de *P. fijiensis* y 36 h de incubación fueron óptimas para evaluar dicha actividad ya que no afectaron la visualización del cambio de color (Gómez-Hernández, 2018). El esquema del ensayo se modificó a partir de lo que plantea el protocolo del fabricante para adecuarlo a las características de crecimiento del hongo (Signaling, 2010; AbD Serotec, 2008).

Para el ensayo, se preparó en viales un volumen de 95 μ L de cada extracto y se mezcló con 5 μ L de DC (200 conidios/ μ L), para obtener la concentración final de 10,000 conidios/mL en cada vial. La mezcla se incubó por 72 h en ausencia de luz a la temperatura del cuarto (25 °C). Posteriormente, se centrifugó a 3,220 g por 30 min para eliminar el

sobrenadante. La pastilla de conidios obtenida se resuspendió en 90 µL de PDB con 10 µL de alamarBlue®. La suspensión se incubó por 36 h a 30 °C en oscuridad y a 180 rpm de agitación. Pasado el período de incubación, se centrifugó a 3,220 g por 30 min para recuperar el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 570 y 600 nm de longitud de onda empleando un lector de placa.

El % de inhibición del hongo por cada tratamiento se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción del AB} = \frac{(O2 * A1) - (O1 * A2)}{(R1 * N2) - (R2 * N1)} * 100 \quad (\text{AbD Serotec, 2008})$$

La actividad fungicida fue evaluada por triplicado para los extractos y fracciones activas. Además, se evaluó el biofungicida y el fungicida comercial (nitrato de miconazol al 2%), como controles positivos en el BAA.

Se prepararon cinco disoluciones seriadas de cada extracto y fracción, considerando las concentraciones evaluadas en los anteriores BAA (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6 Concentraciones por tratamiento para cuantificar la actividad fungicida.

Tratamiento	Concentraciones
T1 ECA	3 a 27 mg/mL (1.25-10%)
T2 EAB	3.4-54.5 mg/mL
T3 F5	68.8-1100 µg/mL
T4 F6	37.5-600 µg/mL

También se analizó la actividad fungicida contra el hongo de los controles positivos empleados en los BAA: nitrato de miconazol 2% (C+1) de 12.5 a 200 µg/mL y el biofungicida (C+2) de 0.05 a 0.8%. El resultado fue el punto de comparación entre los tratamientos y ambos controles para cuantificar quién era más activo.

Como se indicó en la sección 3.2.5, los controles para este ensayo fueron: control de esterilidad con medio sin conidios para evaluar su esterilidad y control de viabilidad para evaluar la germinación y crecimiento micelial de los conidios empleados (Signaling, 2010; AbD Serotec, 2008). Estos controles son necesarios para realizar los cálculos

correspondientes utilizando la ecuación descrita en la sección 3.2.5, sin embargo, no miden acción biológica sobre los conidios.

En la Figura 3.1 se muestra el diseño final de la placa de 96 pocillos para el ensayo descrito. Inicialmente se dividió en tres zonas: zona 1 correspondiente al control de la esterilidad de los tratamientos evaluados y el medio de cultivo PDB, siendo su objetivo descartar que exista contaminación en los tratamientos y el medio de cultivo que dificulten el desarrollo y la interpretación de los resultados. Las zonas 2 y 3 corresponden a los tratamientos evaluados, mientras que los controles de esterilidad (final de zona 1) y control de viabilidad celular (final de zona 3) sirvieron para realizar los cálculos finales. En cada placa se evaluaron tres tratamientos: los controles positivos de los BAA, los extractos y fracciones activas preparadas en cinco disoluciones de diferentes concentraciones, siendo T1 c1 el tratamiento 1 a la concentración más diluida.

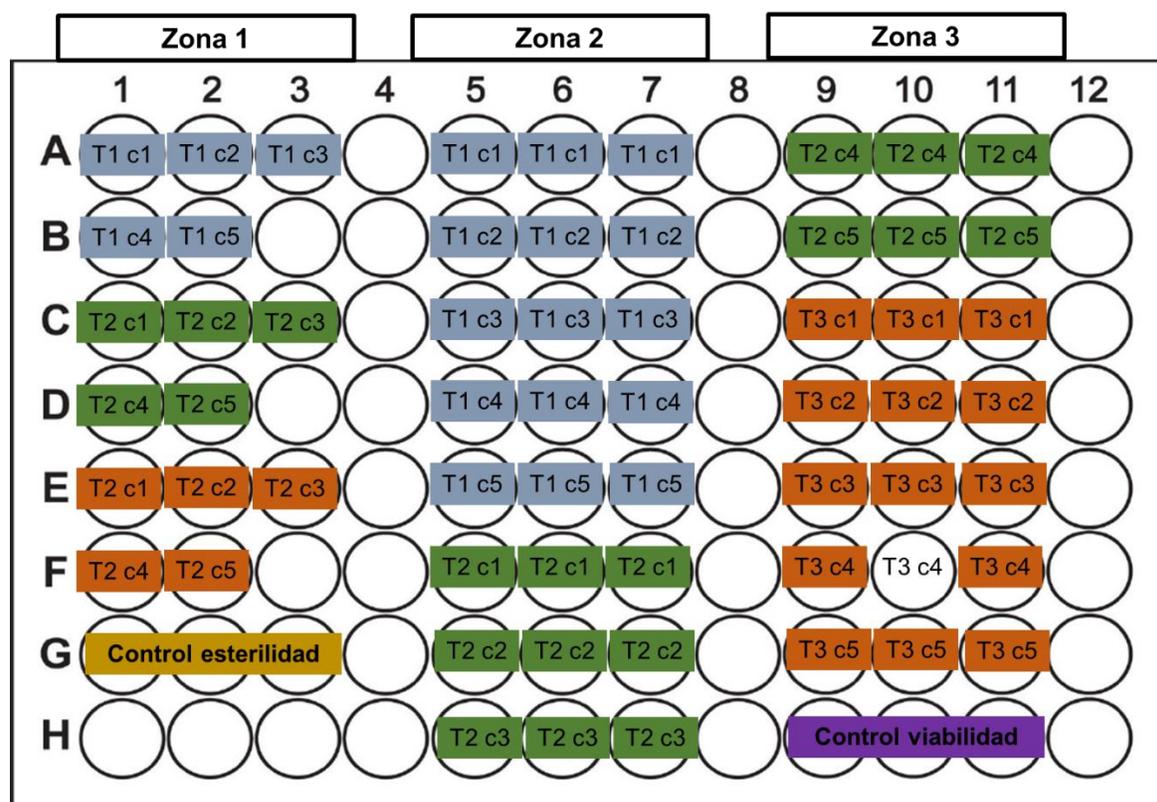


Figura 3.1 Diseño de la placa de 96 pocillos.

Los datos del ensayo de cuantificación se analizaron estadísticamente empleando el programa GraphPad Prism versión 8.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Separación de metabolitos del ECA por filtración

La separación de metabolitos del ECA se realizó con el objetivo de identificar la naturaleza de los compuestos involucrados en la actividad inhibitoria. Se utilizaron tres microconos, cada uno con un total de nueve ciclos, logrando un factor de concentración de 6.3. En el Cuadro 3.7 se observan los volúmenes obtenidos para cada fracción.

Cuadro 3.7 Volúmenes obtenidos en el proceso de separación de metabolitos del ECA.

Fracción	Volumen (μL)	Concentración (%)
Concentrado de proteínas	3000	10
Concentrado de metabolitos secundarios	1500	10
Concentrado de proteínas después de lavar	4500	10
Concentrado de metabolitos secundarios después de lavar	6075	X
X: no cuantificado		

Después de 30 días de cultivo en fotoperíodo, se observó una inhibición de crecimiento micelial en la caja Petri correspondiente a la mezcla de metabolitos secundarios con compuestos proteicos (T5) (Figura 3.2).

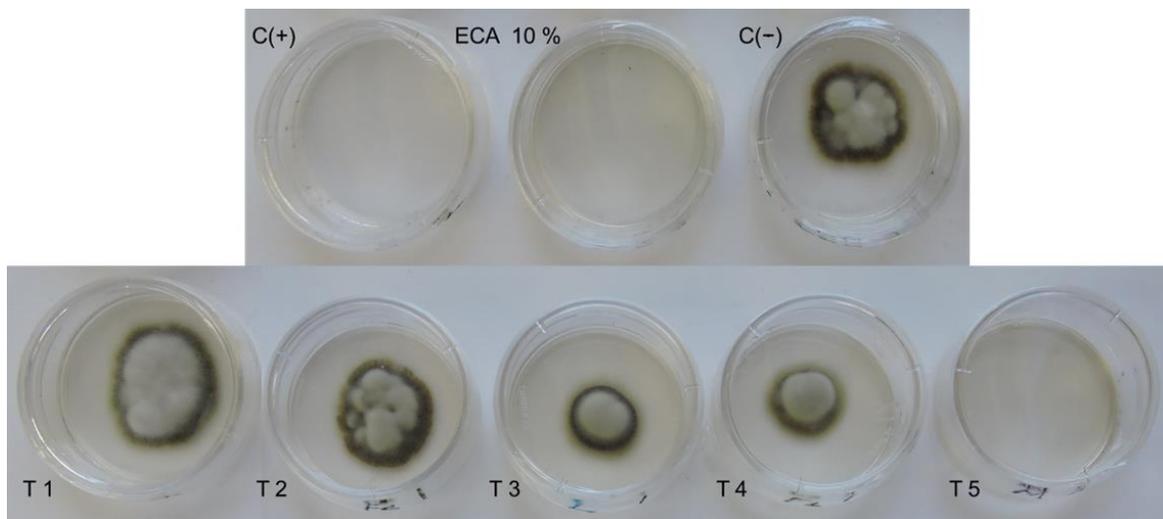


Figura 3.2 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* fraccionado por microconos Amicon después de 30 días de incubación. C(+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C(-): Control negativo, PDB. T1: Fracción proteica, T2: Metabolitos secundarios, T3: Fracción proteica lavada, T4: Permeado de la fracción proteica lavada y T5: Mezcla de la fracción proteica con los metabolitos secundarios.

Al observar la caja T5 bajo microscopio (Figura 3.3), se comprobó una actividad similar al ECA sin tratar, confirmando la recuperación de la actividad biológica después de mezclar.

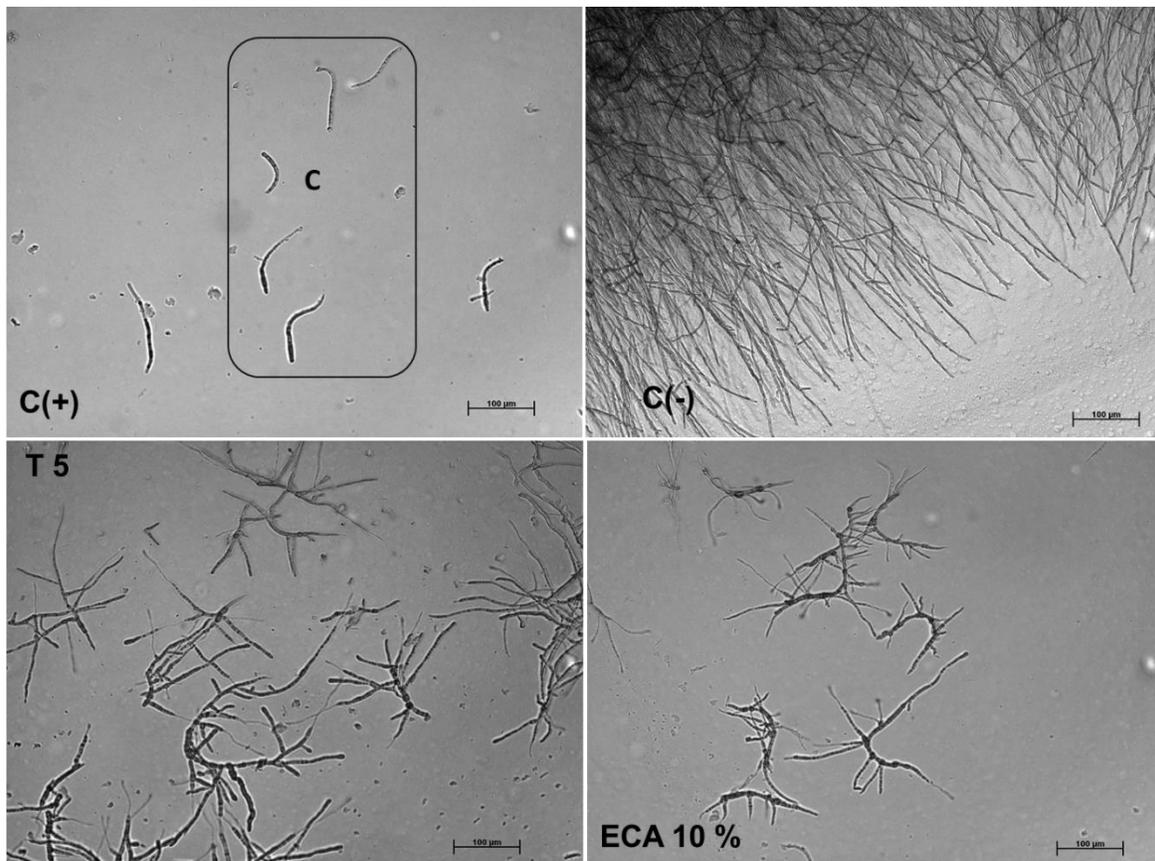


Figura 3.3 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 por el ECA de hojas de *Passiflora foetida* fraccionado por microconos Amicon después de 30 días de incubación observado bajo microscopio óptico. C(+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C(-): Control negativo, PDB y T5: Mezcla de la fracción proteica con los metabolitos secundarios. Escala: 100 µm.

3.3.2 Extracción y separación

Las extracciones sucesivas realizadas a partir de material vegetal por el método de Bokesch *et al.* (2004) aportaron 128 g del extracto de DCM-MeOH, 52 g del extracto MeOH y del EAB 220 g. De cada extracto se tomó una alícuota para preparar disoluciones y determinar cuál presenta actividad inhibitoria. Luego de 30 días de incubación se comprobó que solo el EAB mostró inhibición en la germinación y desarrollo del conidio, a partir de la concentración de 6.25 mg/mL (Figura 3.4).

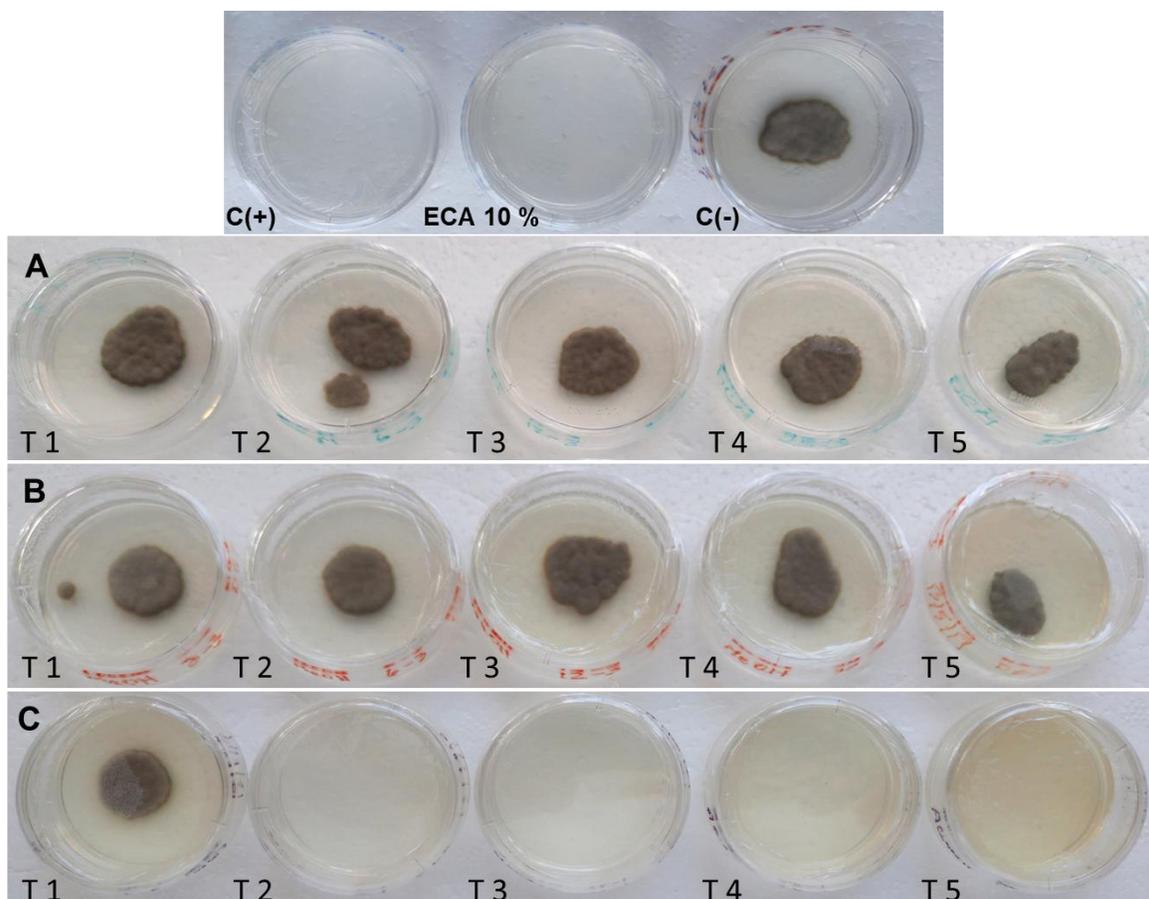


Figura 3.4 Inhibición micelial de la cepa 1233 expuesta a extractos de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. A: extracto de DCM-MeOH, B: extracto MeOH, C: extracto EAB, C(+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C(-): Control negativo, PDB. T1: 3.175 mg/mL, T2: 6.25 mg/mL, T3: 12.5 mg/mL, T4: 25 mg/mL y T5: 50 mg/mL.

Lo descrito anteriormente se observó bajo microscopio óptico, comprobándose inhibición micelial de los conidios desde 6.25 mg/mL y con el ECA al 10% (Figura 3.5). Aunque en la concentración de 6.25 mg/mL se observó una germinación de los conidios, la inhibición del crecimiento micelial se observó durante los 30 días de monitoreo. El resultado indicó que la naturaleza de los compuestos activos es polar e hidrofílica, debido a que las extracciones sucesivas eliminan los compuestos que presenten poca afinidad por el agua. Este resultado sentó las bases para la posterior etapa de fraccionamiento del extracto activo.

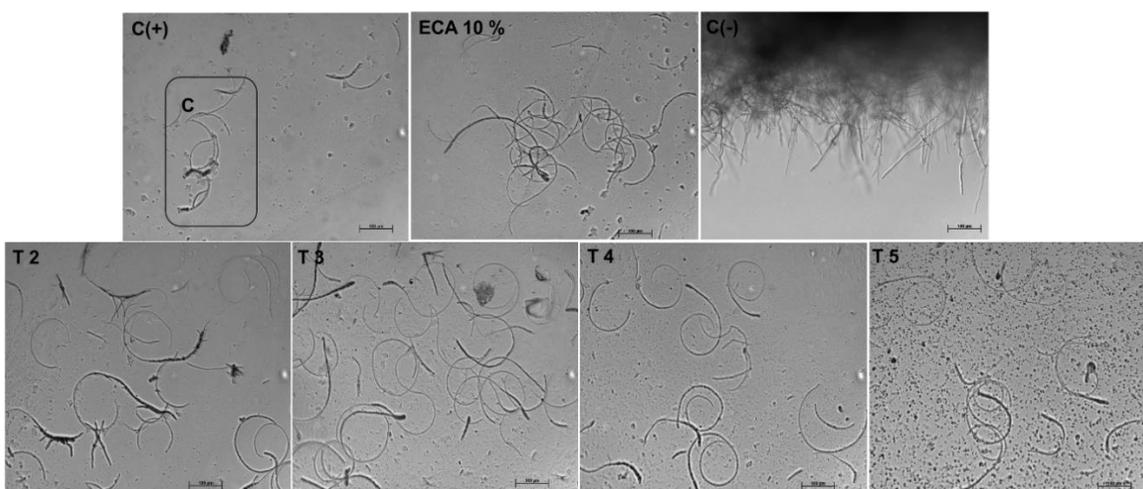


Figura 3.5 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 en contacto con el EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. C(+) = control positivo, nitrato de miconazol 2%, C(-): control negativo, PDB. T2: 6.25 mg/mL, T3: 12.5 mg/mL, T4: 25 mg/mL y T5: 50 mg/mL. Escala: 100 μ m.

A partir de la liofilización de la alícuota del ECA (sección 3.2.3) se obtuvieron las concentraciones equivalentes de % a mg/mL como se muestra en el Cuadro 3.8.

Cuadro 3.8 Equivalencias de las diluciones del ECA de *Passiflora foetida*.

Concentración (%)	Equivalencia (mg/mL)
10	27.06
5	13.53
3.75	10.15
2.5	6.77
1.125	3.04

Considerando los datos es posible comparar la actividad inhibitoria del ECA (Figuras 2.2 y 2.3) a partir de 2.5%, ya que este valor equivale a 6.77 mg/mL, similar al del EAB (6.25 mg/mL). Este resultado sugiere que ambos extractos presentan compuestos activos en similares proporciones, independientemente del proceso de extracción utilizado.

A partir de los resultados obtenidos se fraccionó el extracto acuoso como se indicó en la sección 3.3.5. De los 200 g procesados del EAB liofilizado se obtuvieron ocho fracciones (F1 a F8), seis correspondientes a las eluciones (Figura 3.6) y dos a los lavados para recuperar la gel de sílice. El estudio se concentró en las fracciones cinco y seis (F5 y F6)

pues han sido las que han mostrado actividad inhibitoria en años anteriores (F5 activa a 1 mg/mL y F6 activa a 6.25 $\mu\text{g/mL}$). Ambas fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio, eliminando el MeOH. Posteriormente se liofilizaron para eliminar el exceso de agua.



Fracción 1 Fracción 2 Fracción 3 Fracción 4 Fracción 5 Fracción 6

Figura 3.6 Fracciones obtenidas en la VLC del EAB. Fracción 1: 0% de MeOH, fracción 2: 20% de MeOH, fracción 3: 40% de MeOH, fracción 4: 60% de MeOH, fracción 5: 80% de MeOH y fracción 6: 100% de MeOH.

Después del proceso de concentración y liofilización se obtuvo de F5 y F6: 1,200 mg y 597 mg, respectivamente. La actividad inhibitoria de ambas fracciones se monitoreó a través del BAA por microdilución. Para F5 se realizó una dilución de 1.1 mg de muestra en 1 mL de una disolución de DMSO (4%), Tween 20 (0.6%) y agua. La concentración final de F5 fue de 1,100 $\mu\text{g/mL}$. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas con agua para obtener un total de 5 concentraciones para evaluar: 1,100, 550, 275, 137.5 y 68.75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Después de 30 días de incubación en fotoperíodo se observó que F5 es activa a partir de la concentración de 137.5 $\mu\text{g/mL}$ (T2) (Figura 3.7). Al analizar el resultado por inspección bajo microscopio óptico, se confirmó la actividad de dicha fracción (Figura 3.8), observándose una inhibición en el crecimiento micelial en comparación con el control negativo.

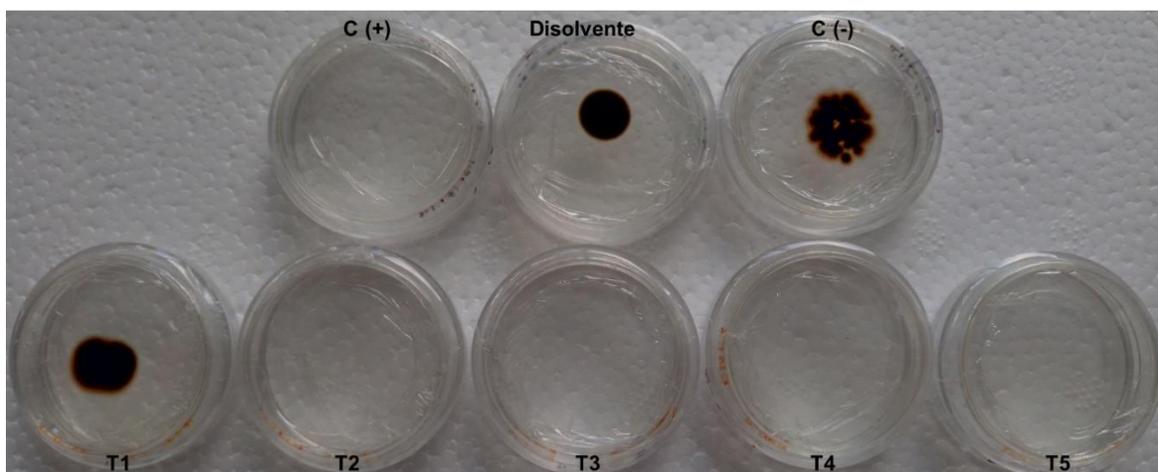


Figura 10.7 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 en contacto con F5 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. C (+) = control positivo, nitrato de miconazol 2%, C (-): control negativo, PDB. Disolvente: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. T1 = 68.75 µg/mL, T2 = 137.5 µg/mL, T3 = 275 µg/mL, T4 = 550 µg/mL y T5 = 1100 µg/mL.

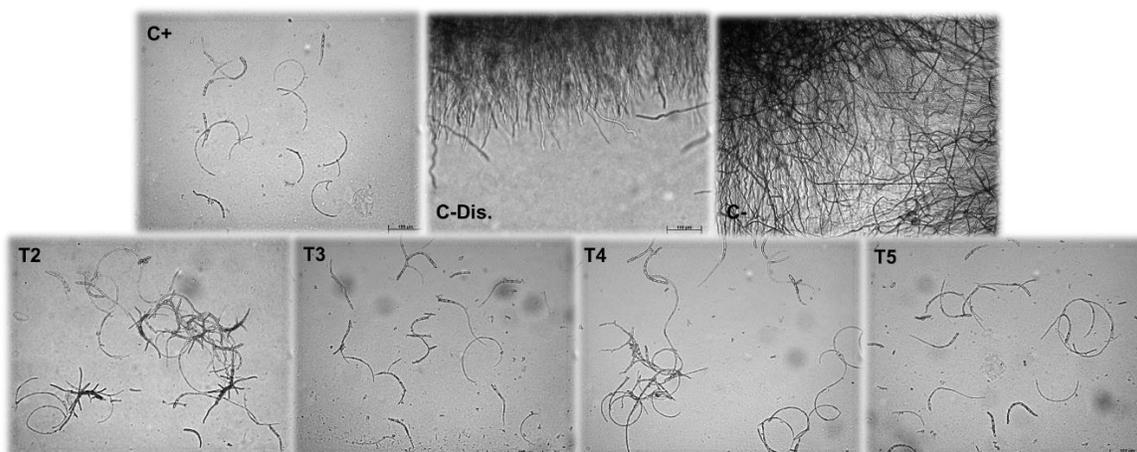


Figura 3.8 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 en contacto con F5 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. C+ = control positivo, nitrato de miconazol 2%. C-Dis.: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. C-: control negativo, PDB T2 = 137.5 µg/mL, T3 = 275 µg/mL, T4 = 550 µg/mL y T5 = 1100 µg/mL. Escala: 100 µm

Con respecto a la F6, después de 15 días de incubación en fotoperíodo, se observó que ninguna concentración inhibió el crecimiento micelial de *P. fijiensis* (Figura 3.9). Este experimento se repitió dos veces para descartar posibles errores en los cálculos o en la manipulación. En la Figura 3.10 se confirmó que la F6 es inactiva a concentraciones ≤ 6.25 µg/mL.

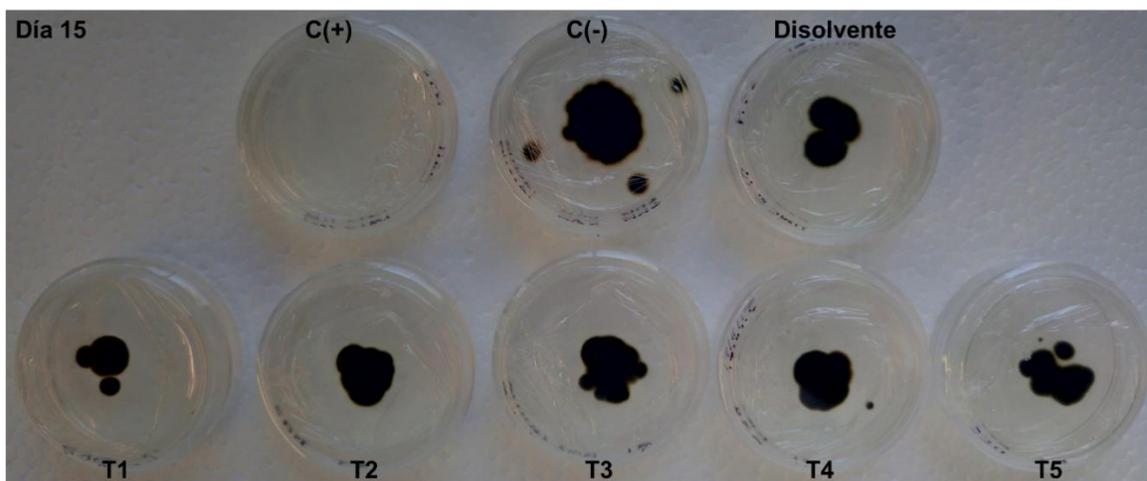


Figura 11.9 Crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 15 días de incubación. C (+) = control positivo, nitrato de miconazol 2%, C (-): control negativo, PDB. Disolvente: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. T1 = 6.25 µg/mL, T2 = 3.125 µg/mL, T3 = 1.56 µg/mL, T4 = 0.78 µg/mL y T5 = 0.39 µg/mL.

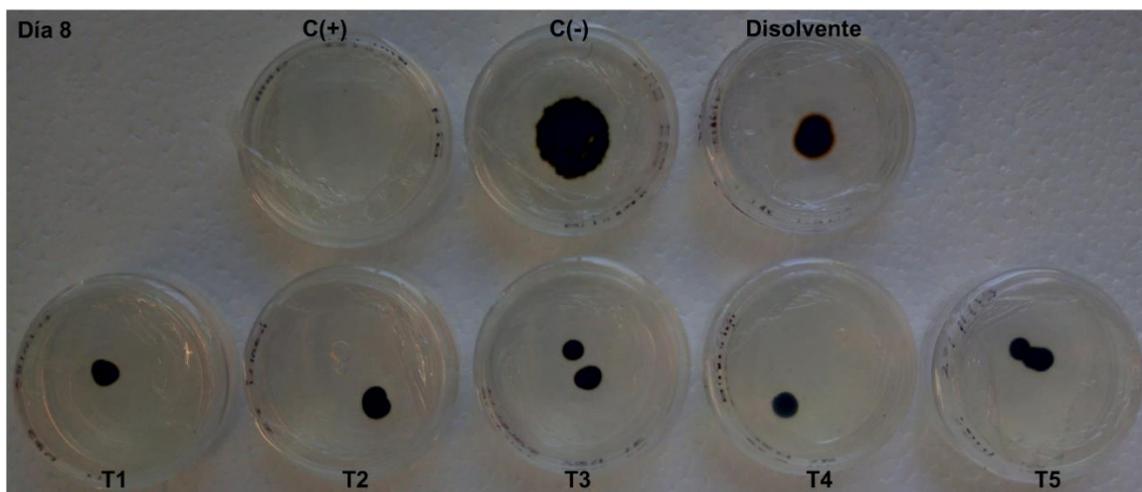


Figura 12.10 Crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 8 días de incubación. C (+) = control positivo, nitrato de miconazol 2%, C (-): control negativo, PDB. Disolvente: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. T1 = 6.25 µg/mL, T2 = 3.125 µg/mL, T3 = 1.56 µg/mL, T4 = 0.78 µg/mL y T5 = 0.39 µg/mL.

En la Figura 3.11 se observa que la máxima concentración (T5) de la F6 inhibió aparentemente el crecimiento micelial del hongo a los 30 días después de incubación de igual forma que los controles positivos (*i.e.* nitrato de miconazol y biofungicida comercial). Sin embargo, se observa que la inhibición de la germinación del conidio por T5 (125 µg/mL) fue menor que la de los controles positivos (Figuras 3.12 a, b y c), lo que indica que existió

una inhibición del crecimiento micelial similar a lo observado en la concentración menos activa de la muestra F5 (T2) (Figura 3.8).

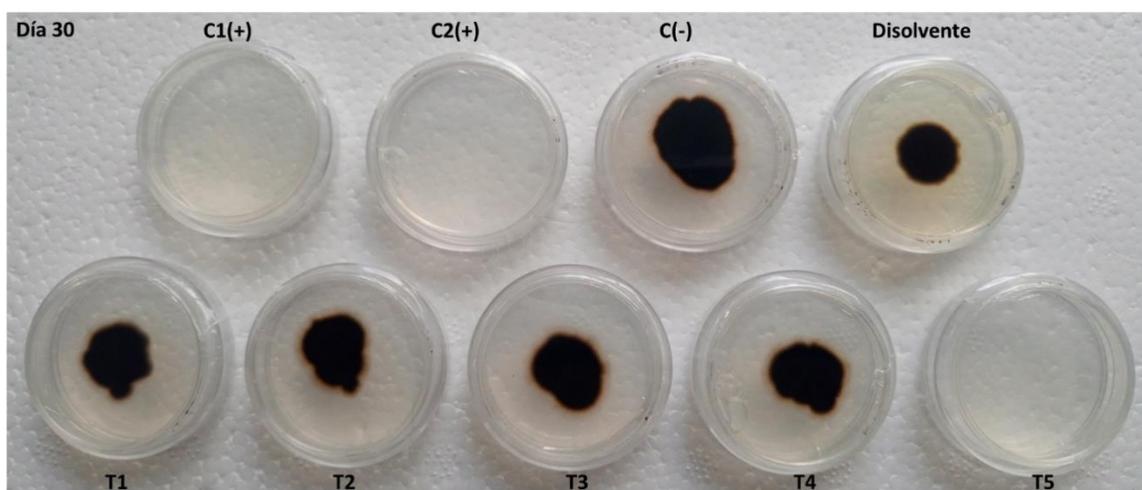


Figura 13.11 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. C1 (+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C2 (+): Control positivo, biofungicida 0.8%. Control negativo, PDB. Disolvente: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. T1 = 7.81 µg/mL, T2 = 15.63 µg/mL, T3 = 31.25 µg/mL, T4 = 62.5 µg/mL y T5 = 125 µg/mL.

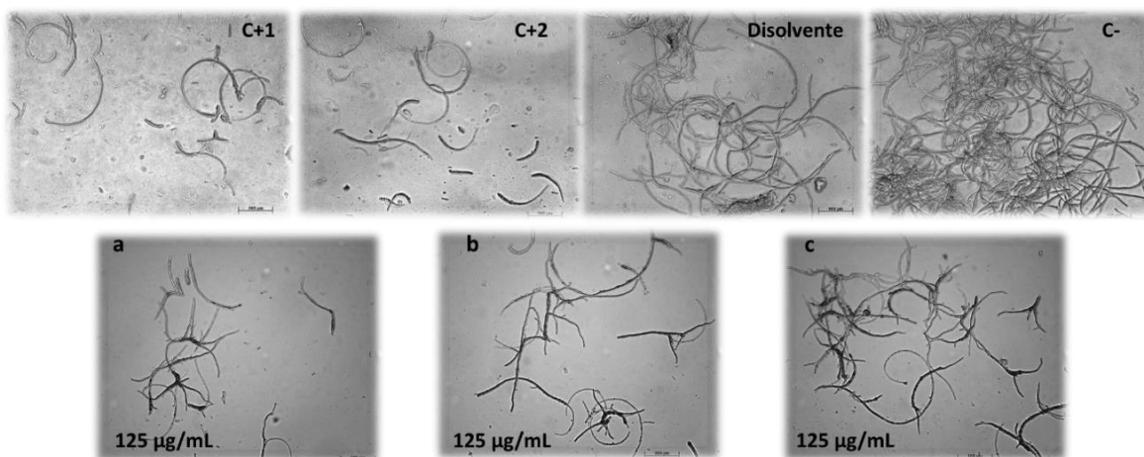


Figura 3.12 Inhibición del crecimiento micelial de la cepa 1233 expuesta a F6 del EAB de hojas de *Passiflora foetida* después de 30 días de incubación. C1 (+): Control positivo, nitrato de miconazol 2%. C2 (+): Control positivo, biofungicida 0.8%. C (-) Control negativo, PDB. Disolvente: disolución de DMSO al 4% + Tween 20 al 0.6% + H₂O. Las imágenes a, b y c corresponden a una misma caja, pero en diferentes zonas. Escala: 100 µm.

3.3.3 Exploración cromatográfica de las fracciones F5 y F6 por CCD

Se realizó el análisis por CCD para comparar la composición de ambas fracciones de interés, por lo que, para separar los compuestos de dichas fracciones por diferencia de polaridad y afinidad se utilizaron varios disolventes. Además, se determinó cuál fue el mejor sistema y la mejor proporción. En la Figura 3.13 se muestran los sistemas 6 (ACN/H₂O 1:1) y 1 (ACN/MeOH/H₂O 3.0:3.5:3.5), los que separaron mejor las mezclas de ambas fracciones.

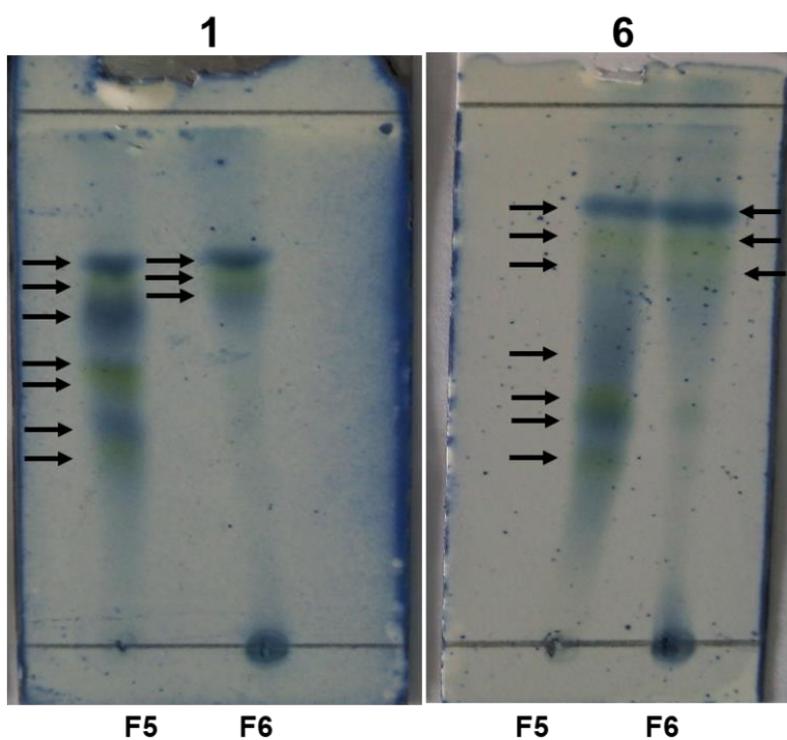


Figura 3.13 Perfil cromatográfico obtenido en placas cromatográficas de fase reversa reveladas con ácido fosfomolibdico de las fracciones F5 y F6. Sistemas: 1 = ACN/MeOH/H₂O (3.0:3.5:3.5) y 6 = ACN/H₂O (1:1).

Cuadro 3.9 Datos de R_f de fracciones evaluadas.

Mancha	ACN/H ₂ O (1:1)		ACN/MeOH/H ₂ O (3.0:3.5:3.5)	
	R_f F5	R_f F6	R_f F5	R_f F6
1	0.77	0.77	0.84	0.84
2	0.74	0.74	0.77	0.77
3	0.7	0.7	0.7	0.7
4	0.58	-	0.63	-
5	0.56	-	0.52	-
6	0.49	-	0.5	-
7	0.42	-	0.43	-

En el Cuadro 3.9 se muestran los valores de R_f calculados para cada mancha detectada en ambas placas. Se destaca que ambas muestras comparten al menos tres compuestos similares, donde uno es un flavonoide (mancha de color amarillo). En el caso de F5 se observan siete manchas donde tres corresponden a flavonoides, mientras que F6 mostró sólo tres manchas, correspondiendo una a un flavonoide.

3.3.4 Separación cromatográfica de las fracciones F5 y F6 por HPLC

Se realizaron diferentes corridas exploratorias inyectando 15 μ L de F5 y F6 por separado para analizar la complejidad, las similitudes y obtener las condiciones de trabajo que separan mejor los compuestos de cada muestra durante la purificación. Se probaron diferentes proporciones del sistema de disolventes ACN-MeOH-H₂O en elución isocrática y en gradiente.

A partir de la exploración se observó que la mejor proporción fue 3.5:1.5:5.0 con elución isocrática.

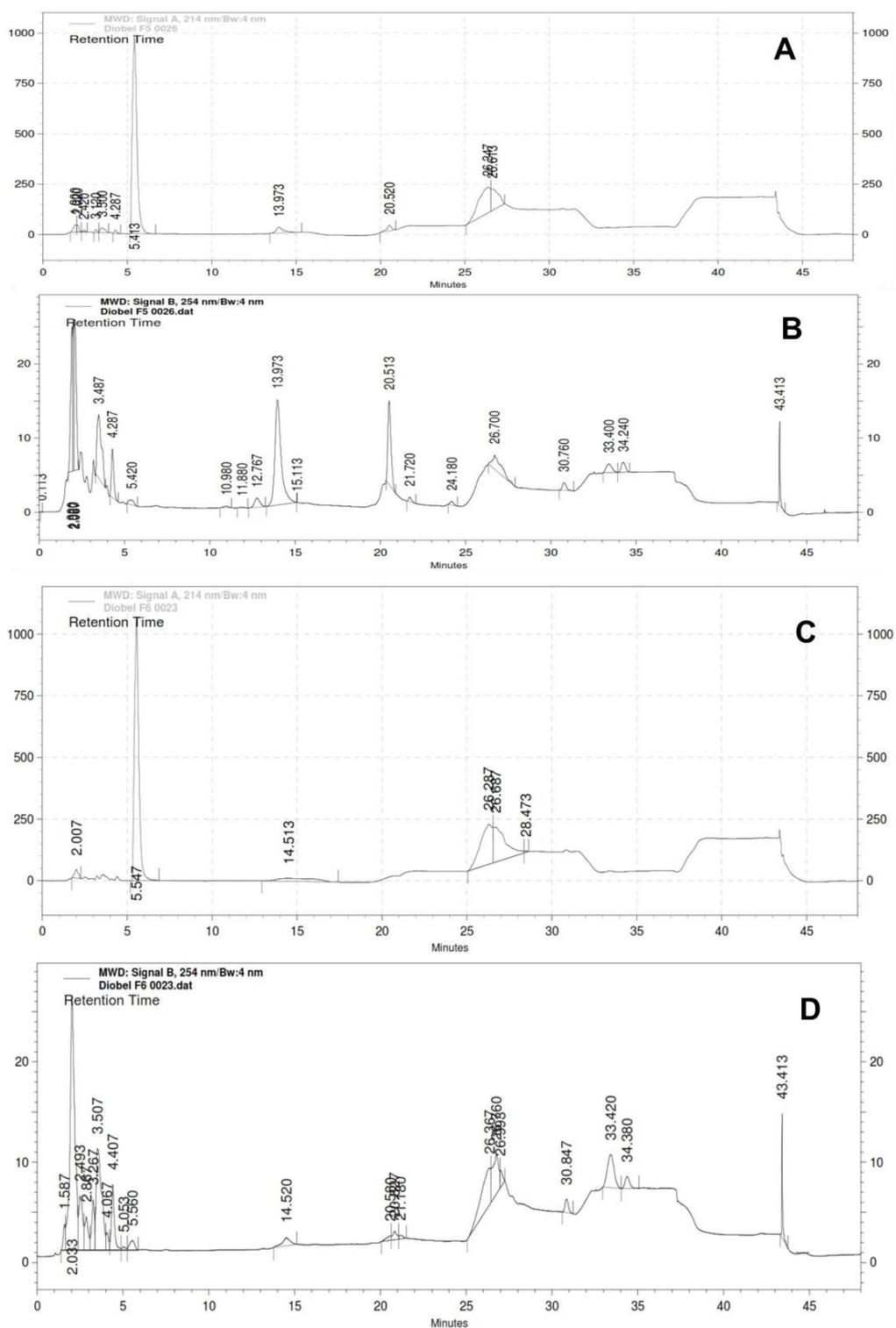


Figura 3.14 Perfiles cromatográficos en HPLC, empleando una columna de fase reversa C18. A: cromatograma F5 a 214 nm, B: cromatograma de F5 a 254 nm, C: cromatograma F6 a 214 nm, D: cromatograma de F6 a 254 nm.

En el cromatograma de líquidos de fase reversa, el orden de elución de los compuestos está en relación con su polaridad, siendo los compuestos más polares los que eluyen primero. Dividiendo el tiempo total de corrida en tres zonas de 17 min (alta, mediana y baja polaridad), se pueden clasificar los compuestos para un análisis más detallado. En los primeros 17 min (alta polaridad), se observa una mayor complejidad, que corresponde a un mayor número de picos a 254 nm y a una mayor abundancia de compuestos a 214 nm (Figura 3.14). Los picos mayoritarios observados a 214 nm, en F5 y F6 (5.4 y 5.5 min, respectivamente), representan más del 50% del área total, mientras que a 254 nm, en F5 y F6 se observan picos mayoritarios hasta los 13 min y 4 min, lo que representa el 70% y 55% del área total, respectivamente (Cuadro 3.10). El resultado anterior confirma que la complejidad de ambas muestras se presenta en la zona más polar del cromatograma como se observó en el análisis en capa delgada.

Cuadro 3.10 Picos mayoritarios de F5 y F6 a 214 nm y 254 nm.

F5 214 nm		
Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área
5.413	38 840 206	59.19
26.347	13 479 657	20.54
26.613	6 692 223	10.20
-	59 012 086	89.93
F5 254 nm		
Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área
1.92	295 870	10.2
2	193 083	6.66
2.087	388 086	13.38
3.487	332 272	11.45
4.287	133 444	4.6
13.973	760 220	26.21
20.513	299 876	10.34
26.7	149 802	5.16
-	2 552 653	88
F6 214 nm		
Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área
5.547	39 115 598	51.58
14.513	4 096 283	5.4
26.287	16 798 723	22.15
26.687	14 561 350	19.2
-	74 571 954	98.33
F6 254 nm		
Tiempo de retención (min)	Área (mAU)	% Área
2.033	1 015 028	31.5
2.493	183 668	5.7
3.507	480 026	14.9
4.407	162 592	5.05
26.367	318 168	9.87
26.76	211 017	6.55
33.42	189 012	5.87
-	2 559 511	79.44

En la Figura 3.15 se aprecian los cromatogramas a 214 y 254 nm de la muestra F5 obtenida por cromatografía semi-preparativa. Para la colección de la elución se dividió en siete zonas (Cuadro 3.11), teniendo en cuenta la agrupación de los picos a partir del tiempo de retención de los compuestos en la columna.

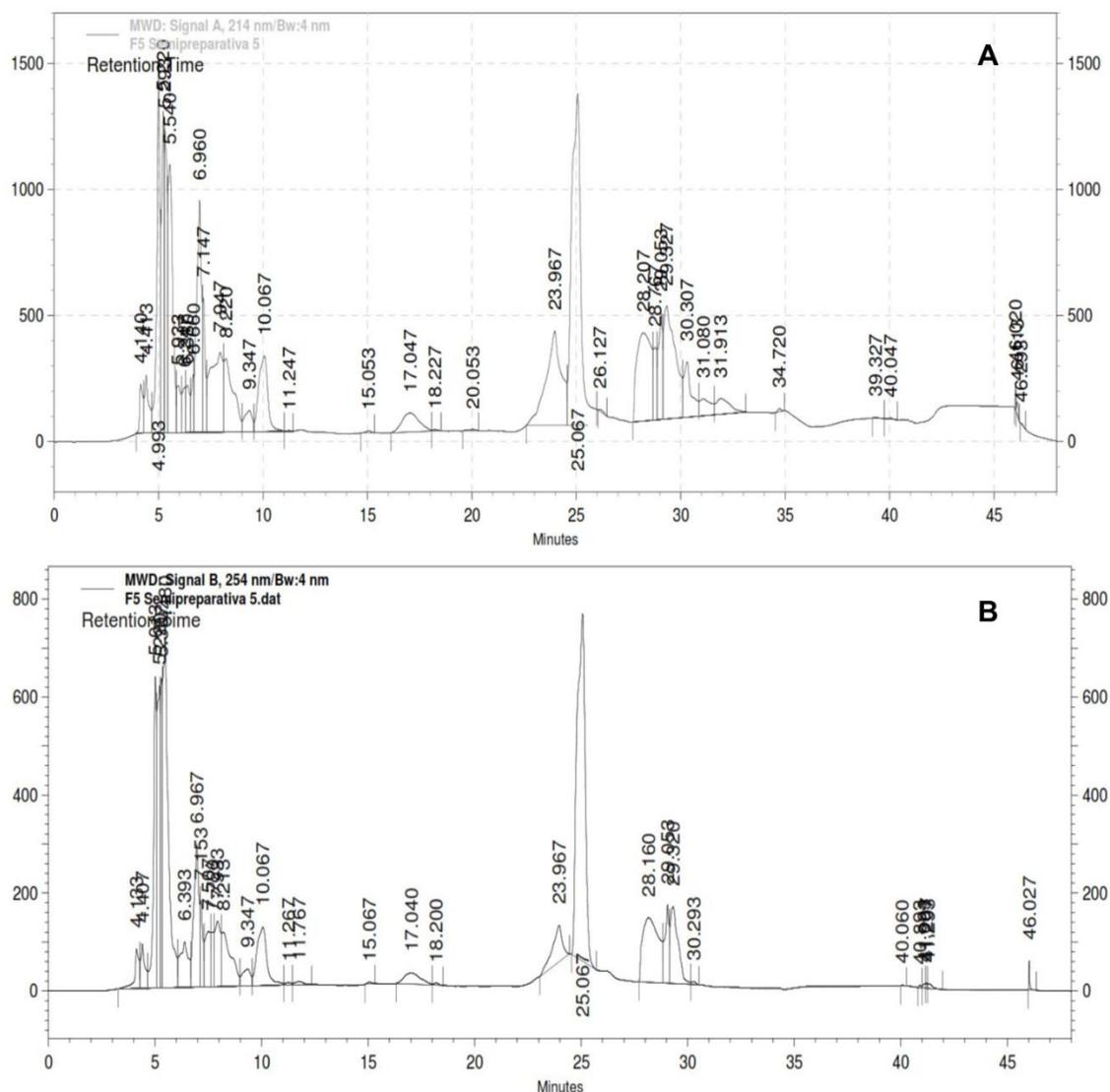


Figura 3.15 Perfiles cromatográficos de la fracción F5 obtenidos en HPLC semi-preparativa empleando una columna de fase reversa C18. A: cromatograma a 214 nm, B: cromatograma a 254 nm.

Cuadro 3.11 División del cromatograma en zonas para coleccionar la elución.

Zona	Tiempo de colecta (min)
1	4.1-12.5
2	12.5-17
3	17-20
4	21-24
5	24.5-27
6	27-34
7	37-final

3.3.5 Análisis cromatográfico en capa delgada de alta resolución

Se utilizó el mismo sistema de disolventes ACN/MeOH/H₂O (3.5:3.0:3.5) que para la CCD, sin embargo, no fue posible observar la separación de los compuestos debido a que la concentración analizada no fue suficiente para apreciar las bandas a simple vista, sólo cuando se realizó una intensificación de la luz UV a 366 nm se pudieron detectar algunas señales.

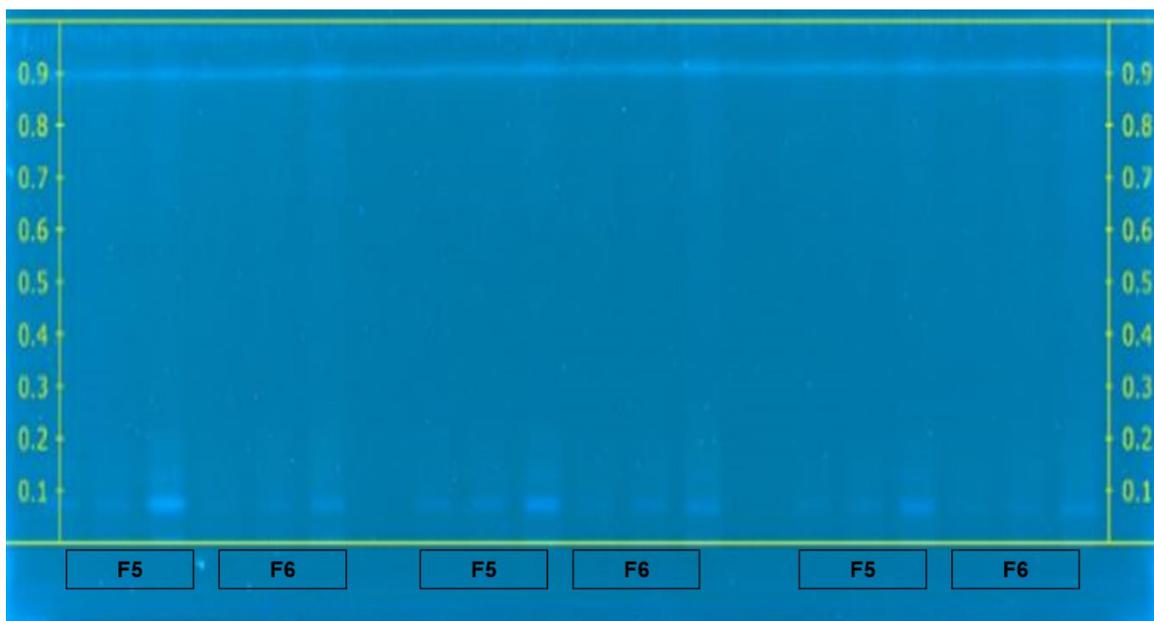


Figura 3.16 Perfiles cromatográficos por triplicado de las fracciones F5 y F6 obtenidos por HPTLC empleando placa de sílice de fase reversa C18, observado a 366 nm de luz UV.

Aunque no fue posible observar la separación de los compuestos de F5 y F6 en la placa, con el programa CAMAG del equipo HPTLC se generó un perfil de picos a partir de la imagen de la placa cromatográfica (Figura 3.16), en donde se observa que en los perfiles

de F5 y F6 se detectan señales a valores similares de R_f , distribuyéndose entre la zona de menor (inicio del cromatograma) y mayor polaridad (final del cromatograma). Asimismo, se observó que al incrementar el volumen inicial de 5 μL (0.25 μg) cuatro veces (20 μL = 1 μg) de cada fracción, aparecen cuatro picos en la F5 y uno en la F6, y que el área bajo la curva calculada para cada pico (Cuadro 3.12) corresponde a la abundancia de metabolitos. Este resultado presentó una similitud con el cromatograma obtenido por HPLC (Figura 3.14), pero invirtiendo el orden de los picos, los primeros corresponden a la zona menos polar y los últimos a la más polar.

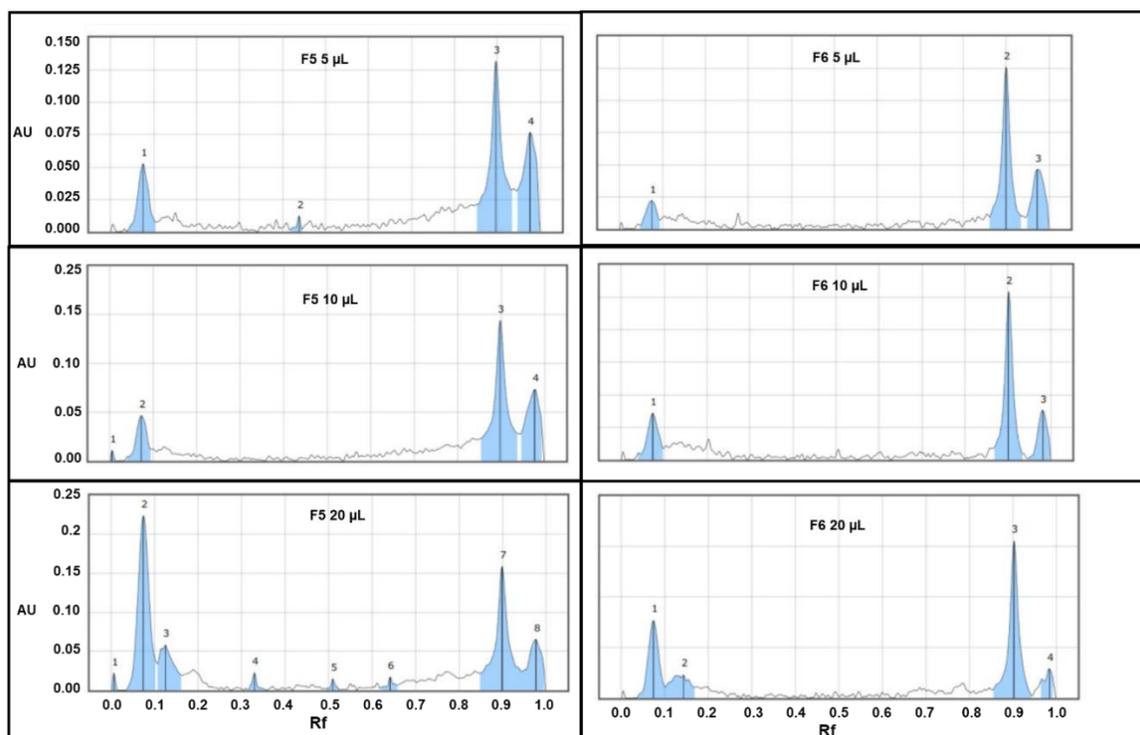


Figura 3.147 Perfil de picos de las fracciones F5 (izquierda) y F6 (derecha) a diferentes cantidades obtenidos por el programa CAMAG del HPTLC.

Cuadro 3.12 Datos de cada pico del cromatograma obtenido por el programa CAMAG para cada muestra por aplicación.

F5 5 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.075	0.00157	17.04
2	0.438	0.00015	1.6
3	0.896	0.00467	50.74
4	0.976	0.00282	30.62
F5 10 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.004	0,00007	0,76
2	0,072	0.00135	14.33
3	0.898	0.00521	55.16
4	0.977	0.00281	29.75
F5 20 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.006	0.00016	0.89
2	0.073	0.00680	37.76
3	0.124	0.00225	12.49
4	0.329	0.00030	1.66
5	0.509	0.00020	1.10
6	0.642	0.00031	1.71
7	0.899	0.00568	31.55
8	0.977	0.00231	12.85
F6 5 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.075	0.00064	11.46
2	0.899	0.00332	59.49
3	0.972	0.00162	29.05
F6 10 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.073	0.00112	21.51
2	0.901	0.00311	59.63
3	0.981	0.00098	18.87
F6 20 µL			
No. Pico	Rf (min)	Área (AU)	% Área
1	0.073	0.00221	26.67
2	0.142	0.00119	14.38
3	0.903	0.00418	50.43
4	0.985	0.00071	8.52

En el Cuadro 3.12 se muestra que en las fracciones F5 y F6 los compuestos más polares son más abundantes, exceptuando el pico 2 de la F5 a 20 μL que fue mayoritario (37.76%), coincidiendo con lo observado en los análisis cromatográficos anteriores donde se comprobó que los compuestos de mayor polaridad eran los más abundantes en la muestra.

3.3.6 Bioautografía

La bioautografía no mostró evidencias de inhibición en el crecimiento micelial de *P. fijiensis* en ninguna zona, incluyendo la correspondiente al control.

3.3.7 Análisis fitoquímico de los extractos

Se aplicaron técnicas colorimétricas para detectar algunas familias metabólicas que componen cada extracto. En los resultados, se observó que la coloración que presentaron los extractos interfirió en la identificación del color esperado, pero no imposibilitó la interpretación del resultado.

Alcaloides: Se detectaron estos compuestos en los extractos polares, ECA, EAB y MeOH (Figura 3.18); mientras que en DCM-MeOH no se observó la existencia de éstos, coincidiendo con la naturaleza polar de estos compuestos.

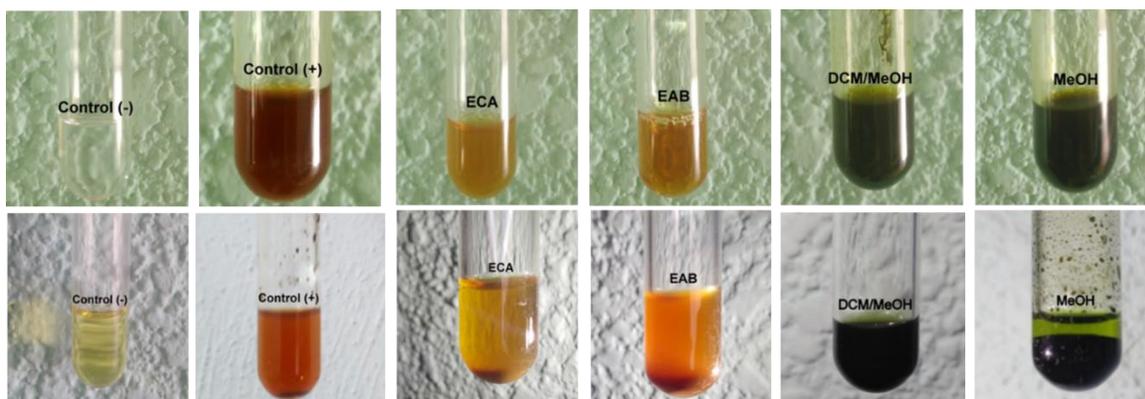


Figura 3.18 Detección de alcaloides en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch *et al.* (2004): EAB, DCM-MeOH y MeOH. Control (-): control negativo, agua destilada. Control (+): control positivo, disolución de café. Panel superior = antes de reacción; Panel inferior = después de reacción.

Taninos: Para la identificación de taninos se buscó un cambio de color a azul oscuro o verde (Colina, 2016), pero debido a la coloración inicial de las disoluciones de los extractos

esta tonalidad era difícil de observar (Figura 3.19). No obstante se detectó la presencia de estos compuestos en ECA y EAB.

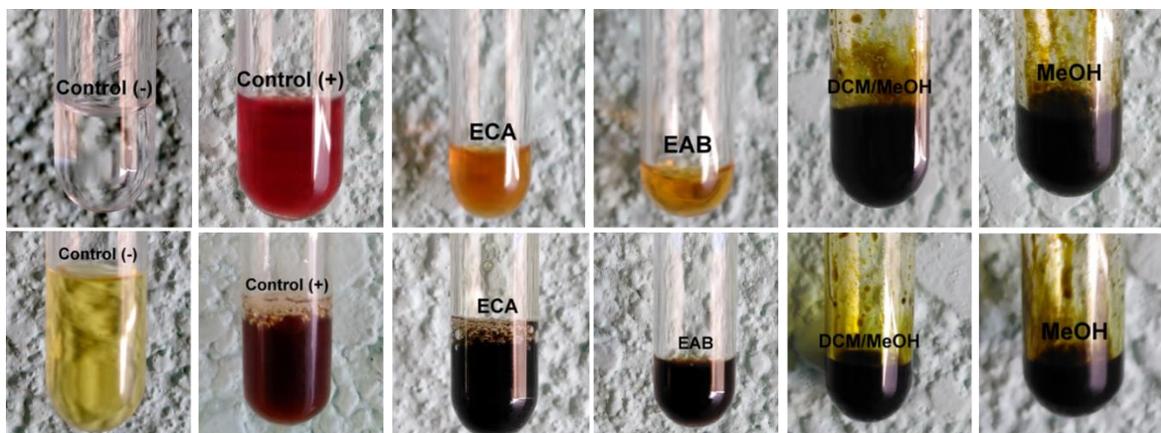


Figura 3.19 Detección de taninos en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch *et al.* (2004): EAB, DCM-MeOH y MeOH. Control (-): control negativo, agua destilada. Control (+): control positivo, disolución de vino tinto. Panel superior = antes de reacción; Panel inferior = después de reacción.

Saponinas: Se detectaron compuestos en diferentes concentraciones en relación con la polaridad del medio (Figura 3.20).

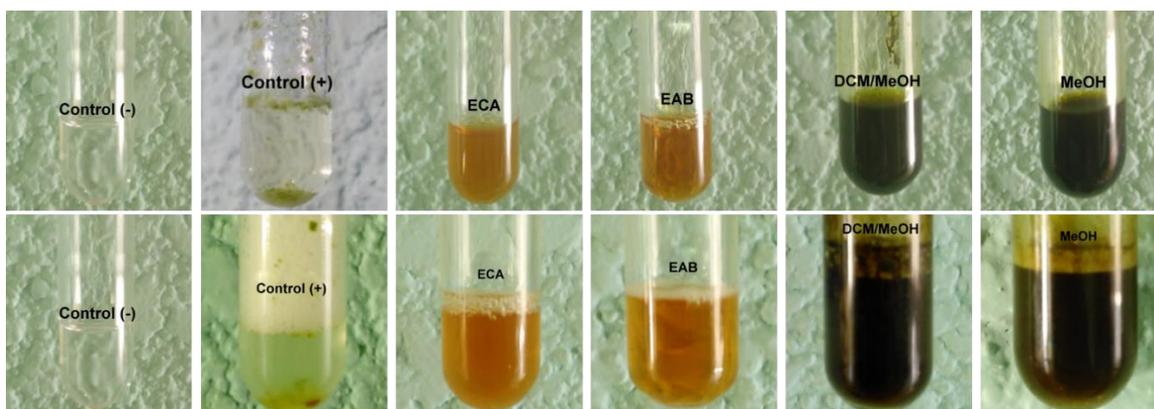


Figura 3.20 Detección de saponinas en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch *et al.* (2004): EAB, DCM-MeOH y MeOH. Control (-): control negativo, agua destilada. Control (+): control positivo, disolución de *Agave lechuguilla*. Panel superior = antes de reacción; Panel inferior = después de reacción.

La detección en los extractos fue mucho menor en relación con el control, comportándose de la siguiente manera ECA > MeOH = DCM/MeOH > EAB, en relación con el tamaño de la columna de espuma.

Flavonoides: Los compuestos de esta familia química se concentraron en los extractos más polares, ECA y EAB (Figura 3.21), donde se comprobó una reacción efervescente que se coloreó de tonalidad anaranjada.

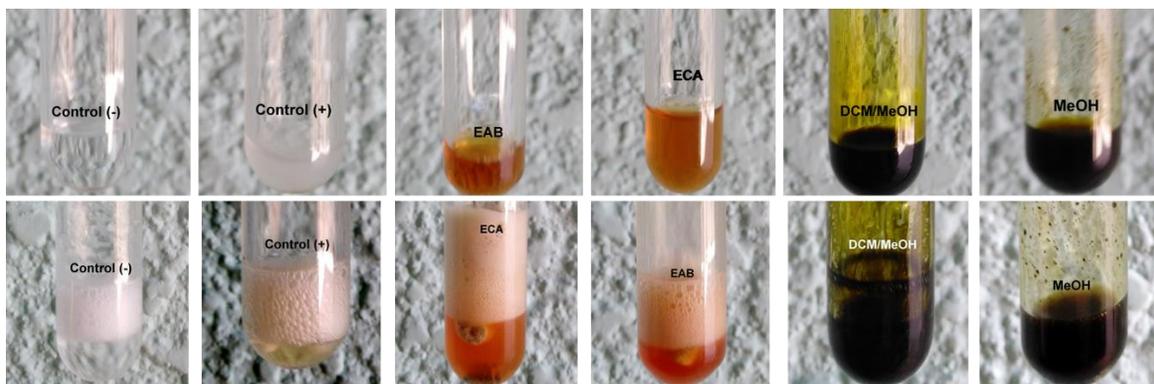


Figura 3.21 Detección de flavonoides en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch *et al.* (2004): EAB, DCM-MeOH y MeOH. Control (-): control negativo, agua destilada. Control (+): control positivo, disolución de cirsimarina. Panel superior = antes de reacción; Panel inferior = después de reacción.

Terpenos: Estos metabolitos se concentran en los extractos orgánicos (Figura 3.22), DCM/MeOH y MeOH, lo cual coincide con lo esperado de este tipo de metabolito secundario debido a su naturaleza química: compuestos de mediana a baja polaridad. Además, en el EAB se observó un cambio en el aspecto de la disolución que debe de estar relacionado con la presencia de terpenos más polares debido a la presencia de grupos OH.

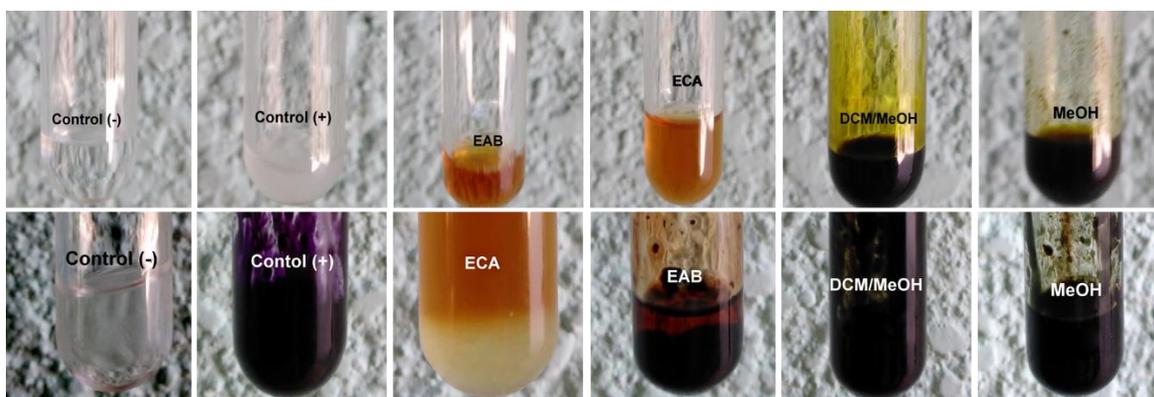


Figura 3.22 Detección de terpenos en ECA 10% y extractos obtenidos por Bokesch *et al.* (2004): EAB, DCM-MeOH y MeOH. Control (-): control negativo, agua destilada. Control (+): control positivo, disolución de betulina. Panel superior = antes de reacción; Panel inferior = después de reacción.

En resumen, los extractos acuosos presentaron una composición fitoquímica similar, en relación con los tipos de metabolitos detectados (Cuadro 3.13).

Cuadro 3.13 Determinaciones fitoquímicas.

Extracto	ECA 10%	DCM/MeOH	MeOH	EAB
Flavonoides	+	-	-	+
Taninos	+	-	-	+
Alcaloides	+	-	+	+
Saponinas	+	+	+	+*
Terpenos	-	+	+	+*
+ Detectado - No detectado +*Ligeramente detectado				

3.3.8 Cuantificación de la actividad antifúngica de los extractos

A partir del diseño mostrado se prepararon dos placas: Placa 1 ECA, biofungicida y nitrato de miconazol en ese orden; Placa 2 EAB, F5 y F6, como se muestran en las Figuras 3.23 A y C. Las placas se fotografiaron en el tiempo 0 (Figuras 3.23 A y C) y 36 horas de incubación (Figuras 3.23 B y D), para una mejor información visual en donde se puede detectar el cambio de coloración por la actividad celular.

En todos los pocillos en el tiempo 0 h se debió observar una coloración azul (resazurina), sin embargo, se observó una coloración más oscura en ambas placas en los pozos correspondientes a extractos con concentración c3 (3.75% o 10.15 mg/mL para el ECA y 13.6 mg/mL para el EAB) (Figuras 3.23 A y C), lo cual interfiere en el resultado final del ensayo como se observó en las Figuras 3.23 B y D, intensificándose la tonalidad rosa de la disolución después de la transformación de la resazurina en resorufina por la actividad celular.

Se observó, además, que ambos controles presentan: tonalidad azul-violeta en el caso del control de esterilidad (Figuras 3.23 A y B), indicando una actividad fungicida (*i.e.* conidios muertos) y rosa en el caso del control de viabilidad (Figuras 3.23 C y D), indicando una reacción oxidativa efectuada por los conidios vivos. A partir de este análisis se compararon los resultados de los tratamientos.

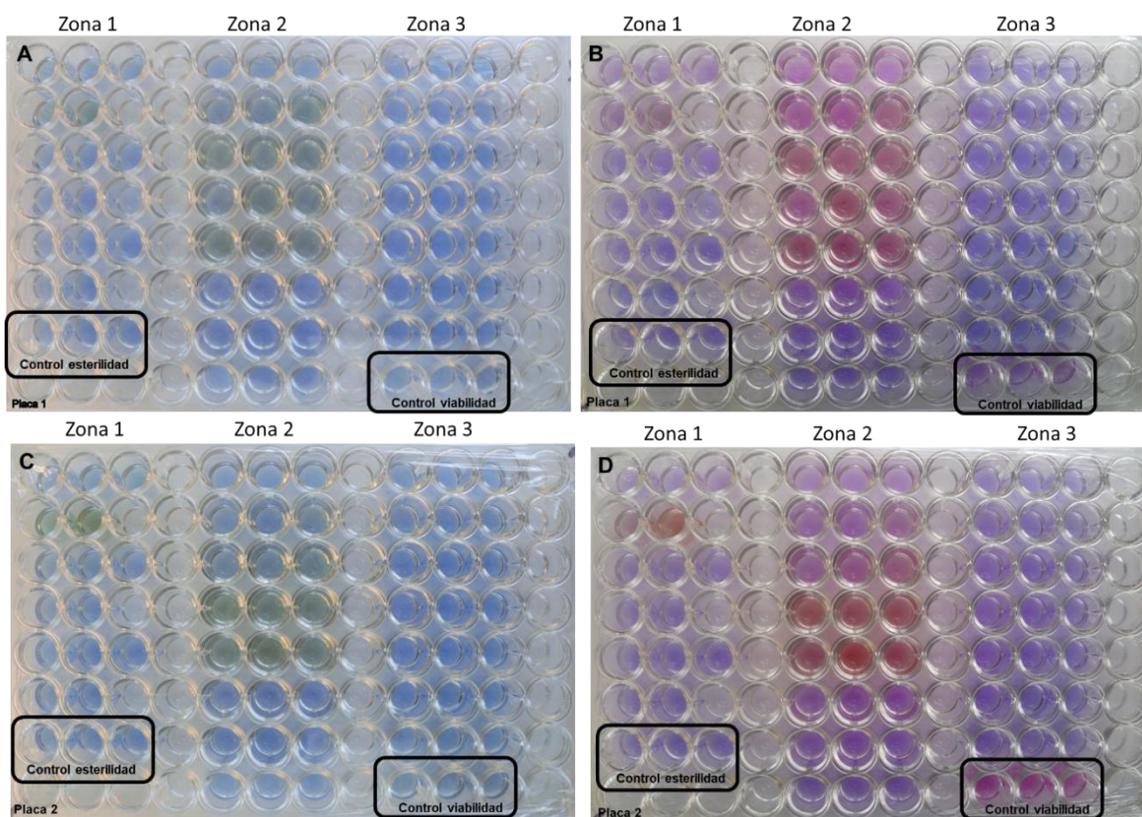


Figura 3.23 Cuantificación de viabilidad celular por la técnica de alamarBlue® para evaluar la actividad fungicida. Placa 1 tiempo 0 (A), Placa 1 tiempo 36 h de incubación (B). Zona 1 tratamientos sin conidios, zona 2 y 3 ECA, nitrato de miconazol y biofungicida con conidios. Placa 2 tiempo 0 (C), Placa 2 tiempo 36 h de incubación (D). Zona 1 tratamientos sin conidios, zona 2 y 3 ECA, nitrato de miconazol y biofungicida con conidios. Control esterilidad: medio PDB sin conidios. Control de viabilidad: medio PDB con conidios.

El ECA (Figura 3.23, placa 1 B, zona 2) fue el que menor actividad fungicida tuvo en relación con los controles positivos, siendo el nitrato de miconazol el de mayor actividad, pues presentó una coloración más azul al comparar ambos tiempos (Figuras 3.23 A y B). Por otra parte, el EAB (placa 2, zona 2), presentó una menor actividad fungicida en relación con las fracciones F5 y F6 (Figuras 3.23 C y D).

El porcentaje de inhibición del hongo que corresponde al número de conidios muertos se obtuvo como se indicó en la sección 3.5.1 (Cuadro 3.14). Estos resultados respaldaron lo observado en las placas de la Figura 3.23, donde ambos extractos presentaron la menor actividad fungicida con una media del 54% de muerte de conidios, mientras que en las fracciones fueron del 62 al 67%. Al comparar los tratamientos con los controles positivos

C+1 y C+2 se observó que la fracción F6 presentó una acción fungicida cercana al C+2, sin embargo el C+1 mantuvo una actividad superior a todos los tratamientos evaluados debido a que es una disolución de un compuesto fungicida puro: nitrato de miconazol.

Cuadro 3.14 Resumen estadístico de los datos de la cuantificación de la actividad fungicida.

	Inhibición (%)					
	T1 ECA	T2 EAB	T3 F5	T4 F6	C+1 Nitrato de miconazol	C+2 Biofungicida
	43.07	42.94	60.69	65.16	81.17	68
	51.46	55.76	62.32	64.49	73.77	68.7
	64.27	57.88	61.65	65.97	84.27	65.66
	57.98	59.45	63.37	70.8	83.26	68.5
	57	55.15	66.66	68.93	81.06	74.42
Media	54.76	54.24	62.94	67.07	80.71	69.06
Coficiente de varianza	14.54%	12.06%	3.652%	4.007%	5.097%	4.684%
Desviación estándar	7.959	6.543	2.299	2.687	4.113	3.235

Para una mejor ilustración de la anterior afirmación se realizó un análisis estadístico de comparación entre los tratamientos, donde se evaluó en primer lugar el tipo de distribución del que provenían los datos para decidir el tipo de prueba a realizar.

La prueba de normalidad empleada fue la de Shapiro-Will que indicó valores de $p \geq 0.05$ para todos los grupos, significando que todos provenían de una distribución normal, pero debido a que no existe una similitud en la dispersión de los datos entre tratamientos, requerimiento esencial para realizar una ANOVA, se descartó esta prueba. Debido a esto se deben analizar las medianas y no las medias, empleando pruebas no paramétricas. Para este análisis se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, comparando las medianas de los grupos analizando el estadígrafo p , siendo mayor a 0.05, lo que indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Para identificar cuáles grupos son diferentes, se construyó un gráfico de cajas y bigotes donde se representó la mediana, visualizando las diferencias entre ellos (Figura 3.24).

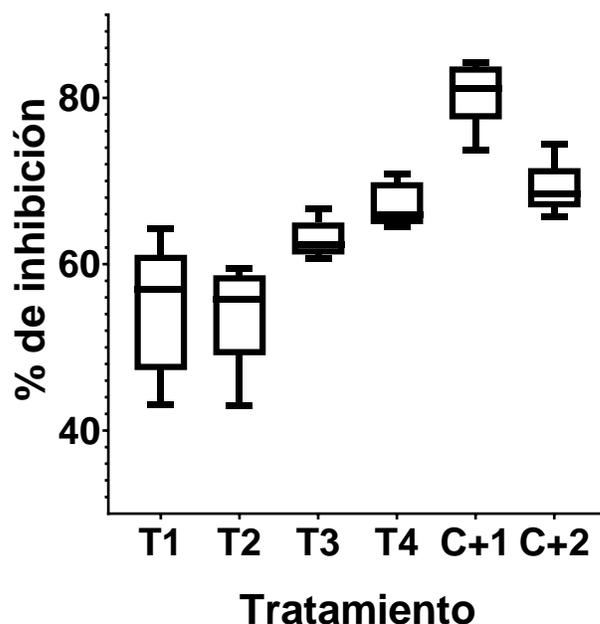


Figura 3.24 Gráficos de comparación entre las medianas de tratamientos más activos evaluados empleando el programa GraphPad Prism versión 8. T1: ECA, T2: EAB, T3: F5, T4: F6, C+1: control positivo nitrato de miconazol al 2%, C+2: control positivo biofungicida.

La actividad fungicida fue significativamente diferente entre los tratamientos, siendo las fracciones F5 y F6 (T4 y T5) las que presentaron un mayor porcentaje de inhibición respecto a los extractos (T1 y T2), los cuales fueron iguales entre ellos. El control C+1 fue superior en actividad al control C+2.

3.4 DISCUSIÓN

En las especies vegetales las moléculas se forman en las diferentes rutas metabólicas, dando lugar a un gran número de compuestos divididos en metabolitos primarios y secundarios. Estos metabolitos se extraen durante la obtención de extractos y presentan una acción biológica determinada, tanto para la planta como para el hombre. Generalmente se asume que la actividad biológica está determinada por un solo compuesto y se descarta la idea de efectos sinérgicos entre compuestos de diversas familias químicas que intervienen en diferentes procesos biológicos. Este fenómeno lo

encontramos como respuesta al BAA del ECA tratado por filtración con microconos Amicon, donde debe estar ocurriendo una posible interacción entre metabolitos secundarios y compuestos proteicos, principalmente péptidos. Medina (2016) obtuvo el perfil proteico del extracto evaluado y encontró que independientemente del tratamiento a que se sometiera el ECA siempre estaban presentes los péptidos de bajo peso molecular. En el caso del estudio actual se observó la pérdida de la actividad inhibitoria al separar el ECA en metabolitos secundarios y compuestos proteicos, pero la misma se recuperó al mezclar nuevamente ambas porciones. Esto es indicativo de una interacción entre los compuestos fenólicos y los proteicos a través de interacciones por puente de hidrogeno o interacciones dipolo-dipolo. Un ejemplo de esto es la unión entre taninos y proteínas como las de la leche y la saliva, lo que afecta la actividad biológica de cada compuesto por separado. La unión entre estas moléculas está afectada por una serie de variables que van desde la secuencia de aminoácidos de la proteína hasta la cantidad de grupos OH del anillo fenólico en los metabolitos secundarios. En la revisión realizada por Czubinski *et al.* (2017) se mencionan diferentes resultados que muestran los diversos factores que intervienen en esta interacción, como el tamaño molecular del compuesto polifenólico y la flexibilidad estructural, los cuales unidos a los factores anteriores modifican estas interacciones. El resultado final es la variación de la actividad biológica de cada molécula por separado. Algo similar debe de suceder con el EAB, pues aunque provenga de una ruta de obtención diferente, presenta compuestos de similar polaridad, por lo cual debe presentar una composición química de péptidos con interacciones similares a las descritas; no obstante, no es criterio suficiente para afirmarlo, siendo necesario someter una alícuota del EAB al mismo procedimiento que el ECA para confirmar esta teoría.

Al fraccionar el EAB se comprobó la actividad en ambas fracciones activas con una inhibición en la germinación y el crecimiento micelial en las fracciones F5 (137.5 µg/mL) y F6 (125 µg/mL). La observación de las imágenes tomadas bajo microscopio óptico indicó que no existe una diferencia apreciable y se necesitaría una técnica de cuantificación para poder comprobar si son similares o diferentes las actividades inhibitorias. Los mecanismos moleculares afectados por esta actividad pueden ser procesos como la respiración, ciclo de Krebs, interferencia en la división celular, traducción de señales, entre otros descritos por diversos autores como Melgarejo-García (2011). Por otra parte, estudios como el reportado por Glazer *et al.* (2012) identificaron diferentes elagitaninos, compuestos polares

encontrados en extractos acuosos u orgánicos polares, que inhibían el desarrollo de hongos fitopatógenos.

En la exploración de ambas fracciones activas por placas de CCD se observó que tienen una composición similar de compuestos polares, los primeros en ser arrastrados por el sistema de disolventes. Esto podría explicar la actividad que se observó en ambas fracciones a concentraciones de 137.5 µg/mL para F5 y de 125 µg/mL para F6. También se distingue un grupo de compuestos de menor polaridad en F5 que no se observa en F6. Esta diferencia podría estar influenciada por la concentración de los compuestos, por lo que se necesita una técnica de purificación para detectar las diferencias entre ambas fracciones. Debido a que no existe evidencia fotográfica de las placas CCD de las fracciones activas evaluadas en años anteriores, no fue posible compararlas con las CCD de las fracciones activas del presente estudio (2018).

La diferencia observada en la cantidad y posición de las bandas en las CCD debe de estar afectada por la composición química de los metabolitos, donde la abundancia de grupos OH impacta en el grado de polaridad del compuesto y su interacción con ambas fases de la técnica cromatográfica (fase móvil y fase estacionaria). Si se analizan los compuestos coloreados observados en el perfil de F5 (bandas amarillas correspondientes a compuestos de la familia de los flavonoides), se puede afirmar que la cantidad de grupos OH del compuesto menos polar (banda amarilla más próxima al punto de aplicación), es menor en relación con el más polar (banda amarilla próxima al frente del disolvente) (Dewick, 2009). Esta diferencia de grupos polares puede afectar la actividad biológica debido a las interacciones entre las moléculas involucradas con la actividad biológica observada en el presente estudio (inhibición en la germinación y crecimiento micelial del hongo) (Hamamsy *et al.*, 2020; Glazer *et al.*, 2012).

Para el monitoreo de los compuestos se empleó un barrido a diferentes longitudes de onda en el HPLC. Inicialmente se comenzó a 214 nm con el propósito de identificar la complejidad de la muestra. A esta longitud de onda se detectan los dobles enlaces de las moléculas correspondiente a los cromóforos dienos, por lo cual se detectan las señales provenientes de todos los compuestos que presenten esta estructura. Para el estudio actual, debido a la polaridad de la muestra, es de esperar que se encuentren compuestos conformados por anillos aromáticos como los compuestos fenólicos o que presenten dobles

enlaces en su estructura: flavonoides, taninos, cumarinas, alcaloides, saponinas, así como también péptidos, los cuales han sido identificados en los extractos de hojas de *P. foetida* con actividad antifúngica, antibacteriana y con acción sobre diversas enfermedades humanas (Smruthi *et al.*, 2021; Thamizh y Sudhakar, 2021; Tandro *et al.*, 2020).

En el cromatograma por HPLC, el número de picos debe de corresponder al número de compuestos y la intensidad es debida al efecto de la conjugación (Avellaneda *et al.*, 2009). Las señales a 270 y a 330 nm se asocian a flavonoides, taninos y antocianinas debido a su estructura, teniendo máximos de absorción en ambas longitudes, correspondiente a la oxigenación del anillo aromático (detección del ion fenol, doble enlaces con O), como lo indica el grupo de trabajo de Ortega *et al.* (2007), quienes identificaron flavonoides y antocianinas. Este grupo de investigación también detectó señales de estos compuestos a longitudes de onda de 360 nm, donde la presencia de heteroátomos como el O (de grupos OH) hacen que aparezcan máximos de absorción que se desplazan hacia longitudes mayores. Fraisser *et al.* (2020) identificaron una serie de antocianinas en frutas de *Vaccinium myrtillus* empleando análisis cromatográficos por HPLC a longitudes de ondas cercanas a los 270 nm.

En el caso de los alcaloides y péptidos, estos se identifican con sus absorciones a 254 nm debido a anillos aromáticos presentes en aminoácidos como triptófano y fenilalanina; además, debido a la presencia de iones fenol, anilina y anilinio, también van a tener señales a 254, 270 y 280 nm, longitudes de ondas empleadas para identificar compuestos fenólicos (El-Hamamsy *et al.*, 2020). A esta longitud también se observarán señales correspondientes al desplazamiento provocado por la unión de N al anillo aromático en alcaloides y péptidos (Avellaneda *et al.*, 2009).

La gran variedad de compuestos que emiten señales en los perfiles cromatográficos indica la complejidad de las fracciones analizadas, pero entre ellas difieren en cuanto al número de señales y la intensidad del pico, aunque se obtengan a la misma longitud de onda y en igual tiempo de retención. Esto puede estar determinado por la abundancia de compuestos de los tipos de metabolitos mencionados en las diferentes muestras analizadas, debido al proceso de fraccionamiento del extracto, así como a la concentración de metanol empleada (80% en F5 y 100% en F6). Además, en el análisis exploratorio por placas en CCD, aunque se observó un número menor de compuestos en F6 que en F5, como se comprobó en el

perfil cromatográfico obtenido por HPLC (Cuadro 3.8), el aumento del área bajo la curva en las señales de F6 indicó un mayor grado de purificación que en F5. También se debe considerar la variación en la intensidad de la señal que provoca la presencia de heteroátomos como el O y el N, lo cual unido a la presencia de enlaces conjugados provoca máximos de absorción (Avellaneda *et al.*, 2009).

En los cromatogramas de ambas fracciones se observaron picos con tiempos de retención similares, pero también señales que no se encontraron en ambos, diferencia que pudiera marcar una variación en la actividad biológica entre ambas muestras. Esta diferencia está determinada por la concentración de metanol empleada en el proceso de fraccionamiento, lo cual determinó que F6 presente compuestos más hidrofóbicos que F5. Se debe remarcar que, con la información obtenida, no es posible identificar los compuestos presentes en las muestras, sólo se tiene información general de los tipos de metabolitos que están presentes. Para identificar algunos compuestos es necesario el empleo de sustancias estándares o aislar las señales para identificar los tipos de metabolitos presentes (Ma *et al.*, 2020).

En el análisis del cromatograma obtenido por HPTLC sólo se detectaron de manera muy tenue señales a 366 nm, las cuales corresponden con la presencia de heteroátomos unidos a la molécula de interés (Ortega *et al.*, 2007). La bioautografía no pudo identificar los compuestos activos como se comprobó en las secciones 3.3.5 y 3.3.6 debido a la no observación de zona de inhibición en la placa después de incubar. Una de las causas pudiera ser las cantidades evaluadas (0.25 µg a 1 µg), por lo cual sería recomendable aumentar las cantidades al doble para así evaluar entre 0.5 µg a 2 µg, correspondiente con lo reportado por Reich y Schibli (2006). Gainche *et al.* (2021) reportaron la concentración de 1 mg/mL en las disoluciones de las fracciones que analizaron, aplicando un volumen de 20 µL, lo cual equivale a 20 µg de la muestra, valor que es 20 veces mayor al obtenido en el presente estudio al máximo volumen de aplicación (20 µL equivale a 1 µg). También Gaurav *et al.* (2020) reportaron una concentración de sus muestras de 0.5 mg/mL aplicando 6 µL (obteniendo 3 µg en cada aplicación), cantidad menor a lo reportado por Gainche *et al.* (2021), pero tres veces superior a la cantidad máxima aplicada en este estudio. Otra explicación podría ser que la actividad inhibitoria se deba a una interacción entre compuestos proteicos y los metabolitos secundarios (Czubinski *et al.*, 2017) como se

observó con lo obtenido al separar los compuestos proteicos/peptídicos de los secundarios del ECA de *P. foetida* (Figura 3.1). En ambas fracciones se pueden encontrar compuestos fenólicos y compuestos peptídicos que estén involucrados en la actividad.

Aunque se conoce que el metanol modifica la estructura tridimensional de los péptidos, no necesariamente implica que deba afectar negativamente su actividad biológica, si esta modificación no afecta el sitio de acción de la molécula, la actividad biológica no se altera. También puede ocurrir que esta alteración favorezca el aumento de estructuras tridimensionales específicas como las hélices alfa y esto incrementa a su vez la actividad inhibitoria de la molécula o el sitio de interacción con otros compuestos como metabolitos secundarios (compuestos fenólicos) (Hwang *et al.*, 2011). No se descarta un problema técnico al momento de la preparación de las disoluciones empleadas en el ensayo, tanto de las muestras como el control positivo, por lo cual se hace indispensable revisar los cálculos debido a que las cantidades son las que pueden variar el resultado final del ensayo.

En las detecciones fitoquímicas se comprobó la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides en los extractos más polares, principalmente los acuosos. Esto está influenciado por la composición química debido a la presencia de grupos OH en su estructura, lo cual le confiere polaridad a la molécula a identificar. La abundancia de los grupos OH presentan una relación proporcional con la polaridad de la molécula. En el caso de las saponinas se observó variaciones en las cantidades detectadas en los extractos, lo cual indicó que en las hojas de *P. foetida* se encuentran saponinas de diferentes polaridades debido a los tipos y número de monosacáridos presentes en dicha molécula. Éstos son los que confieren polaridad a la molécula, lo cual afecta la solubilidad de estos compuestos en el seno de la disolución (Dewick, 2009). Por otra parte, los flavonoides fueron detectados sólo en los extractos más polares, lo cual coincide con la naturaleza de este tipo de compuestos, debido a la presencia de anillos fenólicos que le confieren polaridad a la molécula de interés (Dewick, 2009). Un resultado similar se obtuvo con los taninos por el mismo motivo descrito. Por otro lado, los terpenos se concentraron en el extracto menos polar, pues fue el que mayor respuesta tuvo, confirmando la naturaleza química de estos compuestos (Dewick, 2009).

Como se observó en la sección 3.3.7, los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico de las muestras activas ECA y EAB confirmaron la presencia de metabolitos secundarios polares e hidrofílicos, como se indicó en el Cuadro 3.13. Según la revisión de Aqil *et al.* (2010), entre los compuestos acuosos detectados con actividad inhibitoria contra hongos podemos citar la cucurbitacina como ejemplo de saponinas; entre los alcaloides antifúngicos se encuentran flidorsina y berberina. Entre los flavonoides podemos mencionar la galangina, alizarina, entre otros; además, el ácido gálico que forma a los taninos también ha mostrado actividad inhibitoria contra hongos (Aqil *et al.*, 2010). Además, se debe tener en cuenta que muchos de estos compuestos por ser de naturaleza polar presentan grupos hidroxilos en su composición con lo cual puede existir interacción por medio de puentes de hidrógeno con compuestos proteicos formando interacciones que favorezcan la actividad inhibitoria (Czubinski *et al.*, 2017).

La cuantificación de la viabilidad de las esporas permitió validar el efecto antifúngico de los extractos y las fracciones. Los extractos, aunque se obtuvieron por diferentes métodos presentaron una actividad fungicida similar, con una menor actividad biológica con relación a las fracciones. Este resultado es debido a la concentración en la que se encuentran los compuestos activos en el seno de un extracto en relación con una fracción o un compuesto puro. Esta es la razón por la cual observamos que las fracciones en promedio son 1.15 veces más activas, mientras que el fungicida comercial es casi 1.5 veces más activo. Al realizar el mismo análisis comparativo entre las fracciones, se observa que F6 presentó una actividad ligeramente mayor que F5 (1.06 veces), lo cual indica que entre ambas fracciones debe haber una diferencia de concentración del compuesto activo. Además, ambas fracciones presentaron una actividad similar al biofungicida que es un producto probado (biofungicida 1.1 veces más activo), el cual también es una mezcla de compuestos activos; mientras que en relación con el fungicida comercial éste mostró ser 1.23 veces más activo en promedio, pero se debe señalar que es una sustancia pura, por lo cual es posible que al purificar estas fracciones se obtengan compuestos que presenten una actividad fungicida similar o superior, resultado que corrobora lo mencionado anteriormente, donde una fracción presenta una mejor actividad biológica que el extracto de donde se obtuvo. Este resultado se debe al aumento de la concentración en la que se encuentran los compuestos activos, al mismo tiempo que aumenta la pureza de los compuestos activos, la concentración de los contaminantes se va debilitando, y esto

aumenta las interacciones entre la molécula activa y el sitio de acción en la célula, traduciéndose en una menor concentración de los compuestos activos para lograr la acción biológica deseada: actividad fungicida en este caso.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

1. El ECA de hojas de *P. foetida* colectada en época de lluvias en 2018 presentó actividad fungicida contra el hongo *P. fijiensis* a partir de una concentración de 2.5% equivalente a 6.77 mg/mL.
2. Los compuestos proteicos y los metabolitos secundarios presentes en el ECA, separado por tecnología de membrana, no presentaron actividad inhibitoria frente al patógeno de interés, lo cual indica que la actividad antifúngica debe estar provocada por una interacción entre ambos.
3. No se identificaron los compuestos responsables de la actividad biológica de los extractos activos (ECA y EAB), pero el análisis fitoquímico detectó presencia de compuestos de la familia química de los flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas, en menor proporción.
4. El EAB presentó inhibición del patógeno a partir de la concentración de 6.25 mg/mL mientras que las fracciones más activas del mismo fueron F5 y F6 a las concentraciones 137.5 µg/mL y 125 µg/mL, respectivamente.

4.2 PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio se plantean como perspectivas continuar la purificación de las fracciones activas (F5 y F6), con el fin de aislar e identificar los metabolitos responsables de la actividad biológica-

BIBLIOGRAFÍA

- AbD Serotec. 2008. AlamarBlue Technical Datasheet. [Online] Disponible en: www.ab-direct.com [Acceso 30 de noviembre de 2018]
- Acosta-Montes, S., C.I. León y A.L. Leal (2004). Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica del Alamar azul. *Infectio*, 8, 194–202.
- Ahmad, I., M. Owais, M. Shahid y F. Aqil (2010). Combating fungal infections: Problems and remedy. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 449–484. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12173-9>
- Aktar, W., D. Sengupta y A. Chowdhury (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2, 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Allué Creus, J. (2013). El Porqué de Algunos Comportamientos de Las Plantas. *Fisiología Vegetal* Universitat.
- Al-Rubaey, N.K.F., F.M. Abbas y I.H. Hameed (2019). Antibacterial and anti-fungal activity of methanolic extract of *Passiflora caerulea*. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 10, 930–935. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.00180.3>
- Álvarez-Quiroz, V., L. Caso-Barrera, M. Aliphath-Fernández y A. Galmiche-Tejeda (2017). Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16, 428–454.
- Angelini, P., E. Bricchi, N. Zeppilli, L. Dimitriu, M. Rondolini, G. Angeles, S. Covino y R. Venanzoni (2019). Screening of the antifungal activity of essential oils against human and plant pathogenic filamentous fungi. *Flora Mediterranea*, 29, 5-12. <https://doi.org/10.7320/FIMedit29.005>

- Arias, P., C. Dankers, P. Liu y P. Pilkauskas (2004). The world banana economy 1985-2002. [Online] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s00.htm#Contents> [Acceso 10 de diciembre del 2018]
- Ávalos-García, A. y E. Pérez-Urria Carril (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2, 119–145.
- Avellaneda, Y., V. Barrios y C. Carmona (2009). Elucidación de compuestos orgánicos. *UV-Visible*, 1–50.
- Banco Mundial. 2017. Agricultura y Alimentos. [Online] Disponible en: <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/overview> [Acceso 10 de octubre de 2018].
- Bennett, R.S. y P.A. Arneson (2003). Sigatoka negra bananeros y plataneros. *The Plant Health Instructor*, 01, 1–10. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2005-0217-01>
- Bokesch, H.R., R.D. Charan, K.M. Meragelman, J.A. Beutler, R. Gardella, B.R. O’Keefe, T.C. McKee y J.B. McMahon (2004). Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treulia obovoidea*. *FEBS Letters*, 567, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.085>
- Campo-Arana, R.O., S.N. Vélez-Leiton y J.L. Barrera-Voleth (2020). La Sigatoka Negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en los cultivos de plátano y banano: una revisión. *Fitopatología Colombiana* 44, 61-66.
- Cardillo, A.B., M.C. Martínez-Ceron, S.M. Romero, O. Cascone, S.A. Camperi y S.L. Giudicessi (2018). Péptidos Antimicrobianos de Plantas. *Revista Farmacéutica* 160, 28–46.
- Castro, M.S. y W. Fontes (2005). Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein and Peptide Letters*, 12, 11–16. <https://doi.org/10.2174/0929866053405832>

- Chillet, M., C. Abadie, O. Hubert, Y. Chilin-Charles y L. Lapeyre de Bellaire (2009). Sigatoka disease reduces the green life of bananas. *Crop Protection*, 28, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.08.008>
- Churchill, A.C.L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12, 307–328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>
- Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química E.A.P. de Química. pp. 47-50.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) (2021). Información Estadística Climatológica. [Online] Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/tools/RESOURCES/Mensuales/yuc/00031007.TXT> [Acceso: 26 de abril del 2021]
- Czubinski, J. y K. Dwiecki (2016). A review of methods used for investigation of protein–phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 573–585. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13339>
- Darçın, E.S. y M. Darçın (2017). Health Effects of Agricultural Pesticides. *Biomedical Research* 2017, Special Issue, 13–17.
- Darmadi, A.A.K., S.K. Sudirga, N.L. Suriani y I.G.A.S. Wahyuni (2019). Antifungal activities of cinnamon leaf extracts against Sigatoka fungus (*Pseudocercospora fijiensis*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 347(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/347/1/012051>
- De Lucca, A.J., T.E. Cleveland y D.E. Wedge (2005). Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 1001-1014. <https://doi.org/10.1139/w05-063>

- De Melo Filho, A.A., Â.K. Kamezaki, P.R.E. Ribeiro, A.C.G.R. de Melo, I.M. Fernández, R.C. Santos, E.A. Chagas y P.C. Chagas (2018). Chemical composition, antioxidant and biological activity of leaves *Passiflora foetida*. Chemical Engineering Transactions, 64, 241–246. <https://doi.org/10.3303/CET1864041>
- Dethoup, T., P. Songkumarn, S. Rueangrit, S. Suesa-ard y C. Kaewkrajay (2018). Fungicidal activity of Thai medicinal plant extracts against *Alternaria brassicicola* causing black spot of Chinese kale. European Journal of Plant Pathology, 152, 157–167. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1460-5>
- Dewanjee, S., M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra y T.K. Dua (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. Journal of Pharmaceutical Analysis, 5, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Dewick, P.M. (2009). Medicinal Natural Product. University of Nottingham, UK. pp. 166-417.
- Domínguez-Barradas, C., G.E. Cruz-Morales y C. González-Gándara (2015). Plantas de uso medicinal de la Reserva Ecológica “Sierra de Otontepec”, municipio de Chontla, Veracruz, México. CienciaUAT, 9, 41-52. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v9i2.708>
- Domingo, D. y M. López-Brea (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Revista Especial de Quimioterapia 16, 385–393.
- El-Hamamsy, S.M.A. y H.A.Z. El-khamissi (2020). Phytochemicals, antioxidant activity and identification of phenolic compounds by HPLC of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology, 11, 79–84. <https://doi.org/10.21608/jacb.2020.95837>
- Espejel, I., O. Jiménez-Rocio, G. Castillo-Campos, P.P. Garcillán, L. Álvarez, S. Castillo-Argüero, R. Durán, M. Ferrer, D. Infante-Mata, S. Iriarte, J.L. León de la Luz, H. López-Rosas, A. Narváez-Medel, R. Monroy, P. Moreno-Casasola, J.P. Rebman, N. Rodríguez-Revelo, J. Sánchez-Escalante y S. Vanderplank (2017). Flora en playas y dunas costeras de México. Acta Botánica Mexicana, 121, 39–81. <https://doi.org/10.21829/abm121.2017.1290>

- Ez-zriouli, R., H.E. Yacoubi, Z.B. Ouaitini y R. Atmane (2020). Study of the antifungal activity of *Origanum compactum* essential oil against different plant pathogenic fungi. *Plant Archives*, 20, 5331–5336.
- Fernández, M.S., F. Hernández-Ochoa, O. Carmona-Hernández, M. Luna-Rodríguez, C. Barrientos-Salcedo, H. Asselin y J.A. Lozada-García (2020). Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39, 1-9. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-6>
- FAO (*Food and Agriculture Organization*) (2013). “Battling Black Sigatoka Disease in the Banana Industry.” Subregional Office for the Caribbean. [Online] Disponible en: <https://studylib.net/doc/18201133/battling-black-sigatoka-disease-in-the-banana-industry> [Acceso 19 de diciembre de 2018].
- FAO (*Food and Agriculture Organization*) (2018). Agricultura de Conservación. [Online] Disponible en: <http://www.fao.org/conservation-agriculture/es/> [Acceso 4 de febrero de 2019].
- FAO (*Food and Agriculture Organization*) (2018). Situación del mercado del banano. Resultados preliminares relativos a 2017. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [Online] Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Spanish_December_2017_update.pdf [Acceso 17 de octubre de 2018].
- Fraisse, D., A. Bred, C. Felgines y F. Senejoux (2020). Screening and characterization of antiglycoxidant anthocyanins from *Vaccinium myrtillus* fruit using DPPH and methylglyoxal pre-column HPLC assays. *Antioxidants*, 9, 512-522. <https://doi.org/10.3390/antiox9060512>.
- Gainche, M., C. Ogeron, I. Ripoché, F. Senejoux, J. Cholet, C. Decombat, L. Delort, J.Y. Berthon, E. Saunier, F. Caldefie Chezet y P. Chalard (2021). Xanthine oxidase inhibitors from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and their efficient detections by

- HPTLC and HPLC analyses. *Molecules*, 26, 1939. <https://doi.org/10.3390/molecules26071939>
- García-Mateos, R. y R. Pérez-Leal (2003). Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9, 5–10. <https://doi.org/10.4270/ruc.2010216>
- Gaurav, Zahiruddin, S., B. Parveen, M. Ibrahim, I. Sharma, S. Sharma, A.K. Sharma, R. Parveen y S. Ahmad (2020). TLC-MS bioautography-based identification of free-radical scavenging, α -amylase, and α -glucosidase inhibitor compounds of antidiabetic tablet BGR-34. *ACS Omega*, 5(46), 29688–29697. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02995>
- Glazer, I., S. Masaphy, P. Marciano, I. Bar-Ilan, D. Holland, Z. Kerem y R. Amir (2012). Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4841–4848. <https://doi.org/10.1021/jf300330y>
- Gómez-Hernández, M. (2018). Actividad antifúngica de extractos de macroalgas marinas de la costa de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Gonzalo-Galileo, R., Z. Marie Françoise, C. Abadie y J. Carlier (2004). Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 13, 471–482. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02043.x>
- Guzmán, M. (2012). Control biológico y cultural de la Sigatoka-negra. *Tropical Plant Pathology*, 37, 1-4. <https://doi.org/10.13140/2.1.2927.7442>
- Hamad, Y.K., Y. Abobakr, M.Z.M. Salem, H.M. Ali, A.S. Al-Sarar y A.A. Al-Zabib (2019). Activity of plant extracts/essential oils against three plant pathogenic fungi and mosquito larvae: GC/MS analysis of bioactive compounds. *BioResources*, 14, 4489–4511. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.4489-4511>

- Hidalgo, M., A. Tapia, W. Rodríguez, E. Serrano (2006). Efecto de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense*, 30, 35-41.
- Hwang, S., Q. Shao, H. Williams, C. Hilty y Y.Q. Gao (2011). Methanol strengthens hydrogen bonds and weakens hydrophobic interactions in proteins - a combined molecular dynamics and NMR study. *Journal of Physical Chemistry. B*, 115, 6653–6660. <https://doi.org/10.1021/jp111448a>
- INFOCOM. (2016). BANANO. Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo. [Online] Disponible en: https://unctad.org/es/system/files/official-document/INFOCOMM_cp01_Banana_es.pdf [Acceso 3 de diciembre de 2018].
- Khairan, A., M. Bahi, C. Nova Eriana y R. Sriwati (2019). Fungicidal activity of garlic (*Allium sativum*) bulbs extracts against plants pathogenic fungi. *Jurnal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 19, 23. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.11923-32>
- Kleinwächter, M. y D. Selmar (2014). New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 121–131. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0260-3>
- Leonberger, K., K. Jackson, R. Smith y N. Ward Gauthier (2016). *Plant Diseases [2016]*, en: *Agriculture and Natural Resources Publications*. University of Kentucky UKnowledge, pp: 182–205.
- Ma, J., X. Zhou, C. Zhang, R. Yu, H. Pei, X. Wang y F. Ge (2020). Identification and quantification of “Quality Markers” in Tongkang tablet on recurrent respiratory tract infections (RRTIs) by UFLC-IT-TOF-MS/MS and HPLC-DAD. *Chromatographia*, 83, 631–646. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03881-4>
- Ma, Y.N., C.J. Chen, Q. Li, , W. Wang, F.R. Xu, Y.X. Cheng y X. Dong (2019). Fungicidal activity of essential oils from *Cinnamomum cassia* against the pathogenic fungi of *Panax notoginseng* diseases. *Chemistry and Biodiversity*, 16, e1900416. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900416>

- Manzo-Sánchez, G., S. Guzmán-González, C.M. Rodríguez-García, A. James y M. Orozco-Santos (2005). La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa* spp. Revista Mexicana de Fitopatología Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., 23, 87–96.
- Martínez, M.L. y M.T. Valverde (1992). Las Dunas Costeras. Ciencias 26, 35–42.
- Martín-Mazuelos, E., E. Cantón-Lacasa y A. Espinel-Ingroff (2007). Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología, 16, 1–9.
- Medina-Dzib., M.G. (2016). Evaluación de un fungicida vegetal de la duna costera de Yucatán contra hongos patógenos de cultivos agrícolas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México
- Melgarejo-García, J. (2011). Mecanismo de acción de los fungicidas. Revista Ventana Al Campo, 15, 193–202.
- Millipore. (2009). Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices. [Online] Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/ufc5003?lang=es®ion=MX&gclid=Cj0KCQjw1a6EBhC0ARIsAOiTKrHMGIZSXU85n2935-C0zVBtugUFzOHgi-MyzWOmoTZan2kEW9OVhKgaAoBvEALw_wcB [Acceso: 10 de junio del 2019]
- Mohanasundari, C., D. Natarajan, K. Srinivasan, S. Umamaheswari y A. Ramachandran (2007). Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. a common exotic medicinal plant. African Journal of Biotechnology, 6, 2650–2653. <https://doi.org/10.5897/ajb2007.000-2426>
- Montaño-Pérez, K. y F. Vargas- Albores (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. Interciencia, 27, 21–27. <https://doi.org/0378-1844/02/01/021-07>
- Nicolls, J.M. (1970). Antifungal activity in *Passiflora* species. Annals of Botany, 34, 229–237. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084357>

- Obidiebube, E., O. Henry, C. Obasi, F. Onejeme (2020). Component assessment of pathogenic fungi organisms associated with Egusi melon (*Citrillus coloncythis* L.) seeds and control using some plant extracts and synthetic fungicide. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 16–25.
- Obila, S.M., D. Musyimi y P. Sikuku (2020). Phytochemical and fungicidal activity of selected plant extracts against *Phaeoisariopsis griseola* of common bean. *International Journal of Microbiology and Mycology*, 11, 1–11.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2018). Bases de Datos Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura. [Online] Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/databases/es/> [Acceso 10 de diciembre de 2018].
- Orozco-Santos, M., K. García-Mariscal, G. Manzo-Sánchez, S. Guzmán-González, L. Martínez-Bolaños, E. Beltrán-García, J.A. Torrez-Amezcuca y B. Canto-Canché (2013). Manejo integral de la Sigatoka negra, en: La sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Mario Orozco-Santos (ed.), Prometeo Editores. Guadalajara. p 38-66.
- Ortega, G., A. Bermello, M. Guerra, G. Michelena, G. Castillo, S. Armenteros, G. Mieres, E. Carreras, D. Crespo, S. Matos y L. Silvano (2007). Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de *Botryodiplodia theobromae*. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, XLI, 27–34.
- Patil, A., B. Lade, H. Paikrao (2015). A scientific update on *Passiflora foetida*. *European Journal of Medicinal Plants*, 5, 145–155. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/12015>
- Pelegri, P.B., E.F. Noronha, M.A.R. Muniz, I.M. Vasconcelos, M.D. Chiarello, J.T.A. Oliveira y O.L. Franco (2006). An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.04.010>
- Promusa: Improving the understanding of banana. 2017. “*Pseudocercosporas fijiensis*.” [Online] Disponible en: <http://www.promusa.org/Pseudocercosporas+fijiensis> [Acceso 10 de octubre de 2018].

- Ramaiya, S.D., J.S. Bujang, M.H. Zakaria (2014). Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. The Scientific World Journal, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/167309>
- Ribeiro, S.M., R.G. Almeida, C.A.A. Pereira, J.S. Moreira, M.F.S. Pinto, A.C. Oliveira, I.M. Vasconcelos, J.T.A. Oliveira, M.O. Santos, S.C. Días y O.L. Franco (2011). Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. Peptides, 32, 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.011>
- Robles-García, M.A., A.J. Aguilar, M. Gutiérrez-Lomelí, F. Rodríguez-Félix, J.A. Morales-Del-Río, P.J. Guerrero-Medina, J.A. Madrigal-Pulido y C.L. Del-Toro-Sánchez (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). Biotecnia 18, 3–8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v18i3.328>
- Rodríguez, D., M.E. Sanabria y J.L. Rodríguez (2006). Comparación del efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Phyllanthus niruri* ante *Phytophthora infestans*. VII Congreso SEAE. 83, 1-5
- Rodríguez-Gaviria, P.A. y G. Cayón (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. Agronomía Colombiana, 26, 256–265.
- Rodríguez-García C.M., J.C. Ruiz-Ruiz, L. Peraza-Echeverría, S.R. Peraza-Sánchez, L.W. Torres-Tapia, D. Pérez-Brito (2019) Actividad antioxidante, antihipertensiva, antihiper glucémica y antimicrobiana de extractos acuosos de doce plantas nativas de la costa de Yucatán. PLoS ONE 14 (3): e0213493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213493>
- Rodríguez-García, C.M., M.G. Medina-Dzib, R.M. Soto-Hernández, R. San Miguel-Chaves, L. Peraza-Echeverría, M.L. Aguilar-Espinosa y A. Dorantes-Euan (2016). Extracto crudo acuoso de *Passiflora foetida*, su método de obtención y uso como fungicida contra *Mycosphaerella fijiensis*. México. MX/a/2016/006876. Mérida, Yucatán. Instituto mexicano de Propiedad Intelectual.

- Salhi, N., S. Ayesh, M. Saghir, V. Terzi, I. Brahmi, N. Ghedairi y S. Bissati (2017). Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant algerian medicinal plants. *BioMed Research International*, 2017, 6. <https://doi.org/10.1155/2017/7526291>
- Sasidharan, S., Y. Chen, D. Saravanan, K.M. Sundram y L.Y. Latha (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- Selmar, D. y M. Kleinwächter (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell Physiology*, 54, 817–826. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct054>
- Sepúlveda-Jiménez, G., H. Ducoing-Porta y M. Rocha-Sosa (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Šernaitė, L. (2017). *Plant extracts: antimicrobial and antifungal activity and appliance in plant protection (Review)*. *Sodininkystė ir Daržininkystė*, 36, 58–68.
- Shelton, J.F., E.M. Geraghty, D.J. Tancredi, L.D. Delwiche, R.J. Schmidt, R.L. Hansen y I. Hertz-Picciotto (2014). Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: The CHARGE study. *Environmental Health Perspectives*, 122, 1103–1109. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307044>
- Signaling, BIOSOURCE Invitrogen cytokines. 2010. alamarBlue® Assay. [Online] Disponible en: www.invitrogen.com [Acceso 10 de febrero de 2019].
- Silva, F.S.G., I.G. Starostina, V.V. Ivanova, A.A. Rizvanov, P.J. Oliveira y S.P. Pereira (2016). Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Current Protocols in Toxicology*, 68, 1–15. <https://doi.org/10.1002/cptx.1>
- Sisin, N.N.T., H. Abdullah y M.D. Sul'ain (2017). Antiproliferative, antioxidative and compounds identification from methanolic extract of *Passiflora foetida* and its

- fractions. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.15406/japlr.2017.05.00166>
- Singh, B., J.P. Singh, A. Kaur y N. Singh (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits - A review. *Food Chemistry*, 206, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.033>
- Smruthi, R., M. Divya, , K. Archana y M. Ravi (2021). The active compounds of *Passiflora* spp and their potential medicinal uses from both *in vitro* and *in vivo* evidence. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4, 45–55. <https://doi.org/10.21608/jabps.2020.44321.1105>
- Stover, R.H. (1980). Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Disease* 64, 750–756.
- Swami Handa, S., S.P. Singh Khanuja, G. Longo y D. Dutt Rakesh (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology Trieste, pp: 21-29.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Secondary Metabolites in Plant Defense. [Online] Disponible en: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Prez_02-Novenelettan-eng/08-Secondary-metabolites-in-plant-defense.pdf.
[10 de noviembre del 2018]
- Tandoro, Y., P.S. Widyawati, T.D.W. Budianta y G. Sumargo (2020). Phytochemical identification and antioxidant activity of *Passiflora foetida* fruits and leaves extracts: a comparative study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 12, 55–58. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2020v12i6.31505>
- Thamizh, S.N. y D. Sudhakar (2021). Physico-chemical, phytochemical and spectroscopic studies on *Passiflora foetida* L. *Recent Trends of Herbal Research in Ayurveda*, 1, 11–17.
- Torres, W., M. Méndez, A. Dorantes y R. Durán, (2010). Estructura, composición y diversidad de matorral de duna costera en el litoral yucateco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 86, 37–51. <https://doi.org/10.1126/science.1135531>

University of Kentucky. Department of Entomology. 2016. Agricultural Plant Diseases. Kentucky.

Vega-Torres, G. (2009). La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el plátano. [Online] Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos33/sigatoka-negra/sigatoka-negra.shtml> [Acceso 10 de abril de 2019].

Vivanco, J.M., E. Cosío, V.M. Loyola-Vargas y H.E. Flores (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, 341, 68–75.

Williams, S.D., M.J. Boehm y T.K. Mitchell (2017). Fungal and Fungal-like Diseases of Plants. *Agriculture and Natural Resources*. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-gen-7> [Acceso 17 de febrero de 2019].

Zhang, P., R.L. Whistler, J.N. Bemiller y B.R. Hamaker (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility - a review. *Carbohydrate Polymers*, 59, 443–458. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.10.014>