



**Ciencia y Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**PROPIEDAD ANTIFÚNGICA Y CUANTIFICACIÓN DE  
MAGNOFLORINA EN COLECTAS ESTACIONALES DE  
EXTRACTOS DE RAÍZ DE *Croton chichenensis***

Tesis que presenta

**NARCISO COUOH CHAN**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: **Biotecnología**)

Mérida, Yucatán, México

**2025**

*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 Narciso Couoh Chan titulado **Propiedad Antifúngica y Cuantificación de Magnoflorina en Colectas Estacionales de Extractos de Raíz de *Croton chichenensis***, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de Biotecnología de Productos Naturales, en el laboratorio de Química de Productos Naturales, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. José Luis Hernández Stefanoni  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 22 de enero de 2025.

Mérida, Yucatán, México, a 20 de enero de 2025.

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

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

Firma:  \_\_\_\_\_  
Narciso Couoh Chan

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra. Marcela Gamboa Angulo por darme la oportunidad de ser parte del grupo de trabajo del laboratorio de productos naturales y por su acompañamiento para desarrollar el proyecto de tesis, mediante sus correcciones, observaciones y retroalimentaciones.
- Al Dr. Sergio Peraza Sánchez, a la Dra. Yolanda Ríos Gómez, por las retroalimentaciones, observaciones, dudas y correcciones en los exámenes tutoriales, durante el periodo de la maestría.
- A la Q.I. Leticia Medina Baizabal, por todo el apoyo que me brindó en el laboratorio, su paciencia al explicar las técnicas, las precauciones que se debe tener, también por compartir su experiencia para reducir errores en la realización de los experimentos.
- Al Mtro. Luis Wiliunfo Torres Tapia, por compartir su experiencia y conocimiento acerca de las técnicas de cromatografía.
- A todos mis compañeros del grupo de trabajo: Christian, Jesús, Karla, Manuel, Renata, Ricardo y Sandy, por sus observaciones, sugerencias y comentarios constructivos, que me ayudaron a mejorar mi trabajo.
- A todos mis compañeros de clases, a quienes, tuve la oportunidad de conocer y aprender algo de su forma de pensar.
- A todos los profesores que impartieron los cursos, compartieron sus conocimientos y consejos para mejorar, no solo profesional, incluso en la vida.
- Al CONAHCYT, por la beca otorgada durante el periodo del posgrado, No. 830463.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. EUPHORBIACEAE	3
1.2. GÉNERO <i>Croton</i>	4
1.3. <i>Croton chichenensis</i>	5
1.3.1 Taxonomía y Distribución de <i>Croton chichenensis</i>	5
1.3.2. Propiedades Biológicas de <i>Croton chichenensis</i>	6
1.4. FITOQUÍMICA DE <i>Croton chichenensis</i>	8
1.5. EL ALCALOIDE MAGNOFLORINA	9
1.5.1 Actividad Biológica de la Magnoflorina	10
1.5.2 Pruebas para Identificar Alcaloides	11
1.6. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	11
1.7. VARIACIÓN ESTACIONAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS	12
1.8. HONGOS FITOPATÓGENOS EN ESTUDIO	13
1.8.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	13
1.8.2 <i>Corynespora cassiicola</i>	14
1.9. JUSTIFICACIÓN	16
1.10. HIPÓTESIS	17
1.11. OBJETIVO GENERAL	17
1.11.1 Objetivos Específicos	17
1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
CAPITULO II	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. COLECTA DE LA PLANTA EN ESTUDIO	19
2.2. EQUIPOS Y MATERIAL UTILIZADO	19
2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	20
2.3.1. Extractos Etanólicos Crudos (EECs)	20
2.3.2 Extractos Acuosa (EAs)	20
2.3.3 Extractos Etanólicos Desengrasados de Colectas Estacionales	21
2.4. PURIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA	22

2.5. CUANTIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA	24
2.5.1 Curva de Calibración de Magnoflorina con Cafeína	25
2.5.3. Cuantificación de Magnoflorina en las Colectas Estacionales	26
2.6. ENSAYO DE ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO CRUDO DE <i>Croton chichenensis</i> EN <i>Eisenia fetida</i>	27
2.6.1 Procedimiento del Ensayo De Ecotoxicidad	27
2.7. BIOENSAYO ANTIFÚNGICO	29
2.7.1 Reactivación de Cepas	29
2.7.2 Bioensayo Antifúngico en Microdilución	29
CAPITULO III	31
RESULTADOS Y MÉTODOS	31
3.1. RENDIMIENTO DE EXTRACTOS OBTENIDOS	31
3.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA	32
3.3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE MAGNOFLORINA CON ESTÁNDAR INTERNO	35
3.3.1 Contenido de Magnoflorina en Extractos Etanólicos Desengrasados (EED) y Acuosos	39
3.4. RESULTADO DEL ENSAYO DE ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO CRUDO DE <i>Croton chichenensis</i> EN <i>Eisenia fetida</i>	42
3.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	43
3.4.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	43
3.4.2 <i>Corynespora cassiicola</i>	46
CAPITULO IV	48
DISCUSIÓN GENERAL	48
CAPITULO V	52
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
5.1. CONCLUSIONES	52
5.2. PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS	54

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1.</b> Especies de <i>Croton</i> y sus aplicaciones en medicina tradicional en Latinoamérica.	4
<b>Cuadro 1.2.</b> Resumen de los estudios realizados de la actividad biológica de <i>C. chichenensis</i> contra fitopatógenos.	6
<b>Cuadro 1.3.</b> Presencia de magnoflorina en diferentes familias y especies de plantas.	10
<b>Cuadro 2.1.</b> Colectas estacionales de las raíces de <i>Croton chichenensis</i> en el municipio de Baca, Yucatán.	19
<b>Cuadro 2.2.</b> Fitopatógenos en estudio aislados de la raíz de chile habanero; y en las hojas de tomate respectivamente.	29
<b>Cuadro 3.1.</b> Extractos de raíz de <i>C. chichenensis</i> y sus rendimientos.	31
<b>Cuadro 3.2.</b> Rendimiento de la extracción ácido-base con butanol del extracto etanólico desengrasado.	33
<b>Cuadro 3.1.</b> Rendimiento de las Sub-fracciones por CLV del extracto etanólico desengrasado de la raíz de <i>Croton chichenensis</i> .	33
<b>Cuadro 3.4.</b> Patrones de curva de calibración de magnoflorina y ecuación de regresión.	36
<b>Cuadro 3.5.</b> Contenido de magnoflorina en raíz de <i>C. chichenensis</i> en colectas estacionales (mg/g de material vegetal seco).	39
<b>Cuadro 3.6.</b> Resultado de bioensayo de ecotoxicidad y dosis letal del extracto etanólico crudo de <i>C. chichenensis</i> (raíz) contra <i>Eisenia fetida</i> , después de 72 h de exposición.	44
<b>Cuadro 3.7.</b> Inhibición de Crecimiento Micelial (% ICM) y Concentraciones Inhibitorias Medias (CI <sub>50</sub> ) de extractos de raíz de <i>C. chichenensis</i> y del alcaloide magnoflorina contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	45
<b>Cuadro 3.8.</b> Inhibición de Crecimiento Micelial (%ICM) y Concentraciones Inhibitorias Medias (CI <sub>50</sub> ) de extractos de raíz de <i>C. chichenensis</i> y del alcaloide magnoflorina contra <i>C. cassiicola</i> .	

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Algunas especies de <i>Croton</i> en la Península de Yucatán. Fuente: Flora de la Península de Yucatán.	5
<b>Figura 1.2.</b> <i>Croton chichenensis</i> Lundell	5
<b>Figura 1.3.</b> A. Distribución, parte de Estados Unidos y México hasta Nicaragua. B. Densidad de la población de <i>C. chichenensis</i> en la península de Yucatán.	6
<b>Figura 1.4.</b> Estructura química de los metabolitos de la raíz de <i>Croton chichenensis</i> .	9
<b>Figura 1.5.</b> Estructura de la magnoflorina.	9
<b>Figura 1.6.</b> A). Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> papa dextrosa agar.	13
<b>Figura 1.7.</b> A) Morfología de <i>Corynespora casiicola</i> en PDA.	14
<b>Figura 1.8.</b> Diagrama de la estrategia experimental desde la colecta de la planta, tratamiento, evaluaciones y cuantificación de magnoflorina de la raíz de <i>Croton chichenensis</i> .	18
<b>Figura 2.1.</b> Diagrama de obtención de extractos etanólicos por maceración.	20
<b>Figura 2.2.</b> Diagrama de la obtención de extractos acuosos.	21
<b>Figura 2.3.</b> Procedimiento para la obtención de extractos etanólicos desengrasados (EED), de las colectas seriadas.	22
<b>Figura 2.4.</b> Procedimiento de extracción ácido-base del extracto etanólico desengrasado.	23
<b>Figura 2.5.</b> Procedimiento para el aislamiento de magnoflorina.	24
<b>Figura 2.6.</b> Diagrama del procedimiento general de la cuantificación de magnoflorina en los extractos de raíz de <i>C. chichenensis</i> de colectas estacionales.	25
<b>Figura 2.7.</b> Procedimiento para preparar los patrones de la curva de calibración de magnoflorina con cafeína como estándar interno.	26
<b>Figura 2.8.</b> Procedimiento para preparar las muestras de las cuatro colectas, EED y extractos acuosos, para la cuantificación de magnoflorina, enriquecidos con cafeína como estándar interno.	27
<b>Figura 2.9.</b> Diagrama del ensayo de ecotoxicidad en <i>Eisenia fetida</i> , 20 réplicas por cada concentración evaluada.	29
<b>Figura 2.10.</b> Placa de microdilución de 96 micropocillos.	30
<b>Figura 3.1.</b> Cromatogramas en cada delgada de los extractos etanólicos desengrasados y acuosos, colectas de octubre 2022, enero, abril y julio 2023.	32
<b>Figura 3.2.</b> Detección de magnoflorina (Mag) por CCD en las sub-fracciones obtenidas de la CLV de la raíz de <i>Croton chichenensis</i> .	34
<b>Figura 3.3.</b> Cromatogramas de las sub-fracciones 13, $t_R = 5.30$ ; 14-16, $t_R = 5.28$ ; y 17-18, $t_R = 5.46$ obtenidas de la CLV del EED de <i>Croton chichenensis</i> comparadas con el estándar de magnoflorina; $t_R = 5.28$ .	34

<b>Figura 3.4.</b> Separación de magnoflorina, $t_R = 5.36$ , y cafeína, $t_R = 7.75$ , con el método TEA-MeOH (Magno-02).	35
<b>Figura 3.5.</b> Linearidad de los patrones de magnoflorina con cafeína como estándar interno.	36
<b>Figura 3.6.</b> Cromatogramas de los patrones de la curva de calibración de magnoflorina.	38
<b>Figura 3.7.</b> Cromatogramas de líquidos de los extractos etanólicos desengrasados de las 4 colectas, cuantificando magnoflorina con cafeína como estándar interno.	40
<b>Figura 3.8.</b> Cromatogramas de líquidos de los extractos acuosos de las 4 colectas, cuantificando magnoflorina con cafeína como estándar interno.	42
<b>Figura 3.10.</b> Efecto antifúngico de los extractos etanólicos crudos, acuosos de <i>C. chichenensis</i> y magnoflorina contra <i>F. oxysporum</i> , observados en el microscopio a 5x.	45
<b>Figura 3.11.</b> Efecto antifúngico de los extractos etanólicos crudos, acuosos de <i>C. chichenensis</i> y magnoflorina contra <i>C. cassiicola</i> , observados en el microscopio a 5x.	47
<b>Figura 4.1.</b> Estructura de alfa y beta magnoflorina y del isómero laurifolina.	49

## LISTADO DE ABREVIATURAS

EEC: Extracto etanólico crudo

EA: Extracto acuoso

EED: Extracto etanólico desengrasado

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

%ICM: Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

C18: Octildecilsilano, gel de sílice de fase reversa.

PDA: Para Dextrosa Agar

CCRN: *Croton chichenensis* raíz

CCD: Cromatografía de Capa Delgada

AcOEt: Acetato de etilo

NaOH: Hidróxido de sodio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico

BuOH: *n*-butanol

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano

MeOH: Metanol

NH<sub>4</sub>OH: Hidróxido de amonio

TEA: Trietanolamina

*t*<sub>R</sub>: Tiempo de retención

mL: Mililitro

min: Minutos

μL: Microlitro

mg: Miligramo

DMSO: Dimetil sulfóxido.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium, en inglés, utilizado para cultivos celulares.

R<sub>f</sub>: Factor de retención (abreviado del inglés).

CM/CC: Concentración magnoflorina/Concentración cafeína

AM/AC: Área amgnoflorina/Área cafeína

CL<sub>50</sub>: Concentración Letal Media.

CI50: Concentración Inhibitoria Mínima

## RESUMEN

Los fitopatógenos afectan a una considerable parte de los cultivos y productos agrícolas en el mundo. El extensivo uso de fungicidas sintéticos ha provocado que estos microorganismos desarrollen resistencia, esto, junto con el aumento de regulación sobre el uso de los agroquímicos en general, ha llevado a la búsqueda de opciones amigables con el ambiente. Los productos naturales provenientes de plantas u otros organismos son fuentes prometedoras para el control biológico de patógenos. En el presente trabajo se continuó generando conocimiento acerca de *Croton chichenensis* Lundell, una planta con actividad antifúngica, contra fitopatógenos que afectan cultivos importantes como la papa, el café, el tomate, el chile, la calabaza, entre otros., siendo la magnoflorina uno de sus principios activos. El objetivo de este estudio fue evaluar los extractos de la raíz de *C. chichenensis* de colectas estacionales contra *Corynespora cassiicola* y *Fusarium oxysporum*, la cuantificación de magnoflorina mediante cromatografía de líquidos; además de determinar la ecotoxicidad de los extractos en lombriz de tierra, *Eisenia fetida*.

La fase experimental se inició con el aislamiento de magnoflorina del extracto etanólico crudo (EEC) de la raíz de *C. chichenensis* mediante técnicas cromatográficas. Después, se utilizó como estándar para cuantificar el contenido de ésta en los extractos etanólicos desengrasados (EED) y acuosos por cromatografía de líquidos (CLAR), de colectas realizadas en los meses de octubre, enero, abril y julio del 2022-2023. La actividad ecotóxica de los extractos etanólico crudo y acuoso se evaluó contra *E. fetida*. La actividad biológica de las colectas estacionales, así como de la magnoflorina, se evaluó contra *F. oxysporum* y *C. cassiicola*.

Se estableció una metodología para la purificación de magnoflorina por Cromatografía de Líquidos al Vacío. La presencia de magnoflorina en los EED se detectó en las cuatro colectas, confirmando su biosíntesis todo el año. La cuantificación de magnoflorina indicó que es más abundante en los meses de enero y julio con  $3.03 \pm 0.52$  y  $3.24 \pm 0.51$  mg/g de material vegetal seco y molido, respectivamente. La magnoflorina presentó una  $CI_{50}$  de 199.33 y 201.19  $\mu\text{g/mL}$  contra *F. oxysporum* y *C. cassiicola*, siendo un componente activo de los extractos etanólicos y acuosos. En adición, se determinó una  $CL_{50}$  de 45.87  $\mu\text{g/cm}^2$  del EEC de las raíces de *C. chichenensis* contra *E. fetida*, no obstante, el extracto acuoso fue inactivo. El conjunto de conocimientos que ya se tiene de *C. chichenensis*, puede servir como punto de partida para desarrollar un biofungicida.

## ABSTRACT

Phytopathogens affect a considerable portion of the world's crops and agricultural products. The extensive use of synthetic fungicides has caused these microorganisms to develop resistance and the increased regulation of agrochemical use, in general, has led to the search for ecofriendly options. Natural products from plants or other organisms are promising sources for the biological control of pathogens. In the present work, we continued generating knowledge about *Croton chichenensis* Lundell, a plant with antifungal activity against phytopathogens that affect important crops such as potato, coffee, tomato, chili, pumpkin, among others, being magnoflorine one of its active components. The objective of this study was to evaluate *C. chichenensis* root extracts from seasonal collections against *Corynespora cassiicola* and *Fusarium oxysporum*, the quantification of magnoflorine by liquid chromatography, and to determine the ecotoxicity of the extracts on earthworm, *Eisenia fetida*.

The experimental phase began with the isolation of magnoflorine from the crude ethanolic extract (EEC) of *C. chichenensis* root by chromatographic techniques. Then, it was used as a standard to quantify its content in defatted ethanolic extracts (EED) and aqueous extracts by liquid chromatography (HPLC), from collections made in October, January, April and July from 2022 to 2023. The ecotoxic activity of the crude ethanolic extract and aqueous was evaluated against *E. fetida*. The biological activity of the seasonal collections was evaluated as well as magnoflorine against *F. oxysporum* and *C. cassiicola*.

A methodology for magnoflorine purification by Vacuum Liquid Chromatography was established. The presence of magnoflorine in EEDs was monitored in all four collections, confirming its biosynthesis all year round. Quantification of magnoflorine indicated that it is most abundant in the months of January and July with  $3.03 \pm 0.52$  and  $3.24 \pm 0.51$  mg/g of dry and ground plant material, respectively. Magnoflorine presented an  $IC_{50}$  of 199.33 and 201.19  $\mu\text{g/mL}$  against *F. oxysporum* and *C. cassiicola*, being an active component of ethanolic and aqueous extracts. In addition,  $LD_{50}$  of 45.87  $\mu\text{g/cm}^2$  of the EEC of *C. chichenensis* roots was determined against *E. fetida*, however, the aqueous extract was inactive. The compendium of knowledge already obtained about *C. chichenensis* can serve as a starting point for the development of a biofungicide.

## INTRODUCCIÓN

La reducción del rendimiento de los cultivos, la calidad de la producción agrícola y las pérdidas económicas a nivel local, nacional y global, son causadas principalmente por patógenos y plagas (Savary *et al.*, 2019). Los fitopatógenos destruyen alrededor del 30% de los productos agrícolas en el mundo; mientras que los hongos que producen micotoxinas y los hongos que descomponen los alimentos contribuyen a reducir la disponibilidad de alimento, representando el 10% de pérdida postcosecha (Avery *et al.*, 2019; Fisher *et al.*, 2018).

El extenso uso de fungicidas sintéticos ha acelerado el desarrollo de resistencia y la aparición de hongos patógenos resistentes a los agentes antifúngicos comúnmente utilizados, ya que disponen de un genoma plástico y se reproducen con rapidez (Fisher *et al.*, 2018). Es crucial buscar otras estrategias de manejo, lo que está guiando a desarrollar alternativas de control biológico, utilizando por ejemplo insectos o metabolitos secundarios derivados de plantas, incluso de hongos (Avery *et al.*, 2019). Aunque el “control biológico” suele referirse sólo al uso de organismos vivos, por eso, es recomendable utilizar el término “biocontrol extendido”, que abarca el empleo de bioplaguicidas (Fauvergue *et al.*, 2022).

En la actualidad, las personas son más conscientes de los problemas relacionados al uso de los plaguicidas, del desarrollo de resistencia de los objetivos, de los efectos nocivos en los seres humanos, peces y otros animales no-objetivo, además de su persistencia en los alimentos, el agua y el suelo, causando desequilibrio ecológico; por lo que, ha sido necesario considerar las implicaciones sociales y ecológicas, (Parra, 2014). Por otra parte, se incrementa el control y la legislación de cero tolerancias a residuos tóxicos en los alimentos, junto con la creciente demanda pública de alternativas menos dañinas; recientemente fue publicada en México una iniciativa para la sustitución paulatina de agroquímicos (DOF: 31/12/2020). La Unión Europea, por ejemplo, desde 2005 comenzó a aplicar regulaciones sobre el uso de los plaguicidas (Erbach, 2012).

En México, así como en la península de Yucatán, se han estudiado varias especies de plantas, que han mostrado potenciales propiedades antifúngicas (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Entre ellas, *Croton chichenensis* (Euphorbiaceae) demostró la mayor actividad antifúngica contra varios hongos fitopatógenos (Moo-Koh *et al.*, 2022; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). El extracto etanólico de raíces de *C. chichenensis* inhibió el crecimiento micelial de *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rizhopus* sp. (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008), y el extracto acuoso inhibió el crecimiento de *A. alternata*, *C. cassicola*, *Curvularia lunata*

y *F. equiseti* (Moo-Koh *et al.*, 2022). Las evaluaciones biodirigidas permitieron detectar al alcaloide magnoflorina como el principio antifúngico principal de la raíz de *C. chichenensis* aislado del extracto etanólico (Concha-Franco, 2020).

Por lo anterior, en el presente estudio se evaluaron los extractos acuosos y etanólicos de las raíces de *C. chichenensis*, obtenidos de colectas estacionales de una población, contra *Corynespora cassiicola* y *Fusarium oxysporum*, se cuantificó la magnoflorina mediante cromatografía de líquidos y se determinó la ecotoxicidad de los extractos en lombriz de tierra.

## CAPITULO I ANTECEDENTES

La presión pública para la producción de alimentos saludables, y libres de residuos de plaguicidas altamente tóxicos se ha incrementado en los últimos años. Entre las estrategias para generar opciones amigables al ambiente están el uso de metabolitos y generar variedades de plantas resistentes, entre otras. Los bioplaguicidas a base de aceites esenciales, extractos y polvos inertes, son algunas opciones viables. Las investigaciones sobre la actividad biológica de las plantas conducen a este objetivo, y se ha demostrado que los productos naturales son fuentes prometedoras para el control de fitopatógenos y plagas. Las plantas producen una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios, que utilizan como mecanismo de defensa contra otros organismos o para adaptarse a situaciones adversas (Stankovic *et al.*, 2020). Estos metabolitos también pueden ser utilizados para combatir a los hongos fitopatógenos que afectan la producción y la conservación postcosecha.

### 1.1. EUPHORBIACEAE

Hasta la fecha, la familia Euphorbiaceae está constituida por 405 géneros y alrededor de 8,352 especies [[Euphorbiaceae \(gbif.org\)](https://www.gbif.org): acceso 08 agosto 2024], distribuidas en una amplia variedad de climas en el mundo, tienen amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales; las especies comprenden hierbas, arbustos y árboles (Webster, 1994; Steinmann, 2002). En México, las Euphorbiaceas se constituyen de aproximadamente 34 géneros y 714 especies, ocupando el quinto lugar en la diversidad nacional, seguido de las familias Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae y Poaceae (Villaseñor, 2016; Gordillo *et al.*, 2009). Es una familia genéticamente muy diversa y se caracteriza por producir una gran variedad de metabolitos como diterpenos, triterpenos, flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides, fenoles, etc., son un importante recurso de medicina herbal para uso humano, veterinario y agrícola (Mwine y Van Damme, 2011). En la búsqueda de plantas que tienen propiedades potenciales para el control de plagas que afectan los cultivos, en México se han identificado 114 especies, de 26 familias botánicas, que han mostrado propiedades insecticidas/nematicidas, incluyendo a la familia Euphorbiaceae. Por otro lado, se han identificado 143 plantas de América, de 43 familias (109 géneros), cuyos extractos tienen actividad antifúngica contra especies de hongos fitopatógenos de 28 géneros, haciendo que estas plantas sean un recurso valioso para seguir investigando y desarrollar biofungicidas (Hernández y Gamboa-Angulo, 2019; Ramírez y Hernández, 2015).

## 1.2. GÉNERO *Croton*

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae, se han reportado al menos 1,300 especies en el mundo, muchas especies son utilizadas en la medicina tradicional de África, Asia y América. En las poblaciones nativas de América es común encontrar preparados herbales para el tratamiento de padecimientos. Algunas especies del género *Croton* son utilizadas por sus propiedades como agentes antiinflamatorios, cicatrizantes, hemostáticos, vermífugos; para el tratamiento de úlceras gastrointestinales, diarrea, cáncer, reumatismo, etc. (Cuadro 1.1., Figura 1.1.) (Barrera *et al.*, 2016; Salatino *et al.*, 2007).

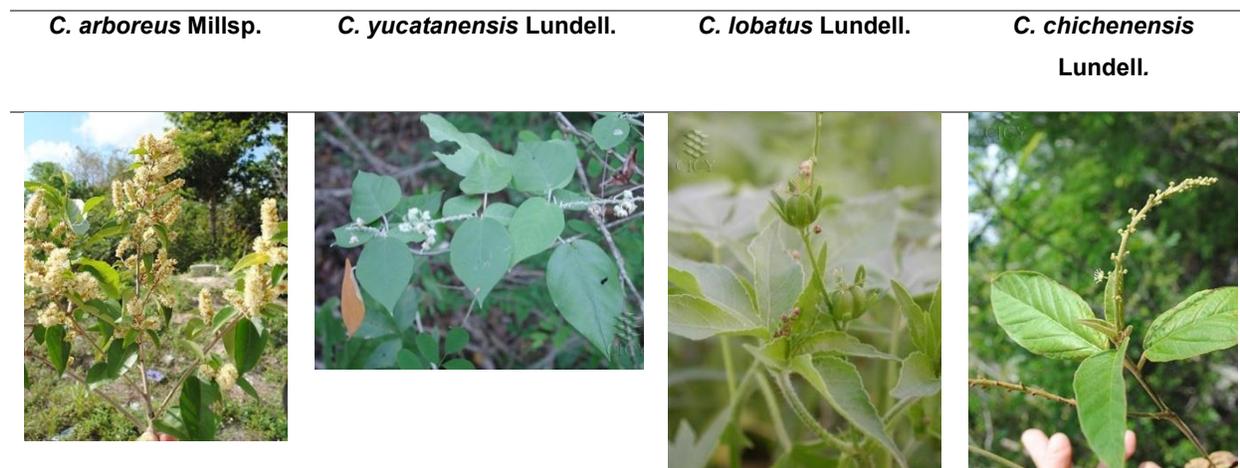
**Cuadro 1.1.** Especies de *Croton* y sus aplicaciones en medicina tradicional en Latinoamérica.

Especie	Aplicaciones
<b><i>C. arboreus Millsp.</i></b>	Partes aéreas. Antiinflamatorio. La infusión de las hojas se utiliza para trastornos gastrointestinales, reumatismo y migraña.
<b><i>C. cajucara Benth.</i></b>	La infusión de hojas, corteza y tallo se utiliza para tratar diabetes, control del colesterol y tratamiento de trastornos gástricos y hepáticos.
<b><i>C. celtidifolius Baill.</i></b>	La infusión de la corteza se utiliza en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, leucemia y reumatismo.
<b><i>C. chichenensis Lundell</i></b>	Cicatrizante, disentería, fogajes, granos, hemorragias, herpes bucal, llagas, salpullido y sarna.
<b><i>C. lechleri Müll. Arg.</i></b>	El látex rojo es utilizado para la cicatrización de heridas.
<b><i>C. malambo H. Karst.</i></b>	Corteza, para diabetes, diarrea, reumatismo, úlcera gástrica, antiinflamatorio y analgésico.
<b><i>C. nepetifolius Baill.</i></b>	La corteza se usa por su efecto antiespasmódico y alivio de gases.
<b><i>C. palanostigma Klotzsch</i></b>	El látex es utilizado como antibiótico, tratamiento de diarrea, úlceras gástricas, inflamación intestinal, incluso cáncer.
<b><i>C. schiedeanus Schtdl.</i></b>	El té de las hojas es usado para tratar la hipertensión.
<b><i>C. urucurana Baill.</i></b>	Cicatrizante y como tinte natural.
<b><i>C. zehntneri Pax &amp; K.Hoffm.</i></b>	El té de las hojas y la corteza se usa por su efecto sedativo.

Guerra *et al.*, 2022; Durán y Méndez., 2010. Flora medicinal; Salatino *et al.*, 2007.

En México hay alrededor de 127 especies de este género, y en la península de Yucatán se han reportado 33 especies, de las cuales, al menos 5 especies son endémicas [(Flora: Península de Yucatán (cicy.mx): acceso el 08 de agosto 2024; Fernández *et al.*, 2021; Villaseñor, 2016)].

El género *Croton* posee una gran diversidad fitoquímica. De los metabolitos secundarios que se han identificado y reportado, los terpenoides son los que sobresalen, principalmente los diterpenoides, además de aceites volátiles (monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides), alcaloides, ácidos grasos, fenoles (flavonoides, lignoides, proantocianidinas) y compuestos glucosídicos (Xu *et al.* 2018; Salatino *et al.*, 2007; Guerra *et al.* 2006).



**Figura 1.1** Algunas especies de *Croton* en la Península de Yucatán. Fuente: Flora de la Península de Yucatán: [Flora: Península de Yucatán (cicy.mx): acceso 08 agosto 2024].

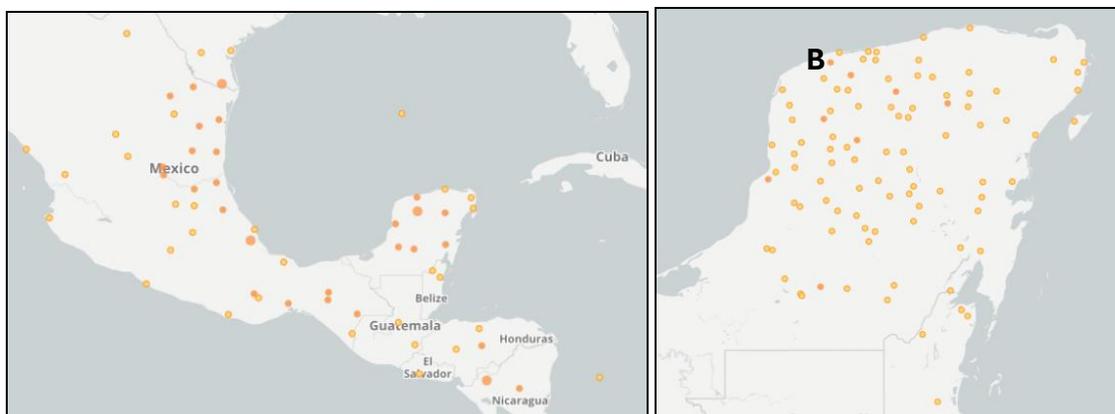
### 1.3. *Croton chichenensis*

#### 1.3.1 Taxonomía y Distribución de *Croton chichenensis*



**Reino:** *Plantae*  
**Phylum/división:** Tracheophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Malpighiales  
**Familia:** Euphorbiaceae  
**Género:** *Croton*  
**Especie:** *Croton chichenensis*  
 Nombre científico  
*Croton chichenensis* Lundell

**Figura 1.2** *Croton chichenensis* Lundell



**Figura 1.3** A. Distribución, parte de Estados Unidos y México hasta Nicaragua. B. Densidad de la población de *C. chichenensis* en la península de Yucatán. (*Croton chichenensis* (gbif.org); acceso 08 agosto 2024.)

### 1.3.2. Propiedades Biológicas de *Croton chichenensis*

Los extractos etanólicos de hojas, tallos y principalmente raíces de *C. chichenensis* fueron efectivos contra los fitopatógenos *A. tagetica*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* y *Rhizopus* sp. (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008), *A. chrysanthemi* y *Mycosphaerella fijiensis* (Merlin *et al.*, 2012). Otro estudio reportó que el extracto crudo etanólico tuvo buena actividad contra *A. chrysanthemi* y *C. gloeosporioides*, además la fracción metanólica tuvo efecto contra *F. oxysporum* (Concha-Franco, 2020). Por otro lado, el extracto acuoso inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata*, *C. casicola*, *C. lunata* y *F. equiseti* (Moo-Koh *et al.*, 2022). En el Cuadro 1.2 se resume la actividad biológica de *C. chichenensis* desde los primeros estudios realizados.

**Cuadro 1.2.** Resumen de los estudios realizados de la actividad biológica de *C. chichenensis* contra fitopatógenos.

Extracto/fracción y parte de la planta	Fitopatógenos	Actividad	
		% ICM	CIM
Extracto etanólico de raíz	<i>A. tagetica</i>	62	
	<i>C. gloeosporioides</i>	78	Nr
	<i>F. oxysporum</i>	83	
	<i>Rhizopus</i> sp.	62	
Fracción hexánica (raíz)	<i>C. gloeosporioides</i>	100	500–
Fracción acetónitrilo (raíz)			1000
Extracto etanólico (raíz)	<i>C. gloeosporioides</i>	100	500
	<i>A. chrysanthemi</i>	100	1000
	<i>Fusarium</i> sp.	100	≤500
	<i>M. fijiensis</i>		

Extracto acetato de etilo de la raíz	<i>C. gloeosporioides</i>	100	≤ 500
Extracto etanólico de la raíz	<i>C. gloeosporioides</i>	100	1000>10
	<i>F. oxysporum</i>	75	00
	<i>A. chrysanthemi</i>	100	≤500
Fracción metanólica (Magnoflorina)	<i>C. gloeosporioides</i>	100	250
	<i>F. oxysporum</i>	75	500
	<i>A. chrysanthemi</i>	100	>125
Fracción acetoneo	<i>A. chrysanthemi</i>	100	2000
Fracción hexánica (raíz)		100	1000
Fracción etanólica residual		100	2000
Fracción acetato de etilo			
Fracción acetoneo	<i>C. gloeosporioides</i>	100	500
Fracción hexánica (tallos)			
Extracto etanólico		100	1000
Fracción acetoneo (tallos)		100	1000
Extracto acuoso (raíz)	<i>A. alternata</i>	100	
	<i>C. cassicola</i>	100	Nr
	<i>C. lunata</i>	99	
	<i>F. equiseti</i>	100	

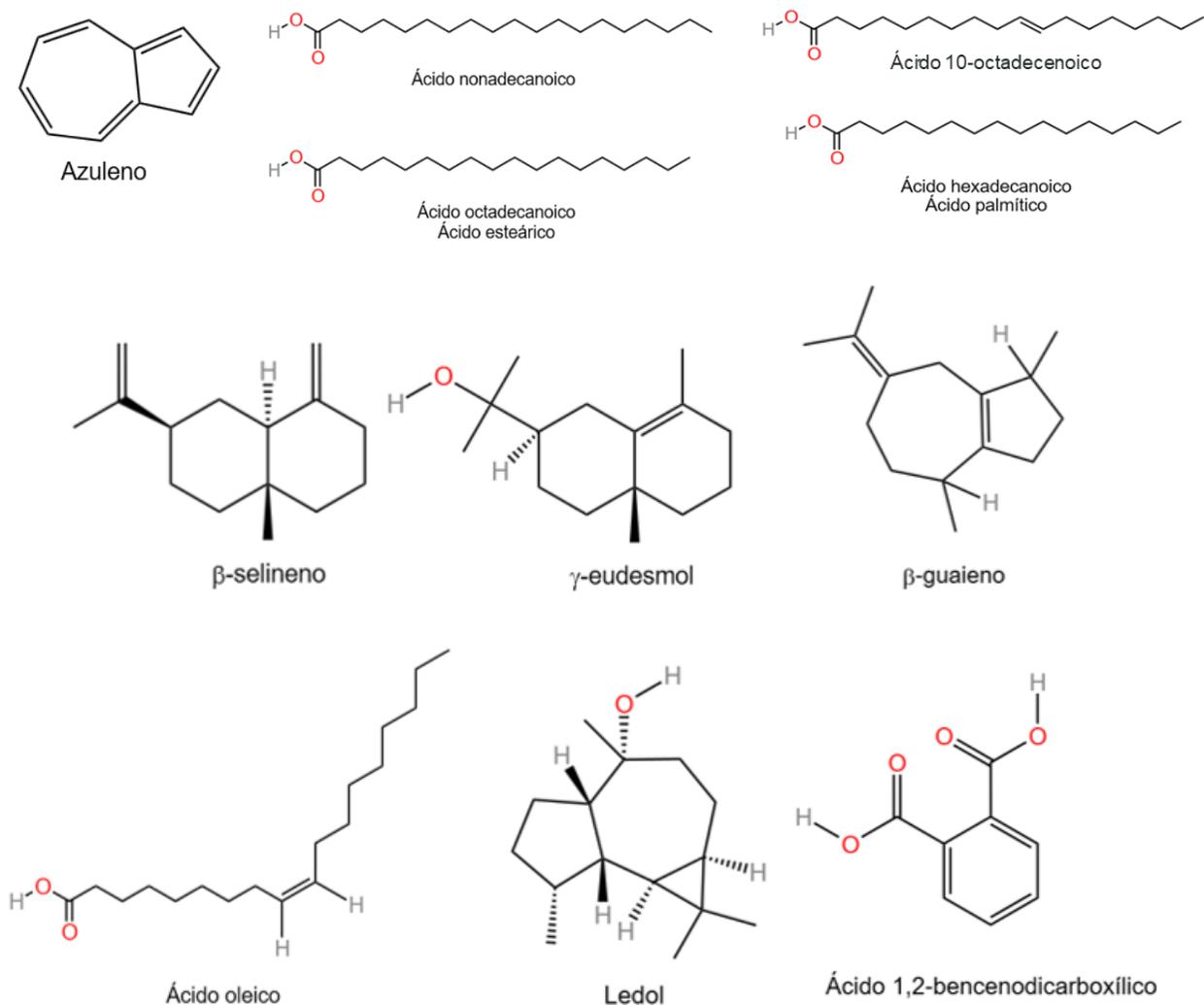
CIM: Concentración inhibitoria mínima; ICM: inhibición de crecimiento micelial. Nr = No reportado. Moo-Koh *et al.*, 2022; Concha-Franco, 2020; Tun-Pinto, 2016; González-Tomas, 2013; Merlin *et al.*, 2012; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008.

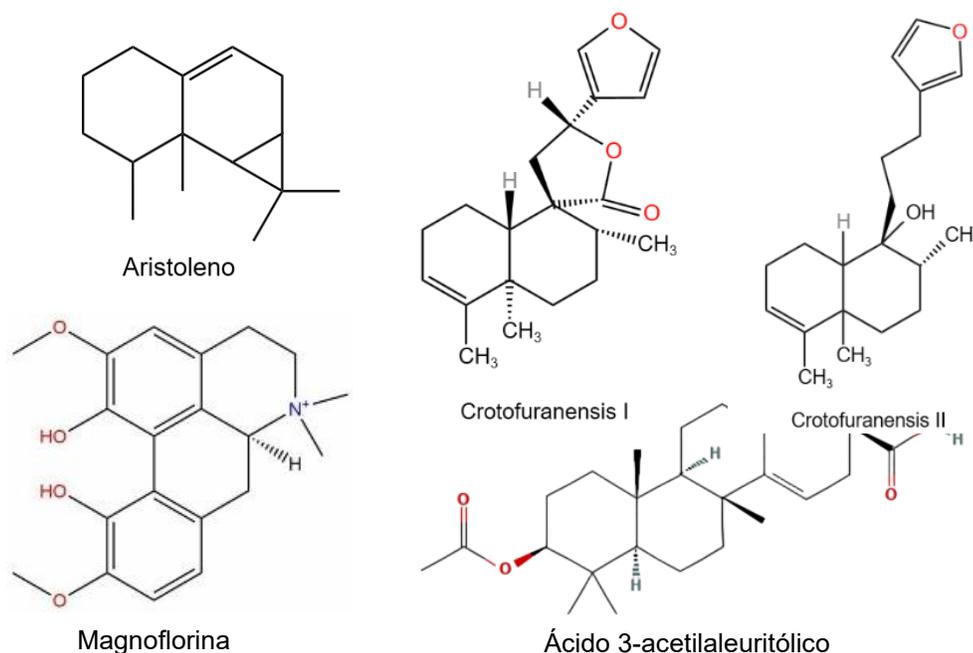
Por otro lado, se ha reportado actividad antifúngica de otras especies de *Croton*. Por ejemplo, se evaluó la actividad del extracto etanólico de las hojas de *C. aromaticus* contra *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*, fitopatógenos postcosecha que afectan el plátano, la papaya y el mango. El extracto inhibió significativamente el crecimiento micelial y la germinación de las esporas de los patógenos, excepto *L. theobromae* (Wijesundara *et al.*, 2015). En otro bioensayo, el extracto de la raíz de *C. bonplandianum* contra *C. camelliae*, *Curvularia eragrostidis*, *C. gloeosporioides* y *Fusarium equiseti*, que causan marchitez en tomate, piña, etc., el extracto tuvo una buena actividad contra los fitopatógenos (Ghosh *et al.*, 2012). También se ha evaluado la capacidad antifúngica de los extractos de las hojas y semillas de *C. tiglium* contra *C. albicans*, *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*, hongos que afectan al humano, provocando infecciones en la piel. Los extractos mostraron inhibición significativa contra los microorganismos (Iraqui, 2015). En otro estudio el extracto de las hojas de *C. ferrugineus* (aceite esencial) mostró actividad moderada contra *C. albicans* (Valarezo *et al.*, 2021); también se observó que el extracto acuoso de la raíz de *C. heliotropiifolius*, inhibió moderadamente a *C. albicans*, mientras que el extracto combinado con

fluconazol produce un efecto sinérgico que mejoró la actividad del fluconazol (De Sousa *et al.*, 2021).

#### 1.4. FITOQUÍMICA DE *Croton chichensis*

Los metabolitos identificados en el extracto de la raíz de *C. chichensis*, incluyen azuleno, ácidos grasos (hexadecanoico, 10-octadecenoico, octadecanoico y nonadecanoico), ledol, aristoleno, ácido-1,2-benzenodicarboxílico y los diterpenos denominados crotofuranensis I y II; también un triterpeno denominado ácido 3-acetilauritólico (González-Tomas, 2013; Mex-Uitz, 2005). En otro estudio se detectaron los sesquiterpenos  $\gamma$ -eudesmol,  $\beta$ -guaieno y  $\beta$ -selineno (sesquiterpenos), ácido 10-octadecenoico, reportado previamente, y magnoflorina (Concha Franco, 2020) (Figura 1.4).

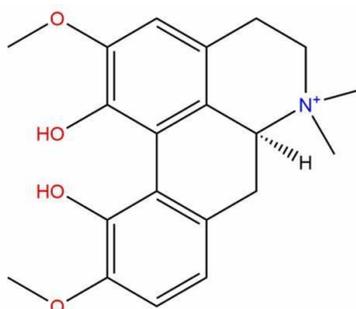




**Figura 1.4.** Estructura química de los metabolitos de la raíz de *Croton chichenensis*.

### 1.5. EL ALCALOIDE MAGNOFLORINA

Algunas especies de *Croton* se destacan por sus alcaloides, los más frecuentes son biogenéticamente relacionados con las bencilisoquinolinas, como las morfandienonas y los alcaloides de tetrahidroprotoberberina que se encuentran en Ranunculales (Salatino *et al.*, 2007). *Coptis chinensis* Franch. es una planta utilizada en la medicina tradicional china por su actividad sedativa, Yamahara (1976) reportó que uno de los compuestos de la planta es la magnoflorina (Figura 1.5). En el Cuadro 1.3 se enlistan algunas especies de plantas que producen magnoflorina.



**Figura 1.5.** Estructura de la magnoflorina.

La magnoflorina, también conocida como talictrina y escolina, pertenece a los alcaloides de isoquinolina, y más precisamente, a sus derivados aporfínicos. Estos compuestos se derivan de

las bencilisoquinolinas en el proceso de sustracción de dos átomos de hidrógeno, lo que da como resultado la formación de una estructura de 9,10-dihidrofenantreno a partir de los dos núcleos de benceno (Okon *et al.*, 2020).

**Cuadro 1.3.** Presencia de magnoflorina en familias y especies de plantas.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>
Annonaceae	<i>Annona glabra</i>
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i> , <i>B. cretica</i>
Euphorbiaceae	<i>Croton urucurana</i> , <i>C. xalapensis</i>
Magnoliaceae	<i>Magnolia officinalis</i> , <i>M. grandiflora</i>
Menispermaceae	<i>Sinomenium acutum</i>
Papaveraceae	<i>Argemone mexicana</i> , <i>A. grandiflora</i>
Ranunculaceae	<i>Coptis chinensis</i>
Rutaceae	<i>Phellodendron chinense</i>

Fuente: Okon *et al.*, 2020; Xu, *et al.* 2020.

Los alcaloides aporfínicos son compuestos que han sido aislados aproximadamente de 100 géneros y de diversas familias de plantas, entre ellos se encuentran los géneros *Caullophyllum* y *Croton* de la familia Euphorbiaceae. Algunos alcaloides de aporfina comunes son cadaverina, liridinina, asimilobina, *N*-metil-asimilobina, nornuciferina, nuciferina, anonaína, magnoflorina, dicentrina, boldina, galucina y neolitsina (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2013). Se ha reportado magnoflorina en varias especies de *Croton*: en la corteza de *C. urucurana*, en las hojas de *C. xalapensis*, en las hojas y látex de *C. lechleri* y en la raíz de *C. chichenensis* (Cordeiro *et al.*, 2016; Arevalo *et al.*, 2009; Milanowski *et al.*, 2002).

### 1.5.1 Actividad Biológica de la Magnoflorina

Estudios recientes han demostrado que la magnoflorina muestra una serie de actividades biológicas que incluyen la antialérgica, antibacteriana, anticancerígena, antidiabética, antifúngica, antiinflamatoria, antiosteoporótica, antioxidante, antiviral, inmunomoduladora y relajante cardiovascular. También se ha demostrado que este compuesto cruza la barrera hematoencefálica y exhibe una acción central que afecta la regulación del sistema nervioso central. Estas últimas propiedades fueron comprobadas en pruebas antidepresivas o antiamnésicas (neuroprotector) realizadas en modelos animales (Okon *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020; Szalak *et al.*, 2023).

### 1.5.2 Pruebas para Identificar Alcaloides

La determinación de alcaloides en un material vegetal se puede realizar utilizando las reacciones de precipitación con reactivo de Mayer (precipitado blanco con disolución de yoduro de potasio y cloruro mercúrico), Dragendorff (precipitado naranja con yoduro de bismuto y potasio), Wagner (precipitado de color marrón rojizo cuando se mezcla con yodo y yoduro de potasio) y Hager (precipitado amarillo con disolución acuosa saturada de ácido pícrico), con ácidos pícrico, picrolónico, fosfomolibdico y silicotúngstico, o en reacciones de color con reactivos que contienen ácido sulfúrico o nítrico, reactivos de Marquis, Frohde y Erdmann (Badal, 2016).

### 1.6. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Existen varias técnicas para realizar el análisis de identificación y cuantificación de metabolitos en extractos de plantas. Para compuestos polares como magnoflorina se utiliza principalmente la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica de química analítica cualitativa y cuantitativa utilizada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. El éxito de la CLAR se atribuye a una serie de características asociadas con la reproducibilidad, la facilidad de manipulación de la selectividad y, en general, altas recuperaciones de la muestra.

La magnoflorina, al igual que la berberina, tiene un nitrógeno cuaternario en su estructura. Para la cuantificación de berberina en la planta *Argemone mexicana* en diferentes estadios (plántula, planta juvenil y adulta, hojas, raíces), se utilizó HPLC-DAD (CLAR/HPLC-arreglo de diodos) de fase reversa (C18). Primero se realizó una extracción ácido-base, después la separación y, de último, la cuantificación, comparando los tiempos de retención y absorbancia. Los estándares empleados fueron chelerithrina y sanguinarina. El método fue validado empleando la desviación estándar relativa, se concluyó que es efectiva para la cuantificación de la berberina (Xool Tamayo *et al.*, 2017). Por otro lado, la berberina ha sido estudiada en *A. mexicana* (hojas, raíz), la cuantificación fue realizada combinando densitometría *in situ*, utilizando cromatografía en capa delgada y análisis quimiométrico (Escobar-Chan, 2018).

### 1.7. VARIACIÓN ESTACIONAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS

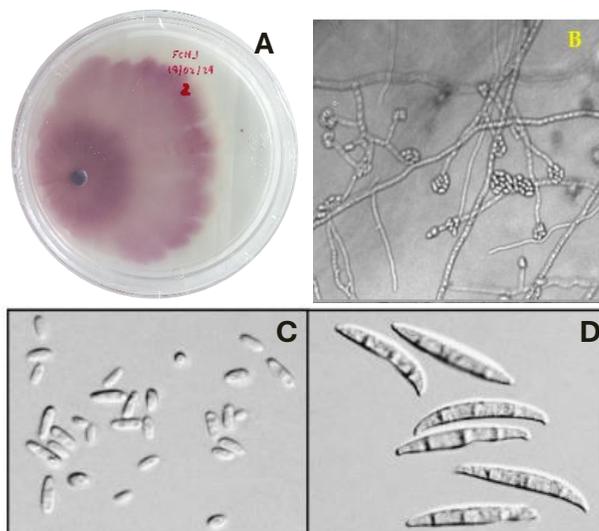
Los metabolitos varían durante el año, lo cual se relaciona con las condiciones bióticas y abióticas del entorno, cuando la planta debe producir más metabolitos para defenderse de otros organismos, además de interactuar con otras plantas o atraer polinizadores (Valares, 2011).

Los terpenos, esteroides, el alcaloide glaucina y  $\alpha$ -tocoferol muestran variaciones estacionales en *Croton hemiargyreus* y *Croton echinocarpus*, se colectaron las hojas y tallos de estas plantas en Nova Friburgo (Brasil), zona montañosa con clima templado. Las cantidades de triterpenos son mayores durante el verano tropical y en la mayoría de las muestras el sesquiterpeno cariofileno se caracterizó como el principal. La variación estacional de la glaucina mostró un máximo entre junio y octubre para *C. hemiargyreus*, y estuvo presente sólo en enero y junio en *C. echinocarpus* (Dos Santos *et al.*, 2001). Por otra parte, se realizaron varias colectas de tallos y raíces de *C. chichenensis* en el municipio de Baca; se observó que las raíces tuvieron mejor actividad, correspondientes a las colectas de febrero y agosto contra *A. chrysanthemi* (Tun-Pinto, 2016).

## 1.8. HONGOS FITOPATÓGENOS EN ESTUDIO

### 1.8.1 *Fusarium oxysporum*

Las cepas de *Fusarium oxysporum* producen macroconidios y esporas en reposo llamadas clamidosporas, y microconidios más pequeños característicos de especies de *Fusarium*. El micelio tiene una pigmentación amarilla/roja cuando se cultivan papa dextrosa agar (PDA) (Figura 1.6)



**Figura 1.6.** A). Morfología de *Fusarium oxysporum* papa dextrosa agar. B y C). Microconidios. D) Macroconidios, (Cruz-Cerino *et al.*, 2020).

El complejo de especies *Fusarium oxysporum* son hongos que habitan en el suelo, se pueden encontrar en suelo cultivado y no cultivado. La evidencia de su diversidad radica en la impresionante variedad de plantas hospedantes que infectan, este complejo de especies tiene importancia a nivel global por su patogenicidad. Las cepas patógenas de *F. oxysporum* causan marchitez o pudrición de raíz en cultivos de importancia económica (por ejemplo, plátano, algodón, soya, tomate, cebolla, melón, etc.), incluso pueden infectar malezas y a plantas parásitas. Sin embargo, algunas cepas pueden mostrar patogenicidad selectiva para una gama, más o menos, estrecha de plantas hospedantes (Edel-Hermann y Lecomte, 2018).

Las cepas patógenas de *F. oxysporum* son responsables de dos tipos de síntomas, la mayoría causan marchitez vascular y, en algunos casos, pudrición. Cuando el hongo ingresa en las raíces del hospedante, una vez que alcanza el xilema, causa un amarillamiento y marchitamiento progresivo de la planta. Finalmente, formación de tejidos decolorados que evolucionan a manchas necróticas de color marrón a negro que terminan en pudrición. Las enfermedades de

podrición afectan predominantemente a las plantas con órganos de almacenamiento. Por ejemplo, bulbos (lirio), cormos (azafrán), tubérculos (papa) y rizomas (jengibre) (Edel-Hermann y Lecomte, 2018). También existen poblaciones no patógenas de *F. oxysporum*, algunas de las cuales han brindado control biológico del marchitamiento y otras enfermedades fúngicas (Kavanagh, 2017). Generalmente, *F. oxysporum* se controla con fungicidas químicos como azoxistrobina, benomilo, bromuconazol, carbendazim, entre otros (Seepe *et al.*, 2021). Aunque también existen alternativas como Fungifree® que emplea esporas de *Bacillus subtilis* como antagonista; existen también biofungicidas formulados a partir de plantas como Promax®, aceite de tomillo, Sporan®, extracto de romero y Trilogy®, extracto de neem, productos disponibles en el mercado (COFEPRIS, 2024).

### 1.8.2 *Corynespora cassiicola*

Morfológicamente, *C. cassiicola* al inicio forma micelios de color gris-blanquecino, tornándose gris oscuro con el tiempo en PDA. Los conidióforos son erectos, ramificados, de color marrón, solos o en grupos con células basales hinchadas. Los conidios son solitarios o en cadenas, lisos, parduzcos y tienen un hilio central en el extremo basal, rectos o ligeramente curvos (Rondon y Lawrence, 2021).



**Figura 1.7.** A) Morfología de *Corynespora cassiicola* en papa dextrosa agar. B) Conidióforos. C) Conidios alargados y elongados en un extremo (Moo-Koh *et al.*, 2022; Xiaoyu *et al.*, 2019).

Este hongo, tiene diversidad morfológica, patógena y ecológica, sin embargo, está teniendo cada vez más importancia, ya que es causante de manchas foliares en más de 500 hospedantes, entre los que se encuentran plantas que tienen importancia económica. También se han identificado nuevas interacciones naturales entre el hospedante y el patógeno, que incluyen repollo, berenjena y melón. Este hongo es conocido por causar enfermedades puntuales en cultivos económicamente importantes como caupí, pepino, papaya, caucho, soya, tomate y calabacita; la enfermedad de caída de hojas en árboles de caucho y manchas en pétalos de la “flor de jamaica”.

Además de las hojas y los frutos, *C. cassiicola* también puede infectar la raíz, el hipocótilo, la cápsula y el tallo, provocando pudrición. *C. cassiicola* es un fitopatógeno selectivo del hospedante, pero se ha observado que la mayoría de las cepas de *C. cassiicola* son altamente patógenas para tomates (Aguar *et al.*, 2022; Toulet *et al.*, 2022; Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Looi *et al.*, 2017; Dixon *et al.*, 2009;). Se ha reportado que también puede causar manchas foliares de color marrón oscuro y tizones negros en hojas, tallos y frutos de chile dulce. Es un patógeno nuevo y emergente en el Chile (Suresh *et al.*, 2017; Shimomoto *et al.*, 2008). Para el control de *C. cassiicola* se emplean fungicidas sintéticos multisitio que contienen ditiocarbamatos (mancozeb, pineb, propineb); suspensiones de azufre, cobre y cloronitrilos (clorotanlonil), generalmente combinados con otros fungicidas que tienen diferentes modos de acción, con el fin de evitar resistencia (Rondon y Lawrence, 2021). En cuanto a alternativas de control, no se encuentran registrados productos naturales específicos para el control de este fitopatógeno, sin embargo, se ha reportado el potencial de *Aspergillus terreus* para inhibir el crecimiento de *C. cassiicola* del árbol del caucho (Mahendran *et al.*, 2021), el extracto acuoso de *C. chichenensis* (Moo-Koh *et al.*, 2022) y extracto acuoso de *Azadirachta indica* (Da Paz *et al.*, 2018).

## 1.9. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, las enfermedades en los cultivos destruyen aproximadamente el 30% de la producción, además de pérdidas postcosecha de alrededor del 10% causado por hongos que producen micotoxinas y hongos necrótrofos. En México, *C. gloeosporioides* afecta cultivos de aguacate, mango, tomate, papaya, chile, cacao; *Corynespora asiicola*, afecta cultivos de tomate, jamaica, chile; *Fusarium* spp. y *F. oxysporum* infectan cultivos de mango, caoba, garbanzo, chile habanero, árbol de hule, tomate verde, trigo, maíz (Moparthy *et al.*, 2024; Zakaria, 2023; Mendoza *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2017).

En los últimos años, se ha reportado la resistencia de hongos fitopatógenos a los fungicidas sintéticos. Por otro lado, hay mayor conciencia sobre los daños que causa el uso indiscriminado de agroquímicos al medioambiente, organismos no objetivo y acumulación, residuos capaces de causar daño a la salud humana. Por estas razones, la búsqueda de alternativas es una necesidad importante y urgente para desplazar el uso de productos altamente contaminantes. Una de ellas es el uso de productos naturales provenientes de plantas, ya que producen una gran variedad de metabolitos secundarios de forma natural, que les sirven de defensa contra otros organismos. Estos productos son utilizados como extractos (aceites esenciales, fenoles, taninos, terpenoides etc.) y derivados semisintéticos. Actualmente existen productos derivados de plantas comercializados como biofungicidas, por ejemplo, Timorex Act® (aceite del árbol de té), Mimoten® (extracto de tepezcohuite), NB-Fungus® (quitina con extracto de orégano y tomillo), PlaguiNeem® (azadiractina, obtenido del neem), Sporan® (aceite de romero, clavo, tomillo y menta) y Grifix® (extracto de naranja agria) son algunos registrados, disponibles en México (COFEPRIS, 2024). Por estas razones, es importante continuar con las investigaciones en *C. chichenensis*, ya que con suficiente datos e información se puede desarrollar un biofungicida.

## 1.10. HIPÓTESIS

El metabolito magnoflorina presente en la raíz de *Croton chichenensis* se biosintetiza todo el año y es el responsable del efecto antifúngico de los extractos contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Corynespora cassiicola*.

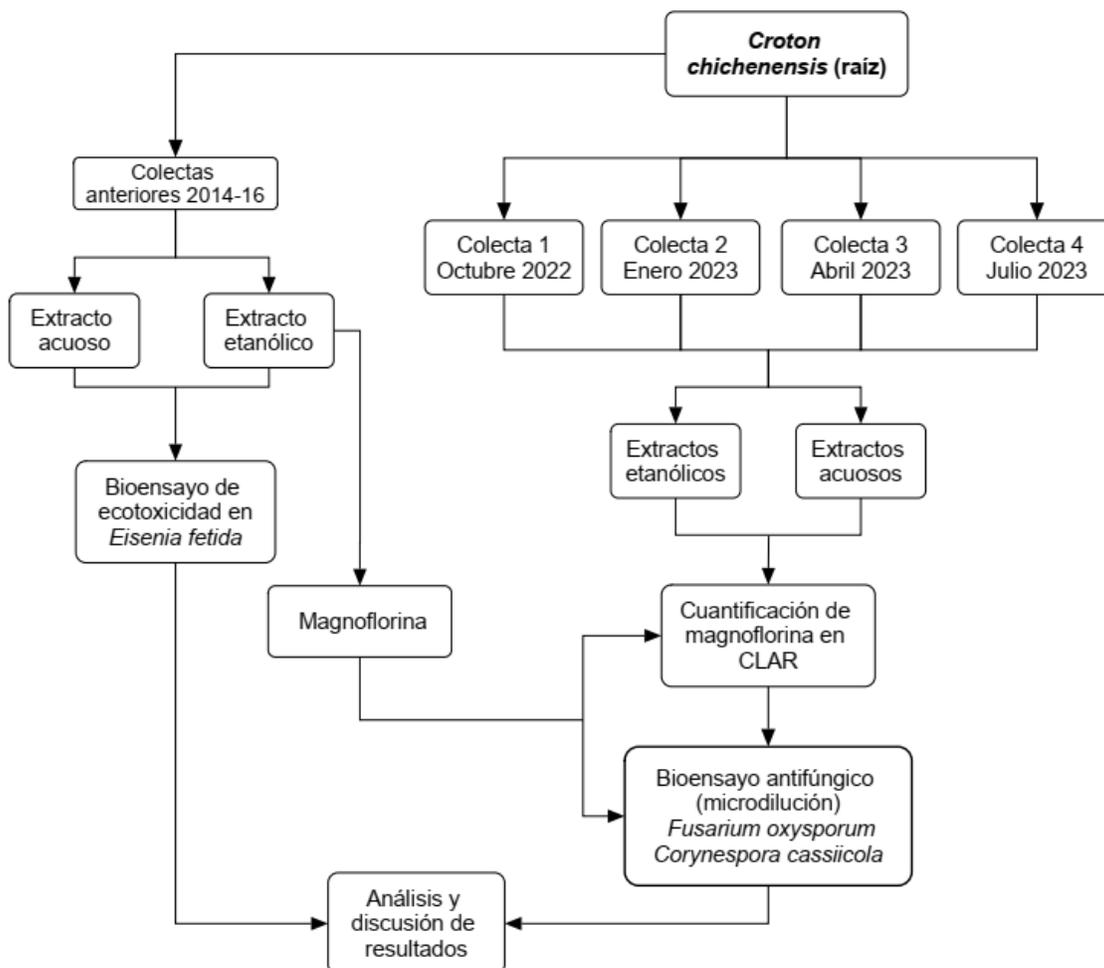
## 1.11. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antifúngica de extractos etanólicos y acuosos de la raíz de *Croton chichenensis*, obtenidos de colectas estacionales y cuantificar su contenido de magnoflorina.

### 1.11.1 Objetivos Específicos

1. Purificar el alcaloide cuaternario magnoflorina a partir de las raíces de *C. chichenensis* para usarlo como estándar para cuantificar su contenido en los extractos etanólicos y acuosos de la raíz de *C. chichenensis* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).
2. Realizar pruebas de ecotoxicidad contra lombriz de tierra (*Eisenia fetida*).
3. Evaluar los extractos etanólicos y acuosos de la raíz de *C. chichenensis* de colectas estacionales contra los fitopatógenos *F. oxysporum* y *C. cassiicola*.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos y acuosos contra los fitopatógenos *F. oxysporum* y *C. cassiicola*.

## 1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 1.8.** Diagrama de la estrategia experimental desde la colecta de la planta, tratamiento, evaluaciones y cuantificación de magnoflorina de la raíz de *Croton chichenensis*.

## CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. COLECTA DE LA PLANTA EN ESTUDIO

Las raíces de *C. chichenensis* se colectaron trimestralmente durante un año en el municipio de Baca (coordenadas: N21°6'22"O89°22'36") ubicado en el noreste del estado de Yucatán (CCRN-1, octubre; CCRN-2, enero; CCRN-3, abril; y CCRN-4, julio). Las muestras se lavaron y se secaron en una secadora de lámparas (50-60 °C) entre 3 a 5 días. Cuando estuvieron secas se molieron y se tamizaron (malla No. 5) en el molino Pagani® 1520 (Unidad de Materiales), se resguardaron en bolsas selladas y etiquetadas hasta la extracción. Un ejemplar se depositó en el herbario *U Najil Tikin Xiu* del CICY y se identificó con el número de catálogo 78036 (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Colectas estacionales de las raíces de *Croton chichenensis* en el municipio de Baca, Yucatán.

No. de colecta	Fecha	Clave	Peso muestra (g)
1. octubre	28/10/2022	CCRN-1	747.7
2. enero	27/01/2023	CCRN-2	1,353.6
3. abril	28/04/2023	CCRN-3	797.5
4. julio	14/07/2023	CCRN-4	885.4

### 2.2. EQUIPOS Y MATERIAL UTILIZADO

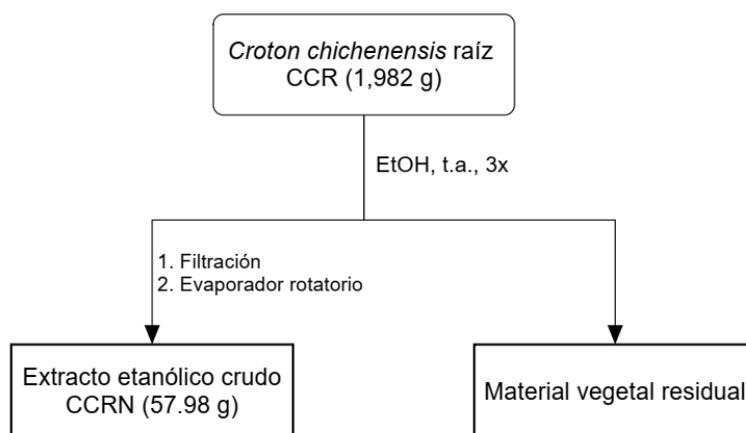
- Cromatofolios de aluminio de 20 cm × 20 cm impregnados con gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, recortados a 20 cm × 5 cm.
- Gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (CCD/TLC), Merck. Utilizada para Cromatografía Líquida al Vacío (CLV) o VLC (Vacuum Liquid Chromatography, en inglés).
- Cromatógrafo de líquidos (High Performance Liquid Chromatography, HPLC): marca Agilent Technologies, modelo 1260, provisto de un detector multicanal UV/visible. Columna Grace C18 Aldrich, 4.6 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud, partícula de 5 µm. Precolumna Altima C18 10 µ (7 mm de diámetro interno y 33 mm de longitud).
- Molino Pagani® 1520 (Unidad de Materiales).

## 2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

### 2.3.1. Extractos Etanólicos Crudos (EECs)

**A.** Un total de 1,981.6 g del material seco y molido de raíces de *C. chichenensis*, de colectas previas (2014-2016), se maceró con etanol destilado, a temperatura ambiente, tres veces. En cada extracción se decantó el disolvente colocando una gasa en la boca del contenedor para evitar partículas grandes y luego se filtró. El extracto etanólico se depositó en un matraz balón y en el evaporador rotatorio se eliminó el disolvente a 40 °C y al vacío. Este, se llevó a sequedad, primero, en la campana de extracción en un recipiente de vidrio y después al vacío, obteniendo así el extracto etanólico crudo (EEC), etiquetado CCRN (57.98 g). El extracto resultante, fue almacenado en viales y guardado en refrigeración en la oscuridad (Figura 2.1). Este material se utilizó para determinar el porcentaje de rendimiento del EEC, el establecimiento de los métodos para la purificación de magnoflorina, y el pretratamiento para la cuantificación de magnoflorina.

**B.** Para determinar el porcentaje de rendimiento de la extracción de las cuatro colectas estacionales se siguió el procedimiento anteriormente descrito. Con 50 g de material vegetal en etanol se obtuvieron los respectivos EECs, CCRN-1, CCRN-2, CCRN-3 y CCRN-4 (Figura 2.1).

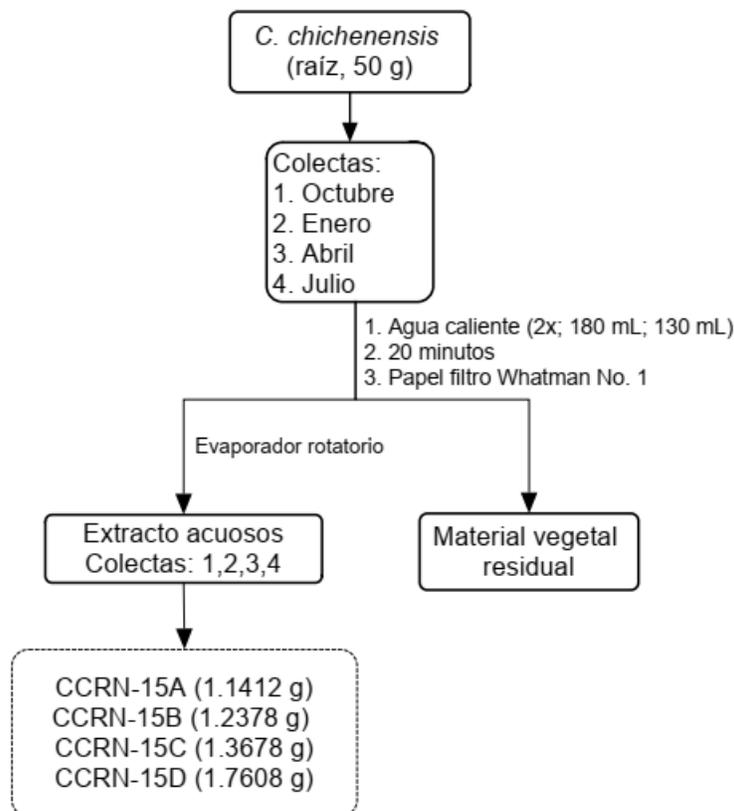


**Figura 2.1.** Diagrama de obtención de extractos etanólicos por maceración.

### 2.3.2 Extractos Acuosos (EAs)

Las muestras (50 g) de la raíz seca y molido de *C. chichenensis* de cada colecta estacional se transfirieron a un matraz y se agregó agua destilada hirviendo con agitación constante, repitiendo el proceso en dos ocasiones (180 y 130 mL de agua). Después de 20 min se filtraron a través de papel filtro Whitman no. 1; se concentró en el evaporador rotatorio entre 40-50 °C para mejorar

el destilado, se obtuvieron los EAs CCRN-15A - CCR-15D, que se resguardaron en refrigeración (Figura 2.2).

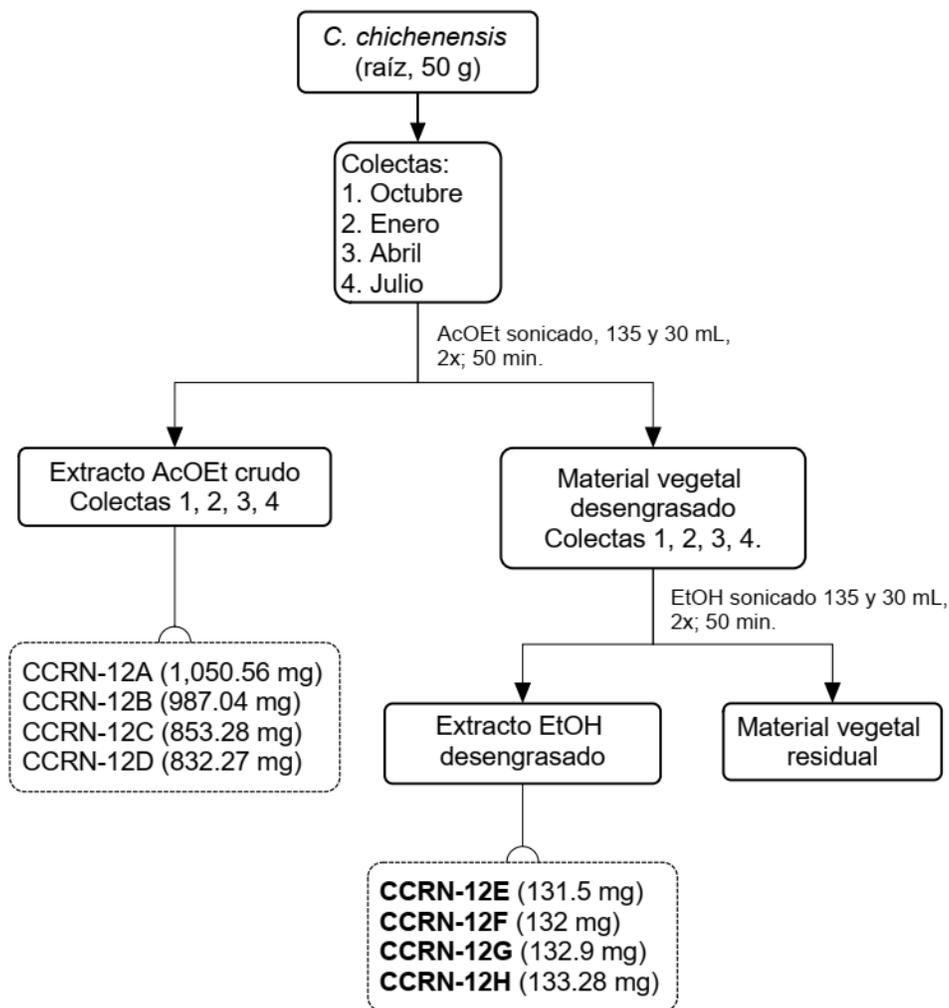


**Figura 2.2** Diagrama de la obtención de extractos acuosos.

### 2.3.3 Extractos Etanólicos Desengrasados de Colectas Estacionales

Para reducir el tiempo de extracción y con el propósito de tener muestras menos complejas para la cuantificación de magnoflorina, el material vegetal de cada colecta (CCRN-1, octubre; CCRN-2, enero; CCRN-3, abril; y CCRN-4, julio) se desengrasó con AcOEt. Cada muestra de 50 g de raíz de *C. chichenensis*, se sonicó con 135 mL de AcOEt destilado por 50 min y un lavado con 30 mL del mismo disolvente. Con la eliminación del disolvente por el evaporador rotatorio se pudo obtener los extractos crudos de AcOEt (CCRN-12A, CCRN-12B, CCRN-12C y CCRN-12D). El material vegetal residual se sonicó con 135 mL de EtOH destilado por 50 min y se lavó con 30 mL. La eliminación por evaporador rotatorio del disolvente permitió obtener los extractos etanólicos desengrasados (EED) CCRN-12E, octubre; CCRN-12F, enero; CCRN-12G, abril; y CCRN-12H, julio; aunque las cantidades obtenidas sean menores, están enriquecidas de magnoflorina; (Figura 2.3). Las muestras se concentraron y se monitorearon en CCD; los

extractos de AcOEt no se incluyeron en estas placas, ya que sólo se trabajó con las muestras polares alcaloidales.

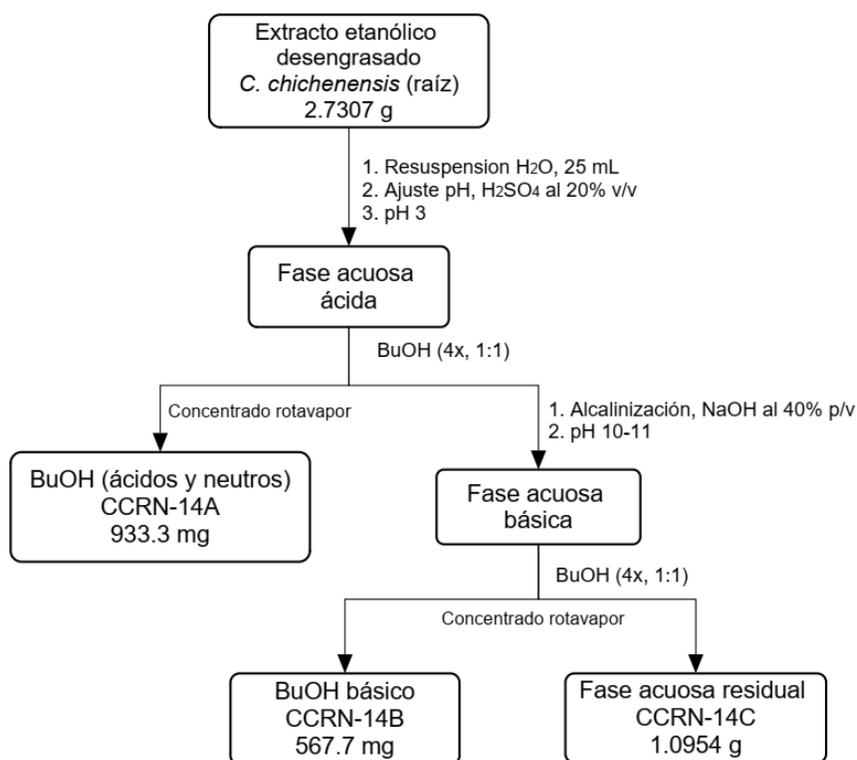


**Figura 2.3** Procedimiento para la obtención de extractos etanólicos desengrasados (EED), de las colectas seriadas.

## 2.4. PURIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA

Del extracto etanólico crudo denominado CCRN (57.98 g), se tomaron 20 g y se disolvieron en agua destilada (50 mL) y la suspensión resultante se particionó con AcOEt (1:1, 3×). El disolvente se eliminó con el evaporador rotatorio, obteniendo la fase orgánica CCRN-9A (15.7757 g), y la fase acuosa residual se concentró hasta obtener el extracto etanólico desengrasado CCRN-9B (3.5962 g) que se resguardó en refrigeración en la oscuridad.

El EED CCRN-9B (2.7307 g) se sub-fraccionó en una partición ácido-base, por lo cual se resuspendió en 25 mL de agua destilada, se añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% v/v hasta pH 3 y se extrajo cuatro veces con *n*-butanol grado reactivo (1:1), obteniéndose así la fase orgánica butanólica, que se lavó con agua destilada dos veces y se concentró en el evaporador rotatorio para obtener la sub-fracción de ácidos y neutros (CCRN-14A, 933.3 mg). La fase acuosa acidificada se alcalinizó hasta pH 10-11 con NaOH 40% p/v y se extrajo cuatro veces con *n*-butanol grado reactivo (1:1); esta fase butanólica básica se lavó con agua destilada dos veces y después de eliminar el disolvente en el evaporador rotatorio se obtuvo la sub-fracción (CCRN-14B, 567.7 mg). Las dos subfracciones y la fase acuosa residual (CCRN-14C) se monitorearon por cromatografía en capa delgada (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Procedimiento de extracción ácido-base del extracto etanólico desengrasado. Posteriormente, la sub-fracción CCRN-14B (BuOH básico) se sub-fraccionó por gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> grado CCD en una columna líquida al vacío (CLV) de 2.5 cm de diámetro y 5 cm de altura, eluyendo con el sistema de disolventes MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-NH<sub>4</sub>OH al principio, luego CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:-NH<sub>4</sub>OH y de nuevo MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-NH<sub>4</sub>OH en polaridad ascendente, aumentando el MeOH junto con el NH<sub>4</sub>OH, hasta la elución de la magnoflorina (Pelletier *et al.*, 1986). Un total de 18 sub-fracciones se obtuvieron que, por similitud por CCD, se reunieron en 7 sub-fracciones finales, de las cuales la magnoflorina se observó en las fracciones CCRN-18B (13), CCRN-18B (14-16) y

CCRN-18B (17-18) (Figura 2.5). La magnoflorina aislada se utilizó para construir la curva de calibración con estándar interno para la cuantificación de ésta en los EED y extractos acuosos, así como para el bioensayo antifúngico.

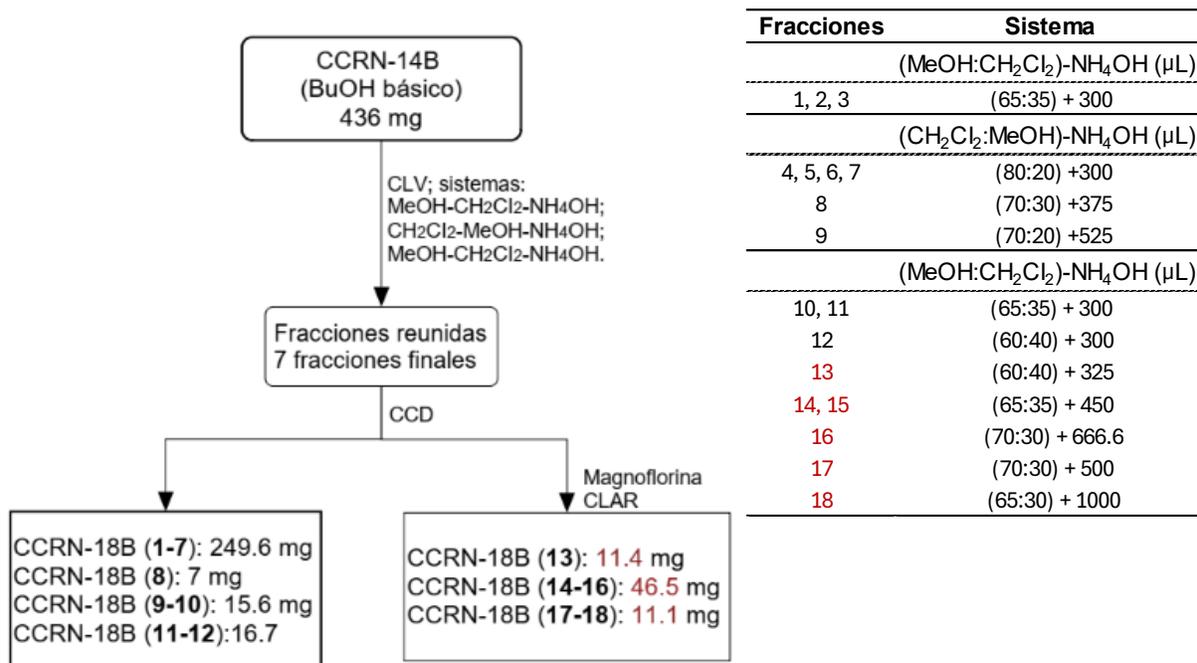
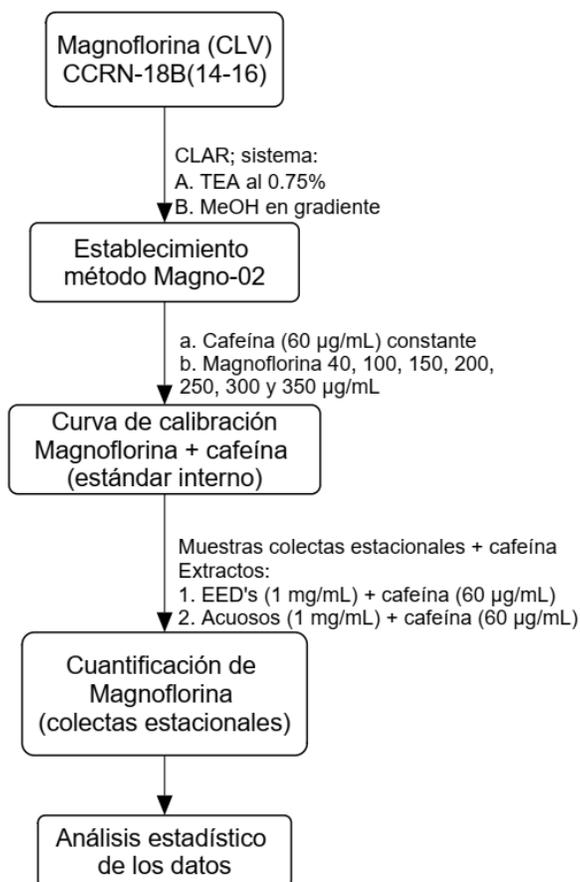


Figura 2.5. Procedimiento para el aislamiento de magnoflorina.

## 2.5. CUANTIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA

### 2.5.1. Establecimiento del Método por CLAR

Las fracciones alcaloidales CCRN-18B (13), CCRN-18B (14-16) y CCRN-18B (17-18) obtenidas de la CLV se analizaron por CLAR en una columna empacada con C18 de fase reversa (Grace Aldrich, con tamaño de partícula de 5 μm, longitud de 250 mm, ancho interno de 4.6 mm), y se compararon con el estándar de magnoflorina (59d-s) purificado e identificado por diversos análisis espectroscópicos (Concha-Franco, 2020). Método **Magno-02**. Sistema de elución: **A**: Trietanolamina al 0.75% (TEA) y **B**: MeOH en gradiente de polaridad ascendente. TEA/MeOH 60:40 (0'-6'); 5:95 (6'-10'); 60:40 (10'-11') y se mantiene hasta el minuto (13'). Flujo constante de 0.8 mL/min. Longitud de onda 220, 254, 280 y 350 nm (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Diagrama del procedimiento general de la cuantificación de magnoflorina en los extractos de raíz de *C. chichenensis* de colectas estacionales.

### 2.5.1 Curva de Calibración de Magnoflorina con Cafeína

Para la construcción de la curva de calibración se utilizó magnoflorina obtenida de la fracción CCRN-18B (14-16), junto con cafeína (Sigma-Aldrich) como estándar interno. Ambos compuestos se separaron bien con el método Mag-02 con  $t_R = 5.36$  y  $7.75$  min para la magnoflorina y cafeína, respectivamente.

En la Figura 2.7 se ilustra el procedimiento para la preparación de los patrones (7 puntos) que se establecieron. Primero, se prepararon disoluciones madre (stock) de la magnoflorina y la cafeína a la concentración de  $1 \text{ mg/mL}$ , luego se tomaron los microlitros de magnoflorina correspondientes ( $40, 100, 150, 200, 250, 300$  y  $350 \text{ µL}$ ) y se agregaron  $60 \text{ µL}$  de cafeína a cada matraz volumétrico, finalmente, se aforaron a  $1 \text{ mL}$  con metanol grado CLAR para tener una concentración final de  $40, 100, 150, 200, 250, 300$  y  $350 \text{ µg/mL}$  para la magnoflorina, y  $60 \text{ µg/mL}$  de cafeína. De cada patrón, se filtraron  $500 \text{ µL}$  por un filtro Millipore de  $0.22 \text{ µm}$  para analizar en

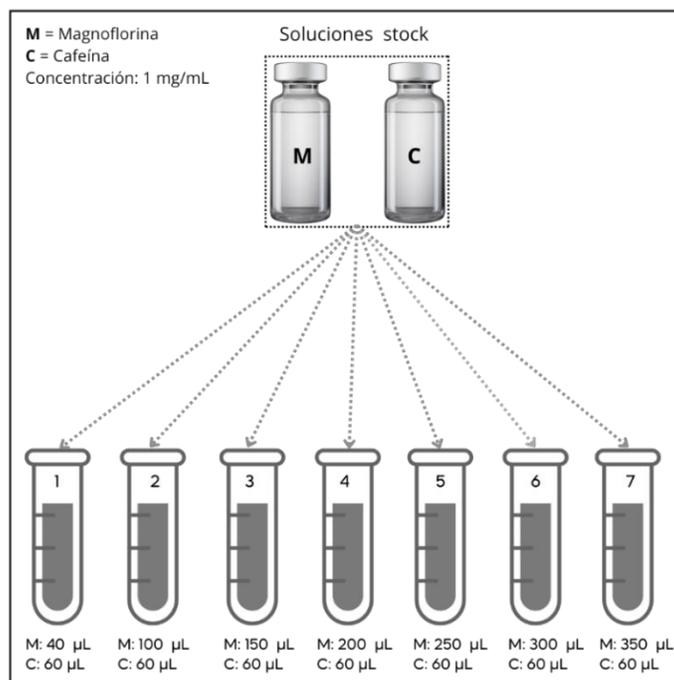
el cromatógrafo de líquidos. Las siete diluciones se inyectaron por triplicado y se registraron las áreas obtenidas.

### 2.5.3. Cuantificación de Magnoflorina en las Colectas Estacionales

A partir de los EEDs obtenidos del material de las cuatro colectas estacionales se prepararon disoluciones madre de 5 mg/mL, se tomaron 200  $\mu$ L de cada una y se añadieron 60  $\mu$ L de cafeína, se aforaron a 1 mL para tener disoluciones con concentraciones finales para los EED de 1 mg/mL y 60  $\mu$ g/mL de cafeína.

Para los extractos acuosos concentrados se prepararon disoluciones madre de 2 mg/mL, una alícuota de 500  $\mu$ L se transfirieron al matraz volumétrico aforado y se enriquecieron con 60  $\mu$ L de cafeína, se aforaron a 1 mL para tener concentraciones finales de 1 mg/mL para los extractos acuosos y 60  $\mu$ g/mL de cafeína (Figura 2.8).

En todos los casos, de cada muestra, alícuotas de 500  $\mu$ L se pasaron por filtros Millipore de 0.22  $\mu$ m, para inyectar al CLAR, por triplicado.



**Figura 2.7.** Procedimiento para preparar los patrones de la curva de calibración de magnoflorina con cafeína como estándar interno.

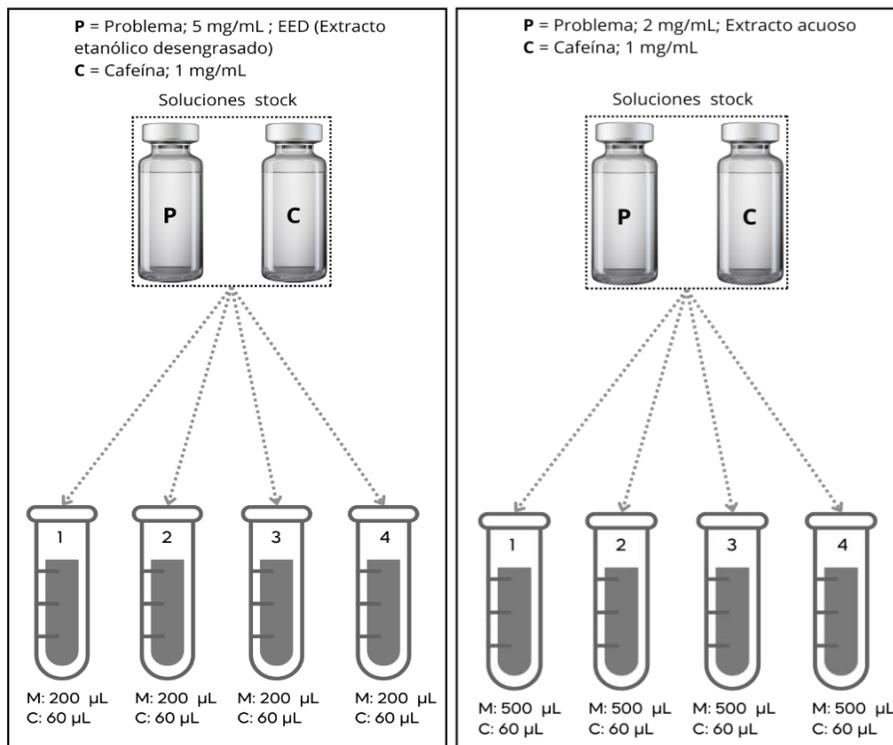


Figura 2.8. Procedimiento para preparar las muestras de las cuatro colectas, EED y extractos acuosos, para la cuantificación de magnoflorina, enriquecidos con cafeína como estándar interno.

## 2.6. ENSAYO DE ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO CRUDO DE *Croton chichenensis* EN *Eisenia fetida*

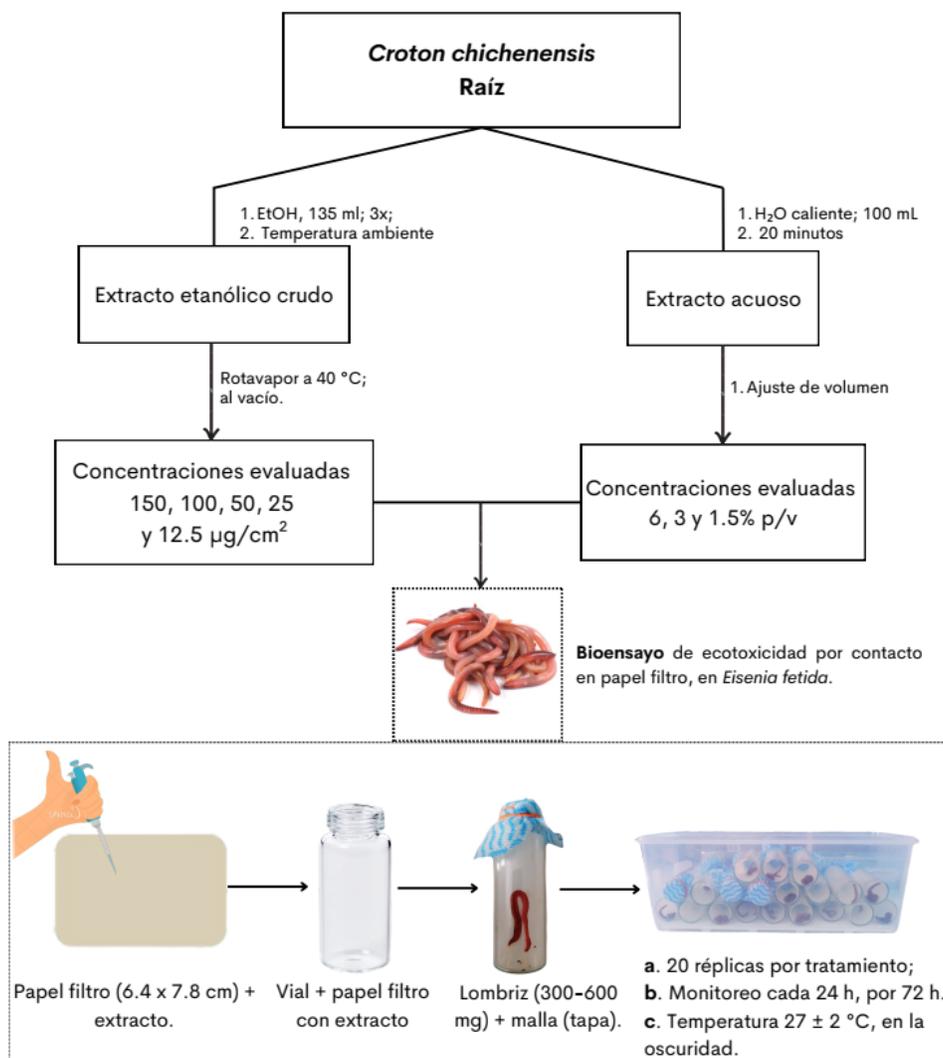
La prueba de toxicidad del extracto crudo etanólico (CCRN) de *C. chichenensis* se realizó contra *Eisenia fetida*, lombriz de tierra, organismo benéfico del suelo no-objetivo (Figura 2.9).

### 2.6.1 Procedimiento del Ensayo De Ecotoxicidad

Para realizar el ensayo de toxicidad contra *Eisenia fetida*, se seleccionaron lombrices de 300-600 mg de peso, se enjuagaron y colocaron en un contenedor con agua y papel filtro durante 3 h, en la oscuridad para que liberen su contenido intestinal.

El extracto crudo etanólico CCRN de *C. chichenensis* se disolvió en MeOH a las concentraciones de 7,500, 5,000, 2,500, 1,250 y 625 µg/mL, para obtener concentraciones finales de 150, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/cm<sup>2</sup> en la superficie del papel filtro, considerando 1 mL por papel filtro con 20 réplicas y por cada concentración evaluada. El extracto se aplicó con una micropipeta (1 mL) en papel filtro (6.4 cm × 7.8 cm) y se dejó secar en la campana; al mismo tiempo, se aplicó sólo

MeOH al papel filtro para el control negativo (20 réplicas). Los papeles filtros impregnados con las muestras y secos se introdujeron en viales de vidrio (8 cm de altura × 3 cm de diámetro); éstos se humedecieron con 1 mL de agua destilada y una lombriz se transfirió con cuidado a cada uno, tapando la boca del vial con una malla de algodón que permita el paso del aire. Los viales se colocaron en un contenedor horizontal de forma inclinada para que no se escurra el agua del interior de cada vial, también se agregó agua en el fondo del contenedor para mantener la humedad y finalmente se cubrió con una bolsa oscura. Todos los viales se mantuvieron a la temperatura de  $27 \pm 2$  °C, durante 72 h, monitoreando el número de lombrices vivas/muertas cada 24 h. Los datos registrados se analizaron para obtener los porcentajes de mortalidad y las concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ). Los extractos acuosos se evaluaron a las concentraciones 6, 3 y 1.5% p/v, 1 mL del EA por cada papel filtro (Aviles-Gomez *et al.*, 2022).



**Figura 2.9.** Diagrama del ensayo de ecotoxicidad en *Eisenia fetida*, 20 réplicas por cada concentración evaluada.

## 2.7. BIOENSAYO ANTIFÚNGICO

### 2.7.1 Reactivación de Cepas

Los hongos fitopatógenos se obtuvieron del cepario de la Unidad de Biotecnología (Cuadro 2.2). Las cepas fueron reactivadas en cajas Petri que contenían PDA (papa dextrosa agar), se incubaron a  $23 \pm 2$  °C, con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, por 7 días.

**Cuadro 2.2.** Fitopatógenos en estudio aislados de la raíz de chile habanero y en las hojas de tomate, respectivamente.

Especie	ID de cepa	Origen	Acceso Genbank
<i>Fusarium oxysporum</i>	FCHJ	<i>Capsicum chinense</i>	MG020428
<i>Corynespora cassicola</i>	ITC23	<i>Solanum lycopersicum</i>	ON815356

### 2.7.2 Bioensayo Antifúngico en Microdilución

El bioensayo de microdilución (placa de 96 pocillos) de extractos etanólicos y acuosos de colectas estacionales de la raíz de *C. chichenensis* y magnoflorina se llevó a cabo con el objetivo de determinar concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), así como el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *C. cassicola*; con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones letales medias  $CI_{50}$ .

Para realizar el bioensayo se obtuvieron las esporas, posterior a la reactivación de las cepas, contándolas en la cámara de Neubauer y ajustando la suspensión de esporas a la concentración de 100,000 esporas/mL. Después se diluyeron los extractos etanólicos (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), acuosos (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y magnoflorina (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en DMSO con 0.5% de Tween 20. Los controles negativos fueron medio RPMI solo (blanco), RPMI + hongo y RPMI + DMSO (5%); los controles positivos fueron RPMI + DMSO (40%) + hongo y RPMI + Procloraz + hongo.

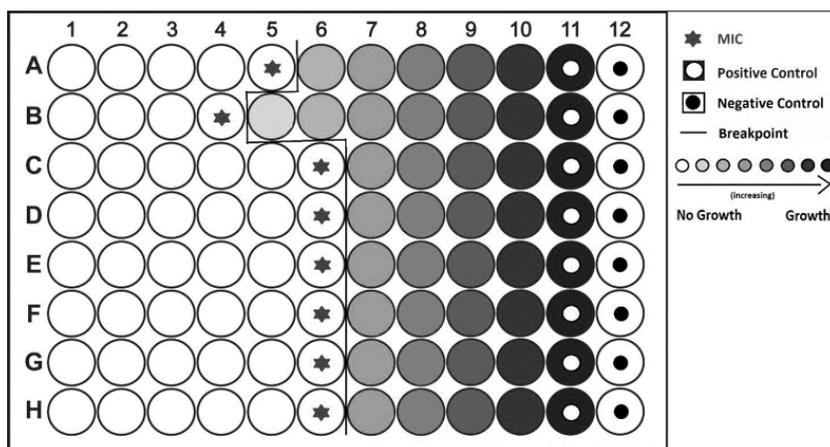
Las concentraciones evaluadas para los extractos etanólicos y acuosos fueron 2,000, 1,000, 500, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; y 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la magnoflorina. Para cada concentración se hizo

tres réplicas. Para las observaciones se tomaron en cuenta las clases que se tienen en el Cuadro 2.3, y se utilizó la fórmula de Abbott para obtener el % ICM, a la vez CIM respectivo.

**Cuadro 2.3.** Escala numérica para la lectura del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en el bioensayo en microdilución (NCCLS, 2002).

Parámetro de lectura	(%)	Clase
Ninguna reducción del crecimiento	100	4
Ligera reducción del crecimiento, 75% de crecimiento comparado con el control negativo.	75	3
Prominente reducción del crecimiento o un 50 % comparado con el control negativo.	50	2
Poco crecimiento o tan sólo el 25% del crecimiento del control negativo.	25	1
Completamente claro, sin ningún crecimiento comparado con el control negativo.	0	0

Formula de Abbott (% de inhibición de crecimiento micelial).  
 $\%ICM = (\text{Control negativo} - \text{crecimiento de la muestra} / \text{control negativo}) \times 100$



**Figura 2.10.** Placa de microdilución de 96 micropocillos.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y MÉTODOS

#### 3.1. RENDIMIENTO DE EXTRACTOS OBTENIDOS

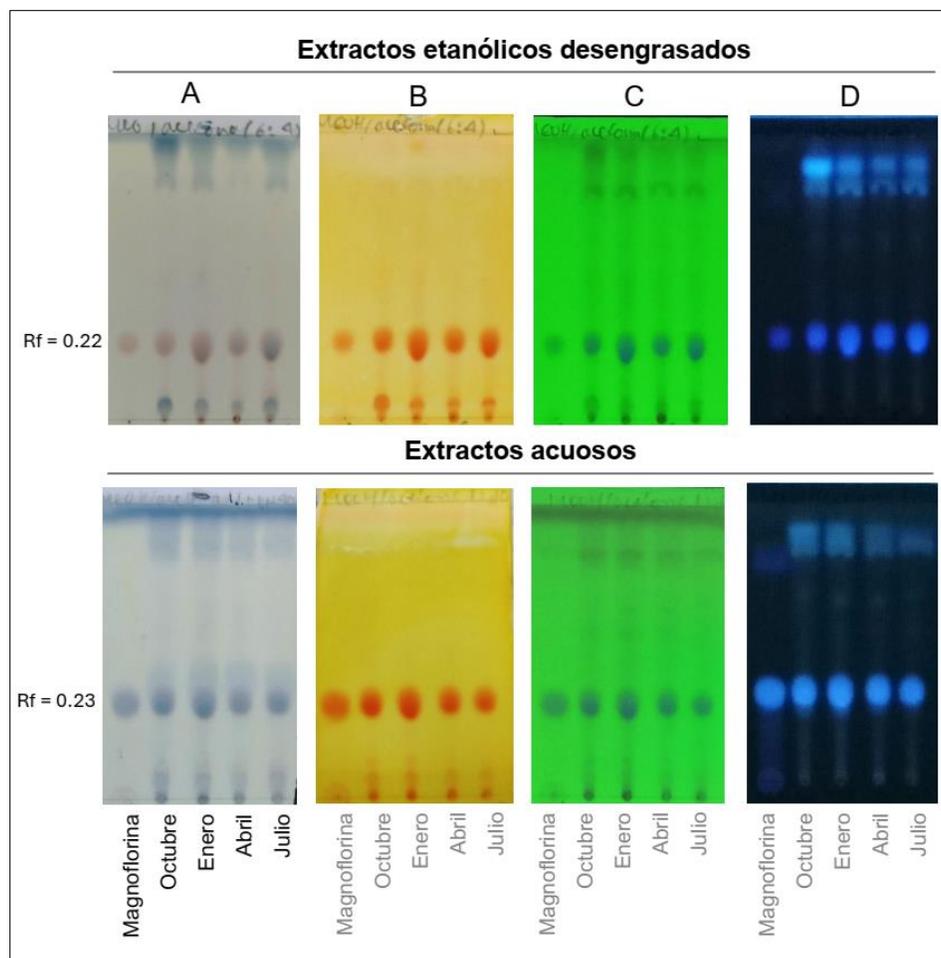
En el Cuadro 3.1 se presentan los rendimientos obtenidos de los extractos etanólicos crudos (EECs), los extractos etanólicos desengrasados (EEDs) y acuosos (EAs) de la raíz de *C. chichenensis* de las colectas realizadas. En general los EECs mostraron rendimientos mayores con respecto a los EEDs y EAs. Los EECs tuvieron rendimientos más altos en las colectas de octubre con 5.18%, seguido por la colecta de enero con 4.90%. En los EAs el mayor rendimiento se registró en la colecta de julio con 3.52%. En cuanto a los EEDs, tuvieron similar rendimiento, aunque los meses de abril y julio tuvieron un rendimiento ligeramente mejor, del 0.27%, ya que la mayor parte del extracto se queda en el AcOEt, en el que la magnoflorina es insoluble. Los EEDs, están enriquecidos del alcaloide.

**Cuadro 3.1.** Extractos de raíz de *C. chichenensis* y sus rendimientos.

Rendimiento (%) de extractos			
Colectas	Etanólico crudo	Etanólico desengrasado	Acuoso
Octubre	5.18	0.26	2.28
Enero	4.90	0.26	2.48
Abril	4.67	0.27	2.74
Julio	4.06	0.27	3.52

‰: g de extracto/g material vegetal extraído multiplicado por 100.

La presencia de magnoflorina en los EEDs y EAs se monitoreó por cromatografía en capa delgada de fase normal (CCD). Los EEDs como los EAs de las cuatro colectas mostraron perfiles cromatográficos similares, con magnoflorina como componente mayoritario y otros componentes alcaloidales minoritarios. La magnoflorina aparece a  $R_f$  de 0.22 - 0.23 con el sistema MeOH-acetona (60:40) + 6 gotas de  $NH_4OH$  (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Cromatogramas en capa delgada de los extractos etanólicos desengrasados y acuosos, colectas de octubre 2022, enero, abril y julio 2023. A). Revelado con ácido fosfomolibdico. B). Revelado con Dragendorff. C y D). Observadas al UV de 254 y 365 nm. El sistema de elución: MeOH-acetona (60:40) + 6 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

### 3.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MAGNOFLORINA

La purificación eficiente de la magnoflorina se realizó inicialmente con una partición ácido-base del EED obtenido de la raíz de *C. chichenensis*. La fracción básica butanólica presentó el menor rendimiento con el 20.8%, mientras que la fracción ácida-neutra el 30.24% (Cuadro 3.2). En CCD, fue descartada la presencia de magnoflorina en la fase acuosa residual.

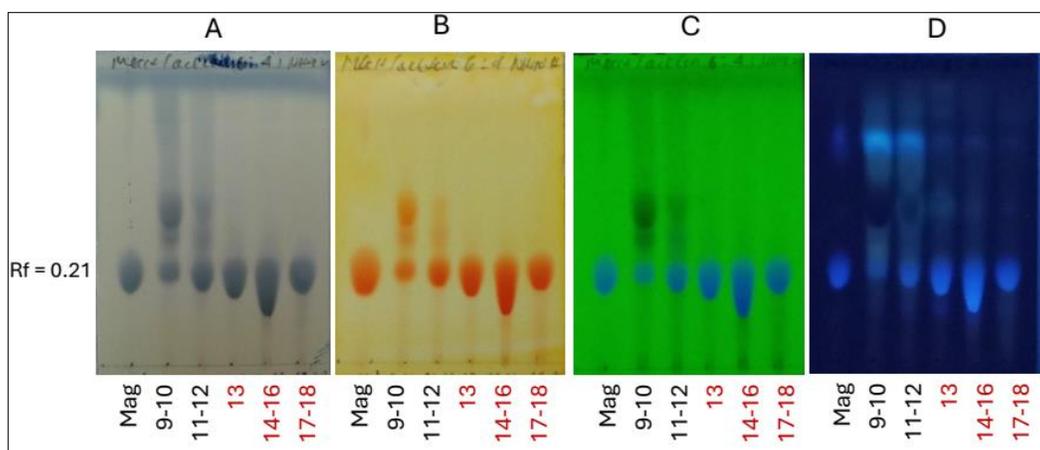
**Cuadro 3.2.** Rendimiento de la extracción ácido-base con butanol del extracto etanólico desengrasado.

Fracciones	Clave	% Rendimiento
BuOH ácido neutro	CCRN-14A	34.2
BuOH básico	CCRN-14B	20.8
Fase acuosa residual	CCRN-14C	40.1
<b>Total</b>		<b>95.1</b>

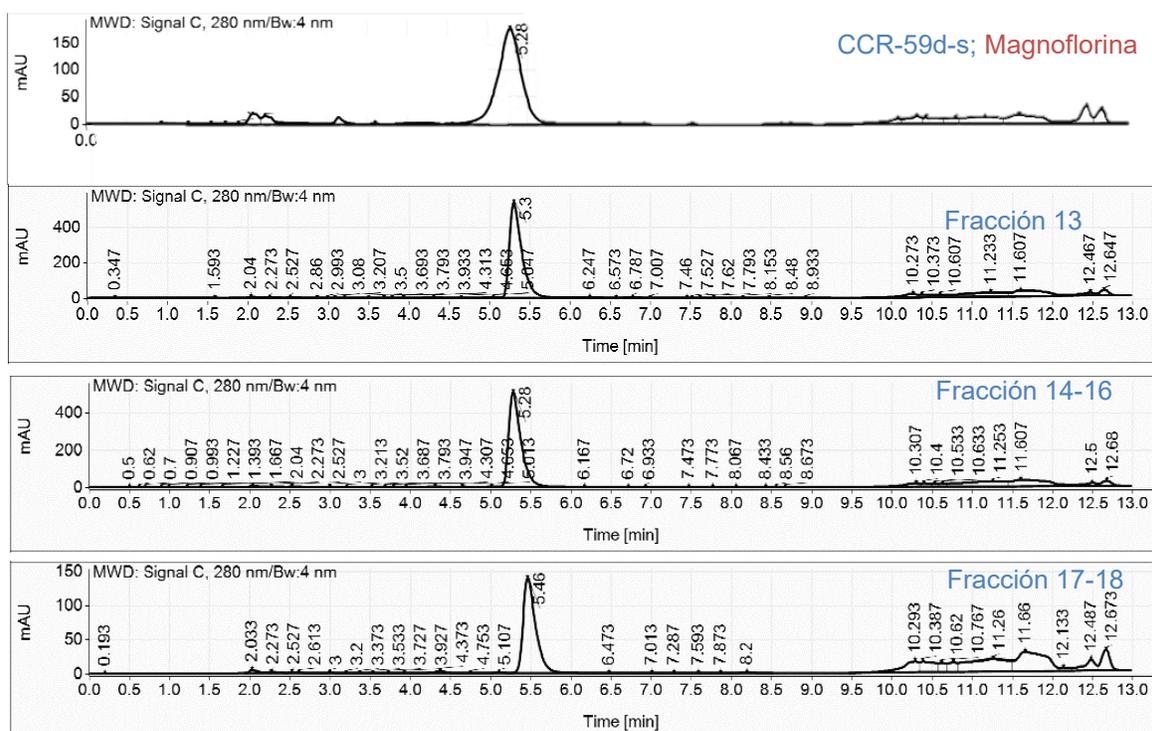
En la segunda parte, se demostró que la técnica de cromatografía líquida al vacío (CLV) es viable para el aislamiento de magnoflorina a partir de la fracción BuOH básica CCRN-14B. Las sub-fracciones de la 13 a la 18 corresponden a la magnoflorina pura (69 mg) con rendimiento de 15.8% respecto del extracto utilizado y 0.0035% respecto del material vegetal seco, la pureza se comprobó por CCD y HPLC (Cuadro 3.3 y Figura 3.2). En las sub-fracciones 9-10, además de magnoflorina se observó otro alcaloide menos polar, visible a 254, no visible a 365 nm, revelable con Dragendorff y ácido fosfomolibdico.

**Cuadro 3.3.** Rendimiento de las Sub-fracciones por CLV del extracto etanólico desengrasado de la raíz de *Croton chichenensis*.

Fracciones	Clave	% Rendimiento
1-7	CCRN-18B(1-7)	57.2
8	CCRN-18B(8)	1.6
9-10	CCRN-18B(9-10)	3.6
11-12	CCRN-18B(11-12)	3.8
13	CCRN-18B(13)	2.6
14-16	CCRN-18B(14-16)	10.7
17-18	CCRN-18B(17-18)	2.5
<b>Total</b>		<b>82.1</b>



**Figura 3.2.** Detección de magnoflorina (Mag) por CCD en las sub-fracciones obtenidas de la CLV de la raíz de *C. chichenensis*. A). Revelado con ácido fosfomolibdico. B). Revelado con Dragendorff. C y D). Observadas al UV de 254 y 365 nm. El sistema de elución fue MeOH/acetona (60:40) + 6 gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (v/v);  $R_f$  = referencia frontal de Mag.

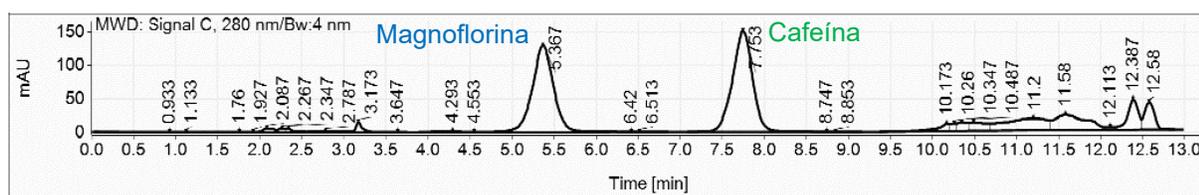


**Figura 3.3.** Cromatogramas de las sub-fracciones 13,  $t_R = 5.30$ ; 14-16,  $t_R = 5.28$ ; y 17-18,  $t_R = 5.46$  obtenidas de la CLV del EED de *Croton chichenensis* comparadas con el estándar de magnoflorina;  $t_R = 5.28$ . Método TEA-MeOH (Magno-02).

### 3.3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE MAGNOFLORINA CON ESTÁNDAR INTERNO

Se analizó el comportamiento de la cafeína (estándar interno) en el CLAR respecto de la magnoflorina, mediante el método TEA-MeOH; registrando la lectura a  $\lambda$  280 nm, para la magnoflorina,  $t_R = 5.36$ , para la cafeína,  $t_R = 7.75$  min. Ambos compuestos presentaron buena separación, también se verificó que la cafeína no se solapara con componentes de las muestras de las colectas para cuantificar y se determinó la concentración apropiada, 60  $\mu\text{g/mL}$ , para obtener un área que esté entre un tercio a un medio del área del patrón 7 de la magnoflorina.

El método de extracción y el método de cuantificación de la magnoflorina en cromatografía de líquidos con el estándar interno de cafeína se estableció en el laboratorio. La cafeína y magnoflorina se separan eficientemente con el método TEA-MeOH (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Separación de magnoflorina,  $t_R = 5.36$ , y cafeína,  $t_R = 7.75$ , con el método TEA-MeOH (Magno-02).

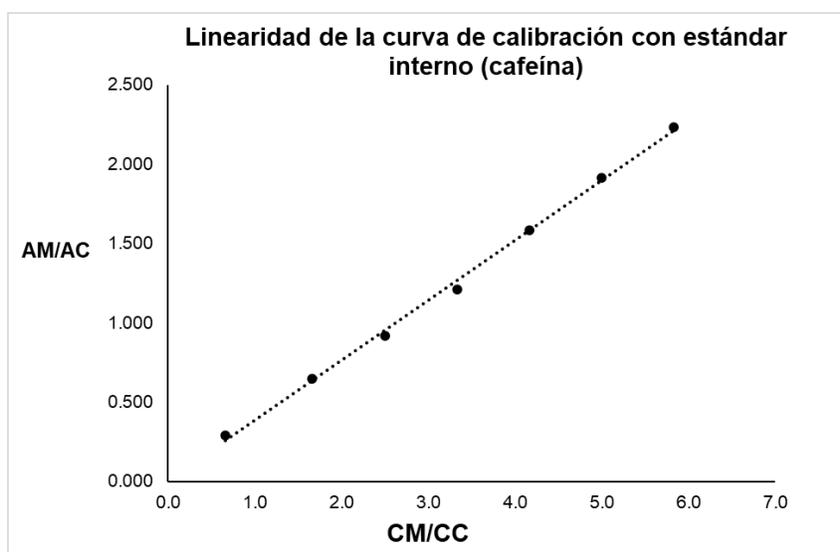
Todos los patrones o puntos para la curva de calibración de magnoflorina se inyectaron por triplicado y con los datos obtenidos se obtuvo la ecuación de regresión, que sirvió para estimar el contenido de magnoflorina en los EED y los EAs (Cuadro 3.4). La correlación entre CM/CC (concentración magnoflorina/concentración cafeína) y AM/AC (área magnoflorina/área cafeína), donde el valor de  $R^2 = 0.9981$ , es observada en la gráfica (Figura 3.5) y en los cromatogramas de líquidos de los siete patrones de 40 a 350  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3.6).

**Cuadro 3.4.** Patrones de curva de calibración de magnoflorina y ecuación de regresión.

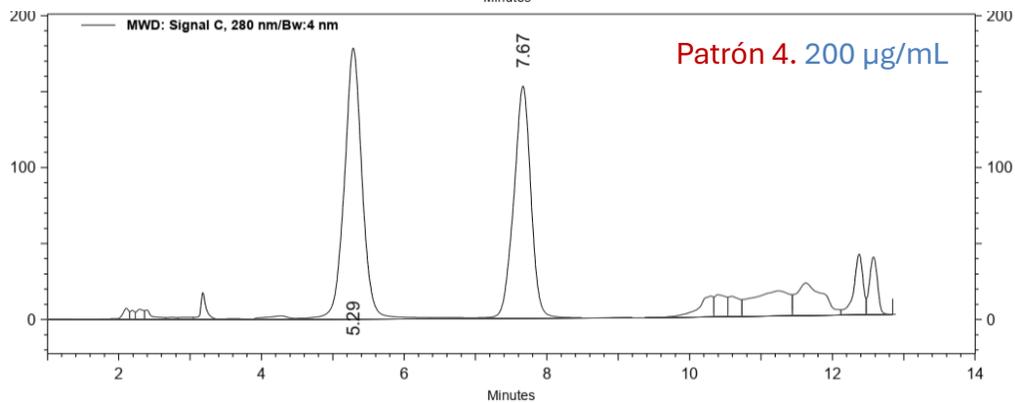
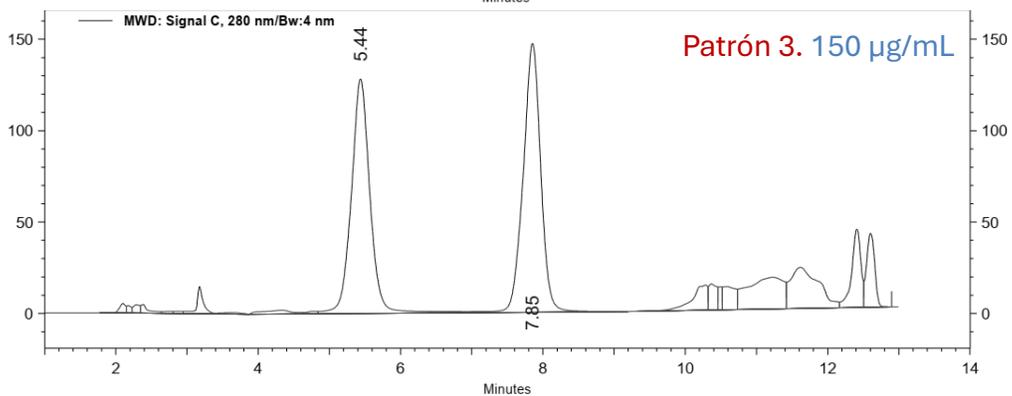
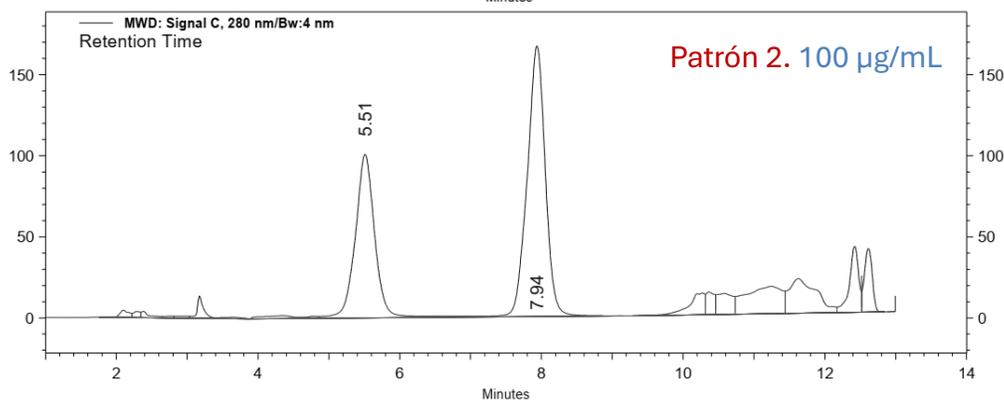
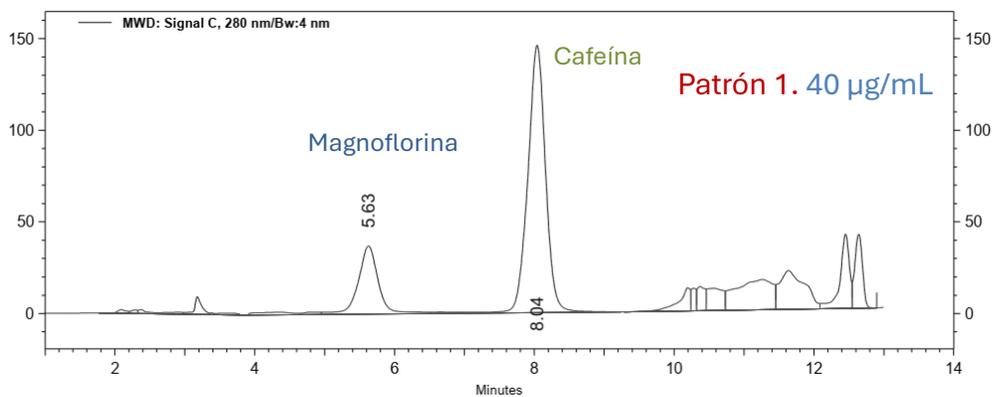
Patrón	CM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio AM (Unidades millones)	Promedio AC (Unidades millones)	CM/CC	Media AM/AC	Ecuación de regresión lineal
1	40	60	1,635,746.7	5,686,481.0	0.667	0.29	$y = 0.3787x + 0.004$ $R^2 = 0.9981$
2	100	60	3,890,728.0	5,998,484.0	1.667	0.65	
3	150	60	4,834,990.3	5,258,962.0	2.500	0.92	
4	200	60	6,746,823.7	5,564,484.3	3.333	1.21	
5	250	60	9,261,224.0	5,835,436.0	4.167	1.59	
6	300	60	11,369,552.0	5,942,195.3	5.000	1.91	
7	350	60	12,771,503.0	5,720,265.3	5.833	2.23	

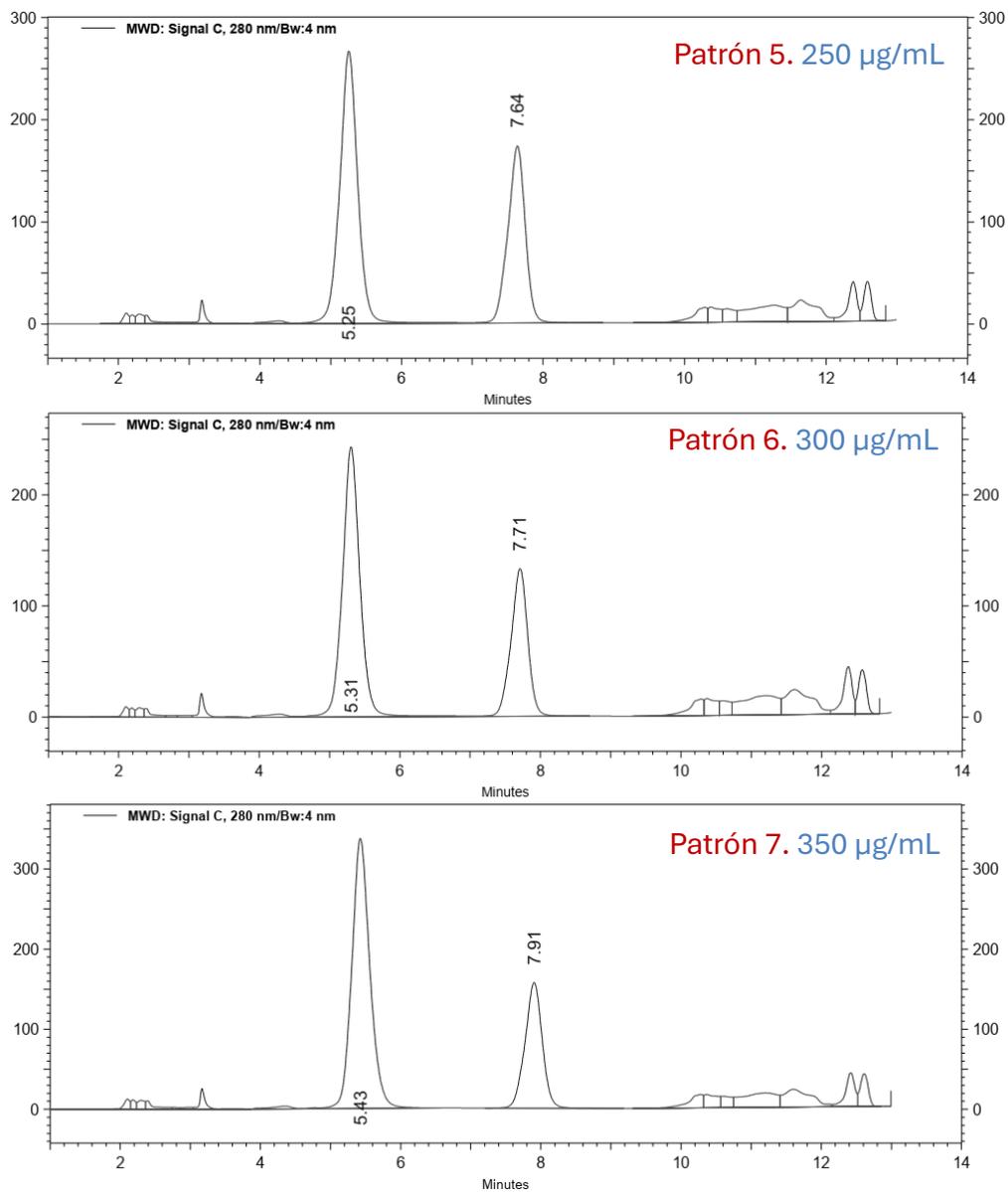
CM: Concentración magnoflorina; AM: Área magnoflorina

CC: Concentración cafeína; AC: Área cafeína



**Figura 3.5.** Linearidad de los patrones de magnoflorina con cafeína como estándar interno.





**Figura 3.6.** Cromatogramas de los patrones de la curva de calibración de magnoflorina de 40 a 350 µg/mL con 60 µg/mL de cafeína, a  $\lambda$  de 280 nm.

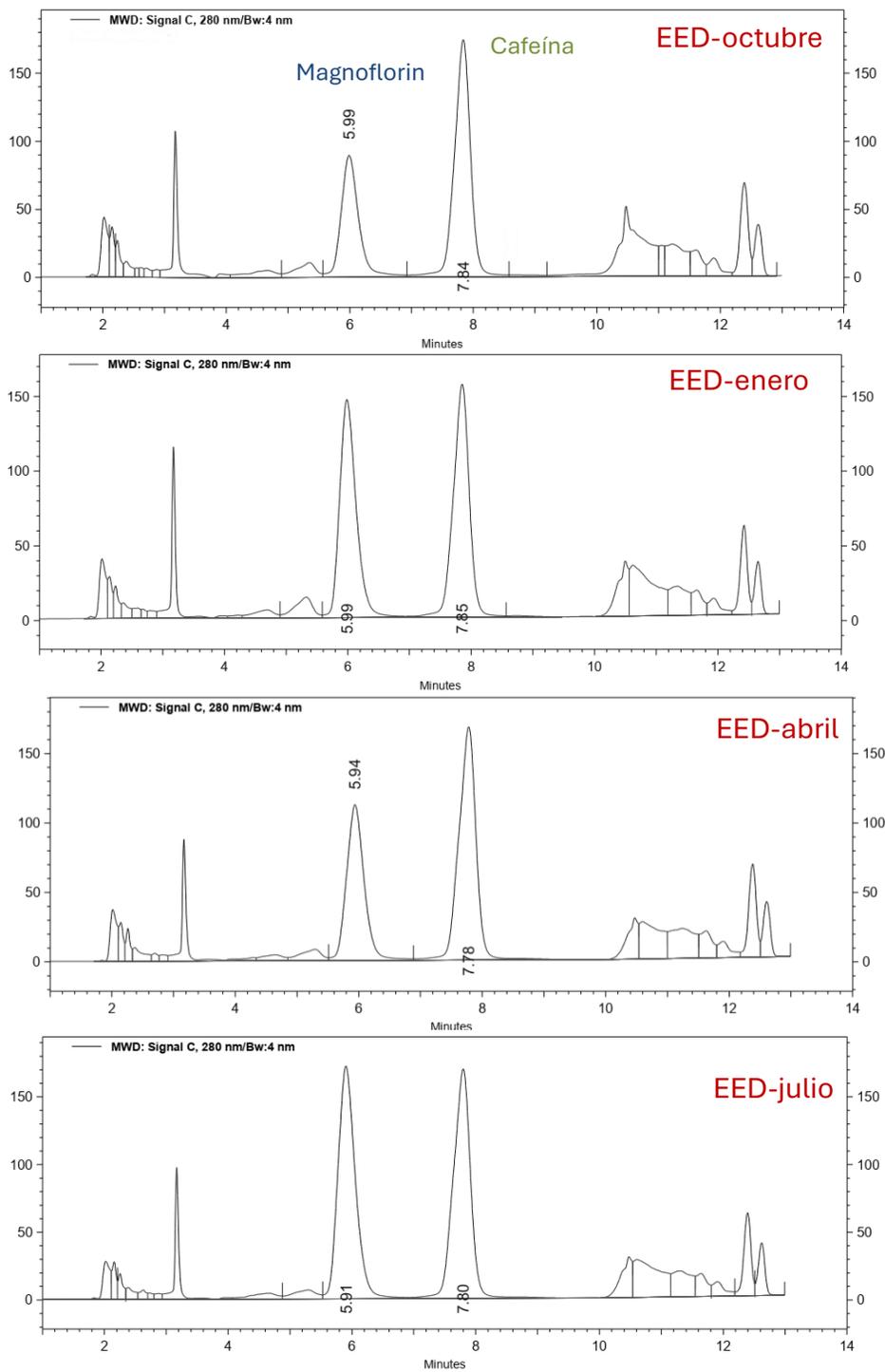
### 3.3.1 Contenido de Magnoflorina en Extractos Etanólicos Desengrasados (EED) y Acuosos

La cuantificación de magnoflorina en la raíz de *C. chichenensis* de las cuatro colectas estacionales (50 g de material seco y molido inicial) se realizaron con los EEDs y EAs con cafeína como estándar interno, después se interpoló la concentración de magnoflorina en cada uno, utilizando la ecuación de regresión lineal. Las cantidades obtenidas se ponderaron sobre la cantidad de material vegetal seco utilizado para obtener los extractos, con lo que se obtuvieron las estimaciones finales y sus límites de confianza (Cuadro 3.5 y Figura 3.7). La concentración de magnoflorina más alta en las raíces de *C. chichenensis* se obtuvo en los EEDs de las colectas de julio y enero con  $3.24 \pm 0.51$  y  $3.03 \pm 0.52$  mg/g de material seco y molido, respectivamente. En cuanto a los EAs, las colectas de octubre y enero mostraron contenido medio de magnoflorina con  $2.39 \pm 0.54$  y  $2.41 \pm 0.54$  mg/g de material seco y molido, respectivamente (Figura 3.8 y Cuadro 3.5).

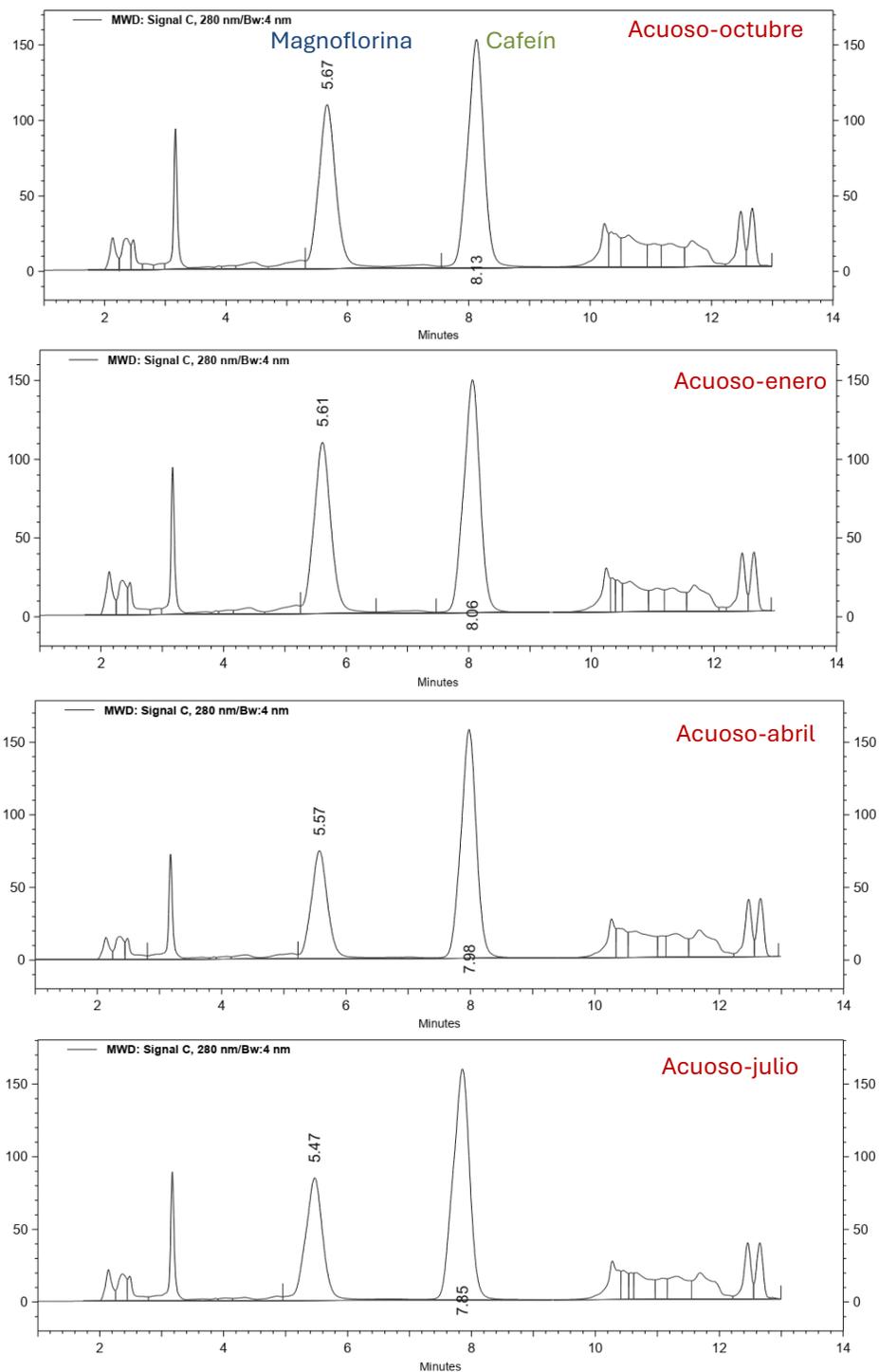
**Cuadro 3.5.** Contenido de magnoflorina en raíz de *C. chichenensis* en colectas estacionales (mg/g de material vegetal seco).

Colectas	Octubre (2022)	Enero (2023)	Abril (2023)	Julio (2023)
EED	$1.74 \pm 0.58$	$3.03 \pm 0.52$	$2.16 \pm 0.56$	$3.24 \pm 0.51$
Extractos acuosos	$2.39 \pm 0.54$	$2.41 \pm 0.54$	$1.56 \pm 0.60$	$1.74 \pm 0.58$

EED: Extracto etanólico desengrasado; contenido promedio de magnoflorina con desviación estándar al nivel de confianza del 95%, expresado en límites.



**Figura 3.7.** Cromatogramas de líquidos de los extractos etanólicos desengrasados de las 4 colectas, cuantificando magnoflorina con cafeína como estándar interno (60 µg/mL) a  $\lambda$  de 280 nm.



**Figura 3.8.** Cromatogramas de líquidos de los extractos acuosos de las 4 colectas, cuantificando magnoflorina con cafeína como estándar interno (60 µg/mL) a  $\lambda$  de 280 nm.

### 3.4. RESULTADO DEL ENSAYO DE ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO CRUDO DE *Croton chichenensis* EN *Eisenia fetida*

Los análisis Probit de las evaluaciones seriadas del extracto EEC de la colecta CCRN de las raíces de *C. chichenensis* contra *E. fetida* mostraron una  $CL_{50}$  de  $45.87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El control negativo metanol y el control positivo Vydate® (oxamil,  $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) mostraron 0 y 100 de mortalidad en *E. fetida*. El efecto del extracto en las lombrices se observó por las laceraciones que sufrían, dificultad para moverse y secreción de una sustancia amarilla a rojiza; en las concentraciones altas, se observaron lesiones desde el primer día. En las concentraciones medias a bajas se observaron laceraciones en el segundo o tercer día., pero sin mortalidad.

El extracto acuoso a las concentraciones de 6, 3 y 1.5% (p/v) de la raíz de *C. chichenensis* no afectó a la lombriz de tierra, con 100% de las lombrices vivas y sin laceraciones (Cuadro 3.6, Figura 3.9).

**Cuadro 3.6.** Resultado de bioensayo de ecotoxicidad y dosis letal del extracto etanólico crudo de *C. chichenensis* (raíz) contra *Eisenia fetida*, después de 72 h de exposición.

Planta (especie)	Concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Ecotoxicidad (% mortalidad)			Dosis Letal ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
		24	48	72	$CL_{50}$
<i>Croton chichenensis</i>	150	75	90	95	45.87 (35.48 - 59.30)
	100	20	60	85	
	50	0	5	35	
	25	0	0	20	
	12.5	0	0	10	
Control negativo: metanol		0	0	0	
Control positivo: Vydate® (oxamil, $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ )		100	100	100	

Límites de concentración establecidos a un nivel de confianza del 95%, estimado a partir del error estándar.



**Figura 3.9.** Efecto ecotóxico de los extractos de *C. chichenensis* contra *E. fetida*. A. Extracto etanólico crudo en las concentraciones más altas, 100 y 150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , después de 72 horas de exposición. B. Extracto acuoso después de 72 horas de exposición.

### 3.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

#### 3.5.1 *Fusarium oxysporum*

Los EECs y EAs mostraron efecto letal contra *F. oxysporum* a la concentración de 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; a partir de 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la actividad disminuyó. El extracto con mayor efecto contra *F. oxysporum* correspondió al EEC de la colecta de abril con  $\text{CI}_{50}$  de 300.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La actividad de los EAs disminuyó en las colectas con ICM de 42 a 50% a 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo actividad antifúngica a concentraciones menores; sin embargo, la colecta de abril presentó la  $\text{CI}_{50}$  más baja de 593.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La magnoflorina a la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostró 96% de inhibición de *F. oxysporum* y una  $\text{CI}_{50}$  de 199.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Cuadro 3.7, Figura 3.10).

**Cuadro 3.7.** Inhibición de Crecimiento Micelial (% ICM) y Concentraciones Inhibitorias Medias (CI<sub>50</sub>) de extractos de raíz de *C. chichenensis* y del alcaloide magnoflorina contra *F. oxysporum*.

	Mes de colecta	Concentraciones µg/mL y % ICM					Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) µg/mL
		2000	1000	500	250	125	
Extractos etanólicos crudos	Octubre	100	75	75	42	0	338.71 (159.95-717.22)
	Enero	100	75	67	42	0	356.05 (172.76-733.81)
	Abril	100	83	75	50	0	300.26 (115.46-780.82)
	Julio	100	75	67	33	8	362.22 (194.03-676.20)
		<b>2000</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	
Extractos acuosos secados	Octubre	100	50	33	0	0	704.94 (557.27-891.76)
	Enero	100	50	25	0	0	756.11 (610.05-937.14)
	Abril	100	50	25	17	0	593.55 (416.59-845.67)
	Julio	100	42	25	8	0	636.19 (474.68-852.65)
Compuesto activo	Magnoflorina	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62.5</b>	-	
		96	63	21	0		199.33 (136.40-291.31)
		<b>%ICM</b>					
Controles negativos	RPMI + hongo	0	0	0	0	0	-
	DMSO 5%	0	0	0	0	0	-
Controles positivos	Procloraz 5%	100	100	100	100	100	-
	DMSO 40%	100	100	100	100	100	-

Límites de concentración calculados a un nivel de confianza del 95% mediante el modelo Probit, en Excel. Las últimas cuatro filas corresponden a los controles.



**Figura. 3.10.** Efecto antifúngico de los extractos etanólicos crudos, acuosos de *C. chichenensis* y magnoflorina contra *F. oxysporum*, observados en el microscopio a 5x.

### 3.5.2 *Corynespora cassiicola*

Los EECs y EAs a 2,000 µg/mL inhibieron completamente a *C. cassiicola*. Los EECs de las colectas de enero y julio presentaron los IC<sub>50</sub> más bajas de 519.33 y 528.72 µg/mL. Los EAs mostraron efectividad similar en las colectas de octubre y abril con CI<sub>50</sub> de 583.48 µg/mL, mientras que enero presentó un CI<sub>50</sub> de 552.33 µg/mL, la más baja. La magnoflorina es efectiva contra *C. cassiicola* a 500 µg/mL con CI<sub>50</sub> de 201.19 µg/mL (Cuadro 3.8, Figura 3.11).

**Cuadro 3.8.** Inhibición de Crecimiento Micelial (%ICM) y Concentraciones Inhibitorias Medias (CI<sub>50</sub>) de extractos de raíz de *C. chichenensis* y del alcaloide magnoflorina contra *C. cassiicola*.

	Mes de colecta	Concentraciones µg/mL y % ICM				Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) µg/mL
		2000	1000	500	250	
Extractos etanólicos crudos	Octubre	100	67	42	8	557.92 (395.96-786.11)
	Enero	100	75	33	17	519.33 (370.88-727.19)
	Abril	100	67	50	8	542.64 (390.29-754.45)
	Julio	100	75	50	8	528.72 (371.66-752.14)
Extractos acuosos secados	Octubre	100	67	33	8	583.48 (426.06-799.05)
	Enero	100	75	33	8	552.33 (394.36-773.59)
	Abril	100	67	33	8	583.48 (433.31-785.68)
	Julio	100	67	25	8	607.35 (445.00-828.91)
Compuesto activo	Magnoflorina	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62.5</b>	
		100	67	8	0	201.19 (151.14-219.35)
<b>%ICM</b>						
Controles negativos	RPMI + hongo	0	0	0	0	-
	DMSO 5%	0	0	0	0	-
Controles positivos	Procloraz 5%	100	100	100	100	-
	DMSO 40%	100	100	100	100	-

Límites de concentración calculados a un nivel de confianza del 95% mediante el modelo Probit, en Excel. Las últimas cuatro filas corresponden a los controles.



**Figura 3.11.** Efecto antifúngico de los extractos etanólicos crudos, acuosos de *C. chichenensis* y magnoflorina contra *C. cassicola*, observados en el microscopio a 5x.

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL

La biodiversidad que posee la península de Yucatán, así como las diferentes condiciones climáticas del año, inciden en las propiedades biológicas y en el metabolismo químico de cada especie. En particular, *Croton chichenensis* es una de las especies cuasi-endémicas reportadas para el género *Croton* en la península de Yucatán (Carnevali *et al.*, 2021), de la cual se ha confirmado en varios estudios que posee efecto antifúngico. El extracto etanólico de sus raíces inhibió, entre el 62 al 83%, el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *A. tagetica* ATTC 53771, *C. gloeosporioides* CICY002, *F. oxysporum* CICY003 y *Rhizopus* sp. a la concentración de 2 mg/disco en el bioensayo de disco (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008); la subfracción metanólica, obtenida a partir del extracto etanólico, inhibió, entre el 75 al 100%, el crecimiento micelial de los hongos *A. chrysanthemi* CICY004, *C. gloeosporioides* CICY002 y *F. oxysporum* CICY003, a la concentración de 125 a 500 µg/mL en microdilución (Concha-Franco, 2020); también, el extracto acuoso de las raíces inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata* ITC24, *C. cassiicola* ITC23, *C. ITC22* y *F. equiseti* ITC32 al 100% a la concentración del 3% (p/v) (Moo-Koh *et al.*, 2022). En el presente estudio, se confirmó la actividad antifúngica de *C. chichenensis*, utilizando los EEC y los EA de las raíces, de las cuatro colectas estacionales contra *C. cassiicola* ITC23 y *F. oxysporum* FCHJ.

La presencia de magnoflorina se ha reportado en cinco especies del género *Croton*. A partir del extracto etanólico de la corteza de *C. heliotropiifolius* (Queiroz *et al.*, 2014), del extracto metanólico de la corteza de *C. urucurana* (Cordeiro *et al.*, 2016), *Croton wilsonii* (Stuart *et al.*, 1967). A partir del extracto metanólico de las hojas de *C. lechleri* (Lock *et al.*, 2004) y del extracto metanólico de las hojas de *C. xalapensis* (Arevalo *et al.*, 2009), la cuantificación de magnoflorina por CLAR se reporta para *C. lechleri* y *C. xalapensis* con un contenido de 2.47 y 139.58 mg/g peso seco de material vegetal, respectivamente, cuantificado por CLAR (Arevalo *et al.*, 2009; Milanowski *et al.*, 2002).

La magnoflorina se aisló y se reportó por primera vez de la corteza de *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae) (Nakano-Tatsuchiko, 1954), en su forma alfa en el H de la posición 6ª. La β-magnoflorina fue reportada por primera vez de las partes aéreas de *Clematis parviloba*, (Ranunculaceae) junto con α-magnoflorina (Chen *et al.*, 2009), aunque, la forma alfa, es la que se suele encontrar con frecuencia en las plantas (Arevalo *et al.*, 2009; Hung *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 1994). Por otra parte, la laurifolina es isómero de la magnoflorina, por el hidroxilo en posición 9 (Figura 4.1), aunque estructuralmente similares, su actividad biológica y propiedades pueden

diferir. La presencia de laurifolina y magnoflorina juntas se ha detectado en las raíces de *Menispermum dauricum*, *Sinomenium acutum* y *Sinomenii cauli*, pertenecientes a la familia Menispermaceae (Jiang *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2014; Shan *et al.*, 2018). En el género *Croton* no se encontraron reportes de laurifolina.

**Figura 4.1.** Estructura de  $\alpha$ - y  $\beta$ -magnoflorina y del isómero laurifolina.



La magnoflorina es un alcaloide polar, soluble en agua y disolventes polares como metanol y etanol; estable en medio ácido y neutro, tal como en medio básico (Dostál, 2000), lo que dificulta su extracción del medio acuoso. Sin embargo, su solubilidad en *n*-butanol permite aislarla de la matriz principal mediante extracción ácido-base y subsecuente aislamiento mediante técnicas cromatográficas. De esta forma, la purificación de magnoflorina a partir de la fracción butanólica básica del extracto etanólico crudo de *C. chichenensis* (raíz), colectada en 2014-2016, tuvo un rendimiento del 0.0035% respecto del material vegetal inicial, no obstante, de la cuantificación se obtuvieron cantidades similares a las reportadas en *C. lechleri* (Milanowski *et al.*, 2002). Además, se demostró que el material almacenado por 6-8 años mantuvo el contenido de magnoflorina.

Con la cuantificación del contenido de magnoflorina de colectas trimestrales, el mayor contenido se observó en los meses de enero y julio en los EEDs y en los meses de octubre y enero en los EAs, siendo mayor el contenido en los extractos etanólicos. Los extractos etanólicos y acuosos de las colectas mostraron actividad contra los dos fitopatógenos evaluados, la colecta de abril tuvo menor  $CI_{50}$  contra *F. oxysporum* y la colecta de enero contra *C. cassiicola*. Contra ambos fitopatógenos, la magnoflorina mostró una menor  $IC_{50}$  con respecto a los extractos. En este estudio se confirmó que la magnoflorina es el principio activo de la raíz de *C. chichenensis* contra *C. cassiicola* ITC23 y *F. oxysporum* FCHJ, siendo por primera vez reportado de un extracto acuoso. La variación estacional de los alcaloides galanthamina y licorina a partir de los extractos

metanólicos de los bulbos y hojas de la planta *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae) colectada mensualmente, se determinó por CLAR (Demir *et al.*, 2022). El mayor contenido de galanthamina se reportó en el mes de abril en el bulbo (29.53 mg/g) y en las hojas (10.37 mg/g). La mayor cantidad de licorina también se tuvo en el mes de abril, tanto en el bulbo como en las hojas, con 26.17 y 15.80 mg/g, respectivamente (Demir *et al.*, 2022). En otros estudios, se ha reportado la cuantificación del contenido de magnoflorina en varias muestras de suplementos alimenticios de la raíz de *Caullophyllum thalictroides* (Berberidaceae), en forma de polvo ( $0.36 \pm 0.08\%$  (p/p: peso/peso); mg/100 mg de material vegetal seco) y en disolución ( $0.194 \pm 0.37 - 3.253 \pm 0.11$  mg/mL), utilizando CLAR (Avula *et al.*, 2011). También se ha cuantificado magnoflorina mediante CLAR de las semillas de *Zizyphus jujuba* var. *Spinosa*, y *Zizyphus Mauritania* (Rhamnaceae); se analizaron varias muestras y el contenido promedio encontrado fue de  $0.1560 \pm 0.0338\%$  y  $0.0553 \pm 0.0163\%$ , a partir de peso de semilla seca, respectivamente (Kim *et al.*, 2014). Con lo anterior, se ilustra la efectividad de la técnica CLAR en la cuantificación de compuestos alcaloidales en diferentes muestras.

En cuanto a sus propiedades antifúngicas, la  $\beta$ -magnoflorina afecta a *Penicillium avellaneum* y a *P. oryzae*, donde las concentraciones inhibitorias mínimas fueron de 10 y 100  $\mu$ g/disco respectivamente; y de 5  $\mu$ g/disco de  $\alpha$ -magnoflorina contra *P. avellaneum*, pero inefectiva contra *P. oryzae*, ambos compuestos aislados de las partes aéreas de *Clematis parviloba* (Chen *et al.*, 2009). La  $\alpha$ -magnoflorina (50  $\mu$ g/mL) afectó hasta un  $55.91 \pm 7.17\%$  la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa en *Candida albicans* KTCC7965, enzima necesaria para el funcionamiento del hongo; en otro estudio se reportó la  $\alpha$ -magnoflorina contra *Tricophytum rubrum* ATCC 28188 y *T. mentagrophytes* ATCC 9533, con concentraciones inhibitorias mínimas de 62.5  $\mu$ g/mL, aislada de la planta *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae) (Kim *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2020); en estos reportes, se tratan de hongos que afectan la salud humana; en cambio, resalta la ausencia de reportes contra hongos fitopatógenos.

Entre otras actividades de la magnoflorina, se encuentra su propiedad antiinflamatoria, demostrando potencial para el tratamiento de la artritis reumatoide a la concentración de 100 y 150  $\mu$ mol/L para inhibir el factor inflamatorio y el óxido nítrico; y el dengue, a la concentración de 25 mg/Kg de peso corporal en ratón administrado 3-4 veces al día (Mu *et al.*, 2024; Suckla *et al.*, 2020). Es un posible agente anticonvulsivo, ya que, por su estructura química, puede unirse a receptores GABA, a la concentración de 1.04  $\mu$ M extracelular y 18.3  $\mu$ M transmembranal (Álvarez *et al.*, 2024). Tiene actividad neuroprotectora en las células del hipocampo a la concentración de

---

10 y 20 mg/Kg peso corporal en ratón; y para el tratamiento del Alzheimer se requiere 10  $\mu$ M en células PC12 (Szalak *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024). También es candidata para el tratamiento del cáncer de mama, con actividad citotóxica,  $CI_{50} = 23.74 \mu$ M en células MCF-7; y actividad citotóxica contra cáncer de pulmón con  $CI_{50} = 189.65 \pm 48.97 \mu$ g/mL en células NCI-H1299, y en células A549 con  $CI_{50} = 296.7 \pm 51.23$  (Tian *et al.*, 2024; Okon *et al.*, 2020).

Por otra parte, se evaluó la toxicidad de los extractos etanólico y acuoso de la raíz de *C. chichenensis* en un organismo benéfico, ya que las plantas también producen metabolitos altamente tóxicos (Ferraz *et al.*, 2022; Jesus-Aviles *et al.*, 2022). El ensayo de toxicidad en lombrices de tierra (*E. fetida*) consiste en exponer a estos organismos en contacto directo con las muestras a evaluar, previamente embebidas en papel filtro para detectar sustancias tóxicas, según la OECD (1984). Se evaluó el extracto etanólico crudo (EEC) y acuoso (EA) de la raíz de *C. chichenensis* contra *E. fetida*, determinando la  $CL_{50}$  del EEC a 45.87  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> (35.48 - 59.30) y el EA al 6% fue inocuo a la lombriz de tierra. Comparado con la actividad del extracto acuoso de las hojas de la planta *Alseis yucatenensis*, tiene efecto ecotóxico, con  $CL_{50}$  2.80% p/v (Aviles-Gomez *et al.*, 2022). Las  $CI_{50}$  de los extractos etanólicos crudos de las colectas contra *F. oxysporum* y *C. cassiicola* estuvieron por debajo de este valor, por lo que no representaría un riesgo para las lombrices. Sin embargo, es importante realizar otras pruebas para mayor seguridad.

## CAPITULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1. CONCLUSIONES

**5.1.1.** El alcaloide cuaternario magnoflorina que se purificó del EEC de la raíz de *C. chichenensis* está presente en muy buena cantidad, recuperándose un 15.8% del alcaloide respecto del extracto subfraccionado; con respecto al material vegetal seco y molido utilizado representa el 0.0035%.

**5.1.2.** El alcaloide magnoflorina aislado es uno de los principios activos de *C. chichenensis*, ya que inhibió el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *C. cassiicola*, y ambas cepas mostraron similar sensibilidad al metabolito.

**5.1.3.** El fitopatógeno *F. oxysporum* FCHJ, mostró mayor sensibilidad a los extractos etanólicos crudos (EEC) de la raíz de *C. chichenensis*, la colecta de abril tuvo  $CI_{50}$  más baja. Mientras que *C. cassiicola* ITC23 tendió a mostrar sensibilidad tanto a los extractos etanólicos crudos (EEC) y acuosos (EAs), siendo los extractos del mes de enero con menor  $CI_{50}$ .

**5.1.4.** Los EEC y acuosos de la raíz de *C. chichenensis* son inocuos a la lombriz de tierra *Eisenia fetida*.

**5.1.5.** La magnoflorina es insoluble en AOEt, por tanto, el desengrasado del material vegetal con este disolvente y posterior extracción con etanol, fue efectivo para obtener muestras de menor complejidad para la cuantificación de magnoflorina en las colectas estacionales, denominadas extracto etanólico desengrasado (EED).

**5.1.6.** El método Magno-02 (TEA-MeOH; TEA = trietanolamina), MeOH en polaridad ascendente, fue un método muy eficiente en la separación del alcaloide magnoflorina con cafeína como estándar interno para la cuantificación de magnoflorina en las colectas estacionales, pues se tuvo un alto rendimiento.

**5.1.7.** La magnoflorina se biosintetiza todo el año, pues se detectó en todas las colectas, tanto en los extractos etanólicos desengrasados (EED) así como en los extractos acuosos (EAs).

**5.1.8.** Se concluye que los meses más convenientes para coleccionar raíz de *C. chichenensis* son enero y julio, en los que se registró mayor contenido de magnoflorina.

## 5.2. PERSPECTIVAS

**5.2.1.** Se recomienda purificar e identificar los alcaloides minoritarios que se observaron en los EED y acuosos.

**5.2.2.** Evaluar la actividad de magnoflorina contra otros hongos fitopatógenos para conocer su espectro de acción.

**5.2.3.** Estudiar la presencia de magnoflorina en plantas de *C. chichenensis* cultivadas *in situ*, así como la actividad biológica de los extractos, de esta manera, determinar su viabilidad en cultivo, considerando a futuro desarrollar un biofungicida con los extractos.

**5.2.4.** Se recomienda realizar prueba de actividad ecotóxica de la magnoflorina aislada contra *E. fetida* (organismo benéfico). Además, evaluar la actividad ecotóxica del extracto etanólico de *C. chichenensis* contra *E. fetida*, en campo, si es posible; también probar con otros modelos de organismos benéficos.

**5.2.5.** Finalmente, también se sugiere confirmar o descartar la posibilidad de la variante  $\beta$ -magnoflorina, además de la forma  $\alpha$ , y la presencia de laurifolina en los extractos de *C. chichenensis*.

## REFERENCIAS

- Aguiar-Francisco M., Vallad, G.E., Timilsina, S., Veloso, J.S., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S., Reis, A. (2022). Phylogenetic network analysis of South and North American *Corynespora cassiicola* isolates from tomato, cucumber, and novel hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 163, 657-671.
- Álvarez-Fanny E.C., Romano, E., Ledesma, A.E. (2024). Structural characterization and biological activity evaluation of magnoflorine alkaloid, a potential anticonvulsant agent. *Journal of Molecular Structure*, 1317, 139-036.
- Arevalo-Carolina, Lotti C, Piccinelli A.L., Russo M., Ruiz I., Rastrelli, L. (2009). Magnoflorine and phenolic derivatives from the leaves of *Croton xalapensis* L. (Euphorbiaceae). *Natural Product Communications*, 4, 1697-700.
- Avery-Simon, V., Singleton, I., Magan, N., Goldman, G.H. (2019). The fungal threat to global food security. *Fungal Biology*, 123, 555-557.
- Aviles-Gomez, G., Cristóbal-Alejo, J., Andrés, M.F., González-Coloma, A., Carnevali, G., Pérez-Brito, D., Moo-Koh, F.A., Gamboa-Angulo, M. (2022). Nematicidal screening of aqueous extracts from plants of the Yucatan peninsula and ecotoxicity. *Plants*, 11, 2138.
- Avula-Bharathi, Wang, Y.H., Rumalla, C.S., Ali, Z., Smillie T.J., Khan I.A. (2011). Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* L. Michx. using UPLC, HPLC and HPTLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 895-903.
- Badal S. (2017). *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategy*. Academic Press Elsevier, London, pp. 163-165.
- Barrera-Carlos, A.C., Gómez D.C., Castiblanco F.A. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21, 234-247.
- Chen-Jia, H., Du, Z.Z., Shen, Y.M., Yang, Y.P. (2009). Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32, 3-5.

- Chen-Jianxin, Gao, K., Liu, T., Zhao, H., Wang, J., Wu, H., Liu, B., Wang, W. (2013). Aporphine alkaloids: A kind of alkaloids' extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. *Asian Journal of Chemistry*, 25, 10015-10027.
- COFEPRIS. Consulta registros de plaguicidas y nutrientes. [acceso 14 de noviembre de 2024].
- Concha, F.S. (2020). Caracterización de metabolitos minoritarios de las raíces de *Croton chichenensis* y su evaluación antifúngica. Tesis de licenciatura de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química, Mérida. pp. 21-60.
- Cordeiro-Kátia, W., Felipe J.L, Malange K.F, Do Prado P.R., De Oliveira F.P., Garcez F.R., De Cássia F.K., Garcez W.S., Toffoli-Kadri M.C. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 183,128-135.
- Cruz-Cerino, P., Cristóbal-Alejo J., Ruiz-Carrera V., Carnevali G., Vera-Ku M., Martín J., Reyes F., Gamboa-Angulo M. (2020). Extracts from six native plants of the Yucatan peninsula hinder mycelial growth of *Fusarium equiseti* and *F. oxysporum*, pathogens of *Capsicum chinense*. *Pathogens*, 9, 827.
- Da Paz-Danielle, S., Araujo, J.R., Rodrigues, A.A., Silva, E.K., Diniz, N.B. (2018). Reaction of papaya genotypes to target spot and activity of plant extracts and *Bacillus* spp. on *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40.
- De Sousa-Priscilla, A.F., Silva, J., Lima S., D., Ribeiro, P., Sousa de Brito, E., Kerntopf, M.R., Delmondes, G.A., Andrade P.J. C., Salazar, G., Batista, F., Alves Magalhães, F.E., Gomez, M., Rolón, M., Coronel, C., Ribeiro-Filho, J., Almeida-Bezerra, J.W., Siyadatpanah, A., Nissapatorn, V., Pereira, M.L., Coutinho, H., Morais-Braga, M. (2021). Chemical constituents and biological activities of *Croton heliotropiifolius* Kunth. *Antibiotics*, 10, 1074.
- Demir-Sina, C., Yıldırım, A.B., Turker, A.U., Eker, İ. (2022). Seasonal variation in alkaloid content, phenolic constituent and biological activities of some *Leucojum aestivum* L. populations in Turkey. *South African Journal of Botany*, 147, 713-723.

- Dixon, L.J., Schlub, R.L., Pernezny, K., Datnoff, L.E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99, 1015-1027.
- Dos Santos-Alberto, P., Fernandes do Amaral, A.C., De Araujo Silva, M., De Aquino Neto, F.R. (2001). Seasonal variation of the chemical constituents from *Croton* species. *Journal of Biosciences*, 56, 357-362.
- Dostál-Jirí. (2000). Two faces of alkaloids. *Journal of Chemical Education*, 77, 993-993.
- Durán R., Méndez M. (2010). Flora medicinal en: Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY-PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. Pp. 349-252.
- Edel-Hermann V., Lecomte C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. *Phytopathology*, 109, 512-530.
- Erbach-Gregor. (2012). Pesticides legislation in the EU towards sustainable use of plant protection products. Library of the European Parliament, 120291REV1.
- Escobar, C.Z. (2018). Análisis quimiométrico de la diversidad de alcaloides en tres especies del género *Argemone* L. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida. pp. 25-33.
- Fauvergue, X., Rusch, A., Barret, M., Bardin, M., Jacquin-Joly, E., Malausa, T., Lannou, C. (2022). Extended biocontrol. Springer Nature. Pp. 1-20.
- Ferraz-Celso, A., Pastorinho, M.R., Palmeira-de-Oliveira, A., Sousa, A.C.A. (2022). Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. *Environmental Pollution*, 292(Pt B), 118319.
- Fisher-Mattew, Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., & Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186-194.
- Fisher-Matthew, C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., Gurr, S.J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360, 739-742.
- Flora de la Península de Yucatán. <https://www.cicy.mx/Sitios../Flora%20Digital/resultados.php>. [Acceso 08 de agosto de 2024].

- Gamboa-Angulo, M., Cristóbal-Alejo, J., Medina-Baizabal, I.L., Chí-Romero, F., Méndez-González, R., Simá-Polanco, P., May-Pat, F. (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955-1959.
- Germán-Fernández, C.C., Ramírez-Morillo, I.M., Pérez-Sarabia, J.E., Tapia-Muñoz, J.L., Medina, H.E., CETZAL-IX, W.R., Hernández-Aguilar, S., Can Itza, L.L., Flores, N.E., De Stefano, R.D., Romero-González, G.A. (2021). Assessing the risk of extinction of vascular plants endemic to the Yucatán peninsula biotic province by means of distributional data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 106, 424-457.
- Ghosh-Pranab, Mandal, A., Rasul, M.G. (2013). A new bioactive ursane-type triterpenoid from *Croton bonplandianum* Bail. *Journal of Chemical Sciences*, 125, 359-364.
- Global Biodiversity Information Facility. Euphorbiaceae. <https://www.gbif.org/species/4691> [Acceso 08 de agosto de 2024].
- González-Tomas, T. F. H (2013). Obtención de metabolitos secundarios de *Croton chichenensis* Lundell y evaluación de sus propiedades antifúngicas. Tesis de Licenciatura en Q.I. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química. pp. 13-33.
- Gordillo-Martha, M., Ramírez, J.J., Durán, R.C., Arriaga, E.J., García, R.M., Cervantes, A., Hernández, R. (2009). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México (parte A). *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, 73, 155-281.
- Guerra-José, I.J., Ferreira, M.R., Oliveira, A.M., Soares, L.A. (2022). *Croton* sp.: a review about popular uses, biological activities and chemical composition. *Research, Society and Development*, 11, e57311225306.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P., López-Martínez, L.X., Contreras-Angulo, L.A., Elizalde-Romero, C.A., Heredia, J.B. (2020). Plant alkaloids: Structures and bioactive properties, en: Swamy, M. (Ed.). Springer, Singapore, pp. 87-108.
- Hernández-Carlos, B., Gamboa-Angulo M. (2019). Insecticidal and nematicidal contributions of Mexican flora in the search for safer biopesticides. *Molecules*, 24, 897.

- Hung-Tran, M., Lee, J.P., Min, B.S., Choi, J.S., Na, M., Zhang, X., Ngoc, T.M., Lee, I., Bae, K. (2007). Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* protects high density lipoprotein during oxidant stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1157-1160.
- Iraqi-Parbin. (2015). Evaluation of antibacterial and antifungal activities of leaf and seed extracts of *Croton tiglium* plant against skin disease causing microbes. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3, 139-144.
- Jiang-Zheng, M., Wang, L.J., Pang, H.Q., Guo, Y., Xiao, P.T., Chu, C., Guo, L., Liu, E.H. (2019). Rapid profiling of alkaloid analogues in *Sinomenii Caulis* by an integrated characterization strategy and quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 376-385.
- Kavanagh, K. (2017). Fungi: Biology and Applications, en: Science, (Ed.; 3a ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 366-374.
- Kim-Jaegoo, Quang H.B.T., Shin, Y.K. Kim K.Y. (2018). Antifungal activity of magnoflorine against *Candida* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 167.
- Kim-Wong I., Zhao B.T, Zhang H.Y., Lee J.H., Son J.K., Woo M.H. (2013). Quantitative and pattern recognition analyses of magnoflorine, spinosin, 6''-feruloyl spinosin and jujuboside A by HPLC in *Zizyphi Semen*. *Archives Pharmacal Research*, 37, 1139-1147.
- Liang-Xiaoyu, Peng, Y., Liu, Y., Wang, M., Yang Y., Zhang, Y. (2019). First report of *Bipolaris bicolor* causing a leaf spot disease on rubber tree. *Journal of Phytopatology*, 167, 553-557.
- Lock-Olga, Rojas R. (2004). Química y farmacología del *Croton lechleri* Muell. Arg., ("Sangre de grado"). *Revista de Química*, 18, 11-18.
- Looi-Hong, K., Toh, Y.F., Yew, S.M., Na, S.L., Tan, Y.C., Chong, P.S., Khoo, J.S., Yee, W.Y., Ng, K.P., Kuan, C.S. (2017). Genomic insight into pathogenicity of dematiaceous fungus *Corynespora cassiicola*. *PeerJ*, 5, e2841.
- Luo-Nanxuan, Jin, L., Yang, C., Zhu, Y., Ye, X., Li, X., Zhang, B. (2021). Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum*. *The Journal of antibiotics*, 74, 206-214.

- Mahendran-Thamby, R.,T., Thottathil, G.P., Surendran, A., Nagao, H., Sudesh, K. (2021). Biocontrol potential of *Aspergillus terreus*, endophytic fungus against *Rigidoporus microporus* and *Corynespora cassiicola*, pathogens of rubber tree. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54, 1014-1032.
- Mendoza-Ricardo, S., Fernández-Pavía, S.P., O'Donnell, K., Ploetz, R.C., Ortega-Arreola, R., Vázquez-Marrufo, G., Benítez-Malvido, J., Montero-Castro, J.C., Soto-Plancarte, A., Rodríguez-Alvarado, G. (2018). A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. *Plant disease*, 102, 1965-1972.
- Merlin-Angeles, C., Contreras-Marín F., Balam-Uc E., Simá-Polanco P., Medina-Baizabal I. L., Gamboa-Angulo M. (2012). Evaluación antifúngica de la raíz de *Croton chichenensis* colectada en dos poblaciones de Yucatán. *Revista Latinoamericana de Química*, 39, 131
- Mex-Uitz, J.A. (2005). Purificación biodirigida de principios antifúngicos producidos por la raíz de *Croton chichenensis* Lundell. Tesis de Licenciatura en Química Biología Bromatología. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Química. Mérida, México. pp. 33.
- Milanowski-Dennis, J., Winter, R.E., Elvin-Lewis, M.P., Lewis, W.H. (2002). Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *Journal of Natural Products*, 65, 814-819.
- Moo-Felicia, A.K. Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J.M., Medina-Baizabal, I.L., Arjona-Cruz, A.A., Gamboa-Angulo, M. (2022). Activity of aqueous extracts from native plants of the Yucatan peninsula against fungal pathogens of tomato *in vitro* and from *Croton chichenensis* against *Corynespora cassiicola* on tomato. *Plants*, 11, 2821.
- Moparthi- Swarnalatha, Perez-Hernandez, O., Burrows, M.E., Bradshaw, M.J., Bugingo, C., Brelsford, M., McPhee, K. (2024). Identification of *Fusarium* spp. Associated with chickpea root rot in Montana. *Agriculture*, 14, 974.
- Mora-Gustavo, A., de la Rosa S.N., Pavía F.S.P., Quezada A.G.D., Alviter, A.R., Arispuro V.I del C., Hernández E.G. (2017). Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35.

- Mori-Hiroshi, Fuchigami, M., Inoue, N., Nagai, H., Koda, A., Nishioka, I. (1994). Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response. *Planta Medica*, 60, 445–449.
- Mu-Kai L., Lei Li, Yun Chen, Min-jie Zhang, Tian-lin He, Kai-min Li, Yu-chen Liu, Gang Liu. (2024). Analysis of chemical constituents of Miao ethnomedicine Heiguteng Zhweifeng Huoluo capsule (HZFC) and the discovery of active substances in the treatment of rheumatoid arthritis. *ACS Omega* 9, 10860-10874.
- Mwine-Julius, T. Van Damme, P. (2011). Why do Euphorbiaceae tick as medicinal Plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 652-662.
- Nakano-Tatsuhiko (1954). Studies on the alkaloids of Magnoliaceous Plants. Alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. *Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kioto*, 2, XIII.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Okon-Estera, Kukula-Koch W., Jarzab A., Halasa M., Stepulak A., Wawruszak A. (2020). Advances in chemistry and bioactivity of magnoflorine and magnoflorine containing extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1330.
- Okon-Estera, Kukula-Koch, W., Halasa, M., Jarzab, A., Baran, M., Dmoszynska-Graniczka, M., Angelis, A., Kalpoutzakis, E., Guz, M., Stepulak, A., Wawruszak, A. (2020). Magnoflorine-isolation and the anticancer potential against NCI-H1299 lung, MDA-MB-468 breast, T98G glioma, and TE671 Rhabdomyosarcoma cancer cells. *Biomolecules*, 10, 1532.
- Ortega-Acosta, S.Á., Ochoa-Martínez, D.L., Hernández-Morales, J., Palemón-Alberto, F. (2019). Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(1), 62-78.
- Parra-Roberto, J. (2014). Biological Control in Brazil: An overview. *Scientia Agricola*, 71, 420-429.

- Queiroz-Marcos M., Queiroz, E.F., Zeraik, M.L., Marti, G., Favre-Godal, Q., Simões-Pires, C.A., Marcourt, L., Carrupt, P., Cuendet, M., Paulo, M.D., Bolzani, V.D., Wolfender, J. (2014). Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochemistry Letters*, 10, lxxxviii-xciii.
- Ramírez-Marco, M.V., Hernandez-Carlos, B. (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* 3, 96-118.
- Rondon-María, N., Lawrence, K.S. (2021). The fungal pathogen *Corynespora cassicola* : A review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. *Journal of Phytopathology*, 169, 329-338.
- Salatino-Antonio, Salatino, M.L.F., Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 11-33.
- Savary-Serge, Ficke, A., Aubertot, J., Hollier, C.A. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 71, 519–537.
- Savary-Serge, Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3, 430-439.
- Seepe-Hlabana, A., Nxumalo, W., Amoo, S.O. (2021). Natural products from medicinal plants against phytopathogenic *Fusarium* species: current research endeavours, challenges and prospects. *Molecules*, 26, 6539.
- Shan-Jinjun, Zhao, X., Shen, C., Ji, J., Xu, J., Wang, S., Xie, T., Tong, W. (2018). Liquid chromatography coupled with linear ion trap hybrid orbitrap mass spectrometry for determination of alkaloids in *Sinomenium acutum*. *Molecules*, 23, 1634.
- Shimomoto-Yoshifumi, Adachi, R., Morita, Y., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Takeuchi, S. (2008). *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 335-337.

- Shukla-Rahul, Rajpoot, R.K., Poddar, A., Ahuja, R., Beesetti, H., Shanmugam, R.K., Chaturvedi, S., Nayyar, K., Singh, D., Singamaneni, V., Gupta, P., Gupta, A.P., Gairola, S., Kumar, P., Bedi, Y. S., Jain, T., Vashishta, B., Patil, R., Madan, H., Madan, S., Khanna, N. (2021). *Cocculus hirsutus*-derived phytopharmaceutical drug has potent anti-dengue activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 746110.
- Singh-Neetu, Yadav, S.S. (2024). Anti-dengue therapeutic potential of *Tinospora cordifolia* and its bioactives. *Journal of Ethnopharmacology*, 330, 118242.
- Stankovic-Sladjan, Kostic, M., Kostic, I., Krnjajic, S. (2020). Practical approaches to pest control: The use of natural compounds, en: *Pests, Weeds and Diseases in Agricultural Crop and Animal Husbandry Production*. IntechOpen. Pp. 1-11.
- Steinmann-Victor, W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*, 61-93.
- Stuart, K.L., Chambers, C. (1967). New aporphine alkaloids from *Croton wilsonii* Griseb. *Tetrahedron letters*, 42, 4135-4138.
- Summerell-Brett, A. (2019). Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323-339
- Sun-Dan, Zhou, M., Ying, X., Cheng, B., Han, Y., Nie, Y., Hou, Y., Bai, G. (2014). Identification of nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors in the folk herb *Rhizoma Menispermis* via bioactivity-based ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 356.
- Sun-Xiao, L., Zhang, X.W., Zhai, H.J., Zhang, D., Ma, S.Y. (2020). Magnoflorine inhibits human gastric cancer progression by inducing autophagy, apoptosis and cell cycle arrest by JNK activation regulated by ROS. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 125, 109118.
- Szalak-Radosław, Matysek, M., Koval, M., Dziedzic, M., Kowalczyk-Vasilev, E., Kruk-Slomka, M., Koch, W., Arciszewski, M.B., Kukula-Koch, W. (2023). Magnoflorine from *Berberis vulgaris* roots - impact on hippocampal neurons in mice after short-term exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 7166.

- Tamayo-Jorge, X., J., Graniel-Sabido, M., Mirón-López, G., Mena-Rejón, G.J., Monforte-González, M., Flota, F.A. (2017). HPLC-dad determination of berberine, chelerythrine and sanguinarine in the Mexican prickly poppy (*Argemone mexicana* L. Papaveraceae), a medicinal plant. *Química Nova*, 40, 1238-1243.
- Tian-Ye, Wang, Z., Xu, X., Guo, Y., Ma, Y., Lu, Y., Sheng, R. (2024). Natural alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde and their G5. NHAc-PBA dendrimer-alkaloid complexes for targeting chemotherapy in breast cancer MCF-7 cells. *Natural Product Research*, 38, 1-18.
- Toulet-María L., Neira, D.A., Escobar, M., Pardo, E.M., Arias, M.E., Ploper, L.D., Welin, B., Castagnaro, A.P., Chalfoun, N.R. (2022). Morphological and pathogenic characterization of *Corynespora cassicola* isolates reveals specific genotypic interactions in soybean. *Plant Pathology*, 4, 843-859.
- Tun-Pinto, T.I (2016). Evaluación antifúngica y propagación de *Croton chichenensis* Lundell en periodo de inicio de secas, secas y lluvias. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida. Pp. 6-28.
- Valares, M.C (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Extremadura. Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Bajadoz. Pp.19-20.
- Valarezo-Eduardo, Gaona-Granda, G., Morocho, V., Cartuche, L., Calva, J., Meneses, M.A. (2021). Chemical constituents of the essential oil from Ecuadorian endemic species *Croton ferrugineus* and its antimicrobial, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Molecules*, 26, 4608.
- Veera-Suresh, N., Sumalatha, Ravat, V.K., Basu, A. (2017). First report of corynespora leaf spot caused by *Corynespora cassicola* on chilli in west Bengal, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 3216-3219.
- Villaseñor-Jose, L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana e Biodiversidad*, 87, 559-902.
- Webster-Grady, L. (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 81, 33-144.

- 
- Wijesundara, S.A.D.T.L., Kannangara, B., Abeywickrama, K. (2016). Antifungal activity of *Croton aromaticus* L. *in vitro*, against post-harvest fungal pathogens isolated from tropical fruits. *Journal of Agricultural Sciences*, 11, 105.
- Xu-Tong, Kuang, T., Du, H., Li, Q., Feng, T., Zhang, Y., Fan, G. (2020). Magnoflorine: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity. *Pharmacological Research*, 152, 104632.
- Xu-Wen. H., Liu, W.Y., Liang, Q. (2018). Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. *Molecules*, 23, 2333.
- Yamahara-Johji. (1976). Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids. Central depressive action of *Coptidis rhizoma* and its constituents. *Folia Pharmacologica Japonica*, 72, 899-908.
- Zakaria-Latiffah. (2023). *Fusarium* species associated with diseases of major tropical fruit crops. *Horticulturae*. 9, 322.
- Zaker-Masoud. (2016). Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control- a review. *The Agriculturists*, 14, 134-141.
- Zhong-Lili., Qin, Y., Liu, M., Sun, J., Tang, H., Zeng, Y., Zhang, J., Wang, W., Liang, G., Zhao, X. (2023). Magnoflorine improves cognitive deficits and pathology of Alzheimer's disease via inhibiting of JNK signaling pathway. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 112, 154714.