



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PLANTAS NATIVAS
DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN PARA EL
CONTROL DE FITOPATÓGENOS POSCOSECHA DE
Capsicum spp.**

Tesis que presenta

TANIA GODOY RODRÍGUEZ

En opción al título de

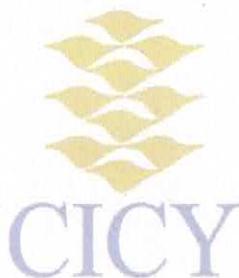
MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

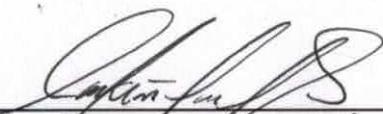
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de la **Biól. Tania Godoy Rodríguez** titulado **Actividad antifúngica de plantas nativas de la península de Yucatán para el control de fitopatógenos poscosecha de *Capsicum ssp.***, fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, dentro de la opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Celia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de marzo de 2019.

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 regirán 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.



Firma: _____

Nombre: TANIA GODOY RODRÍGUEZ

Este trabajo se llevó a cabo en el **Laboratorio de Productos Naturales** en la **Unidad de Biotecnología**, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto **CONACYT PDCN-2015-266** en el que se participó bajo la dirección de la **Dra. Marcela Gamboa Angulo**.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de este camino de aprendizajes, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de experiencias y sobre todo lecciones de perseverancia.

A mi hermosa bendición, mi hijo Luis Emiliano, por ser una parte importante de mi vida, y sobre todo por la paciencia que me tuvo, su amor incondicional y la sonrisa que siempre me mostró cada vez que me veía cansada y ocupada.

Le doy gracias a mi hermosa familia, a mis padres Luis y Rosalía, a mis hermanas Jahel y Stephanie, a mi cuñado Roberto y a JC por apoyarme en todo momento, y darme fortaleza y ánimos a la distancia.

Muy agradecida de corazón con mi asesora de tesis, la Dra. Marcela Gamboa Angulo, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por creer en mí al aceptarme en su equipo de trabajo, por todo el apoyo con la tesis y las facilidades que nos brindó para trabajar en armonía y en equipo dentro del laboratorio, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender a hacer investigación como lo ha hecho ella.

Gracias infinitas también a la Q.I. Irma Leticia Medina Baizabal, por la gran paciencia que me tuvo, por todas las técnicas de laboratorio que me enseñó a lo largo de este posgrado y, sobre todo, por su linda amistad, miles de bendiciones Lety.

Un agradecimiento muy especial a todos los doctores del Centro de Investigación Científica de Yucatán que fungieron como mis docentes en el transcurso del posgrado, por todos los conocimientos y enseñanzas dentro del aula. Al Dr. Germán Carnevali y al Tec. José Luis Tapia por el apoyo en la colecta e identificación del material vegetal utilizado en este trabajo. A mi comité tutorial, por todas las observaciones y críticas constructivas para llevar a cabo un buen trabajo de investigación.

También un agradecimiento especial al Tecnológico Nacional de México, campus Conkal, por las cepas proporcionadas en este trabajo de investigación.

También agradezco al Tecnológico Nacional de México por el apoyo de Beca-Comisión para la realización de este posgrado en CICY, Mérida, Yucatán. Al director del Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan, Lic. Brígido Castrejón Sánchez, por el gran apoyo profesional durante estos años y por todas las facilidades brindadas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Marilem, Diana, Aida, Daivy, Syndel, Horacio, Felicia y Jesús, por haber hecho el papel de una familia verdadera en todo momento, gracias por su apoyo en el laboratorio, comprensión y sobre todo por su amistad. Esta tesis tiene aportes de cada uno de ustedes.

Agradezco al proyecto CONACYT PN-2015-266, por el apoyo para la presentación de parte de los resultados en la XIV Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, en Cuernavaca, Morelos, del 23-26 de mayo de 2018.

DEDICATORIAS

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi hijo

Porque esta obtención de grado es para brindarle un mejor futuro y porque siempre me mostró amor con todos sus abrazos a pesar del estrés que le mostraba. Te amo mi hermoso bebé Luem (Luis Emiliano).

A mis maestros y al H. Comité Tutorial

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de esta maestría y para la elaboración de esta tesis, por su apoyo ofrecido en este trabajo, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que, hasta ahora, seguimos siendo amigos: Marilem, Maritoña, Lety, Diana, Syndel, Daivy, Carmen y Mauricio.

A todos ellos se les agradece desde el fondo de mi alma.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos, hay quienes luchan muchos días y son muy buenos, hay quienes luchan por años y son mejores, pero están los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles” (Anónimo).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. 1 Género <i>Capsicum</i> spp.....	3
1.2 Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	4
1.3.Chile dulce (<i>Capsicum annuum</i> L).....	5
1.4 Chile <i>Xkat'ik</i> (<i>Capsicum annuum</i> L).....	5
1.5 Enfermedades causadas por Hongos Fitopatógenos	6
1.6. Fitopatógenos en frutos poscosecha en tres especies de chiles en Yucatán	6
1.6.1 <i>Penicillium oxalicum</i> Currie, J.N.; Thom, C. 1915	7
1.6.2 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl (1912).....	8
1.6.3 <i>Alternaria brassicicola</i> (Schwein.) Wiltshire (1947).....	10
1.6.4 <i>Colletotrichum capsici</i> (Syd.) E.J. Butler & Bisby	10
1.6.5 <i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus & W.D. Moore (1935)	11
1.7 Plantas regionales con antecedentes de actividad fungicida	12
1.8 Bioensayos.....	13
1.9 Efecto fungicida o fungistático	14
1.10 Concentración efectiva media (CE ₅₀).....	14
1.11 Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	14
1.12 Perfil químico con métodos cromatográficos.....	14
1.12.1 Cromatografía en Capa Fina	14
1.12.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	15
1.12.3 Cromatografía de Gases.....	15
1.13 Bioprospección.....	16
1.14 Especies vegetales a evaluar contra patógenos del chile habanero	16
1.14.1 <i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerem	16
1.14.2 <i>Byrsonima bucidaefolia</i> Standl.....	17
1.14.3 <i>Cameraria latifolia</i> L.....	18
1.14.4 <i>Croton arboreus</i> Millsp.	19
1.14.5 <i>Croton itzaeus</i> Lundell.....	19
1.14.6 <i>Erythroxylum confusum</i> Britton	20
1.14.7 <i>Guettarda combisii</i> Urb.....	20

1.14.8 <i>Heteropterys laurifolia</i> (L) Juss.....	21
1.14.9 <i>Licaria</i> sp.....	21
1.14.10 <i>Morella cerifera</i> (L) Small	22
1.14.11 <i>Mosannonna depressa</i> (Baill.) Chatrou	22
1.14.12 <i>Parathesis cubana</i> (A.DC.) MOLINET & M. GÓMEZ.....	23
1.14.13 <i>Psychotria</i> sp.....	24
1.14.14 <i>Simarouba amara</i> Aubl.	24
1.14.15 <i>Stenmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson.. ..	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
CAPÍTULO II	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Colecta del material vegetal	29
2.2 Procesamiento del material vegetal	29
2.3 Preparación de extractos.	31
2.3.1 Extractos etanólicos (EE).....	31
2.3.2 Extractos acuosos (EA).....	31
2.4 Reactivación y conservación de cepas <i>Capsicum</i> spp.....	33
2.5 Bioensayos antifúngicos.....	34
2.5.1 Técnica del bioensayo en minidisco de agar-extracto	34
2.5.2 Preparación de medio PDA con extractos etanólicos (EE).....	34
2.5.3 Preparación de medio PDA con extractos acuosos (EA).....	35
2.5.4 Preparación de suspensión de esporas de <i>Penicillium oxalicum</i>	35
2.5.5 Preparación de propágulos de <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Colletotrichum capsicum</i> y <i>Colletotrichum truncatum</i>	35
2.5.6 Ensayo antifúngico con minidisco de agar.....	36
2.5.7 Partición del extracto etanólico.	37
2.5.8 Bioensayo de Microdilución.....	37
2.6 Análisis estadístico de los datos.....	38
2.7 Perfil cromatográfico	38
2.7.1 Cromatografía en placa fina	38

2.7.2 Cromatografía líquida de alta eficacia.....	39
2.7.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	39
2.7.3 Cromatografía de gases-masas.....	39
2.8 Metilación	40
CAPÍTULO III	41
3. RESULTADOS.....	41
3.1 Actividad antifúngica de Extractos etanólicos (EE).....	41
3.2 Actividad antifúngica de Extractos acuosos (EA).....	42
3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	43
3.4 Concentraciones efectivas 50 y 95 de las fracciones de <i>M. depressa</i> contra <i>P. oxalicum</i>	44
3.5 Perfiles cromatográficos.....	46
3.5.1 Cromatografía capa delgada (CCD).....	46
3.5.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	47
3.5.3 Cromatografía de Gases-EM	49
CAPÍTULO IV.....	53
4. DISCUSIÓN	53
CAPÍTULO V	59
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
5.1 CONCLUSIONES.....	59
5.2 PERSPECTIVAS	59
5.3 RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Conidióforo de <i>Penicillium oxalicum</i>	7
Figura 1.2. <i>Penicillium oxalicum</i> en medio Agar-Papa-Dextrosa	8
Figura 1.3. <i>Alternaria alternata</i> en medio Agar-Papa-Dextrosa	9
Figura 1.4. <i>Alternaria brassicicola</i>	10
Figura 1.5. <i>Colletotrichum capsici</i> en medio Aga-Papa-Dextrosa	11
Figura 1.6. <i>Colletotrichum truncatum</i> en medio Agar-Papa-Dextrosa.....	12
Figura 1.7. Estrategia experimental.....	29
Figura 2.1. Procesamiento del material vegetal colectado	31
Figura 2.2. Extractos etanólicos de las especies obtenidas por sonicación.....	33
Figura 2.3. Obtención de Extractos acuosos.....	34
Figura 2.4. Reactivación y conservación de cepas fitopatógenas	35
Figura 2.5. Preparación de medio PDA con los extractos etanólicos.....	36
Figura 2.6. Bioensayo en Minidisco de agar con extractos de <i>M. depressa</i> contra <i>Penicillium oxalicum</i>	38
Figura 3.1. Replicación de fracciones y extractos más activos de <i>M.depressa</i> y <i>Licaria</i>	46
Figura 3.2. Cromatogramas en capa delgada de fracciones más activas de <i>Mosannonna depressa</i>	47
Figura 3.3. Cromatogramas de líquidos de las fracciones de a) MDT-01b, b) MDT-01c, c) MDR-01b y d) MDR-01c de <i>Mosannonna depressa</i> a 254 nm, en una columna C18	49
Figura 3.4. Metabolitos detectados en <i>Mosannonna depressa</i>	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Actividad biológica de extractos de plantas nativas de la Península de Yucatán con efecto antifúngico	12
Cuadro 1.2. <i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerm	16
Cuadro 1.3. <i>Byrsonima bucidaefolia</i> Standl.....	17
Cuadro 1.4. <i>Cameraria latifolia</i> L.....	18
Cuadro 1.5. <i>Croton arboreus</i> Millsp.....	19
Cuadro 1.6. <i>Croton itzaeus</i> Millsp.	19
Cuadro 1.7. <i>Erythroxylum confusum</i> Britton.....	20
Cuadro 1.8. <i>Guettarda combisii</i> Urb.	20
Cuadro 1.9. <i>Heteropterys laurifolia</i> (L) Juss	21
Cuadro 1.10. <i>Licaria</i> sp.....	21
Cuadro 1.11. <i>Morella cerifera</i> (L) Small.....	22
Cuadro 1.12. <i>Mosannonna depressa</i> (Baill.) Chatrou.....	22
Cuadro 1.13. <i>Parathesis cubana</i> (A.DC.) MOLINET & M. GÓMEZ.....	23
Cuadro 1.14. <i>Psychotria</i> sp.....	24
Cuadro 1.15. <i>Simarouba amara</i> Aubl.	24
Cuadro 1.16. <i>Stenmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson.	25
Cuadro 2.1. Información general de especies vegetales colectadas en Jahuactal	32
Cuadro 2.2. Material vegetal seco y molido de cada parte de las especies colectadas ...	34
Cuadro 2.3. Información general de los hongos fitopatógenos.....	35
Cuadro 2.4. Parámetros de lectura para ensayo antifúngico con minidiscos.....	38
Cuadro 2.5. Escala numérica para las lecturas de inhibición del crecimiento fúngico en microdilución.....	40
Cuadro 3.1. Actividad antifúngica de EE obtenidos de plantas de la Península de Yucatán contra hongos patógenos de <i>Capsicum</i> spp	42
Cuadro 3.2. Actividad antifúngica de EA contra hongos patógenos de <i>Capsicum</i> spp	43
Cuadro 3.3. Concentración mínima inhibitoria de extractos y fracciones de partición de <i>M. depressa</i> vs <i>Penicillium</i>	44
Cuadro 3.4. Concentración mínima inhibitoria de extractos y fracciones de partición de <i>Licaria</i> sp. vs <i>Penicillium</i>	45

Cuadro 3.5. Determinación de las concentraciones inhibitoria 50 y 95 (CI_{50} y CI_{95}) de extractos y fracciones de <i>Mosannonna depressa</i> contra <i>Penicillium oxalicum</i>	47
Cuadro 3.6. Componentes observados por CCD del extracto y fracciones de <i>Mosanonna depressa</i>	48
Cuadro 3.7. Análisis de CG-EM de fracciones hexánicas (01a), sus derivados metilados (01aM) y de las fracciones de acetonitrilo (01b) de partición del extracto etanólico de Hoja Tallo y Raíz de <i>Mosannonna depressa</i>	50
Cuadro 4.1. Actividades biológicas reportadas de <i>Mosannonna depressa</i>	56

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CI₅₀: Concentración inhibitoria media

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: Extracto acuoso

EE: Extracto etanólico

PDA: Agar papa y dextrosa

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

µg: Microgramo

µL: Microlitro

RESUMEN

Un total de 82 extractos (acuosos y etanólicos) de quince especies de plantas nativas de la Península de Yucatán se colectaron y se evaluaron contra *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum truncatum* y *Penicillium oxalicum*, hongos reconocidos como agentes causales de enfermedades en frutos poscosecha de *Capsicum* spp. La prospección inicial se realizó con el ensayo antifúngico en minidisco a $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados obtenidos en los bioensayos, mostraron que la más alta actividad antifúngica se detectó en el extracto etanólico (EE) de la corteza de *Mosannonna depressa*. Este EE se particionó con disolventes de polaridad ascendente y las fracciones se evaluaron en el bioensayo de microdilución. De esta forma, se detectó la presencia de efecto antifúngico en las hojas, tallo y raíz de *M. depressa*, siendo el extracto de mediana polaridad el que presentó la más baja CMI a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una CI_{50} de $141.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un efecto fungicida. El perfil químico de este extracto activo se analizó por CG-EM y reveló como componentes mayoritarios a los ácidos palmítico, oleico y linoleico, así como una mezcla de α - y β -asarona. El contenido en las fracciones de hoja fue similar a lo encontrado en corteza. A partir del EE de la raíz el metabolito mayoritario identificado fue el aliltetrametoxi-benceno. El conocimiento químico de *M. depressa* se enriquece y por primera vez se reportan los componentes de hoja y raíz. Los datos del presente trabajo sugieren que la especie *M. depressa* es un candidato potencial para ser un fungicida botánico en el control de fitopatógenos poscosecha de *Capsicum* spp. específicamente contra el hongo fitopatógeno *Penicillium oxalicum*.

ABSTRACT

A total of 82 extracts (aqueous and ethanolic) of fifteen species of plants native to the Yucatan Peninsula were prepared and evaluated against *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum truncatum* and *Penicillium oxalicum*, fungi recognized as causative agents of diseases in post-harvest fruits of *Capsicum* spp. The initial prospecting was made with the antifungal test in minidisc at $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results obtained in this bioassay showed that the ethanolic extract (EE) of the bark of *Mosannonna depressa* has the highest antifungal activity. This EE was partitioned with solvents of ascending polarity and the fractions were evaluated in the microdilution bioassay. In this way, the presence of an antifungal effect on the leaves, stem, and root of *M. depressa* was detected, being the extract of medium polarity the one that presented the lowest MIC at $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and an IC_{50} of $141.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, with a fungicidal effect. The chemical profile of this active extract was analyzed by GC-MS and revealed that the major components are palmitic, oleic, and linoleic acids, as well as a mixture of α - and β -asarone. The content in the leaf fractions was similar to that found in bark. From the EE of the root, the best metabolite identified was allyltetramethoxy-benzene. The chemical knowledge of *M. depressa* is enriched and for the first time the leaf and root components are reported. The data of the present work suggest that the species *M. depressa* is a potential candidate to be a botanical fungicide in the control of postharvest phytopathogens of *Capsicum* spp. specifically against the phytopathogenic fungus *Penicillium oxalicum*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas son causadas principalmente por hongos, con un estimado de 8,000 especies en comparación con las 50 especies que producen enfermedades en el hombre o en los animales. En el control de los fitopatógenos, el método más utilizado es a base de productos sintéticos. Sin embargo, la aplicación incorrecta de estos productos ha provocado el desarrollo de mecanismos de resistencia en los hongos fitopatógenos. Además, estos productos sintéticos generan residuos tóxicos en alimentos y en el ambiente, poniendo en riesgo la salud del hombre (Angulo *et al.*, 2009).

Una alternativa para el control de enfermedades de las plantas la representan los productos naturales derivados de las plantas. Tales como extractos acuosos, etanólicos, acetónicos y aceites esenciales (Gamboa *et al.*, 2009). Además, son amigables con el ambiente, debido a que sus residuos son fáciles de degradar y se pueden utilizar en el control de patógenos de frutos poscosecha (Guerrero *et al.*, 2007). Una gran cantidad de trabajos relacionados con el efecto antifúngico que presentan algunas plantas han sido reportados (Montes *et al.* 2000; Ramírez y Hernández, 2015). Como resultado se han detectado plantas con propiedades antifúngicas, de diferentes familias tales como Acanthaceae, Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Meliaceae, Papilionaceae, Poaceae y Verbenaceae, entre otras (Gahukar, 2012; Ramírez y Hernández, 2015; Ravikumar y Garampalli, 2013; Walia *et al.*, 2017; Zaker, 2013). Sin embargo, aún falta mucho por explorar, en particular en regiones tropicales donde la investigación es incipiente.

En este sentido, en la Unidad de Biotecnología del CICY se lleva a cabo la bio-prospección de plantas nativas de la península de Yucatán para el control de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos en la región (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Y dada la importancia del cultivo de chile en el Estado de Yucatán, en el Instituto Tecnológico de Conkal, se han aislado fitopatógenos en frutos poscosecha de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), chile dulce y *xkat ik* (López-Puc *et al.*, 2006). Estos incluyeron a las especies *Alternaria alternata*, *A. brassicicola*, *Colletotrichum truncatum*, *C. capsici* y *Penicillium oxalicum*, siendo este último un patógeno secundario

del chile habanero (Hoil, 2016). El control de estos fitopatógenos se realiza con agroquímicos sintéticos como Aliette y el Prozicar, y si no se controlan, las pérdidas se reportan entre el 40-100% (Agrios, 2010).

Por otra parte, las legislaciones de exportación demandan cada vez menores o nulas cantidades de residuos de fungicidas sintéticos en los frutos, por lo que es urgente encontrar opciones naturales para reemplazarlos. En este estudio se realizó un escrutinio antifúngico *in vitro* de extractos obtenidos de 15 especies vegetales colectadas de la selva mediana del Jaguactal, Quintana Roo contra hongos patógenos poscosecha del género *Capsicum* spp. Como segunda etapa se determinó el más efectivo y su perfil químico.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1. 1. Género *Capsicum* spp.

Las diversas especies de chile (*Capsicum* spp.) pertenecen a la familia Solanaceae, nativas de Sudamérica y de la región mesoamericana, distribución que incluye parte de México. Desde que el género fue establecido en 1753 por Linneo, se han descrito alrededor de 27 especies de chiles en el mundo, aunque sólo hay cinco especies cultivadas. De hecho, a excepción del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), el tabasco (*Capsicum frutescens* L.) y el manzano (*Capsicum pubescens* L.), prácticamente todas las variedades de chiles en México corresponden a *Capsicum annuum* L. En esta especie se encuentran todas las variedades de jalapeños, serranos, pimientos, poblanos, anaheim, de árbol, cascabel, etc. El fruto es muy apreciado por su estimulante sabor, producto de una combinación de muchas sustancias, pero siempre con la presencia de la sustancia química llamada capsaicina, la cual confiere el "picante" a cada variedad de chile (Torres, 2012).

En cuanto a los países del mundo que más cultivan chile habanero, China es el que presenta mayor producción, donde la superficie sembrada actual es de 612,800 hectáreas, que representa un 36% de la superficie sembrada a nivel mundial con una producción de 12,531,000 toneladas; más de la mitad de la producción mundial de chiles al año. Estados Unidos es el destino principal del chile procesado, el mercado está dirigido para consumo interno de grupos étnicos, industrias de condimentos, especias, la industria de alcaloides y extractos usados como base de pinturas de alta resistencia a la corrosión (Rincones, 2015).

México ocupa la tercera posición en superficie sembrada con 144,000 ha y con una producción de 1,950,000 ton. El valor de su cultivo en México se ha estimado en alrededor de 13 mil millones de pesos por año, por lo que resulta muy importante desarrollar nuevas estrategias que permitan la producción sustentable de este cultivo (http://2006-2012.conacyt.gob.mx/fondos/FondosSectoriales/.../Convocatoria_2012-02.pdf).

1.2. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

El chile habanero es una hortaliza de clima caliente, los rangos de temperatura en que se desarrolla de forma normal son: mínima 10 °C, máxima 35 °C y óptima de 30 °C. Es una planta de ciclo anual, de hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable, pero en los cultivares comerciales puede variar entre 75 y 120 cm. Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (2.5 a 3.5 mm); con testa de color café claro a café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho y quince días. De tallo grueso, erecto, glabro, robusto y generalmente tiene tendencia a trifurcarse en la primera ramificación (Villa *et al.*, 2014).

El fruto es una baya hueca en forma de trompo, poco carnosa, con dos y hasta ocho hojas modificadas que constituyen el aparato reproductor femenino de la flor y se denominan carpelos. Según González-Estrada *et al.* (2006), el chile habanero es un fruto muy picante y aromático, su color antes de alcanzar la madurez, generalmente es verde; sin embargo, cuando madura puede presentar variantes de color amarillo, naranja, rojo, morado o café. Las paredes que dividen el interior del fruto son incompletas y en el extremo inferior se unen para formar estructuras membranosas que comúnmente se les denomina como venas, las cuales se insertan en la placenta de color blanco amarillento y de apariencia esponjosa.

En el mundo, el chile habanero es uno de los de mayor pungencia o picor, su contenido de capsaicina puede variar entre 200,000 a 500,000 unidades “Scoville” (Ramírez *et al.*, 2015). Esta cantidad de capsaicina ha sido determinante en el incremento de la demanda de esta especie de chile en el mercado nacional e internacional. La capsaicina tiene amplia utilización en la medicina, cosméticos, pinturas, gases lacrimógenos y salsas (Salazar *et al.*, 2014).

Los estados que producen el chile habanero son Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Sonora, Tabasco y Veracruz. La mayor superficie cultivada se encuentra en el estado de Yucatán con un 73% (708.43 ha) del total de la superficie sembrada (SIAP-SAGARPA, 2017).

En Yucatán, la producción es “estacional” (octubre-noviembre) en la época de terminación de la temporada de lluvias. La zona productora más importante se localiza en el sur/sur-oeste del Estado de Yucatán en los municipios de Halachó y Maxcanú (De la Cruz, 2001).

1.3. Chile dulce (*Capsicum annuum* L.)

El chile dulce es una variedad de *C. annuum*, conocido como *ch'uhuk ik*, *ch'ujuk iik*, *xwoolis* y *xts'a'ay iik*. Su fruto es de forma redonda con hendiduras irregulares, de color verde en estado inmaduro y rojo en estado maduro, y presenta de 2-4 lóculos. Su peso fresco varía de 19.8 a 49.6 g, con un promedio de 33.2 g y su peso seco, entre 1.75-11.9 g, con un promedio de 5.0 g. Tiene un rango de longitud de 4.4-9.6 cm y un diámetro de 4.7-7.4 cm. Este chile, al igual que el chile bobo, no registra capsaicinoides y es ampliamente utilizado en la cocina regional, de delicado sabor y de temporada caliente (González-Estrada *et al.*, 2006).

El chile dulce es una hortaliza que ha aumentado su importancia en el país en los últimos años, por su alto valor nutritivo, debido a su alto contenido de vitamina A, B y C y de algunos minerales. La planta es un semiarbusto de forma variable y alcanza entre 0.60 a 1.50 m de altura, dependiendo del cultivar, de las condiciones climáticas y del manejo. Es una planta monoica y autógama, aunque puede experimentar hasta un 45% de polinización cruzada, es decir, ser fecundada con el polen de una planta vecina. Por esta misma razón se recomienda sembrar semilla híbrida certificada cada año (Orellana *et al.*, 2010).

1.4. Chile *Xkat'ik* (*Capsicum annuum* L.)

El nombre maya del chile *xkat'ik* significa en español rubio o güero. La planta de esta variedad puede alcanzar una altura de 35-70 cm, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se siembre. El color de la hoja presenta diversas tonalidades (verde oscuro a verde claro). El chile *xcat'ik* o *kaat iik* inmaduro es de color amarillo pálido, delgado, puntiagudo, de forma cónica alargada y algo ondulado; al madurar se torna de color naranja o rojo. Tiene una longitud que varía de 9.0-17.6 cm y un diámetro

de 2.1-3.4 cm. Su peso fresco puede variar entre 23-55 g. En pungencia, puede ser moderadamente picoso o muy picoso (González-Estrada *et al.*, 2006).

1.5. Enfermedades causadas por hongos fitopatógenos

Una enfermedad fúngica puede ser descrita como policíclica si el agente causal es capaz de producir esporas y reinfectar plantas durante una temporada de crecimiento, o monocíclica si el agente causal debe esperar una nueva temporada. Esta clasificación aplica a regiones con cuatro estaciones donde los patógenos deben producir estructuras específicas para sobrevivir al invierno. Los hongos fitopatógenos también pueden ser definidos por los tipos de esporas que producen y por el método por el cual penetran en la planta. Una vez que el patógeno ha penetrado produce un haustorio y crece dentro de la planta (alimentación biotrófica), o mata las células de su alrededor y se alimenta del tejido muerto (alimentación necrotrófica) (Agrios, 2010).

En campo, la identificación de los patógenos se realiza basándose en los signos y síntomas de la enfermedad. Signos se refieren a la observación de alguna de las estructuras del patógeno (como esporas). Síntomas son evidencia secundaria producida por la planta de que un patógeno está presente (como el marchitarse de las hojas). Las principales enfermedades causadas por hongos son mildius, oidios, royas, carbones, agallas y deformaciones, necrosis, chancros, marchiteces foliares, vasculares, etc., podredumbres radicales, de flores, de frutos, etc. y micosis post-recolección, etc., (<http://fitoagro.blogspot.mx/2015/09/fitopatologia-general-enfermedades-de.html>).

1.6. Fitopatógenos en frutos poscosecha en tres especies de chiles en Yucatán

A partir de lesiones de frutos poscosecha de chile habanero, chile dulce y chile *xkat ik* del estado de Yucatán, se aislaron e identificaron cinco hongos. Estos incluyeron a las especies *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum Capsici*, *Colletotrichum truncatum* y *Penicillium oxalicum* (Hoil-Cocom, 2016; López-Puc *et al.*, 2006). Estos se describen a continuación.

1.6.1. *Penicillium oxalicum* Currie, J.N.; Thom, C. 1915

La clasificación del género *Penicillium* ha variado en función del propio género o de las distintas clasificaciones de los hongos. Según la clasificación de Pitt (1997) *P. oxalicum* se clasifica en el reino fungi (hongos verdaderos) (Visagie *et al.*, 2014)

Phylo: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Especie: *Penicillium oxalicum*

Esta especie posee típicamente penicilos biverticilados y asimétricos que constan de 2 o más métulas de 10-15 μm de longitud. Los conidióforos erectos tienen las paredes lisas, y en general miden entre 200-400 \times 3.0 a 3.5 μm (longitud \times diámetro), formados por una serie de ramas que se orientan paralelamente, en general. Las ramas terminales constituyen las fiálidas de donde nacen los conidios en cadenas abundantes. Las fiálidas son acerosas, y se presentan en grupos de 6 a 10 por verticilo, de 10-15 \times 3.0-3.5 μm . Los conidios son usualmente elípticos, con paredes lisas o equinuladas de 5.0-5.5 \times 3.0-3.5 μm (Samson *et al.*, 2000).



Figura 1.1 Conidióforo de *Penicillium oxalicum* (400 X) (Roselló –Caselles, 2003) (a) sin ramificación, (b) con ramificación lateral. 1. Conidióforo, 2. Métula, 3. Fiálida, 4. Conidios.

En cuanto a su crecimiento en medio de cultivo presenta colonias de crecimiento rápido. En medio Papa-Dextrosa-Agar PDA, sus colonias alcanzan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10 días. Son planas o estriadas radialmente y con áreas centrales aterciopeladas o ligeramente algodonosas, de aspecto compacto a causa de la abundante producción de conidios de color verde grisáceo y con gotitas de exudado claro y brillante. Su reverso de color amarillo claro, marrón o naranja (Roselló- Caselles, 2003).

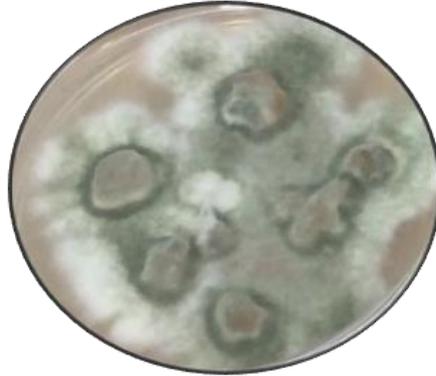


Figura 1.2 *Penicillium oxalicum* en medio Papa-Dextrosa-Agar.

Esta especie ha sido citada como patógeno en algunos cultivos (Baird, 1996), ocasiona marchitez vascular que puede ser general o parcial en las plantas afectadas, además que la localización del patógeno es en el sistema vascular, concretamente en el xilema. El síntoma más específico es la coloración oscura interna del tallo la cual se controla con fungicidas sistémicos como los bencimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato (Agrios, 2005).

1.6.2. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (1912)

El género *Alternaria* fue establecido en el año 1817 por Nees Von Esenbeck, proviene del latín "alternare" y se refiere a la disposición que guardan los conidios. Es un hongo extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos), pulpa de madera y madera podrida, pero también se encuentra en alimentos y tejidos, así como en diferentes tipos de suelo.

En los invernaderos con cultivos de crisantemos y tomates, se aísla de las plantas enfermas o muertas por su tendencia a habitar sustratos orgánicos en descomposición.

Produce con frecuencia manchas negras en tomates. Las especies de *Alternaria* son parásitos facultativos que infectan a plantas y han sido patógenos responsables de epidemias masivas en cultivos de importancia agrícola (Ulloa y Herrera, 1994).

Clasificación taxonómica

Phylo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *Alternaria alternata*

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios. Colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), con un tamaño de 53-63 mm de diámetro, vellosas o algodonosas, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen siendo grisáceos. Reverso de color negro (Andrews, 1992).



Figura 1.3 *Alternaria alternata* en medio Papa-Dextrosa-Agar

1.6.3. *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire (1947)

Clasificación taxonómica

Phylo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *Alternaria brassicicola*



Figura 1.4 *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire (1947).

1.6.4. *Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby

Originalmente descrito como *Vermicularia capsici* Syd. (Sydow, 1913) en India. Si bien ha sido descrito como patógeno responsable de la antracnosis del chile, este género también ha sido reportado para 121 hospederos en 45 familias de plantas de diferentes partes del mundo. Produce conidios de 17-26 μm de longitud \times 3.75 μm de ancho, son uniceladas, de paredes lisas, hialinas, falcadas, en algunas ocasiones fusiformes es decir de extremos estrechos y punteados. Las colonias en PDA son blancas al principio y luego con la edad se tornan de color verde-grisáceo, alcanzando 85 mm de diámetro radial en diez días. Con micelio aéreo de coloración blanca a gris, acérvulos conspicuos, marrones oscuros y setas oscuras, conidióforos unicelulares, hialinos, cilíndricos, septados en algunas ocasiones ramificado (Shenoy *et al.*, 2007).



Figura 1.5 *Colletotrichum capsici* en medio Papa-Dextrosa-Agar.

1.6.5. *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore (1935)

Clasificación taxonómica

Phylo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum truncatum*

Los síntomas de la enfermedad son más evidentes al comienzo del período reproductivo ya que hasta entonces el patógeno permanece en estado de latencia. Se observan numerosas lesiones, pequeñas, elongadas y de color marrón rojizo. En los estadios reproductivos tempranos son atacados sobre todo tallos, vainas y pecíolos. En el follaje aparecen síntomas luego de prolongados períodos de alta humedad, observándose necrosis de nervaduras, canchros en pecíolos, enrollado de las hojas y defoliación prematura.

En estados avanzados del desarrollo de las plantas, los tejidos infectados pueden cubrirse con puntos negros, correspondientes a los cuerpos fructíferos del patógeno (acérvulos). Las ramas y hojas ubicadas en la parte inferior de las plantas suelen ser más afectadas, debido a su proximidad al inóculo primario y a la producción de inóculo secundario a partir de las hojas inferiores senescentes. La enfermedad se ve favorecida

con temperaturas superiores a 25 °C y lluvias abundantes a la madurez del cultivo, especialmente con alta densidad de siembra. El patógeno puede persistir en el suelo en rastrojos de plantas enfermas y semillas contaminadas (Abeledo, 2006).



Figura. 1.6 *Colletotrichum truncatum* en medio Papa-Dextrosa-Agar.

1.7. Plantas regionales con antecedentes de actividad fungicida

En general, un limitado número de especies de plantas de la Península de Yucatán han sido evaluadas y reportadas con actividad antifúngica (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Actividad biológica de extractos de plantas nativas de la Península de Yucatán con efecto antifúngico.

Familia	Nombre científico	Patógeno	Referencia
Euporbiaceae	<i>Acalypha gaumeri</i> <i>Croton chichenensis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus</i> sp. <i>Alternaria tagetica</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Alternaria chrysanthemi</i>	Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2008 Vargas-Díaz, 2009
Teophrastaceae	<i>Bonellia flammea</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Vera-Ku, 2004 García Sosa <i>et al.</i> , 2008
Sapindaceae	<i>Serjania yucatanensis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vera-Ku, 2004

1.8. Bioensayos

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los bioensayos son una de las alternativas utilizadas para la investigación de compuestos o extractos con actividad antimicrobiana. En dicha búsqueda, la efectividad de los fungicidas es determinada inicialmente en experimentos “*in vitro*”. Posteriormente se extrapolan los resultados obtenidos, al hospedante natural o al material que debe ser protegido (Castillo, 2004).

La detección de actividad biológica se realiza comúnmente *in vitro* en un bioensayo diseñado para revelar una bioactividad definida (por ejemplo, fungicida o antibacteriana). La construcción de un bioensayo da la posibilidad de ser un método más rápido, lo que permite más extractos que se proyectarán dentro de un marco de tiempo más corto. También se puede utilizar para revelar acción antifúngica en un estado temprano en el proceso de la prospección (Uldahl y Knutsen, 2009).

El bioensayo en microdilución, es un método usado para determinar la sensibilidad de productos naturales antifúngicos. En esta técnica se usa una placa de 96 pocillos con concentraciones crecientes del extracto a evaluar, inoculados con el organismo de interés. Posee las ventajas de utilizar pequeños volúmenes finales (100 o 200 μL) las diluciones se hacen de manera automatizada, se pueden realizar en corto tiempo y se puede hacer con mayor número de muestras (Salinas, 2016).

1.9. Ensayo de detección de efecto fungicida o fungistático

Para detectar la acción fungicida o fungistática de un producto sintético o natural se utilizan diferentes técnicas. Entre ellas se pueden mencionar la de disco, difusión en agar, E-test, bioautografía y microdilución. El efecto fungicida es la capacidad de un agente

sintético o natural para inhibir la viabilidad del patógeno y el *efecto fungistático* es la capacidad para inhibir la germinación de las esporas o el desarrollo inicial de un hongo, mientras permanezca en contacto continuo (Achicanoy, 1981).

1.10. Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

La concentración inhibitoria media (CI₅₀) es la cantidad de que se estima ocasiona la muerte al 50% de la población de un ensayo. La CI₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico (Castillo, 2004).

1.11. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de un agente que produce una reducción específica visible en el crecimiento de un microorganismo en un medio de crecimiento favorable (Taroco *et al.*, 2012).

1.12. Perfil químico con métodos cromatográficos

La cromatografía en sus orígenes era exclusivamente una técnica de separación que se transformó en técnica de análisis cuando se acopló con un dispositivo para monitorear los metabolitos que se iban separando. La cromatografía es actualmente el principal método utilizado para la separación de mezclas de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Se puede emplear para identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas (Polo, 2015).

1.12.1. Cromatografía en capa delgada (CCD)

La cromatografía en capa fina o delgada (CCD) consiste un lecho abierto formado por una capa fina de fase estacionaria soportada sobre una superficie plana. La elución se consigue por el movimiento capilar ascendente de la fase móvil. Las fases estacionarias utilizadas normalmente para cromatografía en capa fina son alúmina o gel de sílice para cromatografía de adsorción y celulosa para cromatografía de adsorción o de reparto. En la cromatografía en capa fina se utiliza normalmente el análisis por desarrollo.

El proceso se lleva a cabo en recipientes cerrados, por ascensión del disolvente, debiendo colocarse en el interior del recipiente cubriendo una de sus paredes una capa de papel de filtro impregnado en la fase móvil (disolvente) para conseguir una atmósfera saturada en ella. Una vez desarrollada la placa, la visualización de los cromatogramas se realiza, en caso de no tratarse de compuestos coloreados, mediante iluminación con luz ultravioleta, si la fase estacionaria lleva un indicador de fluorescencia, o bien mediante pulverizado de la placa con reveladores de carácter general (yodo, ácido sulfúrico, etc.) si se quieren visualizar únicamente compuestos de un tipo determinado (Restrepo y Pinheiro, 2011).

1.12.2. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Técnica de separación en la que la fase móvil es un líquido. Puede desarrollarse en una columna la cual emplea generalmente partículas muy pequeñas y una presión de entrada relativamente alta, denominándose entonces cromatografía líquida de alta eficacia o de alta presión, cuyas siglas provenientes del inglés son HPLC (Scott, 1992).

1.12.3. Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases (CG) es una técnica de separación en donde los componentes o moléculas solutos de una mezcla son transportados por una fase móvil gaseosa, a través de una fase estacionaria, siendo separados de acuerdo a su volatilidad y polaridad. Esta es una técnica de alta resolución, rápida, sensible y sencilla, que permite estimar de forma cualitativa la complejidad de una mezcla de metabolitos. El objetivo de esta técnica es determinar los componentes de una mezcla, mediante su separación en una columna de gases y detectores de diferentes tipos. Cuando el cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM), entonces cada metabolito detectado es ionizado, forma fragmentos con cargas eléctricas separados de acuerdo a su masa (m/z). Los patrones de fragmentación se comparan con los registrados en la base de datos del equipo para su identificación. Estos componentes pueden ser utilizados como marcadores en diversos estudios de monitoreo. Con esta técnica (CG-EM) es posible realizar la separación e identificación química de una muestra compleja (Polo, 2015).

1.13. Bioprospección

La bioprospección es definida como la búsqueda sistemática de componentes naturales (plantas, microorganismos, enzimas, genes, y otros) y organismos completos de la biodiversidad para identificar alguna aplicación en beneficio de la sociedad y pro consiguiente otorgarles un valor comercial para el desarrollo de productos. La bioprospección genera productos que tienen relación con industrias como la farmacéutica, la biotecnológica, la de agroinsumos y la de fitomedicamentos (uso de plantas para curar diversas enfermedades); entre otras; calculándose que en la actualidad una cuarta parte de los productos farmacéuticos son derivados de vegetales (Kanchiswamy, *et al.*, 2015; (Libreros *et al.*, 2013).

1.14. Especies vegetales a evaluar contra patógenos del chile habanero

Un total de 15 plantas nativas colectadas de la selva mediana del Jahuactal, Quintana Roo se describen a continuación, las cuales se evaluaron contra hongos patógenos poscosecha de *Capsicum* spp. Éstas incluyen a *Annona primigenia*, *Byrsonima bucidaefolia*, *Cameraria latifolia*, *Croton arboreus*, *Croton itzaeus*, *Erythroxylum confusum*, *Guettarda combsii*, *Heteropterys laurifolia*, *Licaria* sp., *Morella cerifera*, *Mosannonna depressa*, *Parathesis cubana*, *Psychotria* sp., *Simarouba amara*, *Stenmadenia donnell-smithii*. La taxonomía, así como los reportes de antecedentes biológicos y fitoquímicos de cada una de las especies estudiadas se describen a continuación.

1.14.1. *Annona primigenia* Standl. & Steyerm

Cuadro 1.2 Información taxonómica de *Annona primigenia* Standl. & Steyerm.

<p>Clasificación taxonómica</p> <p>División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Magnoliales Familia: Annonaceae Género: <i>Annona</i> Especie: <i>A. primigenia</i></p>	
--	--

Sinónimo *Annona reticulata* L. var *primigenia* (Standl & Steyerm.) Lundell.

Especie de árbol frutal tropical 4-15 m de altura, con flor perteneciente a la familia de las anonáceas. Posee una fruta comestible muy parecida a la chirimoya. La fruta es considerada como analéptica y antiescorbútica. El polvo de las semillas es un recurso para la enterocolitis. La raíz es astringente y tónico. Las semillas son astringentes, se han usado en casos de diarrea y disentería. El núcleo de la semilla es altamente venenoso y las raíces contienen también un veneno mortal. Se usan el fruto, las semillas y la corteza (https://www.ecured.cu/Anon_rojo). Antioxidante, efector inhibidor de *Bacillus subtilis*, antibacteriano con *E. coli* y antifúngico contra *Candida blanki* (Jamkhande *et al.*, 2016). Bioplaguicida contra *Helicoverpa armigera*. Acetogeninas, flavonoides y antraquinonoas se han reportado de esta especie (Souza *et al.*, 2017).

1.14.2. *Byrsonima bucidaefolia* Standl.

Cuadro 1.3 Información taxonómica de *Byrsonima bucidaefolia* Standl.

<p>Clasificación taxonómica</p> <p>División: Tracheophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Malpighiales Familia: Malpighiaceae Género: <i>Byrsonima</i> Especie: <i>B. bucidaefolia</i></p>	
--	--

Es un árbol tropical, distribuido ampliamente en México, Centro y Sudamérica, conocido como grosella, nance agrio, nance blanco y nance de monte. Arbol pequeño y torcido o arbusto perennifolio (caducifolio en bosques secos), de 3 a 7 m (hasta 15m) de altura con un diámetro de hasta 30 cm. El fruto es comestible y amarillo brillante cuando madurado; Tiene sabor dulce y regusto ligeramente amargo. En México, la fruta se consume como jugo, licor, jalea y caramelo. Desde épocas prehispánicas se ha utilizado como Medicina en el tratamiento de diversas enfermedades (Arellano *et al.*, 2003).

Las actividades biológicas reportadas son como antioxidante, antibacteriano, espasmogénico, anti-inflamatorio, leishmanicida, tripanocida e hipoglucémico (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007; Castillo-Avila *et al.*, 2009). Los estudios fitoquímicos indican que *B. bucidaefolia* contienen ésteres, epicatequinas, glicolípidos, alcaloides y saponinas (Fernández de Córdoba *et al.*, 1995).

1.14.3. *Cameraria latifolia* L.

Cuadro 1.4 Información taxonómica de *Cameraria latifolia* L.

<p>Clasificación taxonómica División: Tracheophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Gentianales Familia: Apocynaceae Género: <i>Cameraria</i> Especie: <i>C. latifolia</i></p>	
--	--

Conocido como *cheecheen blanco*. Son arbustos bajos muy ramificados o árboles pequeños que alcanzan un tamaño de hasta 8 m de altura, usualmente con látex blanco acre. Los miembros del género son bien conocidos por su látex extremadamente irritante y venenoso. La mayoría de sus integrantes están provistos de laticíferos constituidos por células individuales o ramificadas que producen látex lechoso, rojizo o transparente, el cual contiene glucósidos y alcaloides que pueden ser muy tóxicos (Arellano *et al.*, 2003).

El único reporte de actividad biológica de esta especie es la presencia de los metabolitos de camerarialdehído y diepiolivil, el primero con actividad citotóxica (Ren *et al.*, 2013).

1.14.4. *Croton arboreus* Millsp.

Cuadro 1.5 Información taxonómica de *Croton arboreus* Millsp.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Euphorbiales Familia: Euphorbiaceae Género: <i>Croton</i> Especie: <i>C. arboreus</i></p>	
--	--

Árbol endémico de México, conocido como cascarillo, *pak che'*, *p'e'es k'uuch* o *xpáay che'*, reportado con actividad antiinflamatoria. Los sesquiterpenos, 5 α , 7 α , 10 β -H-3-patchoulen-2-ona, 5 α , 7 α , 10 β -H-4(14)-patchoulen-2 α -ol y 9 α , 10 β -dihidroxi-2 β , 4 β -peroxi-1 α , 5 β , 7 α -H-guaiano han sido reportados de esta especie (Aguilar, 2004).

1.14.5. *Croton itzaeus* Lundell.

Cuadro 1.6 Información taxonómica de *Croton itzaeus* L.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Euphorbiales Familia: Euphorbiaceae Género: <i>Croton</i> Especie: <i>C. itzaeus</i></p>	
---	--

Arbusto endémico de la Península de Yucatán. No se encontró información de actividad biológica ni fitoquímica.

1.14.6. *Erythroxylum confusum* Britton

Cuadro 1.7 Información taxonómica de *Erythroxylum confusum* Britton.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Malpighiales Familia: Erythroxylaceae Género: <i>Erythroxylum</i> Especie: <i>E. confusum</i></p>	
--	--

Conocido como cascarillo, árbol de 4-12 m, el cual es utilizado por sus propiedades etnomédicas relacionadas con procesos virales, principalmente para la bronquitis, afecciones respiratorias, antivirales y estimulantes del sistema nervioso central. Se le considera citotóxica (González-Lavaut *et al.*, 2008; Martínez-Harmaza *et al.*, 2006). Los reportes indican la presencia de cocaína y flavonoides (Bieri *et al.*, 2006; González-Guevara *et al.* 2006).

1.14.7. *Guettarda combisii* Urb.

Cuadro 1.8 Información taxonómica de *Guettarda combisii* Urb.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Gentianales Familia: Rubiaceae Género: <i>Guettarda</i> Especie: <i>G. combisii</i></p>	
--	--

Conocido como manzanillo, es un árbol de hoja perenne con una corona abierta o extendida, de 3 a 10 m de altura, conocido como manzanillo y como *Guettarda scabra*, su uso

es maderable. (<http://www.tropicos.org/name/27905996?projectid=7>). No se encontraron reportes de actividad biológica ni fitoquímicos de *G. combisii*.

1.14.8 *Heteropterys laurifolia* (L.) Juss

Cuadro 1.9 Información taxonómica de *Heteropterys laurifolia* (L.) Juss.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Malpighiales Familia: Malpighiaceae Género: <i>Heteropterys</i> Especie: <i>H. laurifolia</i></p>	
--	--

Conocido como *chillillo aak'* o bejuco de miel. Bejuco o arbusto escandente, leñoso, voluble que alcanza hasta 8 metros de largo. También llamado “bejuco de miel”, nativa de México al oeste de Sudamérica y en las Antillas. Sus tallos son utilizados como cuerda (http://floraerverde.catec.upr.edu/especie_info.php?id=245). No se encontraron estudios fitoquímicos.

1.14.9. *Licaria* sp.

Cuadro 1.10 Información taxonómica de *Licaria* sp.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Laurales Familia: Lauraceae Género: <i>Licaria</i> Especie: No identificada</p>	
--	--

Licaria es un género botánico de plantas de la familia Lauraceae, endémica de Centroamérica y de Sudamérica. (Lorea-Hernández, 2005). En Yucatán se reportan dos

especies *Licaria campechiana* (Standl.) Kosterm. y *Licaria pecki* (Fernández-Carnevali et al, 2009). No existen reportes biológicos ni fitoquímicos para estas dos especies mencionadas.

1.14.10. *Morella cerifera* (L.) Small

Cuadro 1.11 Información taxonómica de *Morella cerifera* (L) Small.

<p>Clasificación taxonómica Phylum: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Myricales Familia: Myricaceae Género: <i>Morella</i> Especie: <i>M. cerifera</i></p>	 <p>©2008 Will Cook</p>
---	---

Conocida comúnmente como arrayán o arbusto de sebo. Esta especie se presenta en dos formas, en áreas secas y arenosas son como arbustos, tienen rizomas y hojas más pequeñas. Los que crecen en situaciones más húmedas con suelos más ricos en *humus*, son más parecidos a árboles con hojas más grandes. Los usos medicinales de *Morella cerifera* son como antibacteriano, astringente, emético, estimulante, estornutatorio, narcótico y tónico general (<http://www.arbolesornamentales.es/Myricacerifera.htm>). En Guatemala, Santizo (2004) realizó un estudio fitoquímico de *Morella cerifera* (*Myrica cerifera*).

1.14.11. *Mosannonna depressa* (Baill.) Chatrou

Cuadro 1.12. Información taxonómica de *Mosannonna depressa* (Baill.) Chatrou.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Magnoliales Familia: Annonaceae Género: <i>Mosannonna</i> Especie: <i>M. depressa</i></p>	
--	--

Basónimo: *Annona depressa*, *Malmea depressa*. Sinónimo: *Guatteria gaumeri*, *Malmea gaumeri*. Árboles de hasta 15 m de alto. Actividad biológica reportada: hipoglucemiante (Ankli, 2000), antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Fusarium oxysporum* (Jimenez-Arellanes *et al.*, 1996), antimicrobiana y citotóxica (Gutiérrez-Lugo, 1996), hipolipidémico (Chamorro *et al.*, 1999), antidepresivo, ansiolítico, antiepiléptico, antitrombótico y anticancerígeno (Chellian, 2017), propiedades antioxidantes y varios metabolitos han sido reportados de *M. depressa*, siendo el mayoritario la β -asarona (Asha *et al.*, 2014) y la guategaumerina (Chamorro, *et al.*, 1999).

1.14.12. *Parathesis cubana* (A.DC.) Molinet & M. Gómez

Cuadro 1.13 Información taxonómica de *Parathesis cubana* (A.DC) Molinet & Gómez

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Ericales Familia: Primulaceae Género: <i>Parathesis</i> Especie: <i>P. cubana</i></p>	
--	--

Son árboles o arbustos de hasta 15 m con frutos globosos, conocido también como *Ardisia cubana* A. DC. No se encontraron estudios fitoquímicos ni biológicos de *Parathesis cubana*.

1.14.13. *Psychotria* sp.

Cuadro 1.14 Información taxonómica de *Psychotria* sp.

<p>Clasificación taxonómica Orden: Gentianales Familia: Rubiaceae Tribu: Psychotrieae Género: <i>Psychotria</i> Especie: No identificada</p>	
--	--

Conocidas más de 1,000 especies neotropicales, y en la Península de Yucatán se tienen registros de *Psychotria aguilarii*, *P. costivenia*, *P. erythrocarpa*, *P. fruticetorum*, *P. graciliflora*, *P. horizontalis*, *P. nervosa*, *P. pubescens*, *P. quinqueradiata* y *P. tenuifolia* (Herbario CICY). Para el género *Psychotria*, se ha reportado que es analgésico, antioxidante, antiparasitario y citotóxico (Carvalho *et al.*, 2017).

1.14.14. *Simarouba amara* Aubl.

Cuadro 1.15 Información taxonómica de *Simarouba amara* Aubl.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Familia: Simaroubaceae Género: <i>Simarouba</i> Especie: <i>S. amara</i></p>	
---	--

Conocida como negrito, aceituna, pasaque o zapatero. Son árboles o arbustos, que alcanzan un tamaño de 3-30 metros de alto. *Simarouba amara* presenta propiedades amebicida, analgésica, antihelmíntica, antimicrobiana, vermífuga, febrífuga, estomáquica, sudorífica, tónica y citotóxica. La corteza contiene el alcaloide causina y de las semillas se ha aislado glaucarubinona (Benavides, 1994; Gaudemer y Polonsky, 1965; Joshi y Joshi, 2007).

1.14.15. *Stenmadenia donnell-smithii* (Rose) Woodson.

Cuadro 1.16 Información taxonómica de *Stenmadenia donnell-smithii* (Rose) Woodson.

<p>Clasificación taxonómica División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Gentianales Familia: Apocynaceae Género: <i>Stenmadenia</i> Especie: <i>S. donnell-smithii</i></p>	
---	---

Conocido como pie de chiva, es un árbol de hasta 20 m de altura, con la corteza lisa y con abundante jugo blanco pegajoso. Las hojas son alargadas y puntiagudas, de color verde oscuro, brillante en el envés. Las flores son amarillas y solitarias. Los frutos son carnosos, tienen numerosas semillas con una parte roja o naranja. Es originario de México y Guatemala. Se usa en tratar mordeduras de la "araña de caballo" (USDA, 2017). Esta especie produce alcaloides (Walls *et al.*, 1958). En la corteza del tronco se han detectado los esteroides β - y γ -sitosterol y el triterpeno pseudotaraxasterol; y en el fruto, los triterpenos taraxasterol y pseudotaraxasterol (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7162>).

HIPÓTESIS

Extractos vegetales obtenidos de plantas nativas de la Península de Yucatán tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan a *Capsicum* spp.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* las propiedades antifúngicas de extractos obtenidos de 15 plantas nativas de la Península de Yucatán contra fitopatógenos aislados de frutos poscosecha de *Capsicum* spp.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los extractos etanólicos y acuosos de 15 especies nativas de la península de Yucatán contra los hongos *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum truncatum* y *Penicillium oxalicum*.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos activos.
3. Analizar los perfiles químicos de los extractos más activos utilizando CCF, CG-EM y HPLC.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

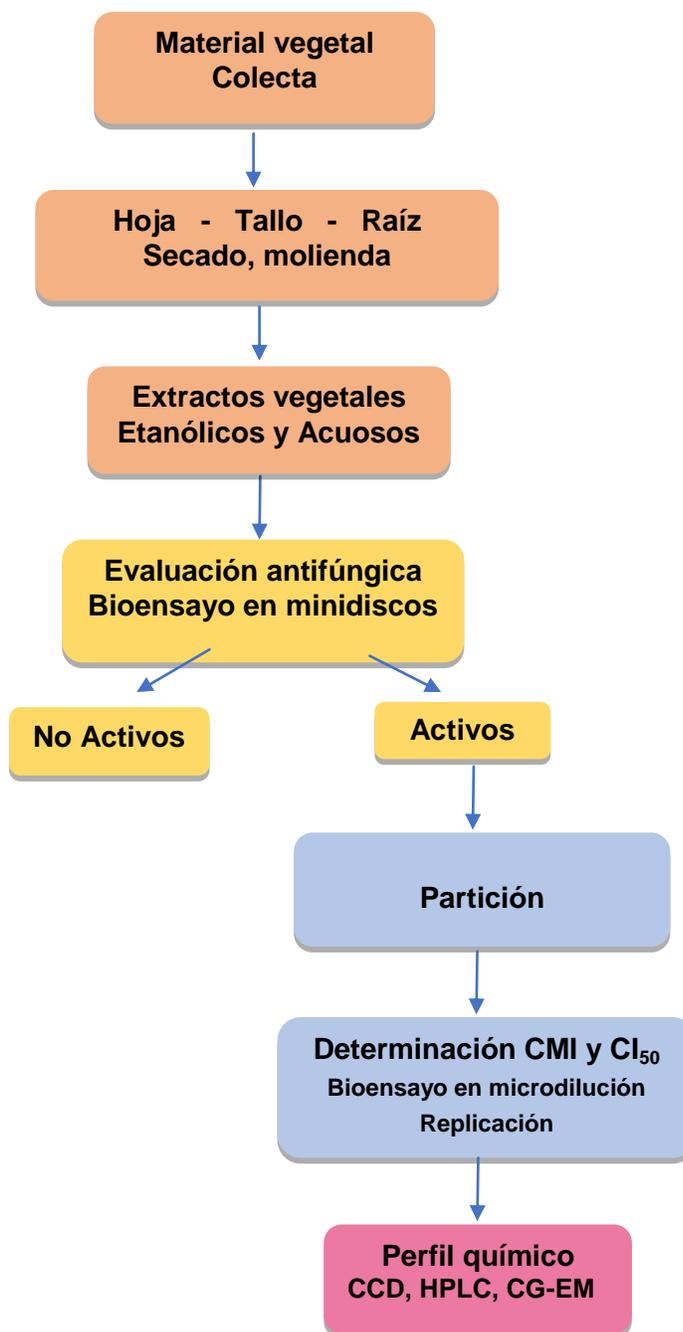


Figura 1.7 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los disolventes utilizados en el trabajo para las extracciones fueron grado industrial, los cuales se destilaron en el laboratorio. Para los análisis cromatográficos se utilizaron disolventes grado reactivo y grado cromatografía de líquidos. El trabajo microbiológico se realizó en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar vertical. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave eléctrica a 121 °C y 15 lb de presión por 20 min.

2.1. Colecta del material vegetal

Las plantas se colectaron en el Ejido Caobas, Municipio de Jahuactal al suroeste del estado de Quintana Roo. Con una latitud de 18°45"N y longitud 88°57"W. Un ejemplar de cada especie se depositó en el herbario *U Najil Tikin Xiw* ("La Casa de la Hierba Seca") del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (Cuadro 2.1).

2.2. Procesamiento del material vegetal

Cada una de las 15 especies se separaron en hoja, tallo y raíz, y se secaron en una cámara de lámparas a aproximadamente 50-60 °C. Los tallos y raíces delgadas se limpiaron con una brocha pequeña y se descortezaron. Posteriormente, se trituraron en un molino (marca Pagani) con cribas de 5 mm. Las hojas se trituraron de manera manual (Figura 2.1).



Figura 2.1 Procesamiento del material vegetal colectado a) separación, b) secado y c) molienda.

Cuadro 2.1 Información general de las especies vegetales colectadas en Jahuactal, Ejido Caobas, Quintana Roo.

ESPECIE VEGETAL	FAMILIA	PESO SECO (g)			VOUCHER	COLECTA
		HOJA	TALLO	RAIZ		
<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerl.	Annonaceae	140	900	NC	GC-8057	jun-17
<i>Byrsonima bucidaefolia</i> Standl.	Malpighiaceae	173	525	335.3	GC-8087	dic-16
<i>Cameraria latifolia</i> L.	Apocynaceae	187.4	638	676.2	JLTapia-1165	dic-16
<i>Croton arboreus</i> Millsp.	Euphorbiaceae	124.2	198.5	275.5	JLTapia-1132	dic-16
<i>Croton itzaeus</i> Lundell	Euphorbiaceae	120	171.5	99.7	JLTapia-1138	dic-16
<i>Erythroxylum confusum</i> Britton.	Erythroxylaceae	340.4	335.6	997.5	JLTapia-1143	dic-16
<i>Guettarda combsii</i> Urb.	Rubiaceae	660	800	275	GC-8047	jun-17
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) A. Juss.	Malpighiaceae	117.8	302.2	227.7	GC-8035	dic-16
<i>Licaria</i> sp.	Lauraceae	200	140	67	GC-8037 y 8072	jun-17
<i>Morella cerifera</i> (L.) Small.	Myricaceae	672.7	602.2	507.4	JLTapia-1137	dic-16
<i>Mosannonna depressa</i> (Baill.) Chatrou	Annonaceae	200	715	70	GC-8085	jun-17
<i>Parathesis cubana</i> (A. DC.) Mollinet & M. Gómez.	Primulaceae	426.1	806.4	599.8	JLTapia-1133	dic-16
<i>Psychotria</i> sp.*	Rubiaceae	178	-	-	GC-8086	jun-17
<i>Simarouba amara</i> Aubl.	Simaroubaceae	300	600	117	GC-8081	jun-17
<i>Stenmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Wodson.	Apocynaceae	180	520	NC	GC-8056	jun-17

*Planta completa NC: No colectada

2.3 Preparación de Extractos

2.3.1 Extractos etanólicos

Para la obtención de los extractos etanólicos crudos (EE), el material vegetal seco y molido de cada una de las partes (hoja, tallo y raíz) de las 15 especies (Cuadro 2.2), se mezclaron por separado con etanol, y se extrajeron por sonicación (frecuencia de 20 KHz, Cole-Parmer), por 20 min en tres ocasiones sucesivas. Posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotaevaporador (Ika ® RV10) con el baño a 40 °C y posteriormente se eliminaron los restos de disolvente a temperatura ambiente. Los EE crudos obtenidos, se transfieren a viales previamente tarados, se obtuvo el peso del extracto seco y posteriormente se determinó el porcentaje de rendimiento de cada uno de ellos con base en el material seco y molido. En total se obtuvieron 41 EE los cuales se almacenaron a -17.5 ± 0.5 °C en un congelador hasta su uso en los bioensayos.



Figura 2.2 Extractos etanólicos de las especies obtenidos por sonicación.

2.3.2 Extractos acuosos

Los extractos acuosos (EA), se prepararon a la concentración del 6% (peso/volumen). Una cantidad de 1.5 g de material vegetal seco y molido se adicionaron a 20 mL de agua destilada en ebullición durante 5 min, aproximadamente. La mezcla fría se filtra a través de gasa y algodón y se aforó a 25 mL. Los EA se almacenan a

congelación a -17.5 ± 0.5 °C para su posterior utilización en los bioensayos. Una alícuota de 5 mL se seca por liofilización (Labconco, Modelo Free Zone 2.5) para determinar el rendimiento del sólido extraído. En total se obtuvieron 41 EA.

Cuadro 2.2 Material vegetal seco y molido de cada parte separada de las especies colectadas.

ESPECIE	Material seco y molido (g)		
	Hoja	Tallo	Raíz
<i>Annona primigenia</i>	50	200	NE
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	100	150	150
<i>Cameraria latifolia</i>	100	100	200
<i>Croton arboreus</i>	80	50	100
<i>Croton itzaeus</i>	80	30	40
<i>Erythroxylum confusum</i>	100	150	200
<i>Guettarda combsii</i>	200	200	100
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) Juss	80	50	80
<i>Licaria</i> sp.	80	50	30
<i>Morella cerifera</i>	100	200	80
<i>Mosannonna depressa</i>	100	200	30
<i>Parathesis cubana</i>	100	100	100
<i>Psychotria</i> sp.*	80		
<i>Simarouba amara</i>	100	200	50
<i>Stenmadenia donnell-smithii</i>	50	200	NE

*Planta completa (hoja, tallo y raíz) NE: No elaborado



Figura 2.3 Obtención de extractos acuosos.

2.4. Reactivación y conservación de cepas *Capsicum* spp.

Los hongos fitopatógenos (Cuadro 2.3) fueron proporcionados del cepario del Laboratorio de Fitopatología, perteneciente al Tecnológico Nacional de México campus Conkal, los cuales se aislaron de lesiones de chile habanero (1), chile dulce (2,3,4) y chile *xkat'ik* (5). Estos se identificaron por su macro y micromorfología, así como por métodos moleculares (Hoil, 2016).

Cuadro 2.3 Información general de los hongos fitopatógenos aislados de frutos del género *Capsicum* spp. en estudio (Hoil Cocom, 2016).

	Especie fúngica	No. GenBank	Crecimiento* (días)	Hospedero
1	<i>Penicillium oxalicum</i> Currie, J.N.; Thom, C.	KP868627	7	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.
2	<i>Alternaria brassicicola</i> (Schwein.) Wiltshire	KF542552	7	Chile dulce
3	<i>Colletotrichum capsicum</i> (Syd.) E.J. Butler & Bisby	HM562706	7	Chile dulce
4	<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus & W.D. Moore	FJ172230	7	Chile dulce
5	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	KU84433	7	<i>Capsicum annuum</i> L

*Temperatura ambiente, con 12:12 horas luz:oscuridad

Las cepas fitopatógenas se reactivaron en cajas Petri conteniendo medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron por una semana, bajo temperatura ambiente y posteriormente con ayuda de un sacabocado se obtienen discos miceliares de aproximadamente 5 mm que se transfirieron para su conservación en a) tubo inclinado con PDA, b) agua destilada estéril y c) glicerol al 20%. Todos se mantuvieron a temperatura ambiente y después de siete días de crecimiento se resguardaron a 4 °C aproximadamente, para su posterior uso.

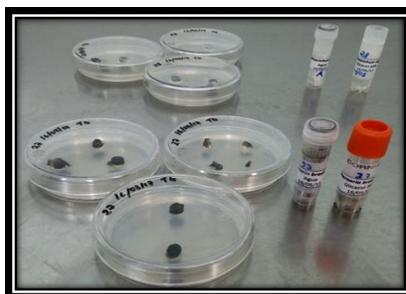


Figura 2.4 Cajas Petri y tubos de cultivo padre inculados con cepas fitopatógenas para su reactivación y conservación.

2.5. Bioensayos antifúngicos

2.5.1. Técnica del bioensayo en minidisco de agar-extracto

El monitoreo inicial se realizó con la técnica de minidisco de agar-extracto utilizando la técnica de UK Patent Application GB 2396349 (Boehlendorf *et al.*, 2004) modificada en el grupo de trabajo.

2.5.2. Preparación de medio PDA más extracto etanólico vegetal

El medio PDA de marca BD Bioxon se hidrato (10.14 g) con agua destilada (260 mL) en un matraz Erlenmeyer y se esterilizan en autoclave a 121 °C, durante 20 min. Cada EE (40 mg) se disolvió en 400 µL de DMSO-Tween 20 al 0.5%, y se mezclaron homogéneamente con 20 mL de medio PDA estéril caliente (aprox. a 50 °C) y se transfirieron a dos cajas Petri de 5 cm de diámetro (10 mL en cada caja). Después de 24 h a temperatura ambiente, se verificó su esterilidad para ser utilizados en el ensayo. Este proceso se realizó para todos los EE. La concentración final de la mezcla EE-PDA fue de 2 mg·mL⁻¹. Como control negativo se prepararon medio PDA con la mezcla de disolventes utilizados con los EE, como control positivo se utilizó Procloraz al 3%.

2.5.3. Preparación de medio PDA con extractos acuosos

Cada extracto acuoso (10 mL al 6%) se esterilizó a través de un filtro Millipore de 0.22 µm estéril. Este EA estéril se mezcla con medio PDA (10 mL) recién esterilizado y enfriado a aproximadamente 50 °C en baño María. Esta mezcla se transfiere a dos cajas Petri de 5 cm de diámetro (10 mL en cada caja). Al igual que los EE, permanecieron 24 horas en prueba de esterilidad. La concentración final del EA-PDA fue de 3%.

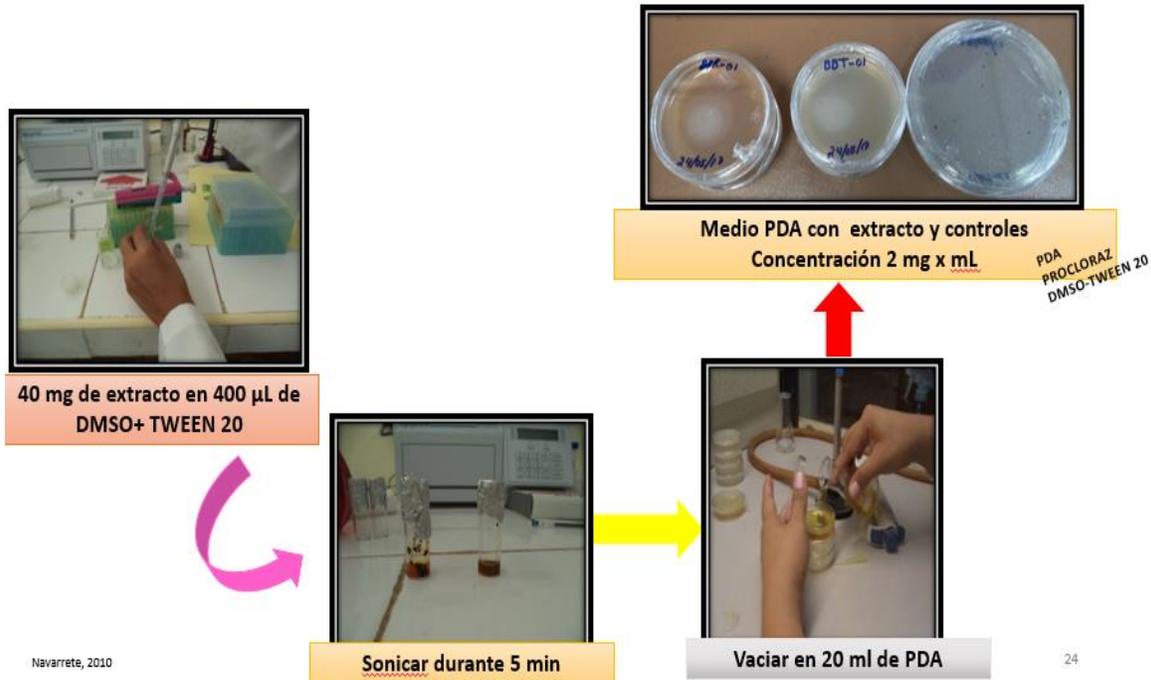


Figura 2.5 Preparación de medio PDA con los extractos etanólicos.

2.5.4. Preparación de suspensión de esporas de *Penicillium oxalicum*

Agua destilada estéril (5 mL) se adicionó en la superficie micelial del fitopatógeno contenido en una caja Petri y se raspó suavemente con un portaobjeto estéril. La suspensión de conidios se recuperó y se filtró a través de gasas estériles. Esta suspensión se diluyó hasta una concentración final de aproximadamente 1×10^5 esporas·mL⁻¹. Para esto, una alícuota (10 µL) de esta suspensión de conidios o suspensión madre se vertieron en cada extremo de la cámara de Neubauer para el conteo de esporas. Generalmente, para este patógeno los conidios son abundantes, por lo que se realizaron diluciones, en este caso fue de 1:50, y posteriormente 1:10 para ajustar a la concentración indicada.

La fórmula que se utilizó para el conteo de esporas fue la siguiente:

$$\text{No. de esporas / mL} = \frac{\Sigma \text{ esporas (1000) (dilución)}}{0.1}$$

2.5.5. Preparación de propágulos de *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsicum* y *Colletotrichum truncatum*

Para los hongos que no esporularon se preparó una suspensión de propágulos. Para esto, en la superficie de la caja Petri que contiene el hongo fitopatógeno se le adicionaron 5 mL de agua destilada estéril. Con la ayuda de un portaobjeto estéril se raspó suavemente la superficie y la suspensión de propágulos se filtró a través de doble tela de gasa estéril para eliminar residuos de agar y masas gruesas de micelio.

2.5.6. Ensayo antifúngico con minidisco de agar

Con la ayuda de un sacabocado estéril se extrajeron discos de 0.5 mm diámetro de la muestra (extracto en agar) y se transfirieron a cajas Petri de tres divisiones. Inmediatamente cada disco se inoculó con la suspensión de conidios-propagulos (10 μ L) del fitopatógeno en ensayo (Boehlendorf *et al.*, 2004). Este procedimiento se realizó con todass las muestras vegetales de EE-agar y EA-agar. Los controles negativos incluyeron minidiscos de PDA y PDA-DMSO-Tween 20 al 0.05%, el positivo PDA-Procloraz al 3% en agar. Un total de cinco réplicas se realizaron con cada muestra. Las cajas Petri conteniendo las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, 12:12 horas de luz oscuridad. La lectura se realizó con los discos inoculados a las 48 h documentando crecimiento o inhibición del hongo (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Parámetros de lectura para el ensayo antifúngico con minidiscos de agar-extracto.

Crecimiento micelial (mm.disco)	Lectura	ICM (%)
0	Inhibición total (++)	100
2.5	Inhibición parcial (+)	50
5	Crecimiento micelial (-)	0



Figura 2.6. Bioensayo en minidisco de agar con extractos de *Mosannona depressa* contra *Penicillium oxalicum*.

2.5.7. Partición del extracto etanólico

El extracto etanólico (500 mg) de la hoja, corteza y raíz de *M. depressa* y *Licaria* sp. se resuspendieron en acetonitrilo y se extrajeron con hexano (3x, 2:1, 1:1, 1:1). Los disolventes se eliminaron por evaporación a vacío, de esta forma se obtuvieron tres fracciones, (a) hexánica, (b) acetonitrilo y (c) un precipitado soluble en metanol.

2.5.8. Bioensayo de microdilución

Este ensayo se realizó con los extractos etanólicos y fracciones de partición de *M. depressa* y *Licaria* sp. (hoja, tallo y raíz). Cada muestra (10 mg) se disolvieron en 500 μL de DMSO + Tween 20 al 0.5% y se obtuvo una concentración de $20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Una alícuota (10 μL) de cada muestra de EE (200 μg) se transfirió al micropozo de la primera fila (A) de microplaca estéril de poliestireno con 96 pozos marca Sarstedt (No. 83.3924.500), a la cual se adicionan previamente 90 μL de medio RPMI 1640 (fila A). Finalmente, 100 μL de la suspensión de esporas del hongo a 1×10^5 esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$ a evaluar se adicionó a cada pozo, para hacer un volumen total de 200 μL de esta mezcla en cada pocillo, teniendo una concentración final de $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Posteriormente, en la segunda fila B se depositaron 190 μL de RPMI y 10 μL de la muestra ($20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). De esta mezcla una alícuota (100 μL) se transfirió a la tercera fila

que ya contenía 100 μL de medio RPMI y se realizó el mismo procedimiento hasta la cuarta fila. Finalmente, se adicionaron 100 μL de la suspensión del hongo en cada micropozo, para tener las concentraciones finales de 500, 250 y 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como control positivo se utilizó el fungicida comercial Procloraz (5 μL) + RPMI + suspensión de esporas; se emplearon cuatro controles negativos: a) medio RPMI 1640, b) la suspensión de esporas, c) el RPMI + DMSO al 0.5% y d) el blanco (suspensión de esporas, DMSO al 5% + RPMI).

La lectura se realizó a las 96 h de manera visual mediante la escala numérica recomendada por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002) (Cuadro 2.5). Primero se verificaron que los controles dieran el resultado esperado y posteriormente las muestras.

Al finalizar el ensayo, las muestras a 1,000, 500 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se replican en una caja Petri conteniendo PDA, y se observaron por una semana, para determinar si el efecto es fungicida o fungistático.

Cuadro 2.5 Escala numérica para las lecturas de inhibición del crecimiento fúngico en el bioensayo en microdilución (NCCLS, 2002).

Parámetro de lectura	Escala	ICM (%)
Completamente claro o Inhibición total del crecimiento micelial	0	100
Reducción del crecimiento micelial en un 75% comparado con el control negativo	1	75
Reducción del crecimiento micelial en un 50% comparado con el control negativo	2	50
Poca inhibición o tan sólo el 25% de crecimiento del control negativo	3	25
Crecimiento micelial abundante, igual con el control negativo	4	0

2.6. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11, realizándose un análisis de varianza y prueba de comparación de

medias (Tukey $P \leq 0.05$) y un análisis Probit con Statgraphics Centurion para realizar el análisis de la CI_{50} y CI_{95} .

2.7. Perfil cromatográfico

2.7.1. Cromatografía en placa delgada

Los análisis por cromatografía de capa delgada (CCD) se realizaron utilizando cromatofolios impregnados de gel de sílice G-60 de 0.25 mm de espesor con indicador fluorescente F_{254} . Los agentes reveladores usados en todos los casos fueron luz ultravioleta (UV_{254} y UV_{366}) y ácido fosfomolibdico. Tres diferentes sistemas de elución se emplearon: hexano-acetona (8:2), CH_2Cl_2 -AcOEt (9:1) y CH_2Cl_2 -MeOH (8:2).

2.7.2. Cromatografía líquida de alta eficacia

2.7.2.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se realizaron en un equipo Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity de bombas cuaternarias, con un detector de UV. Los disolventes se filtraron por discos Millipore 0.45 μm y se degasifican por sonicación 20 min. Las muestras se inyectaron (10 μL) a una concentración de 1 mL^{-1} en una columna Alltima C18 de 5 μm , diámetro de 4.6 mm y longitud de 250 mm. El análisis se realizó en gradiente de polaridad descendente con mezclas de metanol-agua (90:10) (5 min), metanol (100) (5 min), metanol-agua (90:10) (2 min), con un flujo de 1 mL/min . Las lecturas se realizaron a longitudes de onda de 210, 254, 280 y 330 nm. Los componentes se reportaron en tiempos de retención (t_R) en min.

2.7.3. Cromatografía de gases acoplado a espectrometro de masas

Los cromatogramas se obtuvieron en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N, con una columna HP-5MS (30 m \times 0.32 mm \times 1.00 μm) acoplado a un detector de masas selectivo Agilent Technologies 5975B (CG-EM). Las muestras se disolvieron en diclorometano o mezclas de diclorometano-metanol (1%) y se inyectaron en volúmenes de 5 μL . El método utilizado fue nombrado Acidmetilados: 100 $^{\circ}C$ (4 min), 10

°C (18 min), 280 °C (15 min), flujo de 1.2 mL/min, usando gas helio de ultra alta pureza, con un tiempo total de corrida de 37 min. Los componentes se reportaron en tiempos de retención (t_R) en min en el CG y por su patrón de fragmentación obtenido en el EM, los cuales se compararon con la base de datos NIST 05 MS Spectra 2006 del equipo para su identificación.

2.8. Metilación

En un matraz balón se depositó la muestra (20 mg) a metilar y se le adicionó 1 mL de metanol con ácido sulfúrico al 1% y se mantuvo en agitación 12 h a temperatura ambiente. Para recuperar las muestras, la mezcla se diluye en 10 mL de agua destilada. Con la ayuda de un embudo de separación, se extrajo el producto de reacción con acetato de etilo (2x, 2:1, 1:1). La fase orgánica se neutralizó con lavados de bicarbonato de sodio, y agua destilada. El exceso de agua se elimina con sulfato de sodio anhidro y se filtró a través de papel Whatman No. 1. El disolvente se eliminó a presión reducida hasta sequedad y los productos de la reacción se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Actividad antifúngica de extractos etanólicos

Entre los 42 EE evaluados contra los cinco hongos fitopatógenos del género *Capsicum* spp., únicamente los correspondientes a *Licaria* sp. y *M. depressa* mostraron efecto antifúngico. En ambas especies, la actividad se detectó en sus tres partes vegetales evaluadas (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Actividad antifúngica de los extractos etanólicos obtenidos de plantas de la Península de Yucatán contra hongos patógenos de *Capsicum* spp.

Especie	Inhibición del crecimiento micelial														
	P.o			A.b			C.c			C.t			A.a		
	H	T	R	H	T	R	H	T	R	H	T	R	H	T	R
<i>Annona primigenia</i>	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cameraria latifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Croton arboreus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Croton itzaeus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erythroxylum confusum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Guettarda combsii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Heteropterys laurifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Licaria</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Morella cerifera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mosannonna depressa</i>	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Parathesis cubana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychotria</i> sp.*	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE
<i>Simarouba amara</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenmadenia donnell-smithii</i>	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE
Control positivo Procloraz	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Control negativo PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Inhibición del crecimiento micelial: (-) = 0% (+) = 50% (++) = 100%

P.o = *Penicillium oxalicum* A.b = *Alternaria brassicicola* C.c = *Colletotrichum capsici*

C.t = *Colletotrichum truncatum* A.a = *Alternaria alternata*

Blanco: PDA+DMSO+Tween 20 al 0.5%

La única especie con la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de *P. oxalicum* a 2 mg·mL⁻¹ correspondió al extracto de la corteza de *M. depressa*. Este mismo extracto inhibió parcialmente a los otros cuatro hongos fitopatógenos (*Alternaria alternata*,

Alternaria brassicicola, *Colletotrichum truncatum* y *Colletotrichum capsici*). También se observó que los extractos de hoja, tallo y raíz de *Licaria* sp. inhibió parcialmente a los cinco hongos en evaluación. El control positivo Procloraz inhibió por completo el crecimiento de los cinco hongos. En los controles negativos se observó el crecimiento micelial en todo el diámetro del disco (5 mm) en todos los hongos, lo cual indicó que no afectan el crecimiento de los fitopatógenos.

3.2. Actividad antifúngica de extractos acuosos

Un total de siete extractos mostraron actividad antifúngica al 3% (p/v) contra los cinco hongos fitopatógenos (Cuadro 3.2). Estos incluyeron a los extractos de *Annona primigenia* (hoja), *Licaria* sp. (hoja), *M. depressa* (hoja, tallo y raíz), *Parathesis cubana* (hoja y tallo) y *Simarouba amara* (hoja y raíz).

Cuadro 3.2 Actividad antifúngica de los extractos acuosos de plantas de la Península de Yucatán contra hongos patógenos de *Capsicum* spp.

Especie	Inhibición del crecimiento micelial														
	P.o			A.b			C.c			C.t			A.a		
	H	T	R	H	T	R	H	T	R	H	T	R	H	T	R
<i>Annona primigenia</i>	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	+	NE	-	-	NE
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cameraria latifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Croton arboreus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Croton itzaeus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erythroxylum confusum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Guettarda combsii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Heteropterys laurifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Licaria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Morella cerifera</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mosannonna depressa</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Parathesis cubana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychotria</i> sp.*	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE	-	NE	NE
<i>Simarouba amara</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Stenmadenia donnell-smithii</i>	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	-	NE
Control positivo Procloraz	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Control negativo PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Inhibición del crecimiento micelial: (-) = 0% (+) = 50% (++) = 100%

P.o = *Penicillium oxalicum* **A.b** = *Alternaria brassicicola* **C.c** = *Colletotrichum capsici*

C.t = *Colletotrichum truncatum* **A.a** = *Alternaria alternata*

Blanco: PDA+DMSO+Tween 20 al 0.5%

El EA de la corteza de *M. depressa* inhibió por completo el crecimiento de *P. oxalicum* y la hoja de *S. amara* fue el único que inhibió parcialmente a los cinco fitopatógenos. Los tres extractos de *M. depressa* junto con los de *A. primigenia* (tallo), *Licaria* sp. (hoja) y *S. amara* (raíz) fueron parcialmente efectivos contra *C. truncatum*.

3.3. Concentración mínima inhibitoria de extractos activos

Los EE de hoja, corteza y raíz de *M. depressa* se partitionaron y las fracciones resultantes se evaluaron en diluciones seriadas contra *P. oxalicum* para determinar su CMI. Los resultados permitieron detectar que la CMI más baja con 250 µg·mL⁻¹, causada por la fracción de mediana polaridad de la corteza de *M. depressa*, con efecto fungicida. El efecto del EE, la fracción hexánica y el precipitado de la corteza presentaron una CMI de 1,000 µg·mL⁻¹, con efecto fungicida. Por otra parte, el EE y las tres fracciones de la raíz mostraron una CMI de 1,000 µg·mL⁻¹, mostrando efecto fungicida el EE y la fracción de acetonitrilo de la raíz (Cuadro 3.3, Figura 3.1).

Cuadro 3.3 Concentración mínima inhibitoria de extractos y fracciones de partición de *Mosannonna depressa* contra *Penicillium oxalicum*.

PARTE VEGETAL	EXTRACTO/FRACCIONES	CLAVE	CMI
Hoja	Extracto etanólico	MDH-01	>1000
	Fracción hexánica	MDH-01a	>1000
	Fracción acetonitrilo	MDH-01b	1000 ^a
	Precipitado	MDH-01c	>1000
Tallo	Extracto etanólico	MDT-01	1000 ^a
	Fracción hexánica	MDT-01a	1000 ^a
	Fracción acetonitrilo	MDT-01b	250 ^a
	Precipitado	MDT-01c	1000 ^b
Raíz	Extracto etanólico	MDR-01	1000 ^a
	Fracción hexánica	MDR-01a	1000 ^b
	Fracción acetonitrilo	MDR-01b	1000 ^a
	Precipitado	MDR-01c	1000 ^b
	Control negativo	-	>1000
	Control positivo	-	125 ^a

Control negativo: RPMI+Hongos

Control positivo: Procloraz+Hongos

^a: Fungicida

^b: Fungistático

Los extractos del tallo y raíz de *Licaria* sp. no fueron efectivos contra *P. oxalicum* (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4 Concentración mínima inhibitoria de extractos y fracciones de partición de *Licaria* sp. contra *Penicillium oxalicum*.

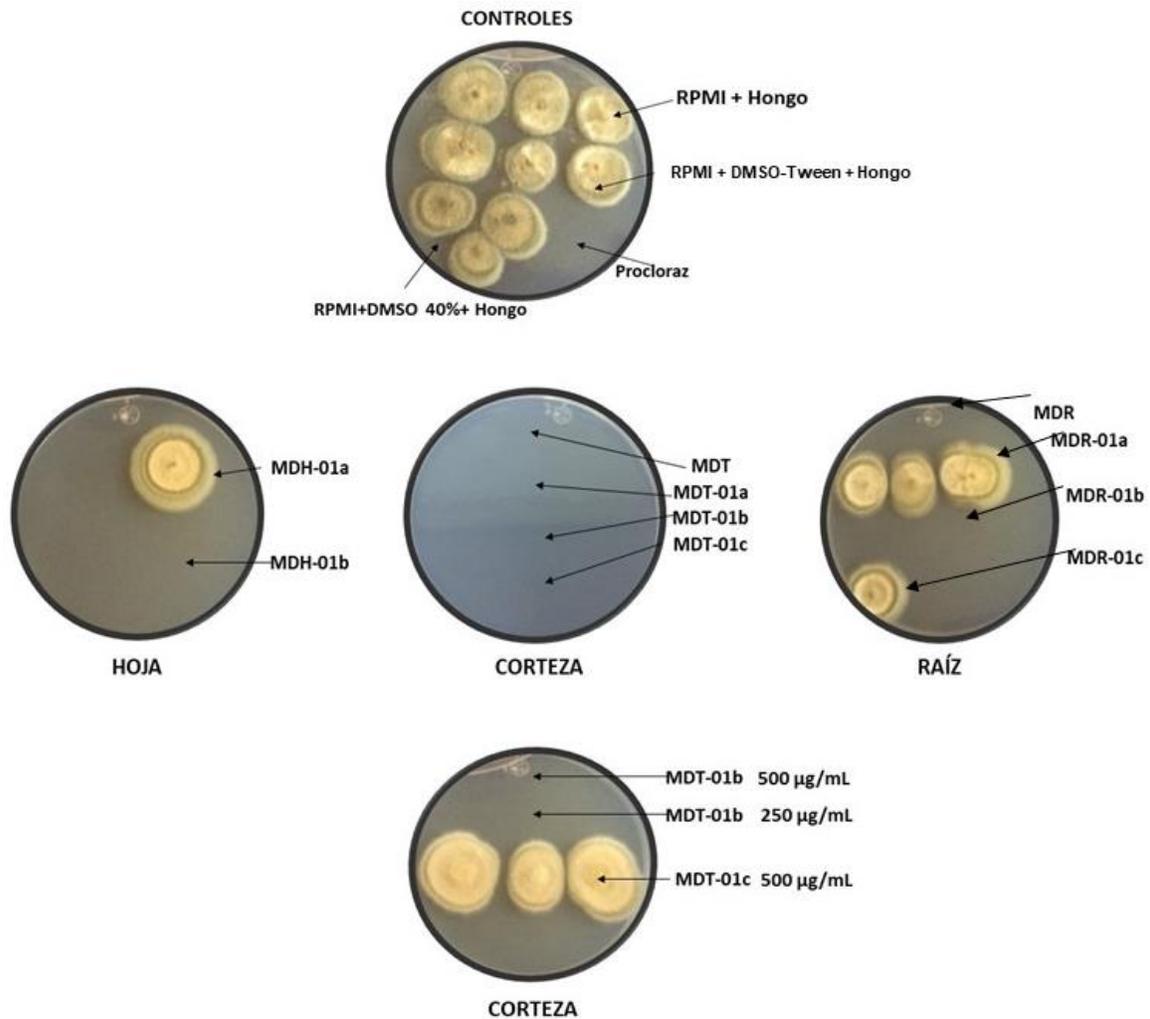
PARTE VEGETAL	EXTRACTO/FRACCIONES	CLAVE	CMI
Tallo	Extracto etanólico	LSPT-01	>1000
	Fracción hexánica	LSPT -01a	>1000
	Fracción acetonitrilo	LSPT -01b	>1000
	Precipitado	LSPT -01c	>1000
Raíz	Extracto etanólico	LSPR-01	>1000
	Fracción hexánica	LSPR-01a	>1000
	Fracción acetonitrilo	LSPR -01b	>1000
	Precipitado	LSPR -01c	>1000
	Control negativo	-	>1000
	Control positivo	-	125 ^a

Control negativo: RPMI+Hongos
 Control positivo: Procloraz+Hongos
^a: Fungicida

En todos los casos donde se observó inhibición total del fitopatógeno se llevaron a cabo las repeticiones con los EE y fracciones de partición con inhibición del 100% de *M. depressa* (Figura 3.1).

3.4. Concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{95}) de las fracciones de *M. depressa* contra *P. oxalicum*

Los resultados de la evaluación antifúngica de las diluciones seriadas de *M. depressa* indicaron que la concentración más efectiva correspondió a la fracción de mediana polaridad de la corteza, con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 141 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A éste le siguieron las fracciones de mayor polaridad de corteza (MDT-01c) y raíz (MDR-01c), con una CI_{50} de 292 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en ambos casos (curvas Probit en anexos).



MDH-01a: Fracción hexánica de hoja
 MDH-01b: Fracción de acetonitrilo de hoja
 MDT: Extracto de corteza de *M. depressa*
 MDT-01a: Fracción hexánica de la corteza
 MDT-01b: Fracción de acetonitrilo de corteza
 MDT-01c: Precipitado de la corteza
 MDR: Extracto de raíz de *M. depressa*
 MDR-01a: Fracción hexánica de raíz
 MDR-01b: Fracción de acetonitrilo de raíz
 MDR-01c: Precipitado de la raíz

Figura 3.1 Replicación de fracciones y extractos más activos de *Mosannona depressa*.

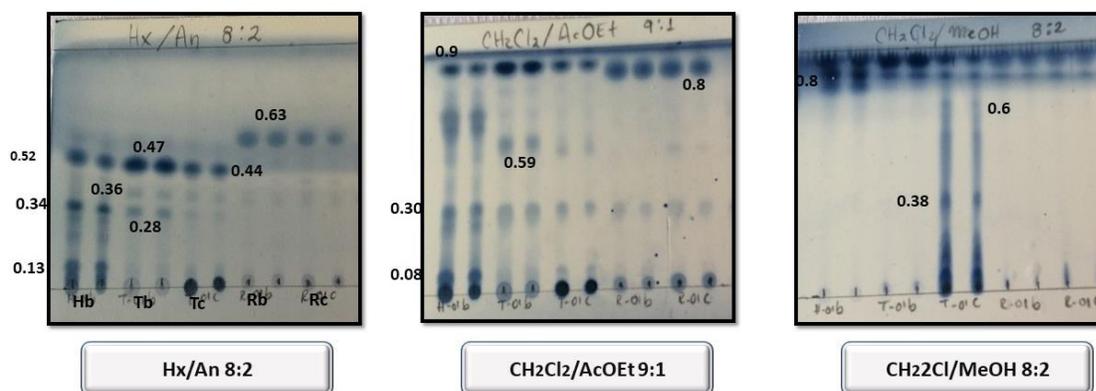
Cuadro 3.5 Determinación de las concentraciones inhibitoria 50 y 95 (CI₅₀ y CI₉₅) de extractos y fracciones de *Mosannonna depressa* contra *Penicillium oxalicum*.

Parte vegetal	Extracto/Fracción	CLAVE	µg/mL						
			1000	500	250	125	CE ₅₀	CE ₉₅	
Tallo	Etanólico	MDT	100	25	50	8.33	479	1031	
	Hexánico	MDT-01 a	100	25	50	25	461	1107	
	Acetonitrilo	MDT-01 b	100	100	100	25	141	181	
Raíz	precipitado	MDT-01 c	100	75	75	0	292	624	
	etanólico	MDR	100	75	25	0	388	632	
	precipitado	MDR-01 c	100	75	75	0	292	624	

3.5. Perfiles cromatográficos

3.5.1. Cromatografía de capa delgada

Las fracciones y precipitados que mostraron mayor efecto antifúngico contra *P. oxalicum* se analizaron por CCD.



Hb: Fracción de acetonitrilo Hoja
 Tb: Fracción de acetonitrilo Corteza
 Tc: Precipitado corteza
 Rb: Fracción de acetonitrilo Raíz
 Rc: Precipitado Raíz
 Hx : hexano
 An: acetona

Figura 3.2 Cromatogramas en capa delgada de fracciones activas de *Mosannonna depressa*.

Cuadro 3.6 Componentes observados por cromatografía en capa delgada del extracto y fracciones de *Mosannonna depressa*.

PARTE VEGETAL	CLAVE	SISTEMA ELUYENTE	R _f			
HOJA	Hb	Hexano-acetona 8:2	0.13			
			0.34			
			0.52			
			Diclorometano-acetato de etilo 9:1	0.08		
				0.28		
				0.30		
		Diclorometano-metanol 8:2	0.90			
			0.60			
			0.63			
			0.80			
			0.90			
			0.90			
TALLO	Tb	Hexano-acetona 8:2	0.28			
			0.36			
			0.47			
			Diclorometano-acetato de etilo 9:1	0.08		
				0.30		
				0.59		
		Diclorometano-metanol 8:2	0.70			
			0.90			
			0.90			
			RAÍZ	Rb	Hexano-acetona 8:2	0.44
						0.63
						Diclorometano-acetato de etilo 9:1
0.80						
Diclorometano-metanol 8:2	0.90					

3.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución

Las fracciones de mediana polaridad y precipitados que mostraron mayor efecto antifúngico contra *P. oxalicum* se analizaron por CLAR. Destaca el pico a t_R de 4.4 min que aparece como mayoritario en las fracciones de los dos cromatogramas de la hoja y corteza de *M. depressa*. En las fracciones de la raíz, se detecta el pico a t_R de 4.2 min que aparece como mayoritario en la fracción de acetonitrilo y a 254 nm, se observa el componente de t_R de 4.4 min. Esto indica que este componente es minoritario en la raíz.

En la fracción más polar de la raíz se detectan los picos a t_R de 1.8 y 2.4 min como los principales.

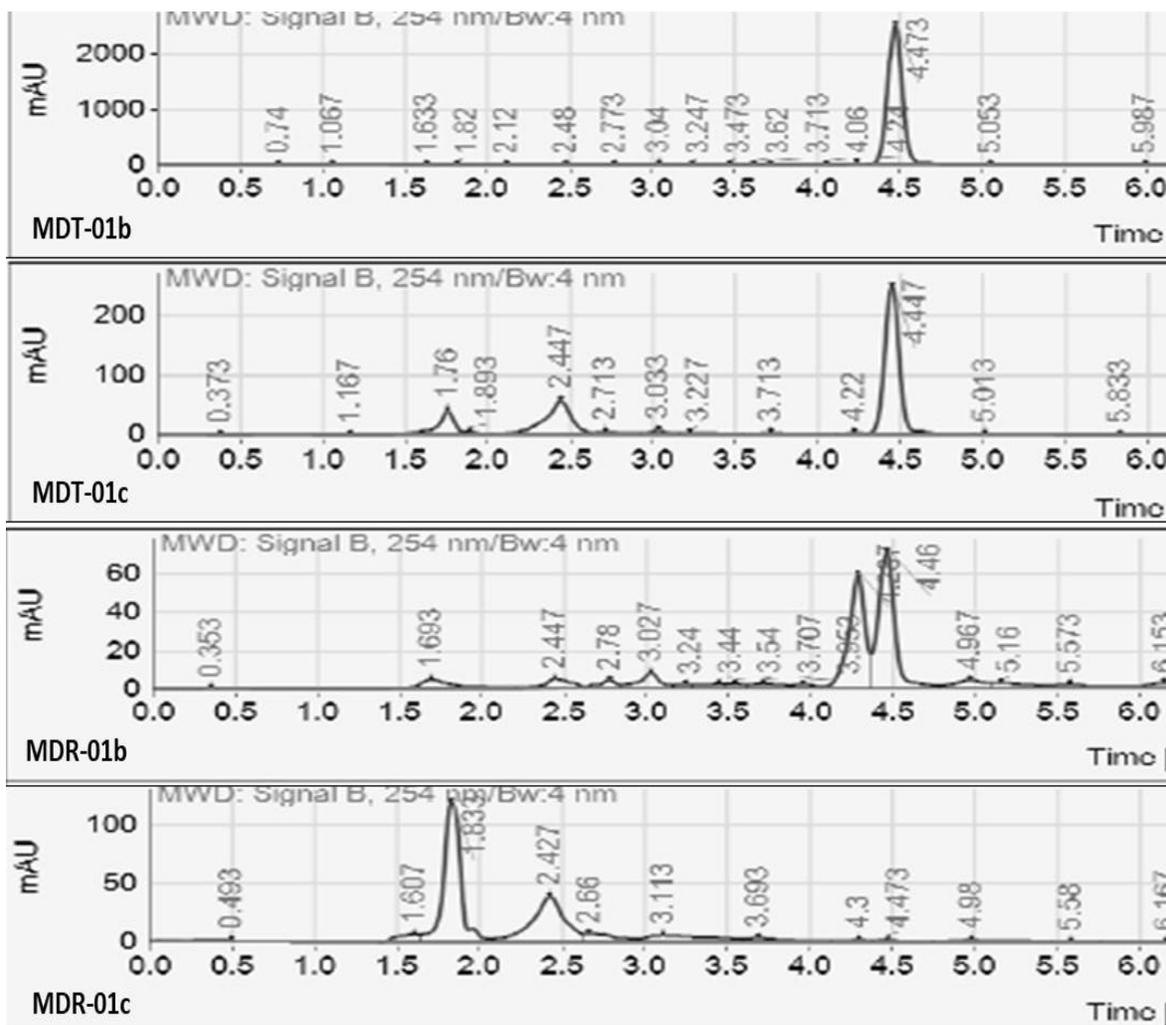


Figura 3.3 Cromatogramas de líquidos de las fracciones de a) MDT-01b, b) MDT-01c, c) MDR-01b y d) MDR-01c de *Mosannona depressa* a 254 nm, en una columna C18.

3.5.3. Cromatografía de Gases - espectrometría de masas

En el Cuadro 3.7 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las fracciones hexánicas, sus respectivos derivados metilados y las fracciones de acetonitrilo por CG-MS.

Cuadro 3.7 Análisis de CG-EM de fracciones hexánicas (01a), sus derivados metilados (01aM) y de las fracciones de acetonitrilo (01b) de partición del extracto etanólico de hoja tallo y raíz de *Mosannonna depressa*.

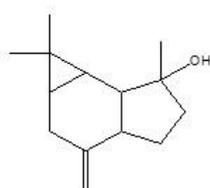
PARTE VEGETAL	CLAVE	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	METABOLITO	IDENTIDAD (%)	
Hoja	MDH-01a	11.245	5.56	Espatulenol	94	
		12.421	41.76	Asarona	99	
		28.397	5.82	β -Sitosterol	99	
	MDH-01aM	12.402	6.02	Asarona	99	
		15.004	9.09	Palmitato de metilo	98	
		16.687	10.51	Linolenoato de metilo	98	
		MDH-01b	10.119	1.60	1,2-dimetoxi-4(1-propenil) Benceno	94
	11.101		1.61	Asarona	96	
	11.238		0.91	Espatulenol	93	
	12.458		42.43	Asarona	99	
	12.890		8.01	Asaraldehido	99	
	Tallo	MDT-01a	12.452	78.24	Asarona	99
			28.397	5.62	Estigmasterol y β -Sitosterol	99
MDT-01aM		12.402	8.58	Asarona	99	
		14.998	8.88	Palmitato de metilo	98	
		16.624	8.33	Linolenoato de metilo	99	
		16.681	22.34	Oleonoato de metilo	99	
		23.593	7.97	Pirrolidina	90	
		28.378	5.99	Estigmasterol y β -Sitosterol	95	
MDT-01b		11.101	0.35	Asarona	97	
		11.388	0.17	Isomiristina	94	
		12.489	93.13	Asarona	99	
Raíz		MDR-01a	11.482	90.59	1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno	99
			11.113	3.81	Asarona	91
	10.875		0.24	Isoelemicina	91	
	12.402		0.16	Asarona	90	
	28.384		0.68	β -Sitosterol	97	
	MDR-01aM	11.464	71.16	1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno	99	
		16.687	9.45	Oleonoato de metilo	99	
	MDR-01b	11.107	6.46	1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno	99	

Los compuestos mayoritarios presentados en las tres partes vegetales son diferentes. A partir de las hojas, los cromatogramas de las fracciones de baja polaridad y su derivado metilado se compararon para determinar la presencia y el área de abundancia de los ácidos grasos, que no volatilizan en las condiciones originales. En la hoja, se detecta que la fracción de baja polaridad está compuesta principalmente por ácidos grasos como mayoritarios. Estos son los ácidos palmítico (9.09%) y linoleico (10.51%), y una de las asaronas (8.01%, $t_R = 12.42$ min). En la fracción de polaridad media la asarona ($t_R = 42.43\%$, 12.45 min), y el asaraldehído ($t_R = 12.89$ min, 8.01%) son los mayoritarios; también se detectó la presencia de una segunda asarona ($t_R = 11.1$ min) en menor abundancia (1.61%).

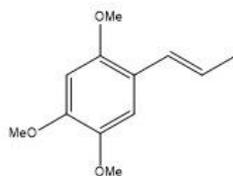
En la corteza, específicamente en la fracción de baja polaridad, se detectaron tres ácidos grasos, el más abundante correspondió al ácido oleico (22.34%), seguido del ácido palmítico (8.88%) y ácido linoleico (8.3%) y la asarona (8.58%, $t_R = 12.40$ min). Al igual que la fracción de mediana polaridad de la hoja, en la corteza se encontraron las dos asaronas, pero el contenido es del 93.13% para la asarona de t_R de 12.48 min.

Al analizar los cromatogramas de la raíz se encontraron diferencias significativas; en este caso, el metabolito 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno es el más abundante (71.16%) en la fracción hexánica, seguido del ácido oleico (9.45%). Aunque en concentraciones bajas se encontraron las dos asaronas (α y β), contrario a lo detectado de tallo, la de menor tiempo de retención (11.10 min) ligeramente mayor (3.8%) en comparación con la de $t_R = 12.42$ min (0.16%). En la fracción de acetonitrilo de la raíz únicamente se identificó al 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno con 6.46% de abundancia.

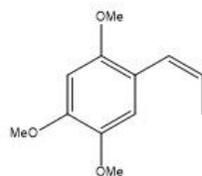
Adicionalmente, en cantidades menores se detectaron los compuestos espatulenol, isomiristina, isoelemicina, pirrolidina y los esteroides β -sitosterol y estigmasterol en el EE de *M. depressa*.



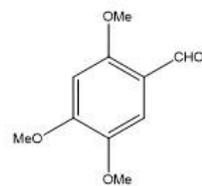
Espatulenol
C₁₅H₂₄O



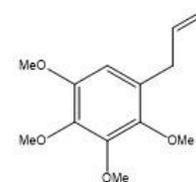
α-asarona
C₁₂H₁₆O₃



β-asarona
C₁₂H₁₆O₃



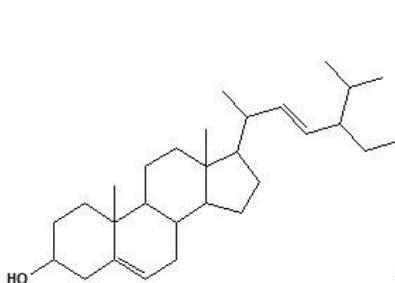
Asaraldehido
C₁₀H₁₂O₄



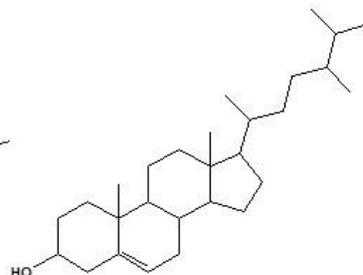
1,2,3,4-Tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno
C₁₃H₁₈O₄



Pirrolidina
C₄H₉N



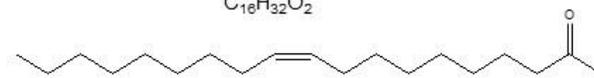
Sitosterol
C₂₉H₅₀O



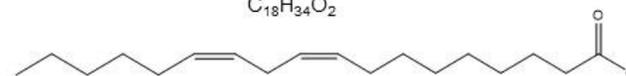
Stigmasterol
C₂₉H₄₈O



Ácido palmítico
C₁₈H₃₂O₂



Ácido oleico
C₁₈H₃₄O₂



Ácido linoleico
C₁₈H₃₂O₂

Figura 3.4 Metabolitos detectados en *Mosannonna depressa*.

Capítulo IV

4. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN

Las enfermedades fungosas en especies del género *Capsicum* spp. ocasionan marchitez de raíz, podredumbre en el tallo y antracnosis en el fruto. Estas enfermedades son controladas principalmente con el uso excesivo de fungicidas comerciales sintéticos. Los daños severos que originan estos productos son contaminar el aire, agua y suelo, afectando la biodiversidad, induciendo una resistencia en patógenos, afectaciones de salud en el ser humano y animales. En el presente trabajo de investigación, la contribución es hacia la generación de productos antifúngicos naturales provenientes de la flora de la Península de Yucatán.

Las colectas del material vegetal se realizaron en el Ejido Caobas, Jahuactal, Quintana Roo, un sitio inexplorado en cuanto a la actividad biológica o fitoquímica de las especies que alberga. Esta zona es de una riqueza florística formada por selva mediana, tintal y una sabana, poseedor del único manchón conocido de *Pinus caribaea* en México. Las sabanas son comunidades dominadas por gramíneas, con elementos arbóreos bajos y dispersos, pertenecientes a especies como *Curatella americana* (tachicón), *Crescentia cujete* (jícara) y *Byrsonima crassifolia* (nanche); generalmente tiene suelos planos inundables una parte del año, y suelos con pendiente y drenaje excesivamente rápido y poca retención de humedad. La zona geográfica donde crecen puede influir en la biosíntesis de los organismos (Fernández-Carnevali *et al.*, 2012; <https://ejidocaoba.wordpress.com/2014/10/23/que-visitar-en-caoba-sitios-de-interes>).

En el presente trabajo 82 extractos etanólicos y acuosos, de 15 especies de plantas nativas, se evaluaron contra cinco hongos fitopatógenos poscosecha de *Capsicum* spp. Los resultados mostraron que el 16% de los extractos, tuvieron la capacidad de afectar al menos a uno de los fitopatógenos, seis fueron de EE y siete de EA. Los extractos evaluados en los bioensayos *in vitro* mostraron la mayor actividad antifúngica inducida por ambos tipos de extractos de la corteza de *M. depressa* contra *P. oxalicum*. Junto con los EE de hoja y raíz, los EE de *Licaria* sp. y el EA de *S. amara*

fueron capaces de afectar el crecimiento de los otros cuatro fitopatógenos *A. alternata*, *A. brassicicola*, *C. capsici* y *C. truncatum*.

Para determinar la efectividad de los extractos y conocer la complejidad en cuanto a metabolitos secundarios, los tres EE de las diferentes partes vegetales de *M. depressa* se fraccionaron con disolventes de polaridad ascendente y se les determinó la CMI. Los resultados indicaron que las tres fracciones obtenidas de mediana polaridad de *M. depressa* tuvieron fuerte efecto fungicida con la más baja CMI de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *P. oxalicum*. Lo anterior indica que los metabolitos responsables de la actividad son de polaridad media.

La especie *M. depressa* (Baill.) Chatrou, cuyos sinónimos son *Annona depressa*, *Malmea depressa* y *Guatteria gaumeri*, de la familia Annonaceae, es un árbol conocido en México como nazareno prieto, yumel, *boox éelemuy*, *éelemuy*, *chakni'*, *ch'ulumay*, *sak éelemuy* (en maya). Diversas actividades biológicas han sido descritas de esta especie, principalmente dirigidas a enfermedades humanas (Cuadro 4.1). Sin embargo, después de una búsqueda exhaustiva, a la fecha sólo un reporte se encontró de actividad antifúngica de esta especie, específicamente contra el zoo-patógeno *Trichophyton mentagrophytes* y el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Jiménez-Arellanes *et al.*, 1996). En este estudio, el compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno, conocido como aliltetrametoxibenceno, está reportado como responsable de la actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes* y *F. oxysporum*, con una CMI de 400 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Jimenez-Arellanes *et al.*, 1996).

El compuesto mayoritario reportado para *M. depressa* es la asarona (1,2,4,5-trimetoxi-propenil-benceno (Leclerq, 1985) que fue aislada de la corteza. Este metabolito fue inicialmente obtenido del aceite de cálamo (*Acorus calamus* L.) junto con la forma isomérica β -asarona. Mandoki *et al.* (1980) aislaron la forma cristalina a partir de la corteza mediante extracción con éter de petróleo y metanol. La asarona está reportada como un metabolito volátil presente en aceites esenciales de las Piperáceas. Esta familia es reconocida como uno de los grupos de plantas tropicales más utilizado tradicionalmente por diversas comunidades como bactericida, insecticida, fitomedicamentos y fuente de especias (Regnault-Roger *et al.*, 2005). También se ha encontrado en aceites esenciales de plantas como *Artemisia vulgaris* conocida como

artemisa vulgar o yuyo. Como insecticida, la α -asarona y cuatro análogos estructurales se han reportado contra larvas del tercer estadio del mosquito, los resultados obtenidos sugieren que estos compuestos ofrecen gran potencial como nuevos agentes para el control de larvas de *Aedes Aegypti* (http://respy2.uanl.entomologia_medica_dengue.htm).

Otros compuestos reportados de *M. depressa* son el asaraldehído trimetoxi-2,4,5-benzaldehído, *trans*-isoelemicina, trimetoxi-1,2,3-(propenil-1)-5-benceno, *trans*-isomiristina, guategaumerina y pirrolidina (Andrade-Cetto *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 1993; Dehaussy, 1983; Enriquez *et al.*, 1980).

Cuadro 4.1 Actividades biológicas reportadas de *Mosanonna depressa* (Baill).

METABOLITO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
1,2,3,4-Tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno	Antifúngica contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Jimenez-Arellanes <i>et al.</i> , 1996
--	Antimicrobiana y citotóxica	Gutiérrez-Lugo <i>et al.</i> , 1996
--	Actividad antioxidante y Antiagregante plaquetario	Alcántara <i>et al.</i> , 2010
Asarona, asaraldehído 2-propenil-benceno	Acción hipocolesterolemiantes, hipolipemiantes, coletitiasis, hipotrigliceridemiantes, hipoglucemiantes	Sánchez <i>et al.</i> , 1980
--	Acción hipoglucemiantes y para problemas renales	Ankli, 2000; Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2006;2008;
--	Ansiolítico, antialzheimer, antiparkinson, anticancerígeno, antitrombótico y anticolestático	Chellian <i>et al.</i> , 2017
α -Asarona	Antioxidante	Asha <i>et al.</i> , 2014
Asarona, Propenilbencenos	Antiblenorrágico, antiespasmódico y antigonorreico	Martínez 1933
Alcaloides	Hipoglucémica y antiséptica	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005; 2008
Pirrolidina	Antiglucemiantes	Kashikar y Tejaswita 2011
	Antibacteriano	Pini <i>et al.</i> , 2014

En la presente investigación, los análisis cromatográficos y espectrométricos de CG-EM de las fracciones y sus derivados metilados, confirmaron la presencia de la mezcla de α - y β -asarona en las hojas, corteza y raíz de *M. depressa*. También se

encontró que una de las asaronas, los ácidos oleico, linoleico, palmítico y la pirrolidina son los componentes mayoritarios de las fracciones de la corteza. En las hojas, con excepción del ácido oleico, son los mismos componentes mayoritarios, además del espatulenol.

Los ácidos grasos han sido ampliamente documentados por su acción fungicida contra un gran número de hongos fitopatógenos. Principalmente los ácidos grasos insaturados, los cuales se encuentran en alta concentración en la corteza de *M. depressa*. Los ácidos grasos como el ácido butírico, caproico, láurico, palmítico, oleico y linoleico aislados de plantas, son conocidos por sus propiedades fungicidas contra diversos tipos de fitopatógenos (Pohl *et al.*, 2011). Los niveles de ácidos grasos juegan un papel importante en las interacciones planta-microorganismo, pues se incrementan en respuesta a diversos factores de estrés en las plantas. Un aumento en la producción de ácidos grasos, como el palmítico, sugiere que mejora la resistencia a enfermedades fúngicas. El aumento en los niveles de ácido linoleico en plantas induce una resistencia al ataque de *Colletotrichum*. En la actualidad los ácidos grasos volátiles son utilizados por sus propiedades biocidas o tóxicas contra microorganismos, plantas y animales (Samaniego, 2013). A la fecha no se encontraron reportes del efecto de los ácidos grasos contra *P. oxalicum*.

En este trabajo se reportan por primera vez los ácidos grasos, los esteroides y el espatulenol de *M. depressa*. También se reportan por primera vez los metabolitos secundarios de hoja y raíz de *M. depressa*. En las fracciones obtenidas del extracto etanólico de hojas se encontraron espatulenol y el asaraldehído, los ácidos palmítico y linoleico. El espatulenol está reportado con actividad citotóxica (Areche *et al.*, 2009) y antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Ulubelen *et al.*, 1994). Un metabolito no identificado ($t_R = 22.95$ min) de las hojas, puede ser una nueva aportación fitoquímica para la especie.

Con respecto al contenido de la raíz, únicamente se detectaron el ácido oleico y el aliltetrametoxibenceno, este último reportado como el responsable de la actividad fungicida de la corteza de *M. depressa* (Jiménez-Arellanes *et al.*, 1996). Esto indica que el contenido fitoquímico de la corteza de *M. depressa* colectada en Jahuactal, difiere a lo reportado con colectas de otros sitios.

Los datos anteriormente descritos indican que los responsables de la actividad antifúngica de la corteza de *M. depressa* no corresponden únicamente al metabolito aliltetrametoxibenceno. Por lo tanto, este extracto debe ser fraccionado para aislar e identificar a los metabolitos responsables de su efecto antifúngico.

Este estudio confirma el potencial de aplicación de *M. depressa* como un posible producto antifúngico botánico en agricultura. Por su naturaleza, los productos botánicos pueden usarse con seguridad en una agricultura sustentable, y un ejemplo de esto, es el uso de los plaguicidas botánicos cuyos ingredientes activos pueden ser de diversas estructuras químicas, como terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, etc. con efectos fungicidas, insecticidas o nematocidas para el control de diversas enfermedades y plagas agrícolas. Además, son menos costosos, son biodegradables y seguros para el ser humano y el ambiente, con poca residualidad (Andrés *et al.*, 2012; Cantrell, 2012; Isman, 2017; Nava-Pérez, 2012; Ramírez-Mares y Hernández-Carlos, 2015; Walia *et al.*, 2017).

Dada la importancia de *Capsicum* spp., el fitopatógeno poscosecha *Penicillium oxalicum* es el que ocasiona pérdidas económicas de importancia a los agricultores (<https://www.gob.mx/sagarpa>). Pueden considerarse hongos colonizadores tanto en condiciones de campo como de almacenamiento; encontrado y reportado por primera vez en lesiones del fruto de chile habanero y es catalogado como un patógeno secundario (Hoil, 2016). Uno de los mayores problemas que genera *Penicillium* spp. para el hombre y los animales radica en la posible producción de micotoxinas: la ocratoxina A (OA) y la citrinina (CIT) con diferentes efectos tóxicos en alimentos (Steyn *et al.*, 1991).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

Entre las 15 especies vegetales evaluadas, *M. depressa* posee la mayor capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos asociados a enfermedades poscosecha de frutos del género *Capsicum*.

El fitopatógeno *Penicillium oxalicum* fue el más sensible al extracto acuoso y etanólico de la corteza de *M. depressa*.

Los metabolitos responsables de la actividad antifúngica de *M. depressa* son de mediana polaridad, en particular los contenidos en la corteza mostraron la más baja CMI a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una CI_{50} con un valor de $141.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *P. oxalicum*.

La identificación de espatulenol, β -sitosterol, y los ácidos palmítico, oleico y linoleico enriquecen el conocimiento fitoquímico de la especie *M. depressa*.

La corteza obtenida de *M. depressa* colectada en Jahuactal no biosintetiza el aliltetrametoxibenceno.

Esta investigación reveló el alto potencial fungicida de *M. depressa* para el control de hongos fitopatógenos de frutos poscosecha de *Capsicum* spp.

5.2 PERSPECTIVAS

Los extractos acuosos de *M. depressa* y *S. amara* deben evaluarse a otras concentraciones y en frutos poscosecha.

El análisis cromatográfico del EA de *M. depressa* debe realizarse para conocer su perfil químico.

Dada la importancia de estos cultivos, los estudios deben continuarse desde la perspectiva de ser evaluados a nivel *in vivo* en frutos de *Capsicum* spp.

Paralelamente, debe realizarse la purificación para determinar cuáles son los metabolitos responsables de la actividad en *M. depressa*.

La citotoxicidad y el efecto en organismos benéficos de los extractos de *M. depressa* deben ser evaluados.

Investigar y explorar la propagación de *M. depressa*.

5.3. RECOMENDACIONES

Actualmente en el estado de Yucatán existen productores de chile que siguen utilizando el control químico con productos convencionales como una práctica habitual. Para sustituir estos se requiere generar opciones viables, como los fungicidas botánicos. Estos productos representan una alternativa viable para ser utilizados dentro de esquemas de control biológico de plagas en los principales cultivos agrícolas. Su uso permitirá mantener la productividad del campo sin contaminarlo y sin poner en riesgo la salud de la población que entra en contacto directo o en forma indirecta con estos insumos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeledo, L., Kruk, B., Savin, R. (2006). Madurez y cosecha de los cultivos en producción de granos, bases funcionales para su manejo. Vol. 950: 13-2.
- Achicanoy, H. (1981). Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Crinipellis pernicioso* Singer y *Monilophthora roreri*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 51 pp.
- Agrios, N. G. (1998). Plant pathology (2 Ed.). San Diego, CA: Elsevier Inc.
- Agrios, N. G. (2005). Plant pathology (5 Ed.). San Diego, CA: Elsevier Inc.
- Agrios, N. G. (2010). Fitopatología 2, pp 17-20. San Diego, CA: Elsevier Inc.
- Aguilar, G. B y Rios, Y. (2004). Three new sesquiterpenes from *Croton arboreous*. Journal of Natural Products, Vol. 67: 914-917.
- Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. Agricultura Orgánica, 2, 26-30.
- Andrade-Cetto, A., Martínez-Zurita, E., Wiedenfeld, H. (2005). Hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 100: 319-322.
- Andrade-Cetto, A., Martínez-Zurita E., Soto-Constantino A., Revilla-Monsalve C., Wiedenfeld, H. (2006). Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 116: 358-362.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., Cárdenas-Vazquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 116: 27-32.
- Andrés, M., Gonzalez, A., Sanz, J., Burillo, J., Sainz, P. (2012). Nematicidal activity of essential oils: a review. Phytochemistry Reviews. Vol. 11:371–390.
- Andrews, S. (1992). Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. International Journal of Food Microbiology, Vol. 119: 351-355.
- Angulo, E., Armenta, R., García, E., Carrillo, F., Salazar, V., Valdéz, T. (2009). Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer*. Revista mexicana de fitopatología. Vol. 27(2): 84-92.

- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 79: 43-52.
- Areche, C., Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Rodríguez, J. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis). *The Journal of pharmacy and pharmacology*. Vol. 61:56-59.
- Arellano, J., Flores, J., Tun, J., Cruz, M. (2003). Etnoflora yucatenense. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. CONACYT. Mérida.
- Asha, S., Mali, A., Rahee, M., Belind, E. (2014). Propiedades antioxidantes de Alfa asarona. *Asian Journal of Biochemistry*. Vol. 9 (2):107-113.
- Baird, R., Huber, D., Mullinix, B. (1996). The mycobiota from seeds shrunken2 (sh2) sweet corn. *Mycopathologia* Vol. 132 (3): 147-154.
- Benavides, J. (1994). *Annales du muséum national d'histoire naturelle* Vol. 17: 424. 1811.
- Bieri, D., Brachel, A., Veuthey, J., Christen, P. (2006). Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 103:439-447.
- Boehlendorf, B., Neff, S., Schuez, T., Louis-Pierre, Winkler, T., Dobler, M. Huang, Y. (2004). Compounds obtained from a fungal microorganism and derivatives thereof. UK Patent Application GB 2396349 A.
- Cantrell, C., Dayan, F., Duke, S. (2012). Natural Products as sources for new pesticides. *Journal Natural Products*. Vol. 75:1231–1242.
- Carvalho, A., Curcino, I., Carvalho, M., Lima, M., Ferreira, F., María, E., Oliveira, D. (2017). 13 C-RMN espectral de datos de alcaloides aislados de *Psychotria* Especies (Rubiaceae). *Moleculas*. Vol. 22:103.
- Castillo, A., García, S., Peña, R. (2009). Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. *Natural Products Communication*. Vol. 4(1):83-6.
- Castillo, M. (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de calidad de aguas*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México. 189 pp. México. <https://www.idrc.ca/sites/default/files/openebooks/147-7/index.htm>

- Chamorro, G., Salazar, M., Salazar, S., Mendoza, T. (1993) y (1999). Farmacología y toxicología de *Guatteria gaumeri* y alfa-asarona. Revista de Investigación Clínica. Vol. 45:597-604.
- Chatrou L. (1997). Studies in Annonaceae. XXVIII. Macromorphological variation of recent invaders in northern Central America: the case of *Malmea* (Annonaceae). American Journal of Botany. Vol. 84(6): 861-869.
- Chellian, R., Pandey, V., Mohamed, Z. (2017). Pharmacology and toxicology of α - and β -Asarone: A review of preclinical Evidence. Phytomedicine. Vol. 32:41–58.
- Dehaussy, H., Tits, M., Angenot, L. (1983). Guattegaumerine, new bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Guatteria gaumeri*. La Guattegaumerine, nouvel alcaloide Bisbenzylisoquinoléinique de *Guatteria gaumeri*. Planta Médica, Vol. 49:25-27.
- Enriquez, R., Chavez, M., Jauregui, E. (1980). Propenylbenzenes from *Guatteria gaumeri*. Phytochemistry. Vol. 19: 2024-2025. UNAM. México.
- Estrada, J. (2002). Potencialidades del uso del nim y sus bioproductos en la producción agropecuaria ecológica y sostenible. Agricultura Orgánica, Vol. 3: 18-21. Cuba.
- Fernández-Carnevali, G., Tapia- Muñoz, J., Duno de Stefano, R., Ramírez -Morillo, I., Can-Itzá, L., Hernández -Aguilar, S., Castillo, A. (2009) y (2012). La flora de la Península de Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. CONABIO Vol.101:6-10.
- Fernández, C., Batista, B., Sarduy, D. (1995). Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. III: Sierra del Rosario. Revista Cubana de Enfermería. Vol. 11(3):23-24.
- Gahkar, R. (2012). Evaluation of plant derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. Crop Protection Volume 42: 202-209.
- Gamboa-Angulo, M., Cristóbal-Alejo, J., Medina-Baizabal, I., Chí-Romero, F., Méndez-González, R., Simá-Polanco, P., May-Pat, F. (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. World Journal of Microbiology and Biotechnology Vol. 24:1955-1959.
- Gamboa, A., Hernández, C., Guerrero, R., Sánchez, A., Lira, S. (2009). Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* mont (De

- Bary) con extractos vegetales metanolicos de hoja sen (*Flourensia cernua* D.C).
Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 21(001):13-18.
- Gaudemer. A. y Polonsky, J. (1965). Structure de la glaucarubinone nouveau principe amer isole de *Simaruba glauca*. Phytochemistry Vol. 4: 1149-153.
- González E, Gutiérrez, P., Contreras, M., Casanova, C., Torres, T., Peraza, S. (2006). El chile habanero de Yucatán. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. Revista Ciencia y Desarrollo. CONACYT. Vol. 32:195.
- Gonzalez, G., Velez, C., González, G., Payo, H., González, L. (2006). Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. Biochemical Systematics and Ecology. Vol. 34: 539-542.
- González, L., García, G., Gordo, A., Vélez, C. (2008). Una Entidad Química aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de β -Amirina. Latin American Journal of Pharmacy. Vol. 27 (1): 85-8.
- Guerrero, R., Solís, G., Hernández, C., Flores, O., Sandoval, L., Jasso, C. (2007). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.Fr.). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 25, núm. 1:48-53.
- Gutiérrez, L., Barrientos, B., Luna, B., Ramírez, G., Linares, E. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. Phytomedicine. Vol. 2 (4):341-347.
- Hoil, P. (2016). Actividad Inhibitoria del Extracto Acuoso de *Bonellia Flammea* contra Hongos postcosecha de *Capsicum* spp. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico De Conkal. México.
- Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology. Vol. 51: 45-66. EE. UU.
- Isman, M. (2017). Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. Industrial Crops & Products. Vol. 110: 10-14.
- Jamkhande, P., Wattamwar, A., Kankudte, A., Tidke, P., Kalaskar, M. (2016). Assessment of *Annona reticulata* Linn. Leaves fractions for *in vitro* antioxidative effect and

- antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. Alexandria Journal of Medicine. Vol. 52. 19-25.
- Jimenez-Arellanes, Mata, R., Lotina, H., Anaya, L., Velasco, I. (1996). Phytogrowth-Inhibitory Compounds from *Malmea depressa*. Journal of Natural Products. Vol. 59.(2): 202-204.
- Joshi, S., Joshi, S., Mishra, P. (2007). *Simarouba glauca* DC. Underutilized and Underexploited Horticultural Crops. Vol. 1: 345-368.
- Kanchiswamy, C., Malnoy, M., Massimo, M. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. Trends in Plant Science. Vol. 20. 206-211.
- Leclercq, J., Dehaussy, H., Goblet, M., Wauters, J., Angenot, L. (1985). Description, identification et utilisation du yumel. Journal of Pharmaceutical Belt. Vol. 40:251-256.
- Libreros, M., Mendieta, L. (2013). Uso de algas para obtener biocombustible y bioenergía con base en biotecnología marina. BUAP.
- López, P., Canto, F., Barredo, P., Zapata, C., Montalvo, P., Barahona, P., Iglesias, A., Santana, B. (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). Horticulture. Science. Vol. 41 (7):1645-1650.
- Lorea, H. (2005). Nuevas especies de *Licaria*, *Ocotea* y *Persea* (Lauraceae) de México. Acta Botánica Mexicana.
- Mandoki, *et al.*, (1980). IV Congreso Nacional de Farmacología. S/D volumen.
- Martínez, H., Quintero, R., Márquez, M., González, L., Alvarez, R., Zarragoitia, A. (2006). Determinación de la toxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt mediante el método de la *Artemia salina*. Acta Farmacéutica Bonaerense. Vol. 25 (3):429-31.
- Martínez, M. (1933). Las plantas medicinales de México. Vol 1. Edición Botas. 656 pp. México, D. F.
- Montes, R., Cruz, C., Martínez, V., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúde, K., Flores, H., Carvajal, M. (2000). Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 18 (2), 125- 131.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nava, P., García, G., Camacho, B., Vázquez, M. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, Vol.8 (3b):17-29.
- Orellana, F., Escobar, J., Morales, A., Méndez, I., Cruz, R., Castellón, M. (2010). El cultivo del chile dulce. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador. Guía Técnica. <http://simag.mag.gob.sv/uploads/pdf/201412011299.pdf>
- Peraza-Sánchez, S., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, B., García-Miss, M., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*. Vol. 78, Issue 4: 315-318.
- Pitt J. (1997). *Penicillium* and Related Genera. In: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, Boston.p. 203-338.
- Pohl, C., Kock, J., Thibane, V. (2011). Antifungal free fatty acids: A Review. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Vol. 1:61-71.
- Polo, L. M. (2015). *Fundamentos de Cromatografía*. Editorial DEXTRA. Pp. 390.
- Ramírez, H., Hernández, C. (2015). Plant-derived natural products from the American continent for the control of Phytopathogenic fungi: a Review. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*. Vol. 3(4): 96-118.
- Ramírez M., Vázquez G. (2015). Potencial de producción del chile habanero (*Capsicum chinense* Jack), en el sur de Tamaulipas. SAGARPA-INIFAP Campo Experimental Sur de Tamaulipas. 52 pp.
- Ravikumar, M., Garampalli, R. (2013). Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. Vol. 46:1897-1903.
- Regnault, R., Philogene, B., Vincent, C. (2005). Biopesticides D" Origine Végétale. *Tec&Doc-Lavoisier*. pp. 69. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np058244q>.

- Ren, Y., Chai, H., Goetz, M., Kinghorn, D. (2013). A cytotoxic decahydronaphthalenylpropenal derivative and tetrahydrofuran lignans from the stems of *Cameraria latifolia*. *Tetrahedron Letters*. Vol. (54). Issue 36, p 4854-4858.
- Restrepo, J., Pinheiro, S. (2011). *Cromatografía. Agricultura Orgánica*. Feriva. Colombia. 21 ed. 252 pp.
- Rincones, C.C. (2015). *Sistema producto chile de Yucatán*. Secretaria de Fomento Agropecuario y pesquero. SAGARPA. Comité Estatal sistema producto chile del estado de Yucatán, A.C. 76 p.
- Roselló, C. (2003). Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Valencia.
- Salazar, O., Silva, O. (2014). Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta* Vol. 1: p 7-14.
- Salinas, M. (2016). Actividad antifúngica de extractos vegetales en hongos patógenos de cultivos comerciales. Tesis (Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable), Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR, Unidad Michoacán. 65 pp.
- Samaniego, J. Pedroz, A. (2013). Usos potenciales de los ácidos grasos volátiles en suelo, agua, aire. *Terra Latinoamericana*. Vol. 31:155-163.
- Samson, R., Hoekstra, F., Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food and airborne fungi*. Sexta ed. Ed. CBS. Utrecht. The Netherlands. 389 pp.
- Sánchez, J., Lerdo de Tejada, A., González, J., Guzmán, R., Tinoco, A., Karchmer, S. (1980). Acción del extracto alcohólico de *Gautteria gaumeri* sobre los niveles del colesterol sanguíneo. *La Homeopatía de México*. 376: 4-18.
- Santizo, I. (2004). Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. 107 pp.
- Scott, R. (1992). *Liquid chromatography column theory*. Libro 3. Primera Edic. 123-133. 292 pp.
- Shenoy, B., Jeewon, R., Lam, W., Bhat, D., Than, P., Taylor, P., Hyde, K. (2007). Morphomolecular characterization and epitypification of *Colletotrichum capsici*

- (Glomerellaceae, Sordariomycetes), the causative agent of anthracnose in chili. *Fungal Diversity*. Vol. 27: 197-211.
- SIAP. (2011). Servicio de información agroalimentaria y pesca. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México. <http://www.siap.gob.mx/>
- SIAP-SAGARAPA. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaria de Agricultura, Ganadera, Desarrollo Rural Pesca. www.siap.gob.mx/.
- Souza, C., Baldin, E., Ribeiro, L., Silva, I., Morando, R., Bicalho, K., Fernández, J. (2017). Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. *Journal Pest Science*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 90:701–709.
- Steyn, P., Thiel, P., Trinder, D. (1991). Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 165-221.
- Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R. (2012). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Pp. 663. Recopilado No. 23.
- Torres, R.A. (2012). Guía para el manejo integrado de plagas con énfasis en el picudo del chile. Kopper México S. A. de C.V. INNOVAPYME-CONACYT. No. 154411.
- Uldahl, S., Knutsen, G. (2009). Spore swelling and germination as a bioassay for the rapid screening of crude biological extracts for antifungal activity. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 79, Issue 1, 82-88.
- Ulloa, M., Herrera, R. (1994). Etimología e Icografía de género de hongos. Universidad Autónoma de México. México. 98 pp.
- Ulubelen A, Topcu G, Eris C, Soenmez U, Kartal M, Kurucu S, Bozok-Johansson C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. Vol. 36(4): 971-974.
- USDA. (2017). ARS, National Genetic Resources Program. GRIN. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.
- Vargas-Díaz, A., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, I., Pérez-Brito, D., Cristobal-Alejo, J., Ruiz-Sánchez, E. (2014). Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad Antifúngica de *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 32 Número 1. 11 pp.

- Vera Kú, M. (2004). Evaluación de la actividad biológica en plantas medicinales nativas de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. CICY. Mérida, Yucatán. México.
- Villa, M., Catalán, E., Inzunza, M., Román, A., Macías, H., Cabrera, D. (2014). Producción hidropónica de chile habanero en invernadero. SAGARPA-INIFAP. Folleto técnico No. 34. 56 pp.
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., Perrone, G., Seifert, K., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* Vol. 78: 343–371.
- Walia, S., Saha, S., Tripathi, V., Sharma, k. (2017). Phytochemical biopesticides: some recent developments. *Phytochemistry Reviews*. Vol.16:989–1007.
- Walls, F., Collera, O., Sandoval, I. (1958). Alkaloids from stemmadenia species-I: The alkaloids of *S. Donnell-Smithii* and *S. Galeottiana*. *Tetrahedron*, Vol. 2, 173 pp.
- Zaker M. (2013). Screening some medicinal plant extracts against *Alternaria sesame*, the causal agent of *Alternaria* leaf spot of sesame. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. Vol. 3:1-8.

Páginas de internet consultadas:

- Ecured. Disponible en: https://www.ecured.cu/Anon_rojo [Acceso enero 2019]
- Flora de Nicaragua. Disponible en: <http://www.tropicos.org/name/27905996?projectid=7> [Acceso enero 2019]
- Flora Virtual, estación biológica verde. Disponible en: http://floraelverde.catec.upr.edu/especie_info.php?id=245 [Acceso junio 2018]
- Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7162> [Acceso 17 de febrero de 2019]
- Myrica cerifera*. Disponible en: <http://www.arbolesornamentales.es/Myricacerifera.htm> [Acceso mayo de 2017]
- SAGARPA. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa> [Acceso octubre de 2016]

United States Medical Licensing Examination. Disponible en:
http://www.rogersadventage.com/pdf/tm_bulletin.pdf [On line] [Acceso abril de 2017]
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=6633843&pid=S0185-3309201100020001100009&lng=es [Acceso enero 2018]
<https://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005> [Acceso julio 2018]
<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?102258> [Acceso noviembre 2017]
<http://2006-2012.concacyt.gob.mx/fondos/FondosSectoriales/> [Acceso mayo 2017]

ANEXOS

Cuadro 1a. Rendimientos de extractos etanólicos.

ESPECIE	Parte planta	Material vegetal seco (g)	EE (g)	% REND
<i>Annona primigenia</i> Standl.&Steyerm	Hoja	50	1.16	2.13
	Tallo	200	4.94	2.47
<i>Guettarda combsii</i> Urb.	Hoja	200	8.65	4.33
	Tallo	200	5.97	2.98
	Raíz	100	3.26	3.27
<i>Licaria</i> sp.	Hoja	80	13.13	16.42
	Tallo	50	1.24	2.48
	Raíz	30	1.02	3.42
<i>Mosannonna depressa</i> (Baill) Chatrou	Hoja	100	4.21	4.21
	Tallo	200	8.34	4.17
	Raíz	30	2.09	6.96
<i>Psychoria</i> sp.	Completa	80	2.4	3
<i>Simarouba glauca</i> DC.	Hoja	100	6.52	6.52
	Tallo	200	4.16	2.08
	Raíz	50	0.95	1.91
<i>Stenmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson.	Hoja	50	1.99	4
	Tallo	200	3.66	1.83

ESPECIE	Parte planta	Material vegetal seco (g)	EE (g)	% REND
<i>Byrsonima busidaefolia</i> Sandl.	Hoja	100	5.06	5.05
	Tallo	150	11.14	7.43
	Raíz	150	16.43	10.95
<i>Cameraria latifolia</i> L.	Hoja	100	8.17	8.1
	Tallo	100	3.32	3.3
	Raíz	200	12.3	6.15
<i>Croton arboreus</i> Millsp	Hoja	80	0.77	0.97
	Tallo	50	1.27	4.02
	Raíz	100	4.28	4.22
<i>Croton itzaeus</i> Lundell	Hoja	80	2	2.49
	Tallo	30	1.03	3.43
	Raíz	40	0.8	1.98
<i>Erythroxylum confusum</i> Britton	Hoja	100	4.37	4.3
	Tallo	150	13.56	9.03
	Raíz	200	19.21	9.6
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L) Juss	Hoja	80	3.78	4.72
	Tallo	50	2.34	4.68
	Raíz	80	3.51	4.38
<i>Morella cerifera</i> (L) Small	Hoja	100	11.35	11.3
	Tallo	200	13.75	6.90
	Raíz	80	16.1	20.13
<i>Parathesis cubana</i> (A.Dc.) Molinet & M. Gómez	Hoja	100	9.85	9.8
	Tallo	100	4.36	4.2
	Raíz	100	9.33	9.2

Cuadro 2a. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones de partición de extractos de hoja de *Mosannonna depressa* contra el fitopatógeno *Penicillium oxalicum*

FRACCIONES	% Rendimiento	Concentración $\mu\text{g/mL}$	CMI
Extracto etanólico	4.21	1000	50
		500	0
		250	0
		125	0
Fracción hexánica	24.4	1000	50
		500	0
		250	25
		125	25
Fracción acetonitrilo	57.6	1000	100
		500	25
		250	0
		125	25
Precipitado	5.2	1000	0
		500	0
		250	25
		125	0

%ICM = Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelia

Cuadro 3a. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones de partición de extractos de raíz de *Mosannonna depressa* contra el fitopatógeno *Penicillium oxalicum*.

FRACCIONES	% Rendimiento	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% ICM
Extracto etanólico	6.96	1000	100
		500	75
		250	25
		125	0
Fracción hexánica	25	1000	100
		500	0
		250	25
		125	0
Fracción acetonitrilo	48.4	1000	100
		500	50
		250	25
		125	0
Precipitado	48.4	1000	100
		500	75
		250	75
		125	0

%ICM = Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial

Cuadro 4a. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones de partición de extractos de corteza de *Licaria* sp. contra el fitopatógeno *Penicillium oxalicum*.

FRACCIONES	% Rendimiento	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% ICM
Extracto etanólico corteza	4.17	1000	75
		500	0
		250	0
		125	0
Fracción hexánica	10.8	1000	0
		500	0
		250	0
		125	0
Fracción acetónitrilo	19.6	1000	25
		500	0
		250	0
		125	0
Precipitado	51.4	1000	0
		500	0
		250	0
		125	0

%ICM = Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial

Cuadro 5a. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones de partición de extractos de raíz de *Licaria* sp. contra el fitopatógeno *Penicillium oxalicum*.

FRACCIONES	% Rendimiento	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% ICM
Extracto etanólico	6.96	1000	100
		500	0
		250	0
		125	0
Fracción hexánica	8.2	1000	100
		500	0
		250	25
		125	0
Fracción acetónitrilo	10.4	1000	100
		500	0
		250	0
		125	0
Precipitado	86.4	1000	100
		500	0
		250	0
		125	0

%ICM = Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con el apoyo de esta información, se corrieron los datos en el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11, para lo cual se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$). Como se muestran a continuación.

Cuadro 6a. Análisis Anova de una vía.

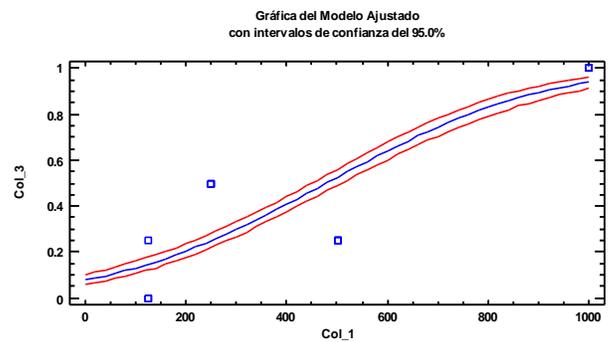
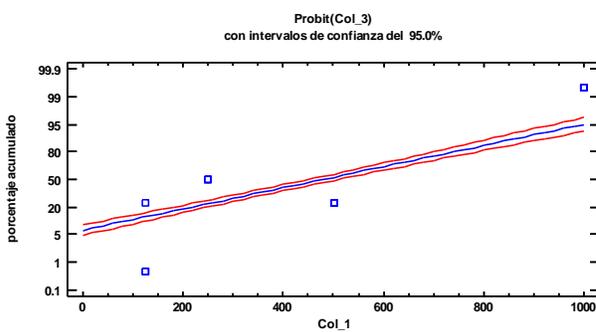
CLAVE EXTRACTOS Y FRACCIONES	Concentraciones			
	1000	500	250	125
T ¹ MDH	50c	0e	0e	0c
T ² MDH-01 a	50c	0e	25d	25b
T ³ MDH-01 b	100a	0e	25d	25b
T ⁴ MDH-01 c	0e	0e	25d	0c
T ⁵ MDT	100a	25d	50c	8.33c
T ⁶ MDT-01 a	100a	25d	50c	25b
T ⁷ MDT-01 b	100a	100a	100a	25b
T ⁸ MDT-01 c	100a	75b	75b	c0
T ⁹ MDR	100a	75b	25d	0c
T ¹⁰ MDR-01 a	100a	0e	25d	0c
T ¹¹ MDR-01 b	100a	50c	25d	0c
T ¹² MDR-01 c	100a	75b	75b	0c
T ¹³ LSPH	0e	0e	0e	0c
T ¹⁴ LSPH-01 a	0e	0e	0e	0c
T ¹⁵ LSPH-01 b	0e	0e	0e	0c
T ¹⁶ LSPH-01 c	0e	0e	0e	0c
T ¹⁷ LSPT	75b	0e	0e	0c
T ¹⁸ LSPT-01 a	0e	0e	0e	0c
T ¹⁹ LSPT-01 b	25d	0e	0e	0c
T ²⁰ LSPT-01 c	0e	0e	0e	0c
T ²¹ LSPR	100a	0e	0e	0c
T ²² LSPR-01 a	75b	0e	0e	0c
T ²³ LSPR-01 b	100a	0e	0e	0c

T ²⁴ LSPR-01 c	100a	0e	0e	0c
RPMI-H	0e	0e	0e	0c
RPMI-DMSO-T-H	0e	0e	0e	0c
PROCLORAZ-H	100a	100a	100a	100a

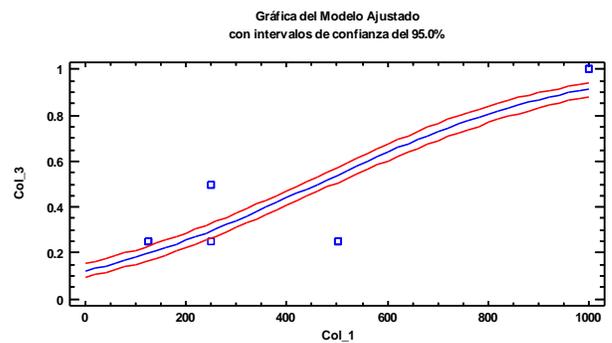
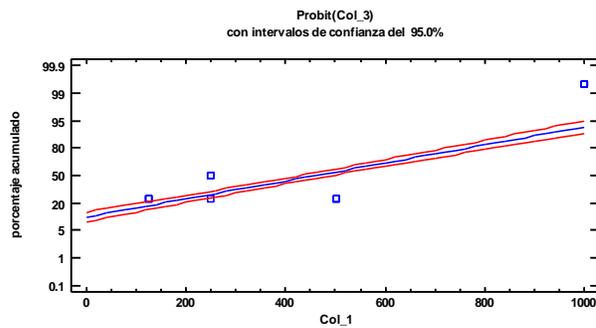
T*: No. De tratamiento

CURVAS PROBIT DE FRACCIONES DE *Mosanona depressa*

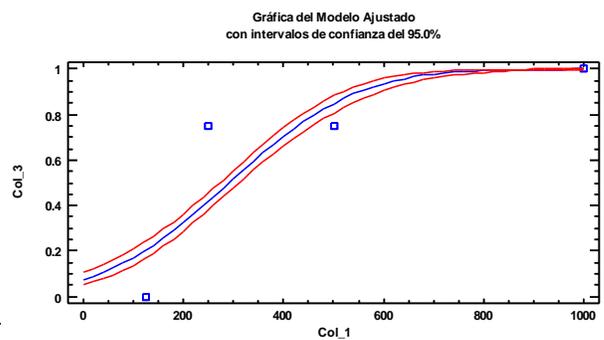
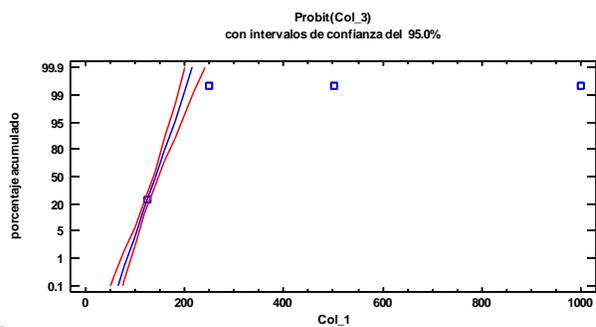
T⁵ MDT



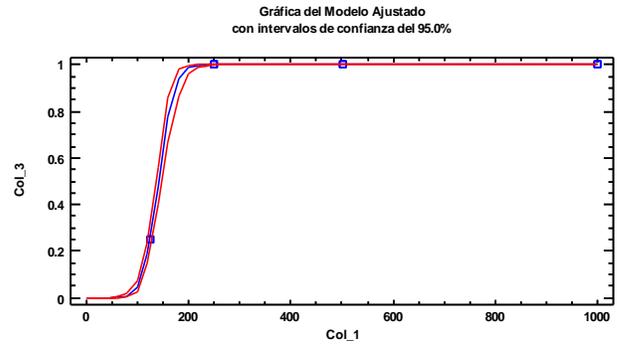
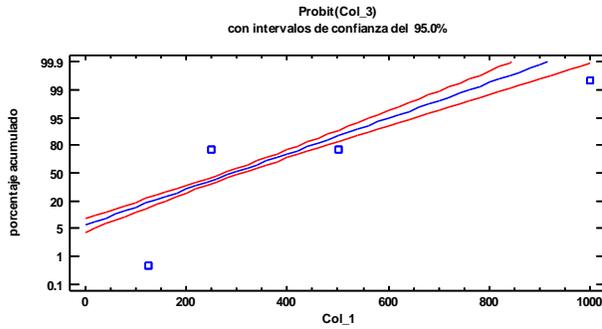
T⁶ MDT-01 a



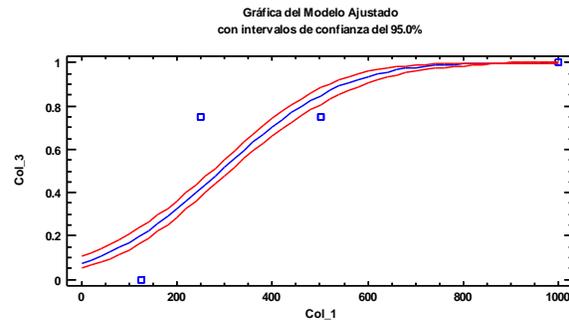
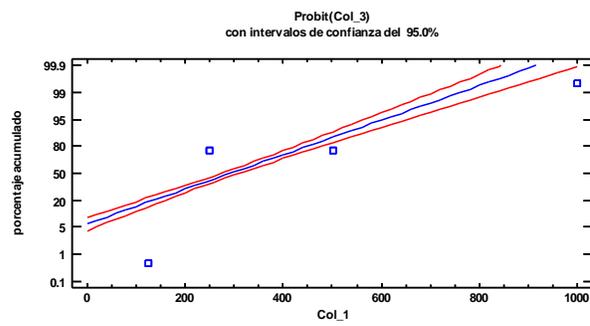
T⁷ MDT-01 b



T⁸ MDT-01 c

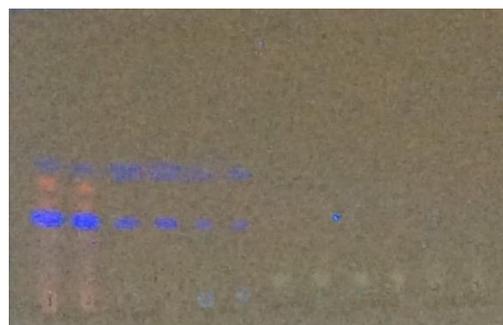
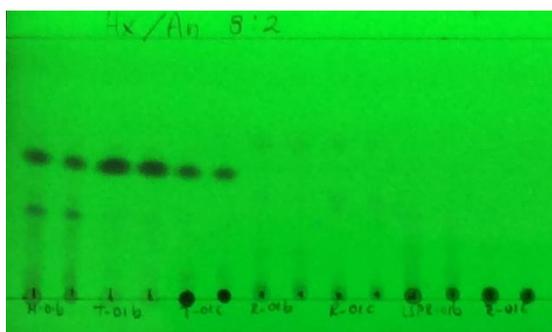


T¹² MDR-01 c

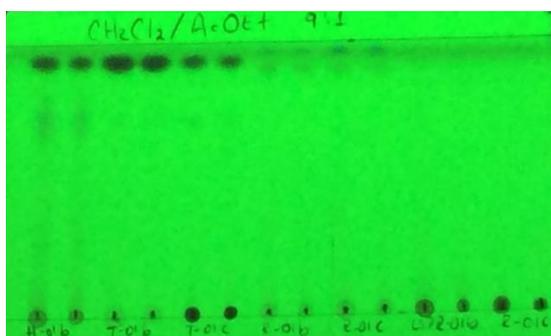


CROMATOGRAMAS DE CAPA FINA LUZ UV E INFRARROJO
Fracciones más activas de *Mosannonna depressa* y *Licaria* sp.

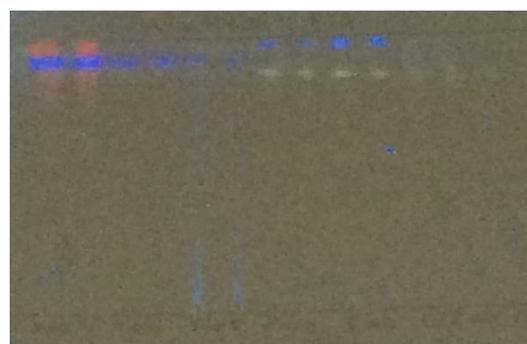
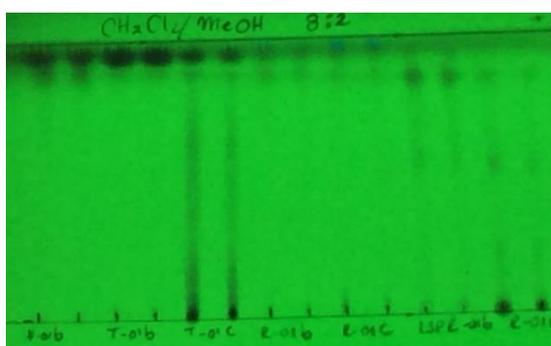
Baja polaridad



Mediana polaridad



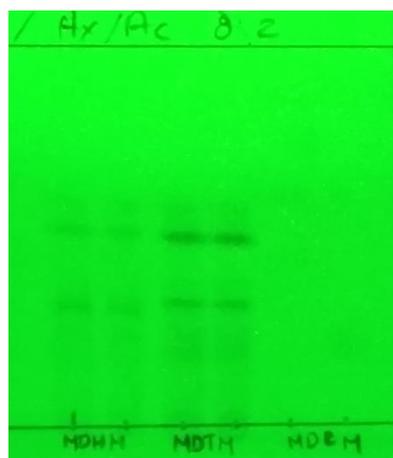
Alta polaridad



Hb: Fracción de acetonitrilo Hoja
 Tb: Fracción de acetonitrilo Corteza
 Tc: Precipitado corteza
 Rb: Fracción de acetonitrilo Raíz
 Rc: Precipitado Raíz

CROMATOGRAMAS DE CAPA FINA EN LUZ UV E INFRARROJO
Fracciones metiladas de *Mosannonna depressa*

Baja polaridad



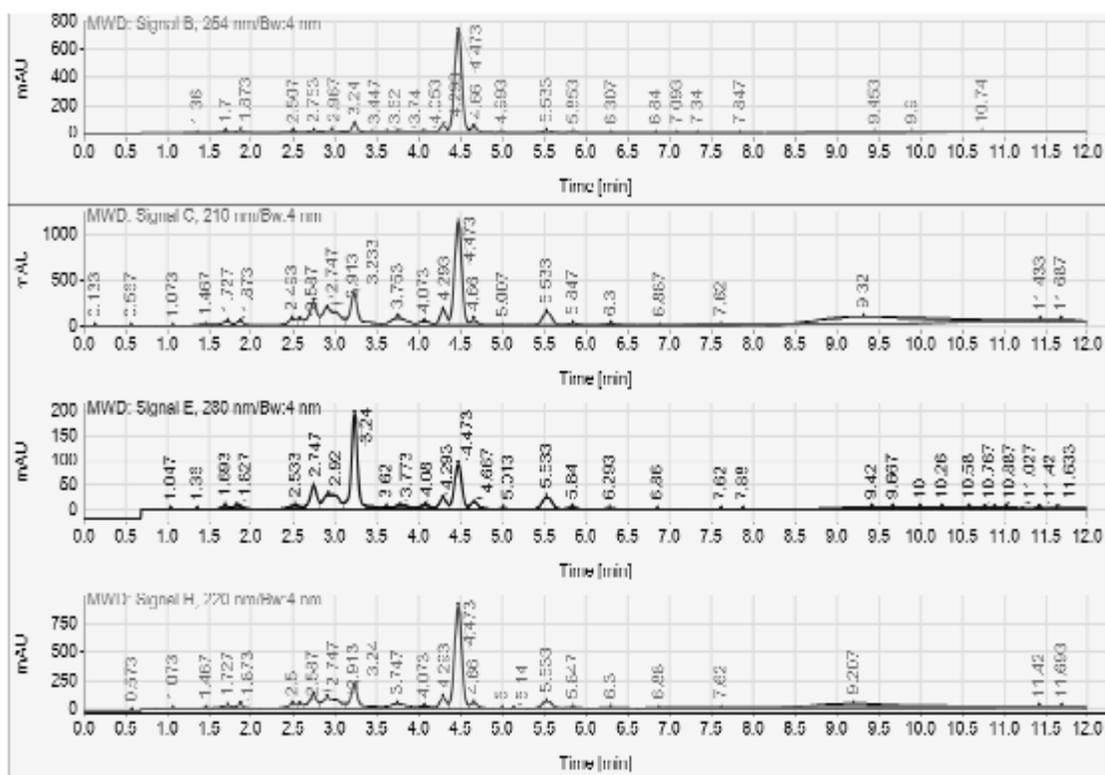
Mediana polaridad



CROMATOGRAMAS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE FRACCIONES DE *Mosanona depressa*



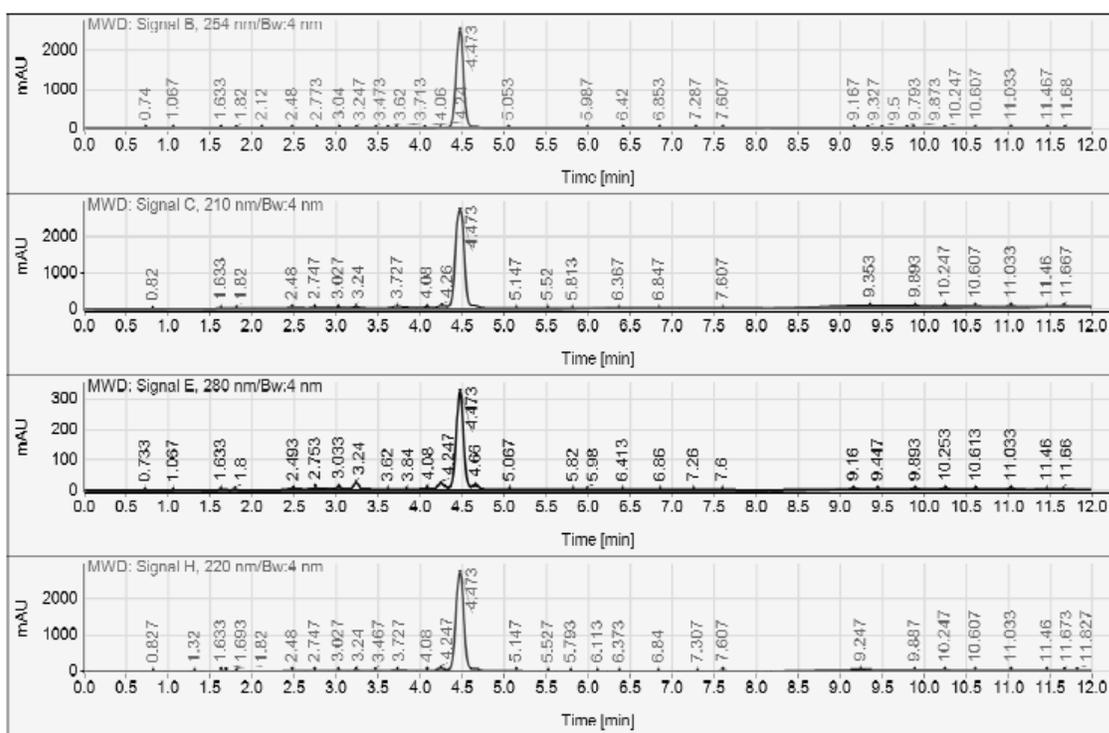
Data file: 007-MDH-01B2018-05-03 13-08-55 (GMT -05-00).dat
 Sample name: 007-MDH-01B
 Injection date: 5/3/2018 1:07:33 PM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\007-MDH-01B.rsl\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 10/24/2017 3:31:38 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18/ 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: 19
 MDH-01B
 Flujo: 1ml/min.
 Concentraci3n: 1 mg/ml



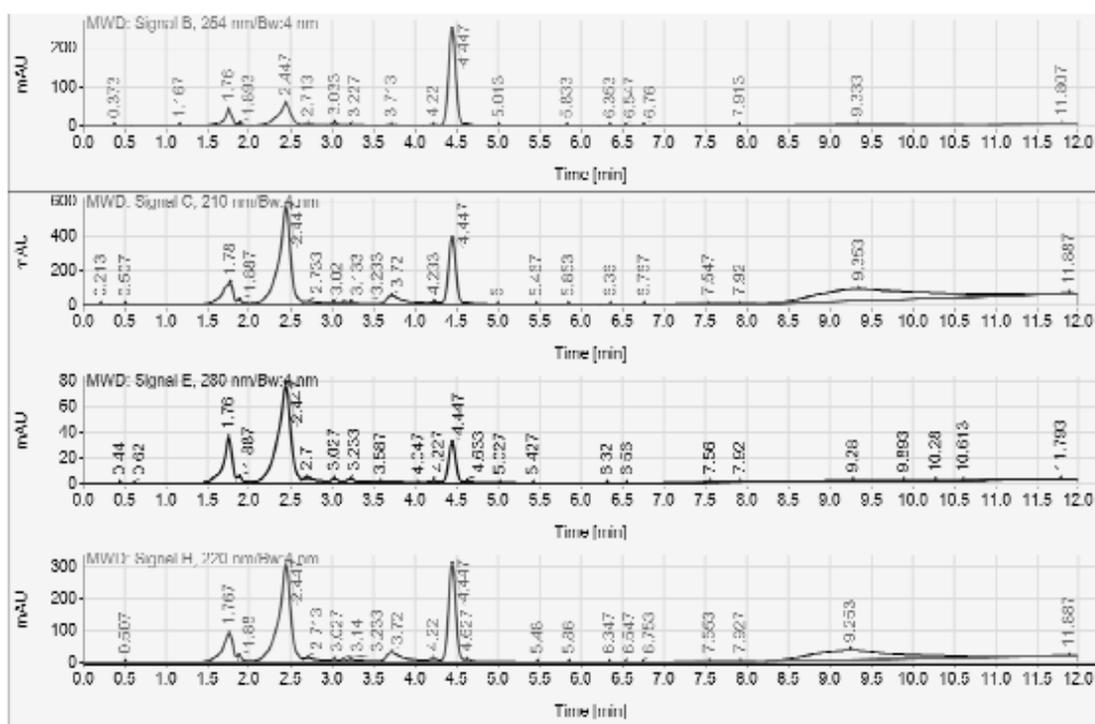
Data file: 005-MDT-01B2018-05-03 11-39-43 (GMT -05-00).dat
 Sample name: 005-MDT-01B
 Injection date: 5/3/2018 11:40:19 AM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\M arcelal\Result\005-MDT-01B.rsl\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 10/24/2017 3:31:38 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: 19
 MDT-01B
 Flujo: 1ml/min.
 Concentracion: 1 mg/ml



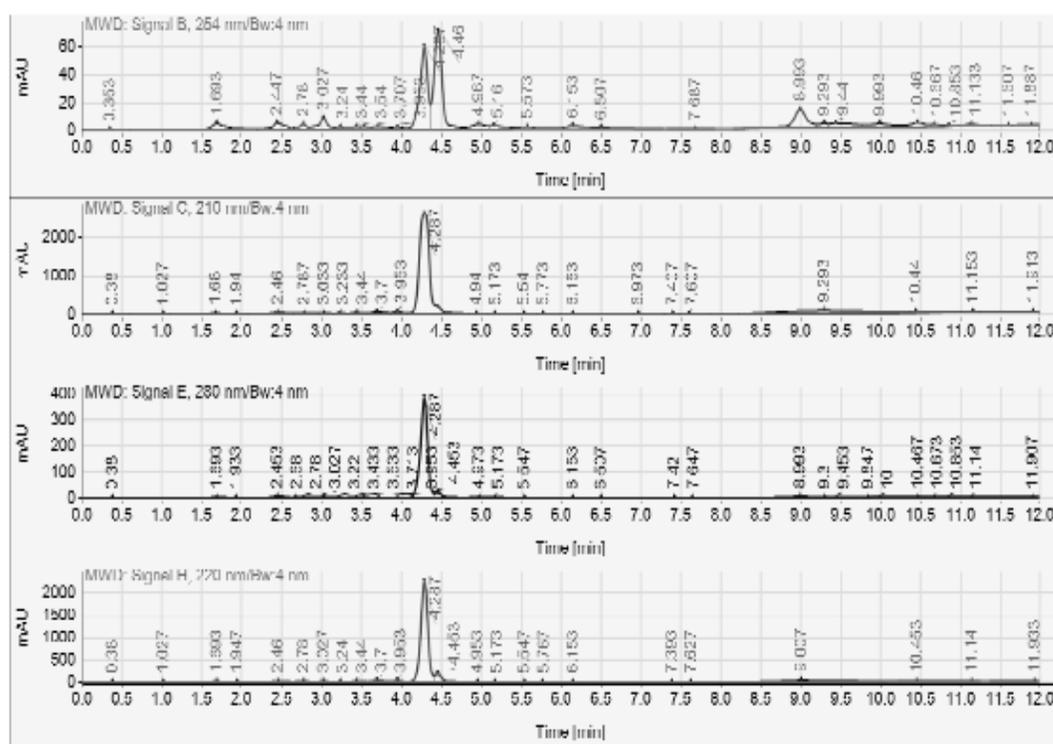
Data file: 003-MDT-01C2018-05-03 11-05-10 (GMT -05-00).dat
 Sample name: 003-MDT-01C
 Injection date: 5/3/2018 11:05:54 AM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\M arcela\Result\003-MDT-01C.rslt\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 10/24/2017 3:31:38 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: 19
 MDT-01C
 Flujo: 1ml/min.
 Concentracion: 1 mg/ml



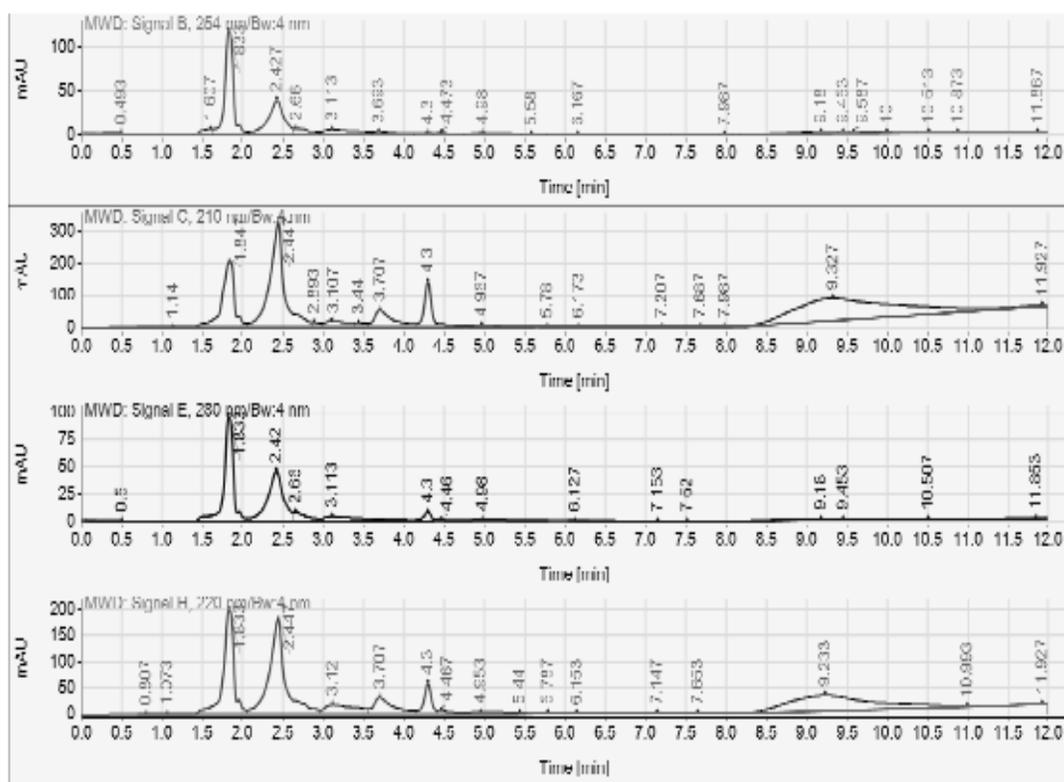
Data file: 001-MDR-01B2018-05-03 10-30-58 (GMT -05-00).dat
 Sample name: 001-MDR-01B
 Injection date: 5/3/2018 10:31:39 AM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\001-MDR-01B.rsl\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 10/24/2017 3:31:38 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18/ 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: 19
 MDR-01B
 Flujo: 1ml/min.
 Concentracion: 1 mg/ml



Data file: 002-MDR-01C2018-05-03 10:47-07 (GMT -05-00).dat
 Sample name: 002-MDR-01C
 Injection date: 5/3/2018 10:47:50 AM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\002-MDR-01C.rsl\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 10/24/2017 3:31:38 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: 19
 MDR-01C
 Flujo: 1ml/min.
 Concentraci3n: 1 mg/ml

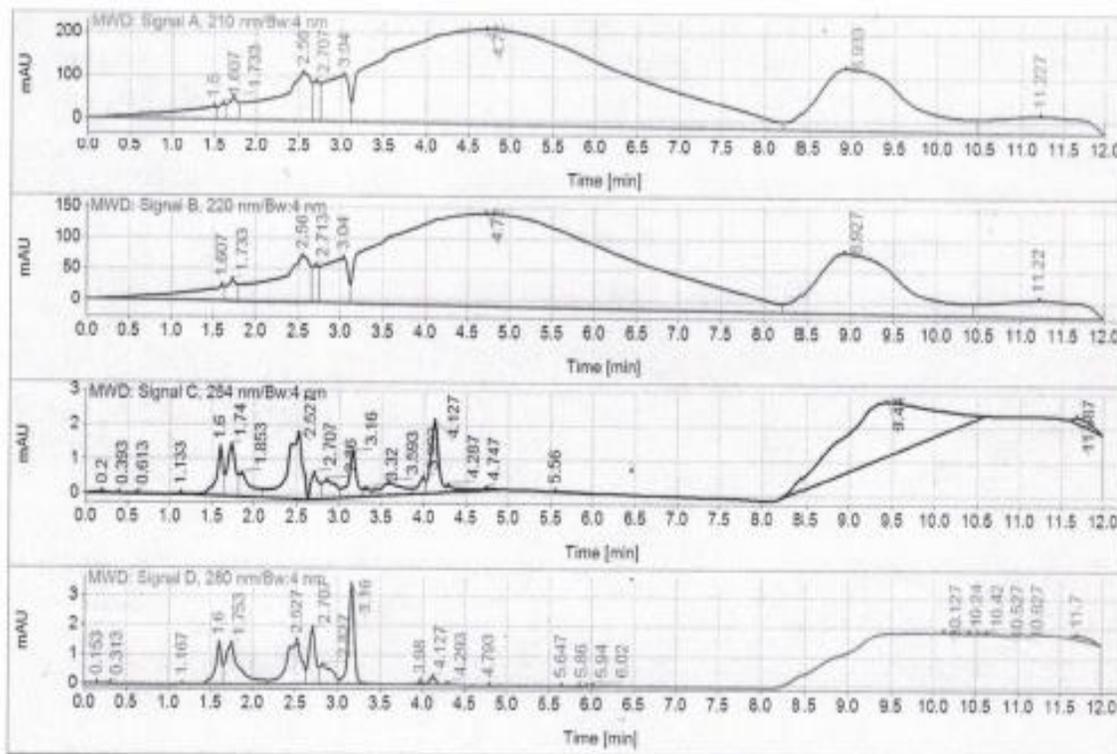
Sequence Summary Report

Accurio



Agilent Technologies

Data file: MDH (003)2018-07-10 14-24-43 (GMT -05-00).dat
 Sample name: MDH (003)
 Injection date: 7/10/2018 2:25:17 PM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\M arcela\Result\MDH (003).rst\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 7/10/2018 2:17:15 PM

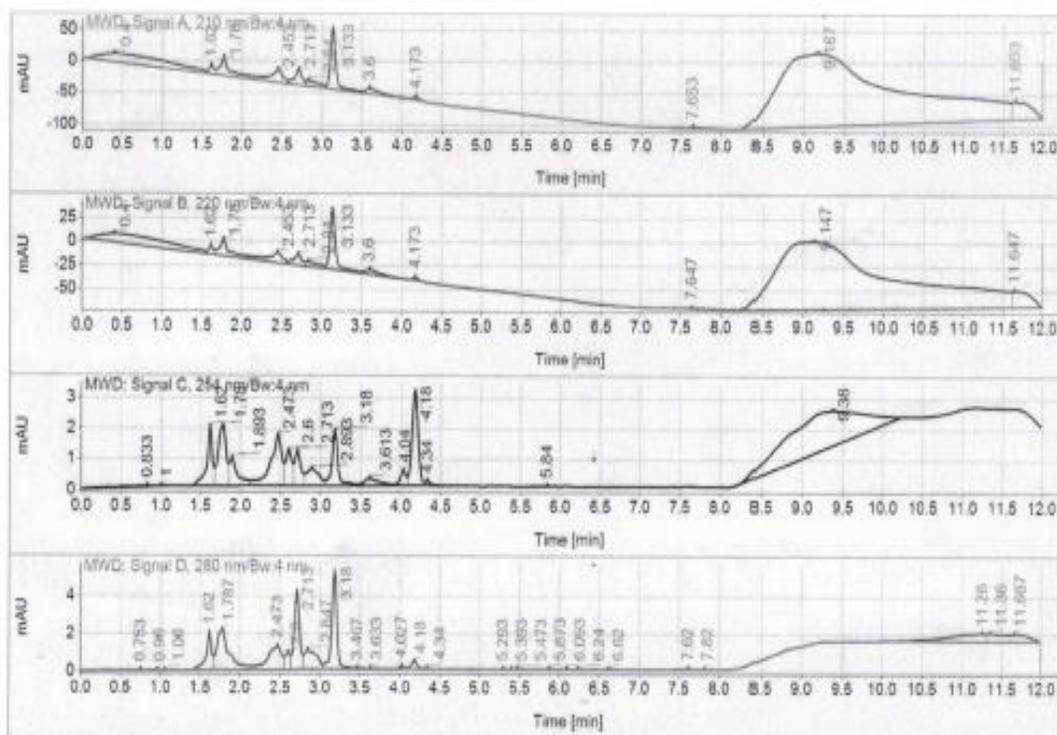


Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: M-19 MeOH/Agua 90:10 (5'), MeOH 100 (6') (8'),
 MeOH/Agua 90:10 (12')

Sequence Summary Report



Data file: MDT (001)2018-07-10 14-40-16 (GMT -05-00).dat
 Sample name: MDT (001)
 Injection date: 7/10/2018 2:40:48 PM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Warcela\Result\MDT (001).rs\1\M-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 7/10/2018 2:17:15 PM



Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: M-19 MeOH/Agua 90:10 (5'), MeOH 100 (6') (8'),
 MeOH/Agua 90:10 (12')

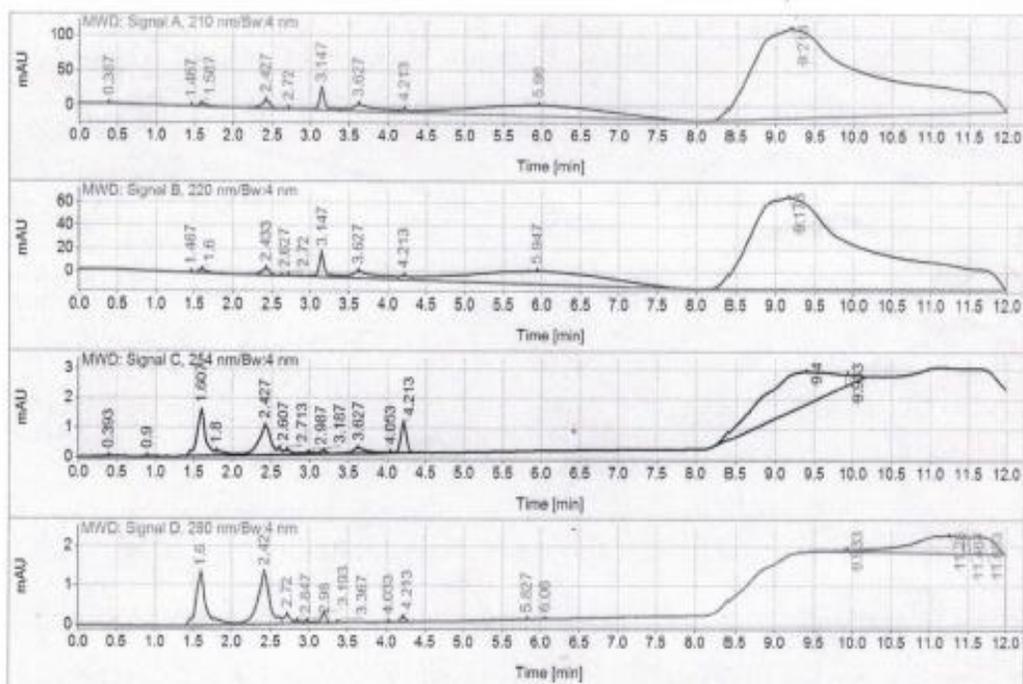
Sequence Summary Report

A0023



Agilent Technologies

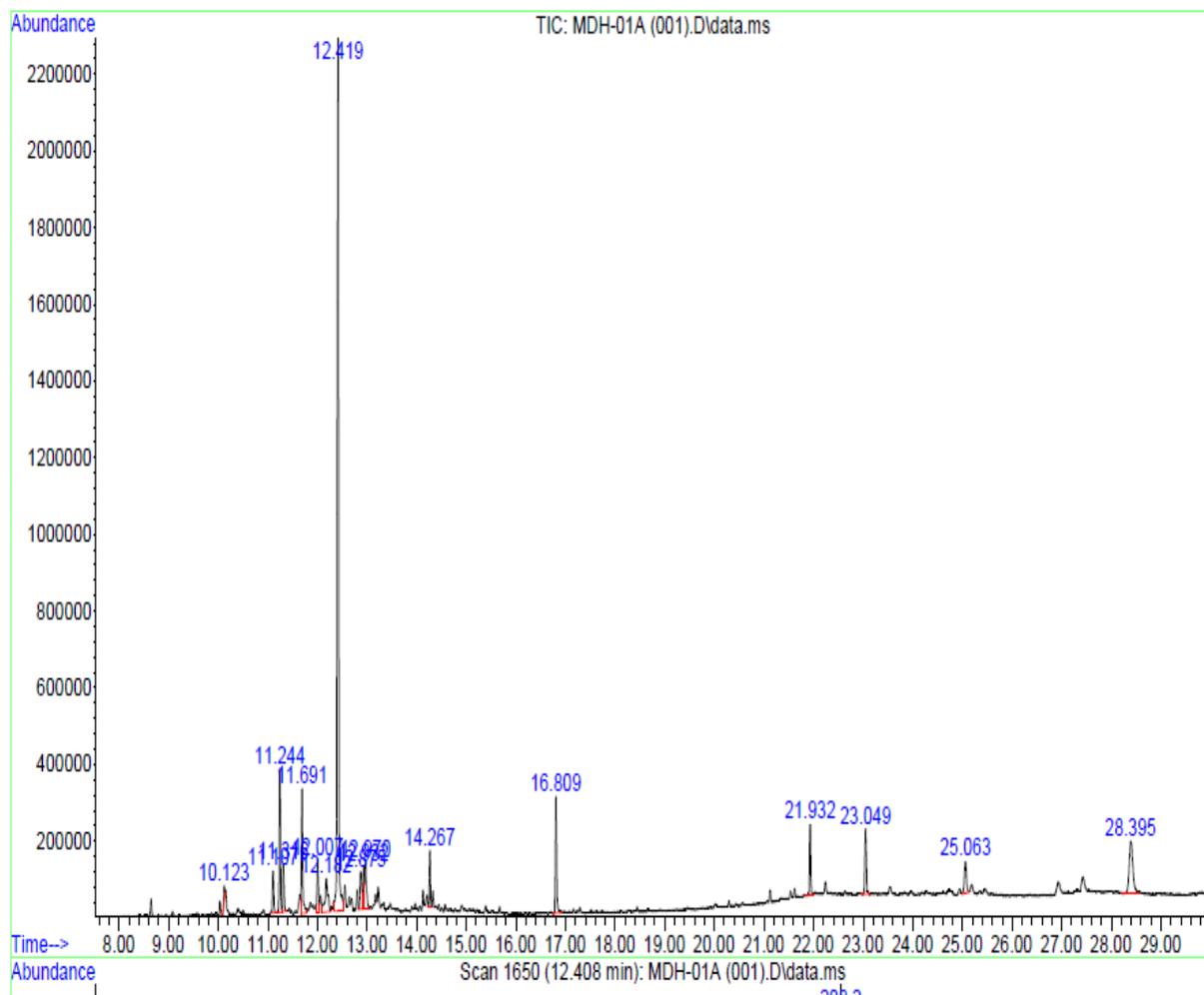
Data file: MDR (001)2018-07-10 14-56-11 (GMT -05-00).dat
 Sample name: **MDR (001)**
 Injection date: 7/10/2018 2:56:46 PM Sample type: Sample
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Warcela\Result\MDR (001).rs\TM-19.met Location:
 Analysis method: M-19.met Injection: 1
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:
 Last changed: 7/10/2018 2:17:15 PM



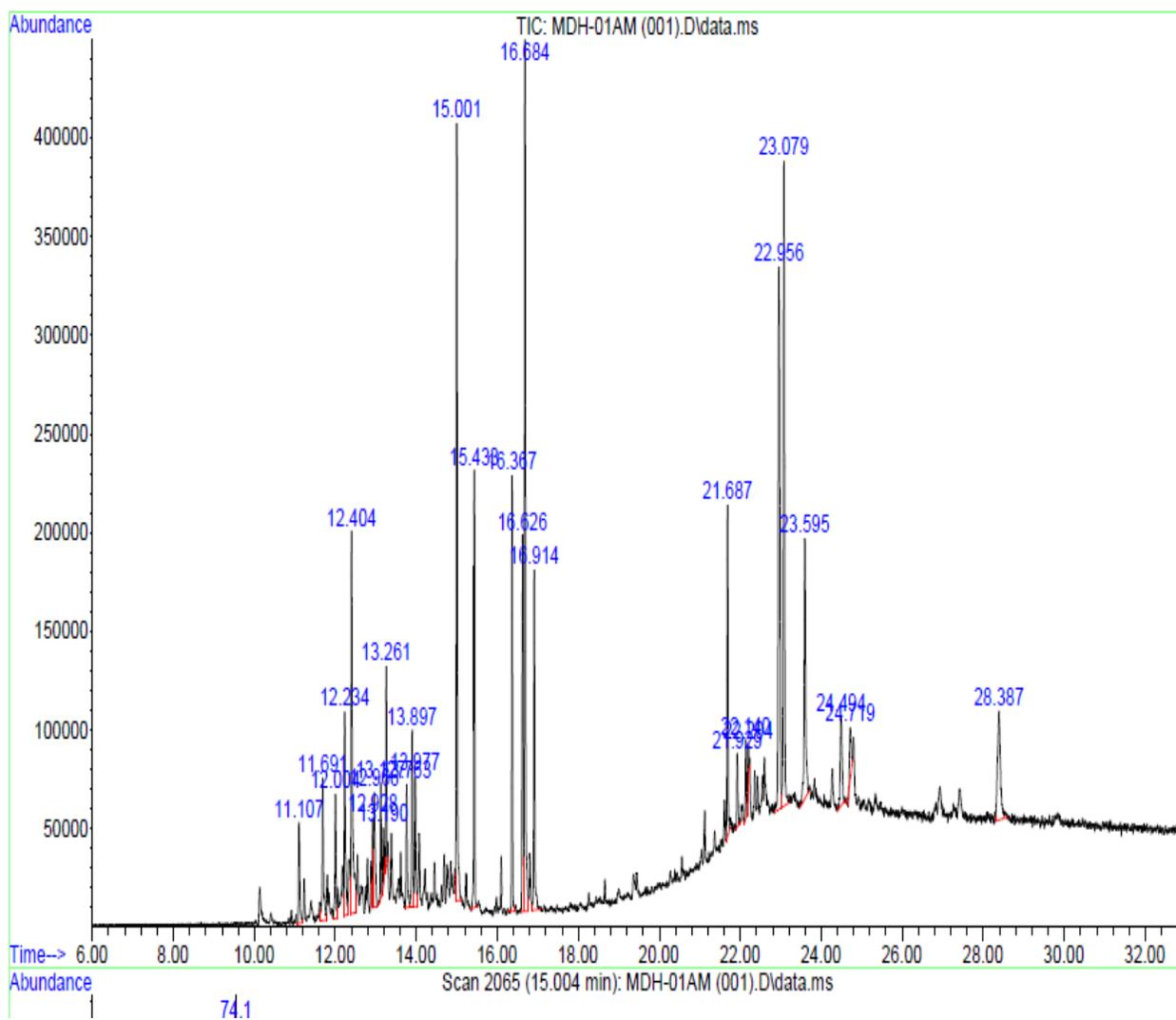
Sample_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm
 Metodo: M-19 MeOH/Agua 90:10 (5'), MeOH 100 (6') (8'),
 MeOH/Agua 90:10 (12')

CROMATOGRAMAS DE GASES-MASAS DE FRACCIONES DE
Mosanona depressa

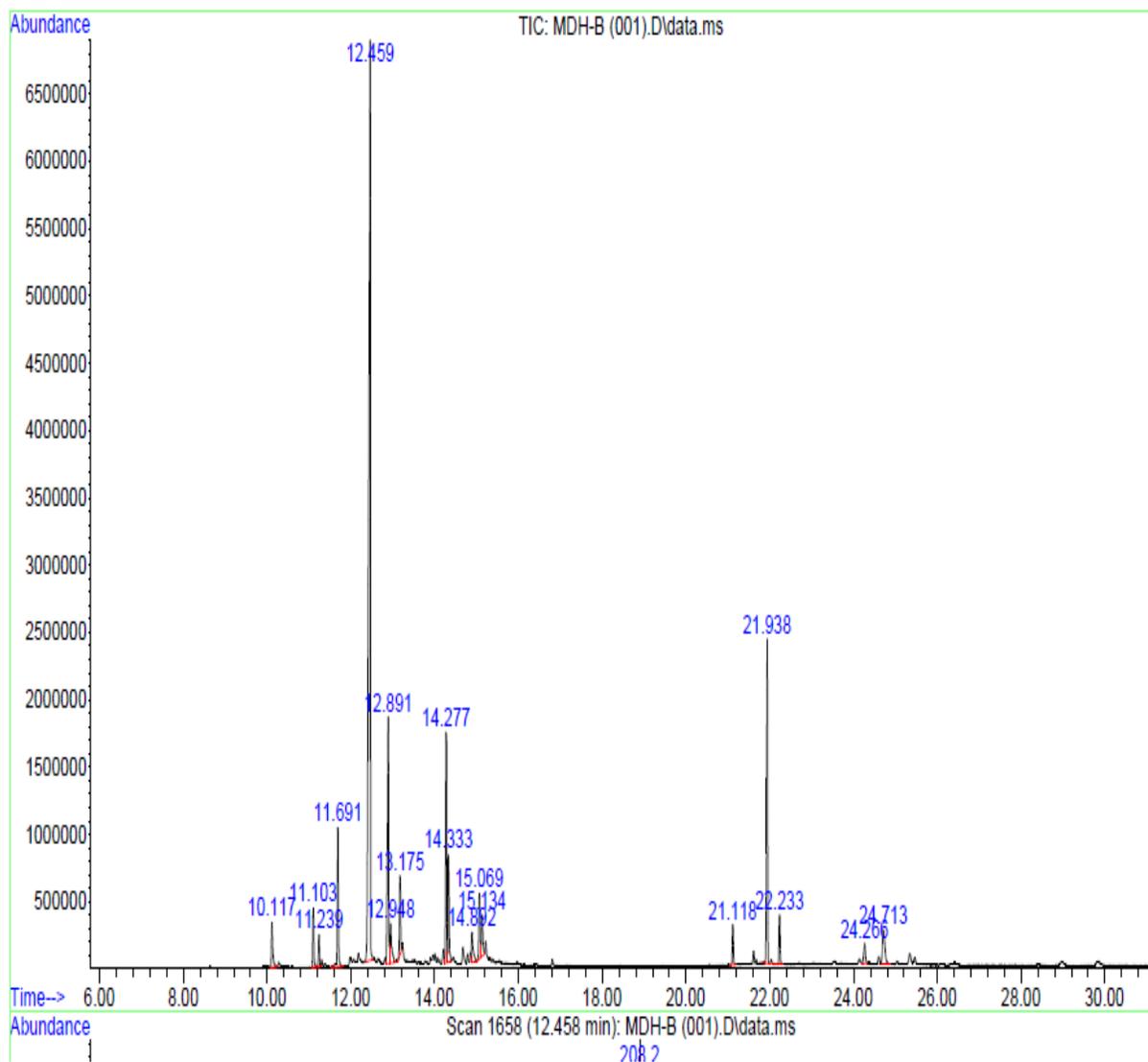
MDH-01a



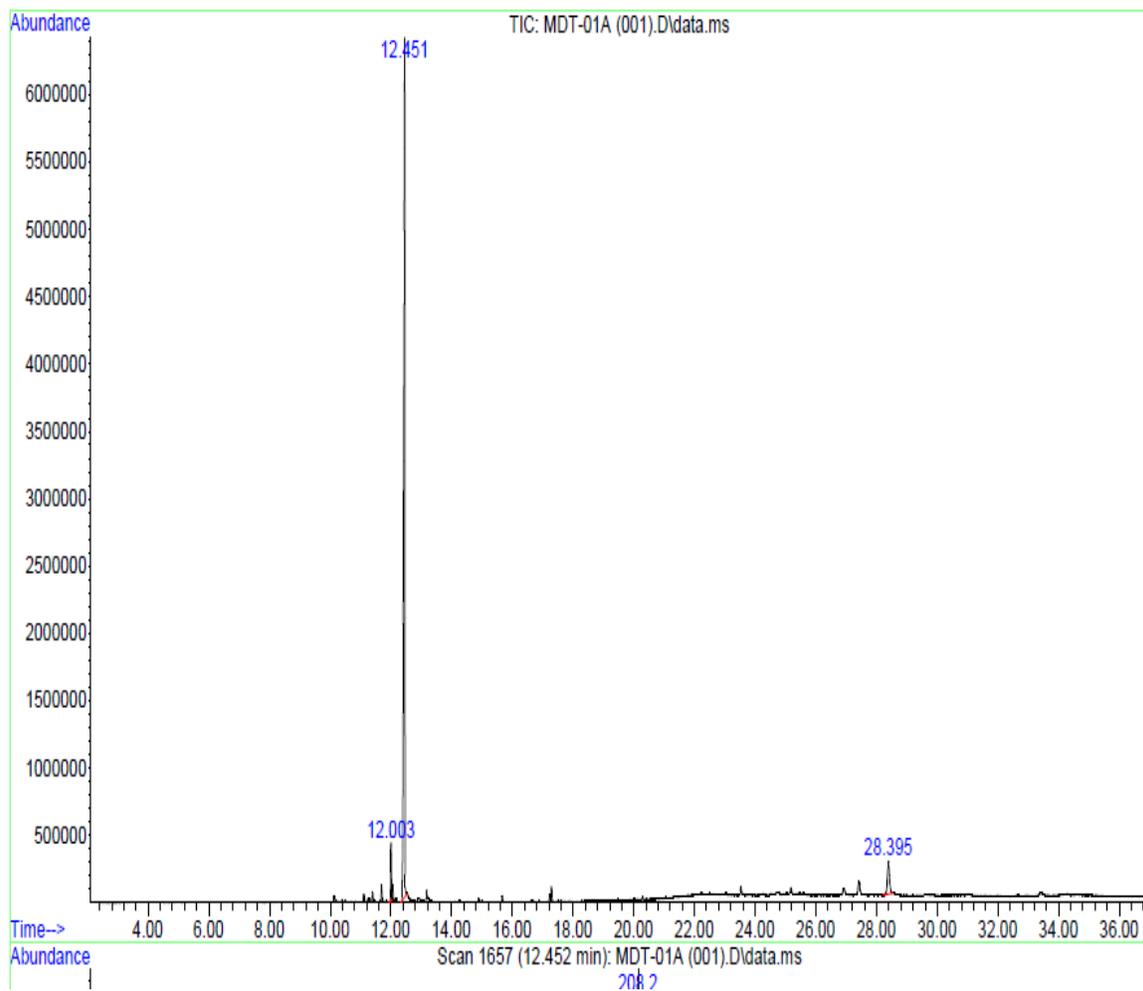
MDH-01aM



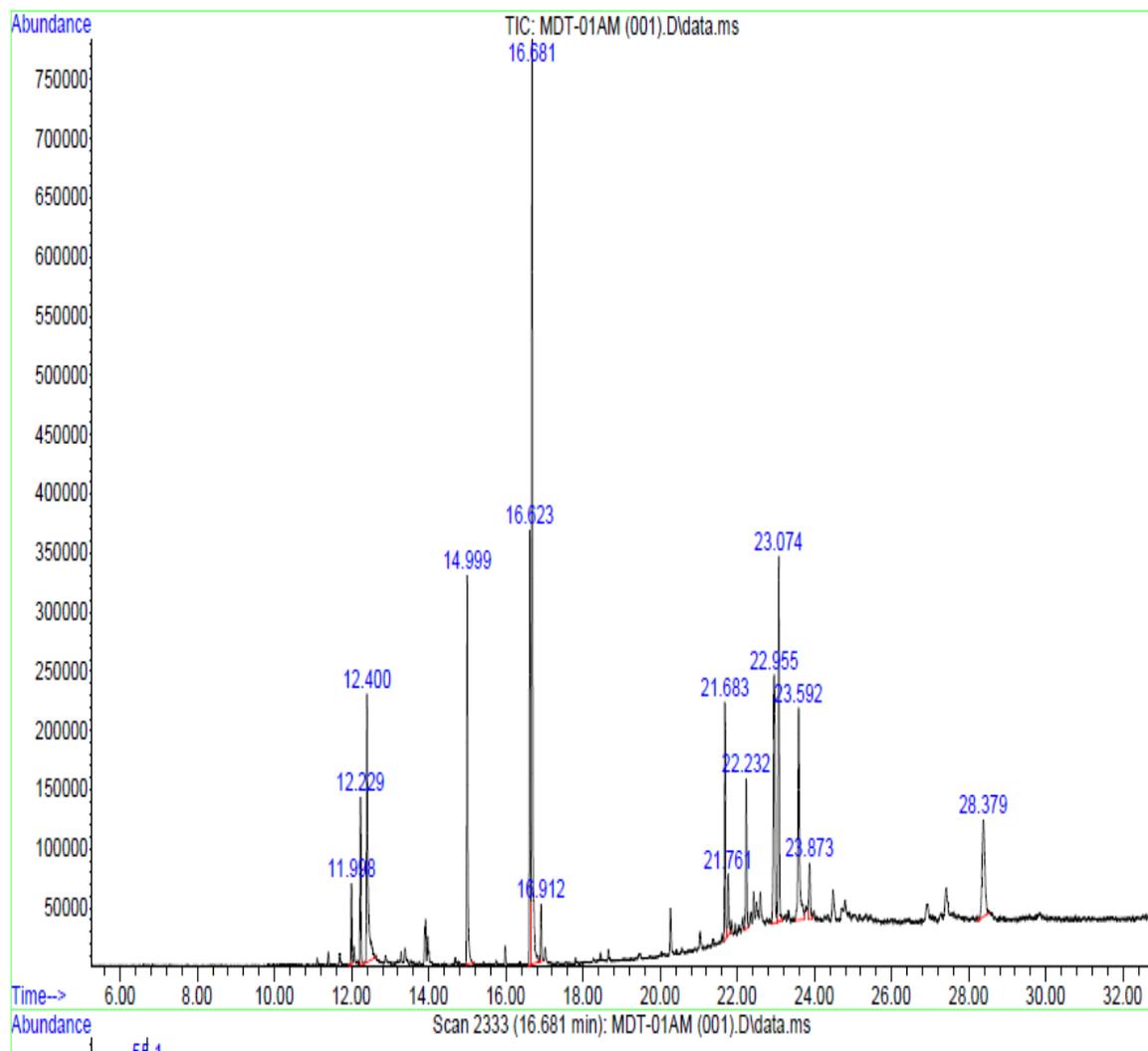
MDH-b



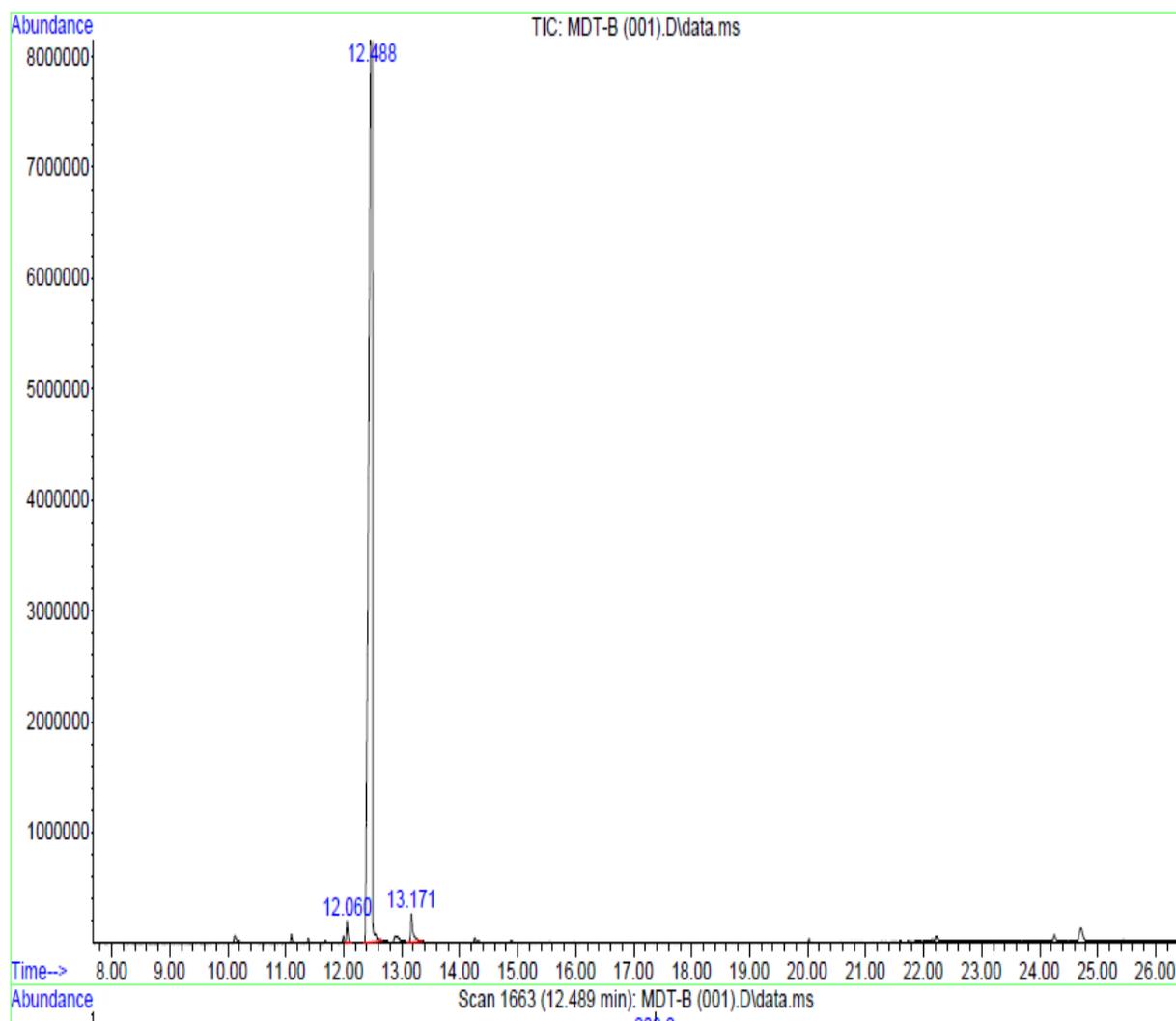
MDT-01a



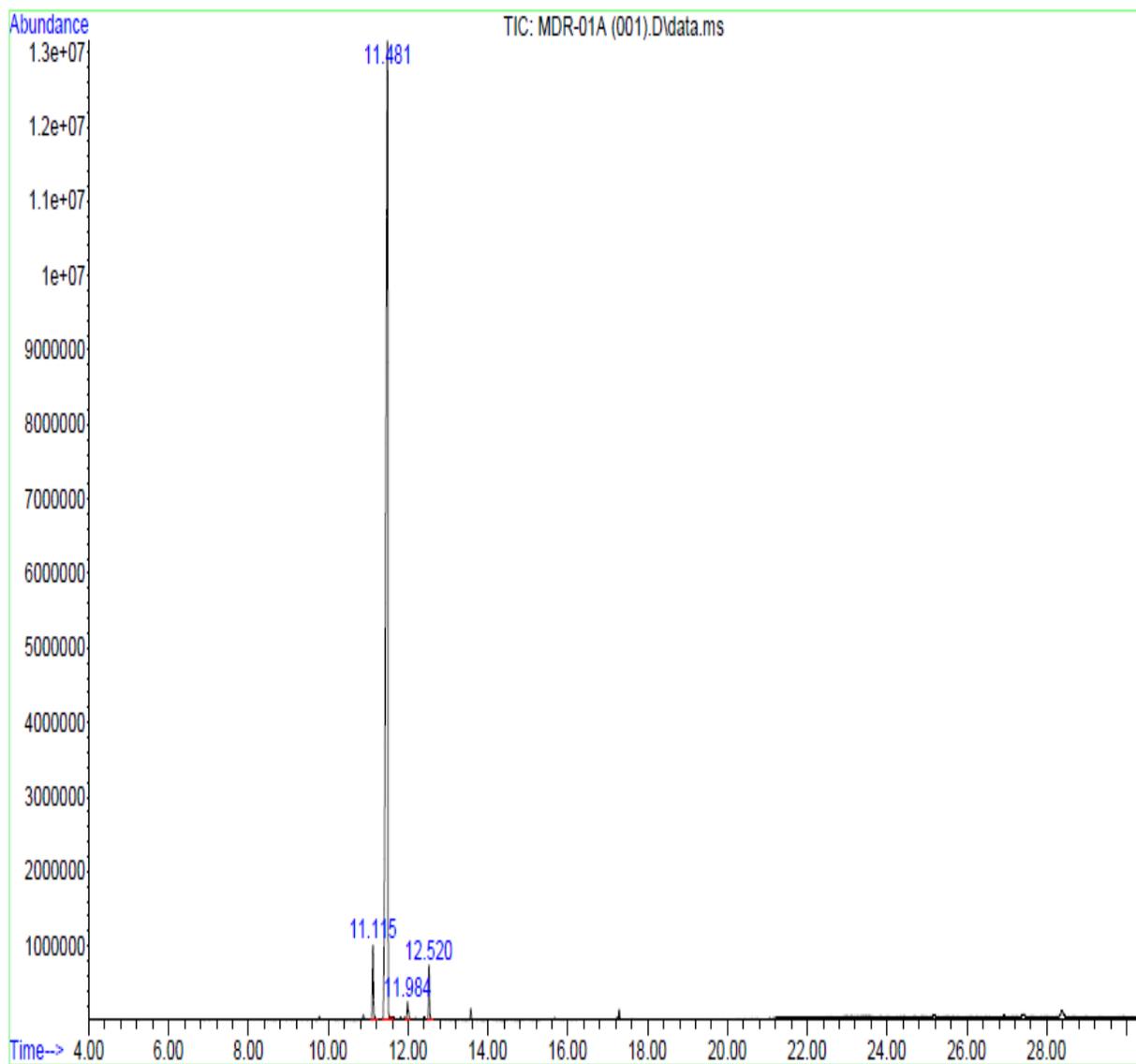
MDT-01aM



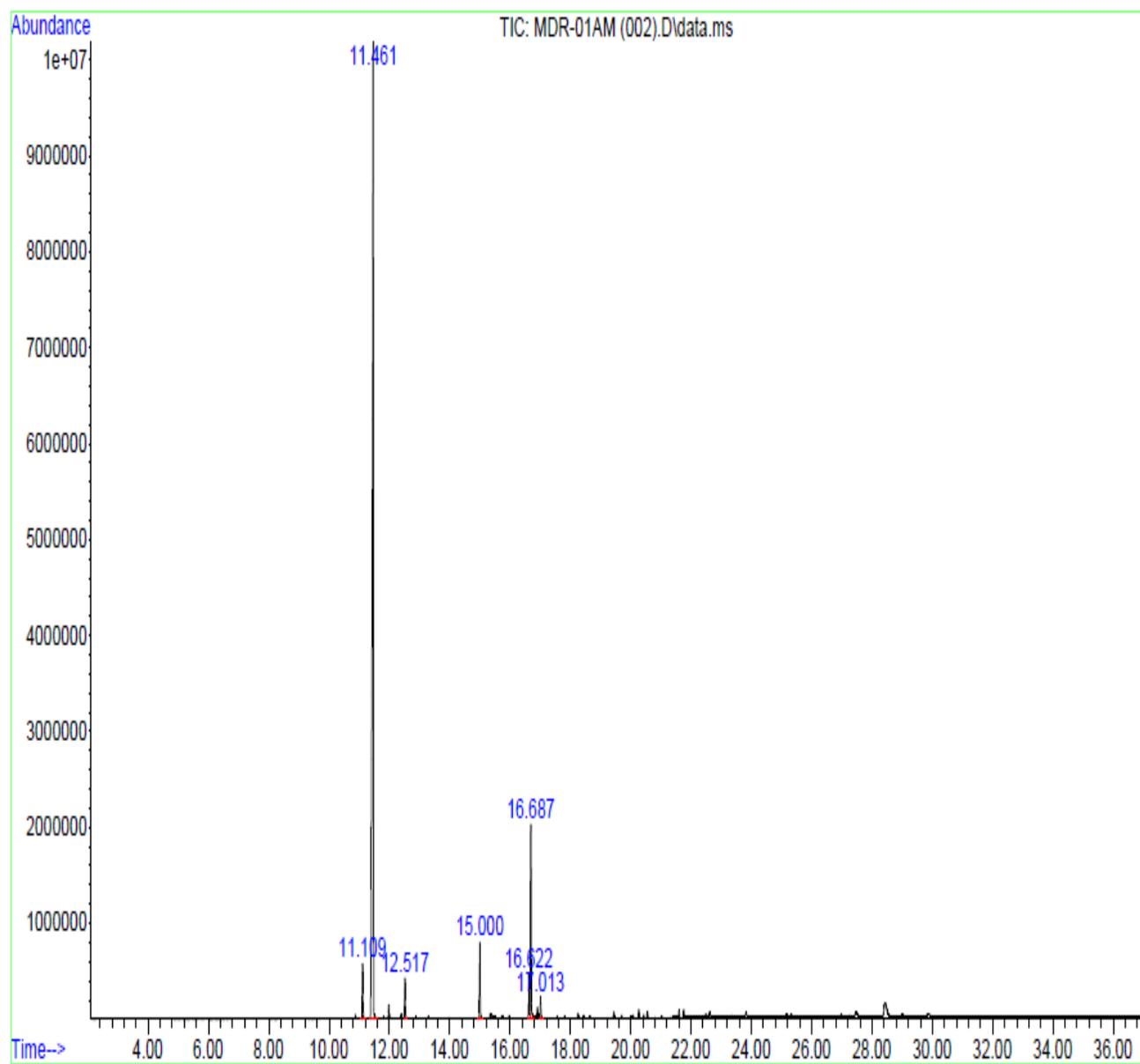
MDT-b



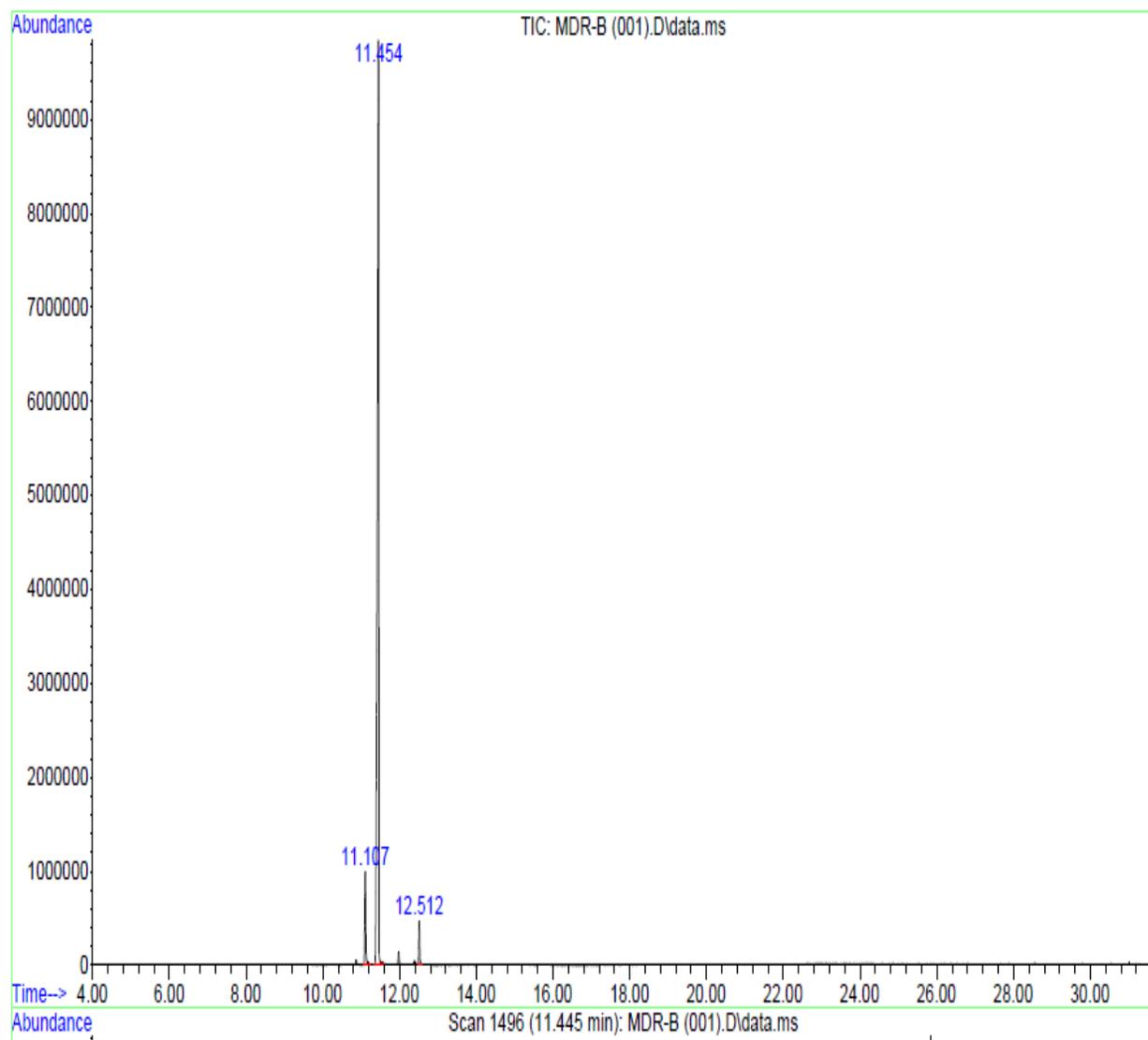
MDR-01a

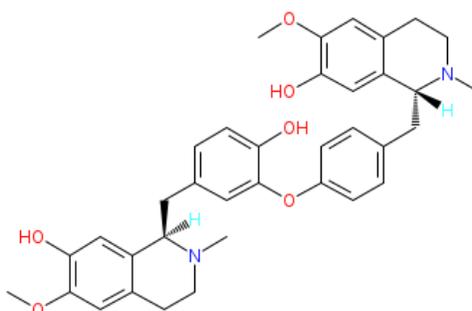


MDR-01aM



MDR-b



COMPUESTO REPORTADO EN CORTEZA DE *M. depressa***Guattegaumerine**

(Dehaussy *et al.*, 1983)

No encontrado en este trabajo de investigación