

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *Swietenia humilis* ZUCC CON  
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PARA EL CONTROL *IN VITRO* DE  
*Rhizopus stolonifer* (EHRENBERG: FR) VUILL.**

POR:

**EVANGELINA ARMENTA REYES**

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS  
AGRÍCOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Culiacán, Sinaloa

Febrero de 2006

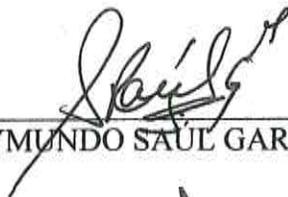
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de EVANGELINA ARMENTA REYES, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



DR. MIGUEL ÁNGEL ANGULO ESCALANTE

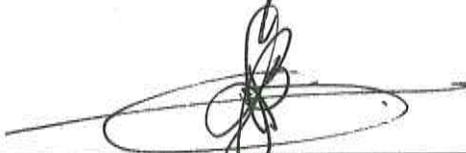
Director de Tesis



DR. RAYMUNDO SAÚL GARCÍA ESTRADA



M.C. JOSÉ ARMANDO CARRILLO FASIO



DR. JOSÉ BENIGNO VALDEZ TORRES

## DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en la presente tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se podrá solicitar permiso al director del centro y al director de tesis con dirección en Carretera Culiacán-Eldorado, Km. 5.5. A. P. 32-A, Culiacán, Sinaloa, México. Bajo cualquier circunstancia, se deberá solicitar permiso al autor.



---

EVANGELINA ARMENTA REYES

Autor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en la presente tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita, del director del trabajo de tesis.

---

DR. ALFONSO A. GARDEA BÉJAR

Director General

## **DEDICATORIAS**

### **A la Memoria de mi Padre, Miguel Armenta Lara:**

A quien espero saber honrar. Su presencia me acompaña siempre.

### **A mi Madre, Graciela Reyes Moreno:**

Con todo amor y respeto, por ser un apoyo incondicional, por sus consejos, pero sobre todo por su cariño y comprensión. Sin Usted hubiera sido muy difícil lograr esta meta tan importante en mi vida.

### **A toda mi familia:**

Hermanos, cuñados, sobrinos, primos, suegros, tíos...Por el cariño y ayuda que me han brindado, y por los grandes momentos que hemos compartido.

### **A mis amigos de hoy y siempre:**

Por estar junto a mí en los momentos de mayor alegría y tristeza; por su constante aliento y comprensión.... Gracias por ayudarme a continuar en el camino.

### **A mi esposo Ignacio:**

Por todo el apoyo y paciencia, por los conocimientos compartidos y por ser ejemplo de perseverancia, pero sobre todo por regalarme tres maravillosos motivos para enfrentar los grandes retos de la vida.

### **Muy especialmente a mis queridos hijos:**

Ignacio Alejandro, Mikkeli Alessandra y América Anahí, que a su tierna edad, han sabido comprender y esperar, y son el principal motor de mi vida ¡Los amo!

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán, por aceptarme en el programa de postgrado, y por todo el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.**

**A la Universidad Autónoma de Sinaloa y al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización y culminación del presente trabajo.**

**A mi Comité de Tesis, con todo respeto y cariño, por ayudarme a llevar a feliz término este trabajo, pero sobre todo, por el trato siempre amable y afectuoso que me brindaron.**

**A mi Director, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante y a mis asesores: Dr. Raymundo Saúl García Estrada, M.C. José Armando Carrillo Fasio y Dr. José Benigno Valdez Torres, por su imponderable colaboración, experiencia y dedicación aportadas para el desarrollo y mejoramiento de este trabajo. Mi admiración y agradecimiento sinceros.**

A los técnicos de Laboratorio **M.C. Yadira López Pantoja** (Toxicología), e **IBQ. Beatriz Elena Ibarra Encinas** e **Ing. Isidro Márquez Z.** (Fitopatología), por su paciencia, apoyo y valiosos consejos y por el tiempo compartido.

De igual manera a todo el **Personal Técnico y Académico** que labora en el CIAD, Unidad Culiacán, por compartir su experiencia y conocimientos desinteresadamente, así como al personal Administrativo por su apoyo y disposición constantes.

A: **Oswaldo López, Adriana Sañudo, Maribel Jiménez, Armenia Velásquez, J. Esteban Dávila, Mirella Romero, J. Ramón Sánchez, Guillermo Niño, Laura D. Carrasco, Ma. Emilia Ibarra y Gladys P. Chávez,** Por su aliento y ejemplo. Compañeros de generación al principio y hoy amigos inolvidables todos.

Con especial agradecimiento a quienes desde lejos estuvieron siempre al pendiente y me apoyaron. A la **Dra. Ana María Calderón de la Barca** por sus finas atenciones en todo momento y por confiar en mí. Al **Dr. Sócrates Trujillo Preciado,** por su amistad y su participación, asesoría y esfuerzo en la selección de técnicas de separación de componentes químicos, las cuales fueron básicas para la culminación de la Tesis.

...Y a todos los que han hecho posible lo que parecía inaccesible ¡Gracias!

*Con Particular Agradecimiento*

*A mi Director, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, con profundo respeto por TODO el apoyo profesional y personal brindado desde mi llegada al C.I.A.D. Por su amistad y consejos siempre incondicionales. Por su invaluable ayuda e infinita paciencia y disposición para la realización de mi tesis.*

## CONTENIDO

<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
Árbol de Venadillo ( <i>Swietenia humilis</i> Zucc).....	4
Características .....	4
Taxonomía.....	6
Distribución.....	6
Usos.....	7
Actividad Biológica .....	8
Componentes Activos .....	10
Las Pudriciones en Poscosecha.....	15
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.:Fr.) Vuill.....	15
Características Generales .....	15
Distribución.....	16
Hospederos.....	16
Rapidez de reproducción.....	16
Resistencia.....	17

Clasificación Taxonómica.....	17
Características morfológicas y dimensionales .....	18
Formas de reproducción.....	19
Factores de infección.....	20
Modos de Acción de los Fungicidas .....	20
Métodos de Control.....	21
Métodos físicos. ....	24
Métodos biológicos .....	25
Compuestos Activos de las Plantas como Antifúngicos .....	27
Alcaloides.....	31
Flavonas y Compuestos Relacionados .....	31
Terpenoides .....	31
Compuestos Fenólicos Simples .....	32
Cumarinas .....	32
Extractos Vegetales con Efecto Antifúngico. ....	33
<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>PROBLEMA.....</b>	<b>38</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>META.....</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>41</b>
Objetivos Específicos.....	41
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>43</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Recolección y Preparación de las Semillas de Venadillo .....	45
Obtención de Extractos Crudos de las Semillas de Venadillo .....	45
Extracto Hidroalcohólico .....	46
Extractos Diclorometánicos y Metanólicos .....	46
Obtención y Mantenimiento del Hongo en Condiciones de Laboratorio .....	47
Preparación de Medios de Cultivo PDA .....	47
Preparación de Suspensión de Esporas y Cultivo Monoespórico .....	48
Bioensayos de Evaluación Antifúngica en Condiciones de Laboratorio .....	48
Evaluación de Crecimiento Micelial.....	48
Evaluación de Esporulación.....	49
Evaluación de Germinación de Esporas.....	49
Evaluación de Viabilidad de Esporas.....	50
Identificación y Evaluación de Estructuras Alteradas .....	50
Identificación de Grupos de Componentes Químicos Activos .....	51
Diseño Estadístico .....	52
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
Rendimiento de los Extractos.....	53
Efecto de Extractos Crudos de <i>S. humilis</i> sobre <i>R. stolonifer</i> .....	55
Efecto sobre el Crecimiento Micelial.....	55
Efectos de interacción triple.....	56
Efectos de interacción doble .....	60

Efectos principales .....	66
Efecto sobre la Esporulaci3n.....	72
Efectos de Interacci3n Doble .....	72
Efectos Principales .....	74
Efecto sobre la Germinaci3n de Esporas .....	78
Efectos de interacci3n doble .....	79
Efectos principales .....	81
Efecto sobre la Viabilidad de Esporas. ....	85
Efecto sobre Estructuras Vegetativas y Germinativas .....	86
Identificaci3n de Grupos de Componentes Qu3micos Activos .....	90
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Árbol de Venadillo ( <i>Swietenia humilis</i> Zucc).....	5
<b>Figura 2.</b> Distribución del género <i>Swietenia</i> y de la especie <i>S. humilis</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Estructuras generales de limonoides Mexicanolides.....	11
<b>Figura 4.</b> Estructuras de los limonoides presentes en <i>S. humilis</i> .....	13
<b>Figura 5.</b> Estructuras de <i>Rhizopus stolonifer</i> vistos al estereoscopio (32 x)..	19
<b>Figura 6.</b> Grupos de compuestos con actividad antifúngica no limonoides, que pueden estar presentes en <i>S. humilis</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Rendimiento de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de venadillo ( <i>S. humilis</i> Zucc.).....	54
<b>Figura 8.</b> Efectos de interacción triple de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	57
<b>Figura 9.</b> Efecto de interacción doble extracto-concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	61
<b>Figura 10.</b> Efecto de interacción doble extracto-tiempo de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	63
<b>Figura 11.</b> Efecto de interacción doble concentración-tiempo de los	

extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> ..	65
<b>Figura 12.</b> Efecto principal del factor extracto de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	67
<b>Figura 13.</b> Efecto principal del factor concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	68
<b>Figura 14.</b> Efecto principal del factor tiempo de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	70
<b>Figura 15.</b> Efecto de interacción doble extracto-concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> .....	73
<b>Figura 16.</b> Efecto principal del factor extracto de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> .....	75
<b>Figura 17.</b> Efecto principal del factor concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> .....	76
<b>Figura 18.</b> Efecto de interacción doble extracto-concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados sobre la germinación de <i>R. stolonifer</i> .....	79
<b>Figura 19.</b> Efecto principal del factor extracto de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados sobre la germinación de esporas de <i>R. stolonifer</i> .....	81
<b>Figura 20.</b> Efecto principal del factor concentración de los extractos de <i>S. humilis</i> evaluados sobre la germinación de esporas de <i>R. stolonifer</i> .....	83
<b>Figura 21.</b> Efecto fungistático del extracto metanólico de <i>S. humilis</i> sobre <i>R. stolonifer</i> .....	85

<b>Figura 22.</b> Comparación entre esporangios de <i>R. stolonifer</i> sin tratar y tratados con extracto metanólico de <i>S. humilis</i> .....	<b>87</b>
<b>Figura 23.</b> Formación de zigospangios de <i>R. stolonifer</i> en los tratamientos con extracto metanólico de <i>S. humilis</i> al 5%.....	<b>88</b>
<b>Figura 24.</b> Alteraciones producidas por el extracto metanólico de <i>S. humilis</i> sobre <i>R. stolonifer</i> .....	<b>89</b>
<b>Figura 25.</b> Cromatograma para detección de grupos terpenoides y alcaloides en extracto metanólico de <i>S. humilis</i> .....	<b>91</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Análisis de varianza para la inhibición micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> con extractos de <i>S. humilis</i> .....	55
<b>Cuadro 2.</b> Diferencias de medias entre concentraciones, para cada extracto de <i>S. humilis</i> , a las 24 horas de inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	58
<b>Cuadro 3.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> , para cada concentración a las 24 horas de inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	59
<b>Cuadro 4.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> para cada concentración evaluada en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	62
<b>Cuadro 5.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> para cada tiempo evaluado en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	64
<b>Cuadro 6.</b> Diferencias de medias entre concentraciones, para cada tiempo evaluado en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	65
<b>Cuadro 7.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> .....	67
<b>Cuadro 8.</b> Diferencias de medias entre concentraciones en la inhibición micelial de <i>R. stolonifer</i> con extractos de <i>S. humilis</i> .....	69
<b>Cuadro 9.</b> Diferencias de medias entre tiempos en la inhibición micelial	

de <i>R. stolonifer</i> con extractos de <i>S. humilis</i> .....	70
<b>Cuadro 10.</b> Análisis de varianza para los resultados del porcentaje de inhibición de la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i> , con extractos de <i>S. humilis</i> .....	72
<b>Cuadro 11.</b> Diferencias de medias, entre extractos de <i>S. humilis</i> , para cada concentración en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> .....	74
<b>Cuadro 12.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> .....	75
<b>Cuadro 13.</b> Diferencias de medias entre concentraciones en la inhibición de esporulación de <i>R. stolonifer</i> con extractos de <i>S. humilis</i> .....	77
<b>Cuadro 14.</b> Análisis de varianza para los resultados del porcentaje de germinación de <i>Rhizopus stolonifer</i> , con extractos de <i>S. humilis</i> .....	78
<b>Cuadro 15.</b> Diferencias de medias, entre extractos de <i>S. humilis</i> , para cada concentración evaluada en la germinación de esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	80
<b>Cuadro 16.</b> Diferencias de medias entre extractos de <i>S. humilis</i> en la evaluación de germinación de esporas de <i>R. stolonifer</i> .....	82
<b>Cuadro 17.</b> Diferencias de medias entre concentraciones en la evaluación de germinación de esporas de <i>R. stolonifer</i> con extractos de <i>S. humilis</i> .....	83

## RESUMEN

El enfoque actual de la investigación científica hacia productos fungicidas de origen natural se centra en la obtención y aplicación de compuestos activos, presentes en las plantas superiores. En la familia Meliaceae están presentes los metabolitos secundarios con mayor eficacia contra hongos fitopatógenos: los Limonoides, así como otros compuestos que pueden poseer efecto antifúngico. *Swietenia humilis* Zucc (Meliaceae), es una especie en la que se reporta la presencia de varios limonoides de tipo humilinoide, pero se carece de información respecto a otro tipo de componentes activos presentes en esta especie. Adicionalmente, no se han encontrado reportes de su efecto contra hongos, específicamente sobre *Rhizopus stolonifer*, causante de pudriciones en poscosecha. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antifúngico de extractos de semillas de *S. humilis* para el control *in vitro* de *R. stolonifer*. Los objetivos específicos fueron evaluar el efecto de extractos hidroalcohólicos, diclorometánicos y metanólicos de *S. humilis* sobre el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de *R. stolonifer*. Así mismo, identificar las alteraciones producidas por la aplicación de los extractos, determinar el tipo de efecto antifúngico y por último identificar los grupos de componentes químicos presentes en el extracto más activo. Para evaluar la inhibición micelial se prepararon mezclas en concentraciones del 1 al 7.5% con los extractos hidroalcohólicos, diclorometánicos y metanólicos que se adicionaron a medio de cultivo papa-dextrosa agar (PDA), y se depositaron en cajas Petri. El hongo se inoculó sobre

estas preparaciones. La inhibición de la esporulación se evaluó por cálculo de la concentración de esporas presentes en alicuota'l de 50  $\mu$ L preparadas después de 48 horas de inoculación del hongo en las cajas del ensayo anterior. Para evaluar la gemlinación se emplearon portaobjetos excavados de dos concavidades en donde se depositaron concentraciones del 5 y 7.5% de los extractos y agua destilada para el testigo para después adkionar una suspensión de  $1 \times 10^4$  esporas en cada concavidad. La alteración de las estructuras se determinó al microscopio con ayuda de una Cámara de Neubauer. El tipo de efecto antifúngico se determinó al resembrar el hongo producto de la evaluación de inhibición micelial en medio de cultivo PDA únicamente. Los grupos de componentes activos se determinaron por reacciones de caracterización y cromatografía en capa fina. El extracto metanólico al 7.5% inhibió en un 92% el crecimiento núcelial mientras que los extractos hldroalcohólico y cliclorometánico no lograron inhibir al micelio más del 30% a la misma concentración. Todos los extractos inhibieron la esporulación en más del 85%. Sin embargo, el extracto metanólico inhfiúo al 100% la formación' de esporas a concentraciones del 5 y 7.5%. Se encontraron alteraciones en las estructuras vegetativas y germinativas del hongo que fueron determinantes para la inhibición de la esporulación. Se demostró que el efecto de los tratamientos sobre *R stolonifer* fue fungistático. Todos los extractos provocaron incremento de la germinación de esporas del hongo respecto al testigo. El extracto metanólico fue el que mostró mayor efecto antifúngico en las evaluaciones de crecimiento micelial y esporulación al 5 y 7.5%. Reacciones de caracterización y ensayos por cromatografía de capa fina demostraron la presencia de compuestos

alcaloides y terpenoides en el extracto metanólico. Este trabajo pretende contribuir a la generación de información científica respecto al efecto antifúngico de extractos de semillas de *Swietenia humilis* evaluados sobre *Rhizopus stolonifer*. Los resultados que se presentaron pueden permitir proponer al árbol de Venadillo como una fuente para el futuro desarrollo de fungicidas.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas durante el manejo poscosecha de vegetales, frutas y granos son causantes de pérdidas económicas extremadamente altas (Bautista-Baños *et al.*, 2000; Hahn, 2004). En particular, la pudrición blanda es causada por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr) Vuill, una de las enfermedades más destructivas en una gran variedad de frutas y hortalizas a nivel mundial (Qing y Shiping, 2000). Las esporas son comunes en la atmósfera y se depositan en las heridas de los frutos maduros, produciendo infección con pérdidas del 25 al 50%, aún con tratamientos antifúngicos (Tamayo, 2002; Hahn, 2004).

Existen diversos métodos de control alternativos para esta enfermedad. Entre los de mayor aplicación se encuentran los fungicidas químicos. Sin embargo, la aplicación de tratamientos a base de productos sintéticos provoca el desarrollo de mecanismos de resistencia en los hongos. A esta problemática se suma la preocupación creciente por la presencia de residuos químicos tóxicos en los alimentos y en el medio ambiente. Lo que produjo la restricción en el uso de Iprodione, uno de los fungicidas más efectivos sobre *Rhizopus* (Bautista-Baños *et al.*, 2003; Adaskaveg, 2005).

Actualmente la investigación está enfocada a la obtención de antifúngicos que sean efectivos, de bajo costo, biodegradables, menos dañinos para los mamíferos y sin

producción de resistencia por parte de los fitopatógenos. De esta forma se pretende que dichas alternativas disminuyan el uso de los fungicidas sintéticos (Qing y Shiping, 2000; Abdelgaleil *et al.*, 2005).

Una línea interesante de investigación, es la aplicación de tratamientos que emplean metabolitos secundarios provenientes de plantas superiores. Entre los más efectivos se encuentran los compuestos limonoides, presentes en la familia Meliaceae, y con actividad contra insectos, nemátodos, bacterias y hongos (Carpinella *et al.*, 2003; Mareggiani *et al.*, 1998; Abdelgaleil *et al.*, 2005). Se caracterizan por alterar el ciclo biológico del organismo, retardar su reproducción e inhibir su capacidad para obtener nutrientes, por lo que la muerte sobreviene a consecuencia de la perturbación provocada (Pietrosemoli *et al.*, 1999; Biswas *et al.*, 2002).

La especie de planta *Swietenia humilis* Zucc (Meliaceae), se conoce comúnmente en Sinaloa como venadillo. Es un árbol maderable al que se le han detectado varios limonoides en las hojas y semillas (Jiménez *et al.*, 1997). Estos limonoides tipo humilinoideos, llaman la atención por su similitud estructural con azadiractina, principal compuesto limonoide de *Azadirachta indica* A. Juss., árbol de neem (Jiménez *et al.*, 1998). Aunado a ello, en varias especies (*A. indica*, *Swietenia mahogani*, *Khaya senegalensis*, *Khaya ivorensis*), de la misma familia Meliaceae se reporta la existencia de otros compuestos que pueden poseer efecto antifúngico (Mulholland *et al.*, 2000).

Sin embargo, no se han encontrado reportes de ellos ni de su efecto contra hongos en la especie *S. humilis*.

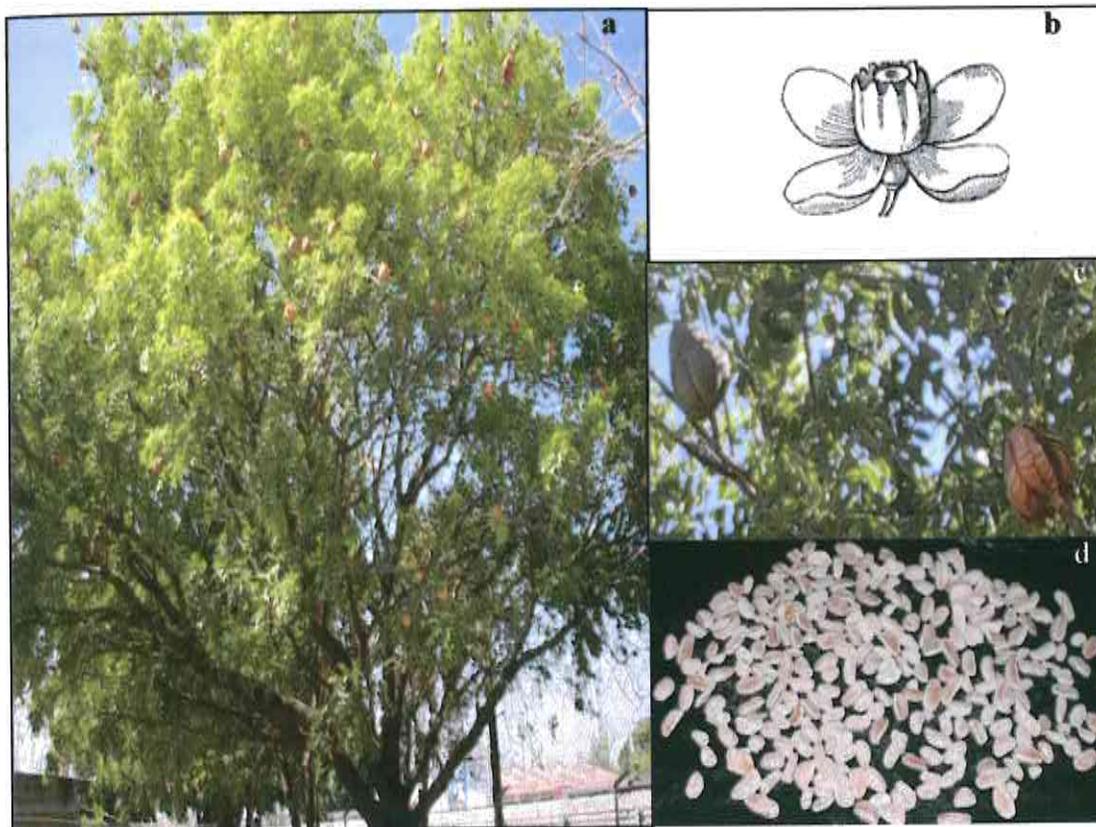
Este trabajo tiene como objetivo contribuir a la generación de información científica, relacionada con el efecto antifúngico de extractos de semillas de *Swietenia humilis* evaluados para determinar la efectividad biológica en el control del hongo *Rhizopus stolonifer*.

## ANTECEDENTES

### Árbol de Venadillo (*Swietenia humilis* Zucc)

#### **Características**

*Swietenia humilis* Zucc (**Figura 1a**), es un árbol de talla mediana. Alcanza entre 15 y 20 m de altura y el tronco tiene un diámetro de 30 a 50 cm. Presenta una copa redondeada, que solo cambia de hojas una vez al año, al madurar el fruto. Sus flores (**Figura 1b**) son blanco-amarillas, pequeñas y están agrupadas en racimos, llamados panículas. Sus frutos (**Figura 1c**), son cápsulas ovoides erectas, de 10 a 12 cm de ancho por 15 a 20 cm de longitud. Cada fruto contiene de 45 a 60 semillas color café claro, con un extremo en forma de ala muy frágil. La semilla mide 8 cm de longitud con tegumento (ala), y sin él (**Figura 1d**), máximo 2 cm (Helgason *et al*, 1996).



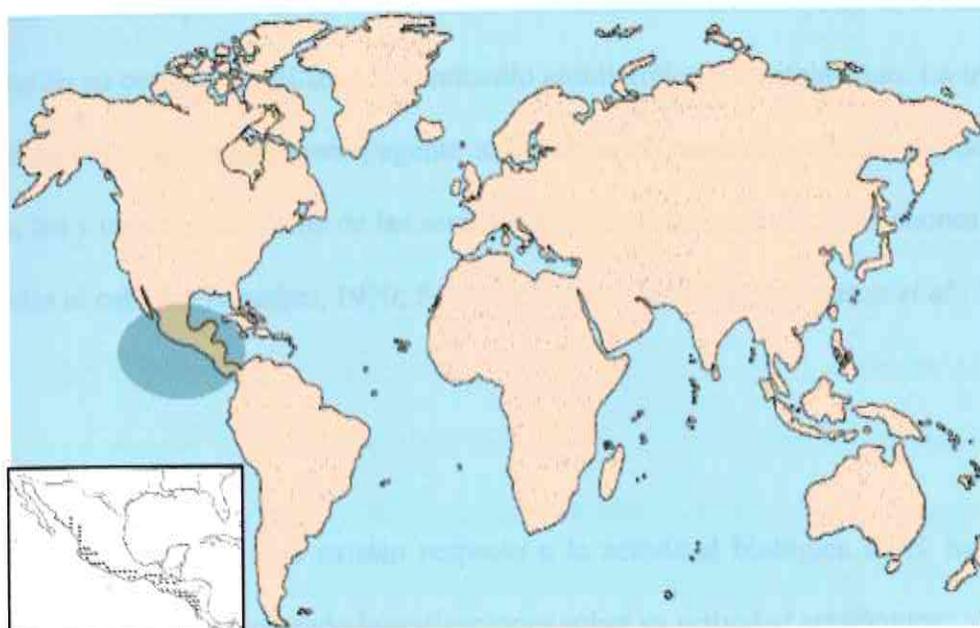
**Figura 1.** Árbol de Venadillo (*Swietenia humilis* Zucc). (a)Copa, (b) flor, (c) frutos con cápsula y con semillas al descubierto y (d), semillas sin tegumento.

### **Taxonomía**

El árbol de venadillo, se encuentra clasificado, al igual que el neem, en el orden de los Sapindales y en la clase Magnoliopsida. Pertenece a la familia Meliaceae, y a la subfamilia Swietenioideae. El género *Swietenia* lo comparten tres especies, *S. humilis* es el de menor talla (Mulholland *et al.*, 2000). Sus sinonimias son: *Swietenia cirrhata*, S. F. Blake y *Swietenia bijuga* Preuss (Helgason *et al.*, 1996).

### **Distribución**

La distribución natural del género *Swietenia* (Figura 2), se restringe a los neotrópicos, zona geográfica comprendida entre los trópicos en el Continente Americano (Helgason *et al.*, 1996). La especie *S. humilis* se encuentra de forma endémica, por la costa del Pacífico (entre 50 y 1000 msnm), desde el Estado de Sinaloa, en México, hasta Guanacaste, Costa Rica, en América Central. Por ello también se le conoce como Caoba del Pacífico. Otros nombres comunes son zopilote, cobano, cáugano, caobilla, combilla y gateado (Jiménez *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Distribución del género *Swietenia*, zona sombreada, y de la especie *S. humilis*, recuadro (Helgason *et al.*, 1996).

Se desarrolla mejor en suelos profundos, bien drenados y ricos en materia orgánica, con clima cálido y húmedo, con temperaturas mayores a los 24 °C y precipitaciones de 1100 a 1400 mm anuales (Helgason *et al.*, 1996).

### Usos

El venadillo es una especie cuya madera se explota ampliamente en ebanistería y es altamente cotizada por su resistencia a plagas. Se utiliza para construcciones rurales, elaboración de mangos de herramientas, artículos torneados, instrumentos musicales, decoración de interiores y carpintería en general (Niembro, 1990).

También existen reportes de su uso en medicina etnobotánica. Por ejemplo, el macerado en agua de su corteza, se utiliza como remedio antidiarréico y antifebrífugo. La infusión de sus semillas se emplea como agente antihelmíntico, contra la amebiasis, dolor de pecho, tos y cáncer, y el aceite de las semillas se aprovecha para elaborar jabones y para dar brillo al cabello (Niembro, 1990; Segura-Correa *et al.*, 1993; Helgason *et al.*, 1996).

### **Actividad Biológica**

Son pocos los reportes que existen respecto a la actividad biológica de *S. humilis* y entre ellos no se han encontrado investigaciones sobre su actividad antifúngica.

Segura-Correa *et al.* (1993), investigaron el efecto inhibitorio de extracto metanólico y de los humilinoídes A-D de la semilla en el desarrollo de varias especies de plantas. Ellos realizaron la evaluación sobre las raíces del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y de una maleza conocida como pie de gallo (*Echinochloa crus-galli*). Los resultados mostraron mayor efectividad inhibitoria sobre *E. crus-galli*. Los humilinoídes A y C dieron mejores resultados que el extracto, mientras que los humilinoídes B y D no fueron efectivos a las concentraciones probadas (100 - 275  $\mu\text{g/mL}$ ).

Jiménez *et al.* (1997), realizaron un estudio *in vitro* sobre células cancerígenas humanas para investigar la actividad citotóxica de los humilinoídes A-D. Los resultados

mostraron toxicidad a 100 µg/mL para los humilinoideos B y C, que es comparable en sus efectos con las dosis de  $3.5 \times 10^{-2}$  a  $7.9 \times 10^{-3}$  µg/mL de Adriamicina, un medicamento anticancerígeno empleado como testigo comparativo.

*Swietenia humilis* también posee actividad moderada sobre el crecimiento y alimentación de insectos. Por ejemplo, Segura-Correa *et al.* (1993), probaron extractos metanólicos de semilla sobre el gorgojo harinero (*Tenebrio molitor*), en estado de larva. Los resultados mostraron reducción significativa (30%), en crecimiento y alimentación, sin encontrar mortalidad al aplicar los extractos en dieta artificial al 1%.

En este sentido, Jiménez *et al.* (1997 y 1998), estudiaron el efecto insecticida de los humilinoideos A-F aislados de semillas de venadillo contra el barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*). Los humilinoideos C y E fueron los que produjeron un mejor efecto. Al aplicarlos a concentraciones de 50 ppm en su alimentación, se observaron reducciones de un 30% en la sobrevivencia en el estado de pupa y en la emergencia de adultos.

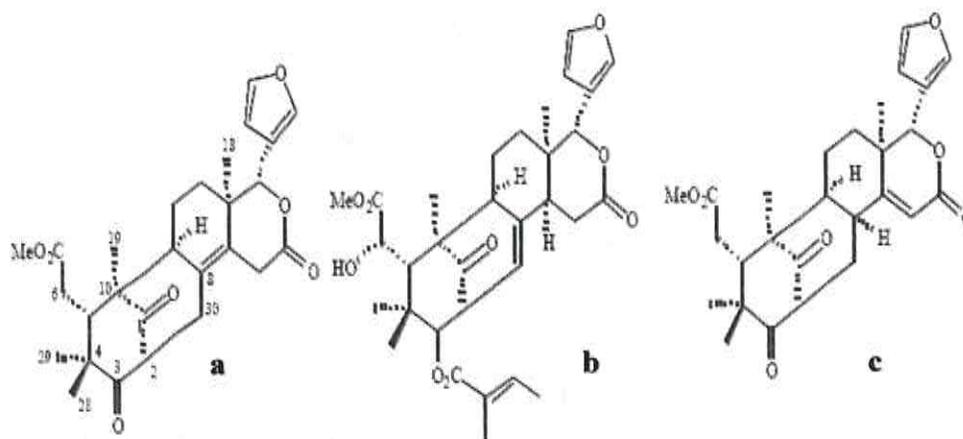
López, (2003), investigó el efecto microbicida de extractos de *S. humilis* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y el bacteriófago PRD1. Aplicó extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos, provenientes de las semillas. Se determinó que los todos los extractos inhibieron completamente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 25 y 50%.

### **Componentes Activos**

Dentro de la familia Meliaceae se ha reportado la presencia de compuestos flavonoides, cromonas, cumarinas, benzofuranos, alcaloides, ácidos fenólicos, mono, sesqui-, di- y triterpenoides (Mulholland *et al.*, 2000). Sin embargo, la actividad biológica del venadillo al igual que en los otros géneros de esta familia, se ha relacionado principalmente con la presencia de compuestos limonoides. Estos se han obtenido en mayores concentraciones a partir de semillas, aunque también se ha reportado su presencia en hojas (Jiménez *et al.*, 1998).

Los limonoides presentes en la familia Meliaceae son tetranortriterpenoides, formados básicamente por C, H y O (Segura-Correa *et al.*, 1993). Se caracterizan por presentar una estructura base de cuatro anillos unidos a un grupo furanil, mediante una cadena lateral (Mulholland *et al.*, 2000).

De acuerdo a los reportes de estudios fitoquímicos existentes, en venadillo se han aislado e identificado once limonoides (Jiménez *et al.*, 1998). Por la semejanza entre sus estructuras químicas todos ellos se encuentran incluidos dentro del grupo de los mexicanolides, con estructuras típicas de tipo swietenina (**Figura 3**). Se diferencian entre ellos principalmente por los radicales unidos a los carbonos 2,3 y 6 en el anillo A (Mulholland *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Estructuras generales de limonoides del grupo de los Mexicanolides. Tipo (a) mexicanolide, (b) swietenina y (c) carapina. Mulholland *et al.* (2000).

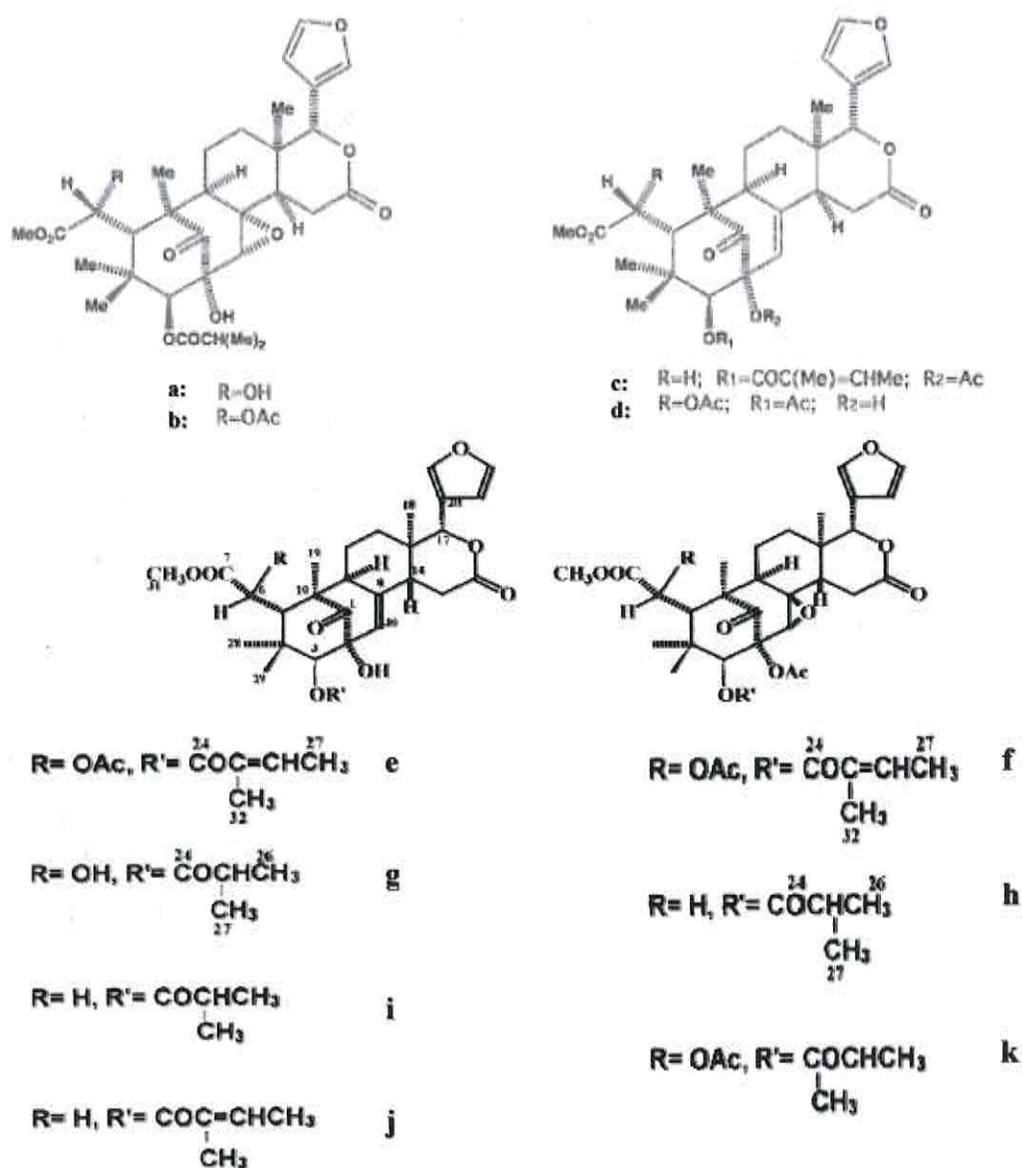
Okorie y Taylor (1970), reportaron la presencia de limonoides en las semillas de venadillo, obtenidos a partir de extractos con éter de petróleo. Estos compuestos se identificaron como metil-2-hidroxi-3-isobutiroximeliac-8(30)-enato, mezclado con 3-tiglato, y su óxido entre las posiciones 8 y 30.

Segura *et al.* (1993), obtuvieron los humilinoideos A-D a partir de extracto crudo metanólico, de semilla previamente desengrasada con hexano. Para purificarlos se sometió el extracto a fraccionamiento empleando mezclas con solventes de polaridades distintas. Estos estudios fueron corroborados por Jiménez *et al.* (1997), quienes además, lograron purificar los limonoides encontrados por Okorie y Taylor en 1970.

Jiménez *et al.* (1998), continuaron con la búsqueda de limonoides. Partieron de extracto crudo con triclorometano y llevaron a cabo una primera etapa de fraccionamiento con benceno, acetato de etilo y metanol. De la fracción obtenida con este último y recromatografiada extensivamente hasta separación e identificación por HPLC, se obtuvieron los humilínolides E y F.

Adicionalmente, Jiménez *et al.* (1998), reportaron la existencia de un limonoide más, identificado previamente en venadillo como humilín B por Okori y Taylor (1970). Los compuestos denominados Swietemahonin C y Swietenin C, también fueron detectados en este estudio, sin embargo estos compuestos ya se habían identificado en *Swietenia mahagoni* (L) Jacq.

En la **Figura 4** se resumen las estructuras de los limonoides encontrados hasta la actualidad, según Jiménez *et al.*, 1998.



**Figura 4.** Estructuras de los limonoides presentes en *S. humilis*. (a) Humilinoide A, (b) Humilinoide B, (c) Humilinoide C y (d) Humilinoide D (Jiménez *et al.*, 1997). (e) Humilinoide E, (f) Humilinoide F, (g) Swietenina C, (h) Humilin B, (i) Metil-2-hidroxi-3-β-isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato, (j) Metil-2-hidroxi-3-β-tigloiloxi-1-xomeliac-8(30)-enato, (k) Swietemahonina C. (Okori y Taylor, 1970; Jiménez *et al.* 1998).

López (2003), analizó extractos acetónicos, hexánicos y etanólicos, y encontró que la mayor cantidad de compuestos limonoides en venadillo colectado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, se encontraban en los extractos etanólicos, los cuales fueron previamente desengrasados con hexano.

Mulholland *et al.* (2000), realizaron estudios en los que establecieron una estrecha relación entre las distintas especies de la familia Meliaceae y compuestos limonoides y no limonoides presentes en ellas. En relación a los componentes activos no limonoides presentes en la subfamilia Swietenioideae, se han detectado diversos alcaloides, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, mono y sesquiterpenoides. Esto hace del venadillo una especie prometedora como proveedora de componentes antifúngicos con efecto similar a los ya reportados en los otros géneros de la familia Meliaceae.

### Las Pudriciones en Poscosecha

La mayoría de las pérdidas poscosecha resultan de la invasión y descomposición del producto por microorganismos. Sin embargo, el daño físico y el “stress” fisiológico, ocasionados por factores abióticos o por un mal manejo, pueden predisponer al producto a tales ataques (FAO, 1989). Generalmente, los hongos son los principales agentes de deterioro de frutas, hortalizas y granos en esta etapa. Las enfermedades que provocan producen daños económicos altos, aún con la aplicación de tratamientos antifúngicos (Bautista-Baños *et al.*, 2000; Mahovic *et al.*, 2002).

#### *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill

##### **Características Generales**

*Rhizopus stolonifer* es uno de los principales hongos fitopatógenos causantes de pudriciones en poscosecha. Algunos factores involucrados en su importancia como causal de enfermedades son su amplia distribución mundial; la gran gama de hospederos que ataca; su rápida reproducción y marcada resistencia a la mayoría de los fungicidas químicos (Agrios, 2001; Mlikota *et al.*, 2004). Todo ello provoca considerables daños económicos en frutas y hortalizas, dado que se reportan pérdidas del 25-50%, aún con tratamientos antifúngicos (Tamayo, 2002; Hahn, 2004).

Distribución. Las especies de *Rhizopus* se encuentran ampliamente distribuidas en toda la naturaleza, de ellas *R. stolonifer* es la especie más común. Generalmente vive como organismo saprófito y en ocasiones como parásito débil de órganos almacenados de plantas (Agrios, 2001). A pesar de ser un patógeno ampliamente distribuido, afecta mayormente en zonas tropicales y subtropicales. Para desarrollarse plenamente requiere de condiciones húmedas y temperaturas templadas de 18 a 27 °C (Le Bars-Bailly et al., 1999; Mlikota et al, 2004). Sus esporas se encuentran en el campo y se transportan por el viento. En poscosecha se diseminan a través del agua de las tinas de lavado o enfriado, por manipulación, así como por contacto de fruta sana con enferma (Latorre, 1999; Han, 2004).

Hospederos. Es un hongo típico de poscosecha que provoca pudrición blanda, acuosa con micelio de aspecto de barba. Ataca a una gran gama de hospederos, las principales hortalizas atacadas son tomates, chiles, berenjenas, pepinos, calabazas y aguacates. Los frutos más susceptibles son los de tipo drupa, como duraznos, nectarinas, ciruelas y cerezas; papayas, piñas, uvas y agregados, como fresas o frambuesas, y varios más. También ataca algunas flores como girasol y tulipán y a granos almacenados con alto contenido de humedad (Agrios, 2001).

Rapidez de reproducción. Tanto la germinación de las esporas como la reproducción de su micelio se llevan a cabo rápidamente, 5-10 veces más rápido que otros hongos como *Penicillium*. Para que esto suceda, además requiere de presencia de humedad y contacto

directo de las esporas con el medio nutritivo. Una vez que el hongo se fija al medio, inicia rápidamente la elaboración de los nutrientes necesarios para el desarrollo y diferenciación de sus esporangios. En estas condiciones germina en 3 a 4 horas, y entre las 24 a 48 horas el micelio forma nuevas esporas para continuar su expansión (Ribes *et al.*, 2000).

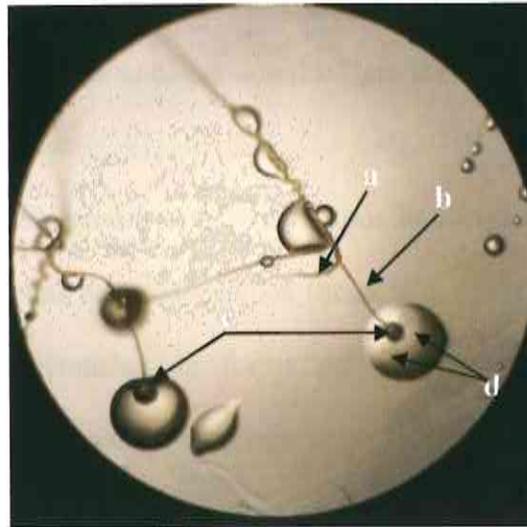
Resistencia. Existen muchos productos químicos disponibles para el control de daño poscosecha causado por los hongos, pero en el caso de la pudrición blanda causada por *Rhizopus* son pocos los que se consideran efectivos (FAO, 1989). Actualmente existen en el mercado dos fungicidas químicos (Pyraclostrobin y Fludioxonil) con actividad sobre *R. stolonifer* similar al fungicida Iprodione, cuyo uso en poscosecha fue cancelado en 1996 (Adaskaveg *et al.*, 2005).

#### **Clasificación Taxonómica**

Hongo verdadero (que forman micelio), perteneciente a la división Eumycota del reino Fungi. Se encuentra, dentro de la subdivisión Zygomycotina, en la clase de los Zigomycetes (hongos que forman esporas asexuales y sexuales), y en el orden de los Mucorales (Agrios, 2001).

Características morfológicas y dimensionales. Morfológicamente, presenta un micelio aéreo hialino, sin septos (cenocítico) en etapas no maduras. Al desarrollarse sus estructuras se pigmentan de color marrón pálido a negro. Forma estolones que le permiten pasar de un sustrato a otro, con rizoides que penetran al medio nutritivo y esporangióforos que emergen hacia el lado opuesto. Estos dan lugar a esporangios globosos, cuya apófisis y columela en conjunto forman una estructura oval a subglobosa. Sus esporangiosporas varían de esféricas a ovaes durante la maduración y germinación y forman estrías negras. Los esporangióforos son aéreos, no ramificados y se encuentran en grupos de uno a tres (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

Presenta rizoides complejos con esporangióforos bien desarrollados, cuya longitud varía entre 1 y 4 mm (Figura 5). Los esporangios pueden variar sus dimensiones con diámetros desde 150 hasta 300  $\mu\text{m}$ , aunque generalmente se presentan entre 250 y 275  $\mu\text{m}$ . La apófisis y la columela, en conjunto, conforman un diámetro de 70 a 120  $\mu\text{m}$ . Las esporas asexuales presentan un diámetro de 7.5 a 15  $\mu\text{m}$ , dependiendo de su grado de madurez. Las zigosporas de la fase sexual son negras con diámetros mayores a los 225  $\mu\text{m}$  (Ribes *et al.*, 2000; Schipper, 1984).



**Figura 5.** Estructuras de *Rhizopus stolonifer* vistos al estereoscopio (32 x);

(a) rizoide, (b)esporangi6foro, (c)esporangio y (d)esporangiosporas.

Formas de reproducci6n. Una caracter6stica de *R. stolonifer* (y en general de todos los hongos del orden de los *Mucorales*) es que pueden presentar dos formas de reproducci6n diferentes, seg6n las condiciones en que se encuentre: una reproducci6n asexual y una reproducci6n sexual (Agrios, 2001).

En su fase asexual de reproducci6n, se caracterizan por la formaci6n de esporangiosporas, en estructuras tipo saco llamadas esporangios. El surgimiento de ellas se presenta como resultado de hendiduras del protoplasma dentro del esporangio. Este a su vez se forma a partir de los extremos de hifas especializadas llamadas esporangi6foros. Los esporangios pueden romperse f6cilmente, liberando miles de esporangiosporas, aproximadamente 30,000 de cada uno. Una sustancia mucosa parece

envolverlas, proporcionándoles humedad, que les permite adherirse fácilmente a cualquier superficie y facilitar su dispersión (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

Su fase de reproducción sexual se diferencia por la formación de zigosporas. Estas pueden presentarse en una sola hifa aislada (homotálica), o requerir de la unión entre dos puntas de hifa orientadas de forma opuesta (heterotálicas). Esta forma de reproducción se presenta cuando el hongo se enfrenta a condiciones adversas a su desarrollo y le permite sobrevivir ante agentes físicos y químicos tales como temperaturas extremas, desecación, sustancias antifúngicas, etc. (Agrios, 2001).

Factores de infección. *Rhizopus* es un hongo predominantemente aeróbico y no requiere luz para crecer. Generalmente, aprovecha la invasión previa de otros microorganismos para penetrar e invadir rápidamente al fruto. Se le considera saprofito por absorber los nutrientes básicos de células del fruto ya muertas, en lugar de sintetizarlos. Producen gran variedad de enzimas, proteínas y metabolitos secundarios que les confieren patogenicidad. Sus enzimas reductoras les permiten crecer bien en ambientes ácidos y ricos en glucosa. (Ribes *et al.*, 2000; Agrios, 2001).

### **Modos de Acción de los Fungicidas**

Los fungicidas producen toxicidad en los hongos de diversas formas. Pueden inhibir o retardar la formación de la pared celular; afectar la permeabilidad de la pared celular

con pérdida de nutrientes. Otros fungicidas se combinan con metales esenciales para la célula, bloqueando sus funciones normales, como reacciones enzimáticas esenciales. Existen otros que inhiben la respiración, la división celular o pueden interrumpir el periodo de dormancia de las esporas. Si emplean un solo mecanismo se consideran sistémicos o específicos. Si presentan varios mecanismos se consideran multisitios o de amplio espectro. Los primeros provocan resistencia y funcionan mejor al aplicarse después de la infección, pues requieren que esta se presente. Los de amplio espectro no inducen resistencia, pero no se degradan y causan fitotoxicidad (Adaskaveg *et al*, 2004).

En el caso de los fungicidas efectivos contra *R. stolonifer*, estos se consideran sistémicos. Presentan mecanismos específicos de acción, por lo que provocan desarrollo de resistencia en los hongos. En general, actúan inhibiendo la respiración mitocondrial al bloquear la transferencia de electrones. Los fungicidas aprobados actualmente contra la pudrición por *Rhizopus* se consideran de bajo riesgo (DL<sub>50</sub> de 2000-5000 mg/kg). Además, Fludioxonil se degrada con la exposición a la radiación ultravioleta, por lo que sólo se aplica en poscosecha y los productos tratados se deben almacenar en ausencia de luz para garantizar la actividad del fungicida (Adaskaveg *et al*, 2005).

### **Métodos de Control**

El uso de buenas prácticas de poscosecha o de manufactura es la mejor forma de controlar los hongos y otros microorganismos que se presentan en esta etapa del fruto

(Mahovic *et al.*, 2002). Sin embargo, una vez que se ha detectado la presencia del patógeno, es necesario utilizar otras alternativas para removerlo o inactivarlo, como procedimientos químicos, físicos o biológicos, si se pretende salvar el fruto o evitar que se extienda la contaminación (Martínez *et al.*, 1994; Hahn, 2004).

Métodos químicos. Los tratamientos químicos son muy importantes por ser los más utilizados y efectivos hasta la actualidad (Qing y Shiping, 2000). Algunos de los tratamientos que han tenido buenos resultados contra *Rhizopus* spp se indican a continuación.

El cloro es el antifúngico más utilizado y económico en poscosecha, ya sea en tinas de lavado o asperjado mediante espreas. Al aplicarse en tinas de lavado, en forma de hipoclorito de calcio (50-100 ppm), inhibe a *Rhizopus* y sus esporas presentes en la superficie de un fruto. Tiene el inconveniente de que disminuye su efectividad en presencia de materia orgánica acumulada en el agua. Además, cuando el hongo ya ha penetrado a los tejidos del fruto, este desinfectante no es efectivo (Adaskaveg, 1995).

Pocos son los fungicidas químicos que tiene efectividad contra *R. stolonifer*. Ensayos a nivel de laboratorio reportan que el fungicida Iprodione a 1 ppm logra inhibir el crecimiento micelial de este hongo (Qing y Shiping, 2000). Este fungicida aún es utilizado en la práctica a pesar de que su uso fue cancelado en 1996 (Adaskaveg *et al.*, 2005).

Mlikota *et al.* (2004), expusieron esporas de distintos hongos, entre ellos *R. stolonifer*, a la acción del etanol a diferentes concentraciones y temperaturas, durante 30 s. La evaluación de las esporas germinadas demostró que *R. stolonifer* fue el hongo más resistente a los tratamientos, ya que a 45°C y 20% de etanol aún germinaron más del 40% de las esporas, y se requirió de combinaciones de 45°C y 30% de etanol ó 50°C y 20% de etanol, para poder inhibir su germinación al 100%.

Estudios con ozono han mostrado variabilidad en su efecto antifúngico. Puia *et al.* (2004), mencionan que 25 ppm de ozono, aplicado por un intervalo de tiempo de 0.5 a 1.5 horas, son suficientes para disminuir significativamente la presencia de *R. stolonifer* en dos variedades de manzana, respecto a frutos sin tratar.

En otros ensayos, al incorporar Tiabendazol en medios de cultivo, se evaluaron distintos hongos, entre ellos *R. stolonifer*. Aquí se reporta que a una concentración de 40 mg/mL se logró inhibir completamente al hongo (Abdelgaleil *et al.*, 2005).

Estudios poscosecha *in situ*, realizados sobre nectarinas en un empaque agrícola, mostraron que Pyraclostrobin (1.7 mg/mL) y Fludioxonil (1.2 mg/mL), tuvieron un efecto inhibitorio similar al fungicida Iprodione (1 mg/mL), sobre *R. stolonifer*. Los fungicidas tuvieron mejor efecto aplicados 14-16 horas después de la inoculación de esporas. La aplicación se realizó por aspersión sobre las heridas, por inmersión del fruto, sobre rodillos y cepillos y en combinación con películas comestibles. El mejor

efecto se obtuvo cuando se aplicó directamente sobre las heridas o por inmersión con posterior aplicación de película comestible mezclada con el fungicida (Adaskaveg, 2005).

El uso inmoderado de los productos químicos para contrarrestar la resistencia creciente de los microorganismos a su aplicación, provocó graves daños al entorno ecológico y al mismo ser humano (Qing y Shiping, 2000). Como consecuencia se optó por cancelar el uso de una gran cantidad de productos químicos, a pesar de su efectividad en el combate de plagas y microorganismos (Adaskaveg, 2005)

Métodos físicos. Lo anterior trajo, como consecuencia favorable, la búsqueda de tratamientos físicos que inhiban al patógeno sin dañar al fruto. El control de temperatura es un procedimiento alternativo utilizado para la inhibición de hongos fitopatógenos en poscosecha. Se emplea disminuyendo la temperatura por abajo de los 4°C o en la aplicación de tratamientos rápidos con agua caliente. La finalidad de estos tratamientos es disminuir la rapidez de respiración del fruto o inactivar las esporas, aunque no siempre es posible aplicarlos debido a que puede causar daños al vegetal (Mlikota *et al.*, 2004).

Otra alternativa es la aplicación de radiación ultravioleta. Stevens *et al.* (2004), aplicaron dosis bajas (3.6 KJ/m<sup>2</sup>) a tomates, reduciendo la actividad de la enzima poligalacturonasa hasta en un 40%, con lo cual logró reducir la incidencia de pudrición

por *R. stolonifer* en tomate. Este tratamiento también aumentó la vida de anaquel y la apariencia física del fruto.

Métodos biológicos. Una alternativa en incremento desde inicios de los 90's es el mejor aprovechamiento de los recursos naturales. En este sentido, actualmente la investigación científica se enfoca hacia especies vegetales o microorganismos que se han identificado como resistentes a enfermedades y/o se han aprovechado empíricamente con fines curativos o de conservación de alimentos. De esta forma se pretende que las alternativas de biocontrol disminuyan el uso de los fungicidas sintéticos (Qing y Shiping, 2000; Abdelgaleil *et al.*, 2005).

Respecto a los microorganismos antagonistas, Qing y Shiping (2000), realizaron un estudio para determinar la efectividad de la levadura *Pichia membranefaciens* contra *R. stolonifer* sobre nectarinas, sola y combinada con compuestos antifúngicos. Los resultados mostraron que la levadura a concentraciones de  $5 \times 10^8$  UFC/mL inhibió completamente al hongo ( $5 \times 10^4$  esporas/mL), cuando el hongo se inoculó 72 horas después de la levadura y no fue efectiva si ambos se aplicaron simultáneamente. La eficiencia de la levadura aumento al combinarla con Iprodione a 0.10 ppm o con cloruro de calcio a 20 ppm.

En cuanto al estudio y aplicación de especies vegetales, con fines de biocontrol, Ejechi *et al.* (1999), evaluaron el efecto de ácido fenólico y aceite esencial de *Dennetia*

*tripetala* (fruto similar al chile de árbol), sobre nueve hongos identificados como causantes de pudriciones en tomate. Las concentraciones mínimas inhibitorias fluctuaron entre 2.5 y 6.5 mg/mL de ácido fenólico, y entre 1.5 y 3.0 mg/mL de aceite esencial. En este caso, *R. stolonifer* mostró mayor sensibilidad a los tratamientos, ya que las concentraciones mínimas fueron de 3.5 mg/mL y 1.5 mg/mL de ácido fenólico y aceite esencial, respectivamente, mientras que las concentraciones más altas correspondieron a *Aspergillus niger* y *Candida* spp.

Bautista-Baños *et al.* (2000), reporta que de 20 extractos acuosos de hojas y tallos de plantas originarias de México, 8 fueron efectivas contra la esporulación de *R. stolonifer*, en tanto que el crecimiento micelial solo se afectó débilmente. De las especies que tuvieron efecto, tres pertenecen al género *Annona* (*A. cherimola*, *A. reticulata* y *A. muricata*), las otras cinco fueron *Carica papaya*, *Citrus limon*, *Crataegus mexicana*, *Phitecellobium dulce*, *Pouteria sapota* y *Psidium guajava*. En el caso de *C. papaya*, ellos consideraron que el alcaloide carpaina presente en esta especie, pudo ser responsable de la inhibición en la esporulación de *R. stolonifer*.

Bautista-Baños *et al.* (2003), reportaron la presencia del compuesto de tipo flavonoide denominado kaemferol en extractos etanólicos y acuosos de guamúchil (*P. dulce*). Este compuesto logró inhibir eficazmente la esporulación de *R. stolonifer*. Ellos realizaron un estudio durante un año, para detectar la presencia de compuestos activos. Encontraron que en los meses donde se observaron mayores proporciones de este

compuesto, la esporulación de *R. stolonifer* fue menor cuando se aplicaron los extractos sobre fresas almacenadas. Este compuesto se detectó por cromatografía de capa fina, comparando contra el control kaempferol, cuya  $R_f$  fue de 0.9 y 0.91 para los extractos etanólico y acuoso, respectivamente.

Abdelgaleil *et al.* (2005), evaluaron la actividad antifúngica de dos limonoides provenientes de *Khaya ivorensis*, árbol perteneciente a la familia Meliaceae y a la misma tribu que *S. humilis*. Evaluaron diez especies diferentes, entre ellas *R. stolonifer*. Los hongos mostraron distinto grado de sensibilidad a los limonoides. *R. stolonifer*, mostró resistencia frente a uno de los limonoides y sensibilidad media frente al otro.

#### Compuestos Activos de las Plantas como Antifúngicos

El reino vegetal está considerado como una fuente inmensa de compuestos antimicrobianos con innumerables aplicaciones. Sin embargo, es relativamente poco el esfuerzo que se ha encaminado a obtener compuestos naturales que sustituyan a los fungicidas sintéticos. Al respecto, el control de hongos en precosecha está mejor documentado que en poscosecha. Más aún, de la gran variedad de compuestos antifúngicos extraídos de las plantas, con efecto sobre hongos de poscosecha, pocos son los reportes que han mostrado resultados satisfactorios en la inhibición de *R. stolonifer* (Bautista-Baños, 2000; Roller 2003).

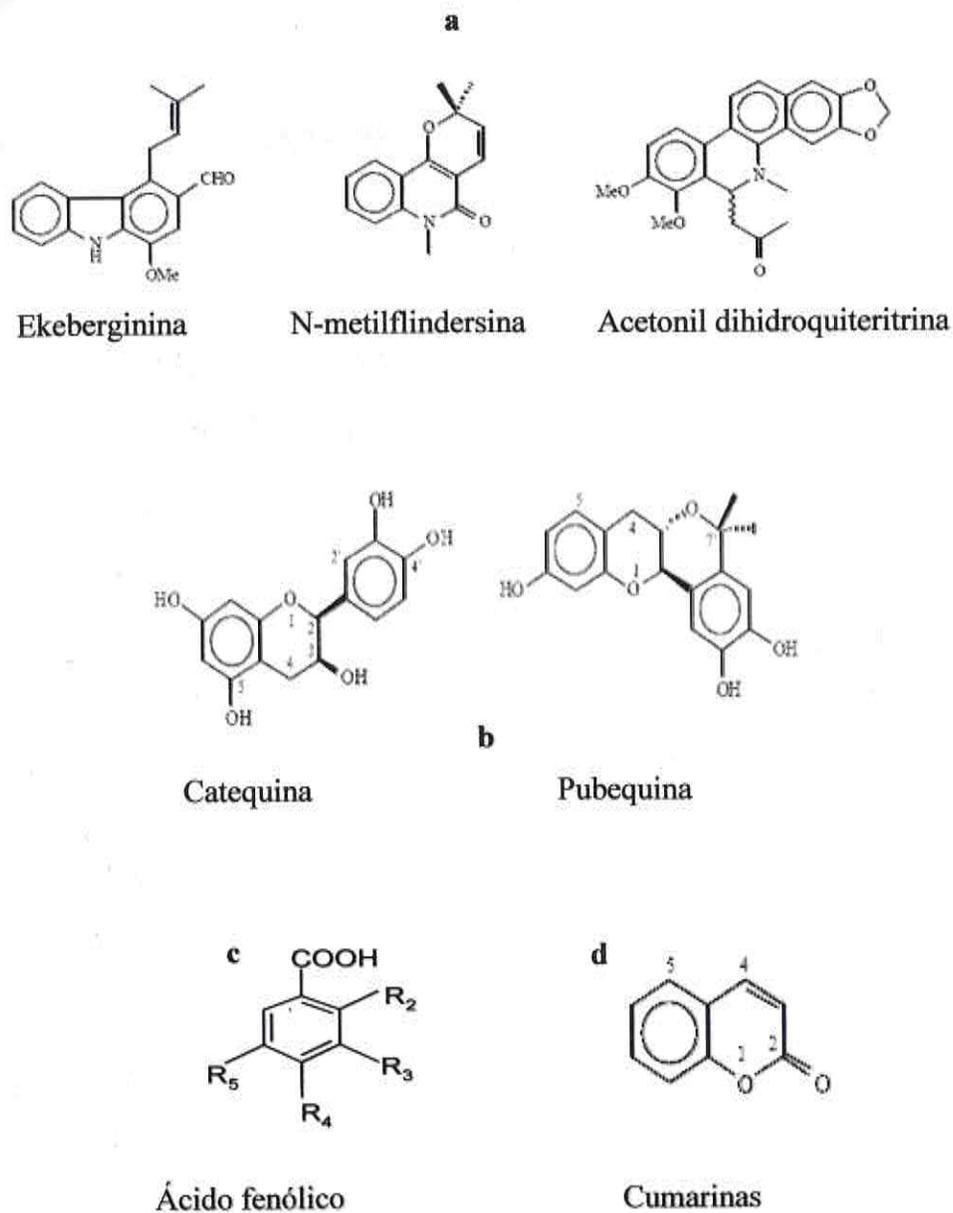
Las plantas elaboran más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, de las cuales se han aislado solo el 10%. Estos se conocen como metabolitos secundarios, que se supone son el resultado de un proceso evolutivo de los vegetales para mejorar sus defensas frente al ataque de microorganismos, insectos y otros animales (Domingo y López-Brea, 2003).

Estos compuestos podrían aportar de manera accidental un poder antimicrobiano, o realmente tener esta actividad como primer fin (Montes y García, 1997). Cuando se aplican en las pruebas de sensibilidad *in vitro*, una gran proporción de los productos vegetales sintetizados con carácter antifúngico muestra concentraciones mínimas inhibitorias altas (100 a 1000 mg/L), en comparación con los antifúngicos sintéticos (Domingo y López-Brea, 2003).

A pesar de la probada capacidad antifúngica de diversos metabolitos secundarios, se ha observado una tendencia a la especificidad en diversos extractos de plantas, en función a que la mayor parte de las plantas probadas tienen actividad frente a algunos hongos y no logran inhibir otros (Montes y García, 1997). Esto está relacionado con la alta concentración de los componentes en las plantas al producirse una infección, en cuyo caso se denominan sustancias constitutivas o inhibitorias. Por otro lado, si las sustancias son resultado de secuencias metabólicas inducidas por una infección se llaman sustancias inducidas o fitoalexinas (Grayer *et al*, 1994).

Esta clasificación no prosperó debido a que los mismos compuestos se pueden encontrar clasificados en ambos grupos. Sin embargo, ya sea que se les llame sustancias constitutivas o inducidas, se encuentran representadas en las principales clases de metabolitos secundarios: terpenoides (iridoides, sesquiterpenoides, saponinas), constituyentes nitrogenados y/o sulfurados (como alcaloides, aminas o amidas), compuestos alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos), compuestos aromáticos (fenólicos, flavonoides, estilbenos, bibencilos, xantonas y benzoquinonas), la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados (Domingo y López-Brea, 2003, Grayer *et al*, 1994).

De la gran diversidad de compuestos activos contra hongos, aquellos que pueden estar presentes en *S. humilis* se esquematizan en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Grupos de compuestos con actividad antifúngica no limonoides que pueden estar presentes en *S. humilis*. (a) Compuestos alcaloides; (b) compuestos flavonoides;

(c) ácidos fenólicos y (d) cumarinas. (Mulholland *et al.*, 2000).

### **Alcaloides**

Son compuestos nitrogenados heterocíclicos. A este grupo pertenecen compuestos como la heroína, cafeína, cocaína y morfina. Estos compuestos parecen estar involucrados en las plantas como mecanismo de defensa contra insectos, y probablemente como sustancias de defensa contra microorganismos fitopatógenos. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Grayer *et al*, 1994).

### **Flavonas y Compuestos Relacionados**

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos puede deberse a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares, por interacción con metales como hierro, estaño o magnesio (Lenz del Río, 1981; Domingo y López-Brea, 2003).

### **Terpenoides**

Son compuestos derivados del isopreno, dieno que a su vez proviene del isopentano. Se clasifican en mono, sesqui, di, tri, terta y politerpenoides. En cuanto a los triterpenoides, la mayoría provienen de las saponinas, que son glucósidos cuya porción azúcar está unida a un terpenoide. Presentan una amplia actividad biológica. Su actividad antifúngica está relacionada con glucósidos cuya porción glucosídica es un tetrasacárido

o una ramnosa. Otros reportes indican que su actividad está asociada a glucósidos cuya unión glucosídica se encuentra entre el azúcar y el grupo 3-hidroxilo del triterpenoide (parte polar de la molécula), mientras que la mayoría de los otros constituyentes antifúngicos, en general, tienden a ser fuertemente lipofílicos e inactivos en la forma glucosídica (Grayer *et al*, 1994).

### **Compuestos Fenólicos Simples**

Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Parece existir relación directa entre los lugares y el número de grupos hidroxilo (-OH) en el anillo con la toxicidad frente a los microorganismos. El mecanismo puede relacionarse con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. En este grupo se incluyen los aceites esenciales, compuestos causantes del aroma agradable de varias plantas, algunos de los cuales poseen efecto antifúngico (Domingo y López-Brea, 2003).

### **Cumarinas**

Son compuestos de polaridad baja a intermedia, derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Al parecer, su mecanismo de acción es mediante interacción con el DNA eucariota (Lenz del Río, 1981; Domingo y López-Brea, 2003).

### Extractos Vegetales con Efecto Antifúngico.

Algunos de los estudios citados anteriormente (Ejechi *et al*, 1999, Bautista-Baños *et al.*, 2000 y 2003, Abdelgaleil *et al*, 2005), dan ejemplo de la actividad antifúngica que poseen los grupos de componentes químicos que pueden estar presentes en *S. humilis*, y que mostraron su efecto contra *R. stolonifer*. Diversas investigaciones reportan compuestos antifúngicos de origen vegetal, cuyas características químicas son similares a las que se esperan encontrar en los extractos de venadillo.

Zhao *et al.* (1998), encontraron que el alcaloide dictamine a 25 mg/mL, obtenido de la especie *Dictamnus dasycarpus* mostró efecto antifúngico contra el hongo *Cladosporium cucumerinum*, al inhibir su crecimiento mediante técnicas de bioautografía.

Suresh *et al.* (1997), encontraron que extractos etanólicos de *A. indica* tuvieron el mejor efecto antifúngico contra diversos hongos, al compararlos con extractos metanólicos.

Govidanchari *et al.* (1999), encontraron efecto antifúngico en limonoides obtenidos de *S. mahogani* y *K. senegalensis* al probarlos contra el hongo *Puccinia arachidis*. Encontró que la inhibición estuvo relacionada con la estructura de los limonoides, donde, en presencia de un grupo tigloil en el carbono 6, se incrementó la actividad antifúngica.

Goun *et al.* (2003), mostraron que de entre veinte plantas analizadas en cuanto a su capacidad bactericida y antifúngica, ocho mostraron mejor efecto en los extractos metanólicos.

Almada-Ruiz (2003), evaluó una flavona metoxilada, denominada nobiletina, obtenida a partir de *Baccharis glutinosa*, sobre el hongo *Collectotrichum gloeosporoides*. Encontró que a concentraciones de 100 µg/mL inhibió al hongo de manera similar al fungicida benomilo a la misma concentración.

Navarro-García *et al.* (2003), evaluaron el efecto antifúngico de nueve plantas sobre los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trychophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*. El estudio se realizó con extractos hexánicos y metanólicos y se encontró que los extractos metanólicos mostraron mayor actividad que los hexánicos. Ellos relacionaron la capacidad inhibitoria de las especies estudiadas con sus compuestos activos: *Eupatorium aschenbornianum* con cromonas y benzofuranos; *Sedum* spp. con flavonoides, *A. cherimolia* con alcaloides y acetogeninas, *L. acapulcensis* con taninos y *Bixa orellana* con terpenos.

Abdelgaleil *et al.* (2004), probaron el efecto antifúngico de tres compuestos terpenoides de tipo limonoide, obtenidos de frutos de *Khaya senegalensis* (Meliaceae) sobre el hongo *Botrytis cinerea*. Los resultados mostraron inhibiciones entre el 60% y el 68%, al aplicar concentraciones de 1000 y 1500 ppm. Los limonoides se obtuvieron por

cromatografía ascendente a contracorriente, a partir de extractos con éter etílico. De los compuestos purificados y evaluados, dos de ellos pertenecen al grupo mexicanolide, y son similares a los compuestos presentes en *S. humilis*.

Abdelgaleil *et al.* (2005), aislaron y purificaron diez limonoides de *K. ivorensis*, dos de los cuales se evaluaron sobre diez diferentes hongos, entre ellos *Botrytis cinerea* y *R. stolonifer*. Los hongos mostraron diferente grado de sensibilidad a estos compuestos, donde *B. cinerea* fue el más sensible, mientras que *R. stolonifer* mostró respuesta nula a moderada. Los diez limonoides aislados se evaluaron a concentraciones de 1000 mg/L sobre *B. cinerea*. Se encontraron respuestas de inhibición de nulas hasta valores arriba del 60% para tres de los limonoides. De los compuestos analizados, tres de ellos son mexicanolides y obtuvieron respuestas de 56.4-57.5 %. Se mostró una relación directa entre el grado de inhibición y la cantidad de radicales hidroxilo unidos a los anillos del compuesto.

Las investigaciones se han inclinado a delimitar los metabolitos antifúngicos a los grupos de compuestos de bajo peso molecular, pero recientemente se han encontrado macromoléculas como las proteínas, que pueden jugar un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas superiores contra los patógenos (Grayer *et al.*, 1994).

Por otro lado, algunos estudios realizados con extractos vegetales de plantas con probada capacidad antifúngica han dado resultados inesperados. Por ejemplo, Coventry

y Allan (2001), señalaron que la respuesta de los hongos a la aplicación de extractos obtenidos con diferentes solventes depende del solvente aplicado, ya que al evaluar extractos etanólicos y acuosos, ambos de alta polaridad, obtuvieron resultados inhibitorios con el extracto etanólico, mientras que el acuoso no produjo inhibición, e incluso potenció el crecimiento fúngico. Ellos atribuyeron esto a que el extracto acuoso actuó como una fuente de nutrientes, donde la concentración de los componentes inhibitorios fue más baja que su dosis efectiva.

En estudios recientes se reporta que los ácidos grasos (compuestos de bajo peso molecular), pueden actuar también como antifúngicos. Abou-Jawdah *et al.* (2002), evaluaron la actividad antimicótica de nueve plantas sobre ocho hongos. Realizaron extracciones con éter de petróleo o metanol y encontraron que los primeros inhibieron eficazmente la germinación de esporas, mientras los metanólicos tuvieron un efecto bajo o nulo. *Melia azaderach* fue una de las plantas evaluadas cuyos resultados siguieron esa conducta. La inhibición de la germinación fue variable entre los hongos tratados. El efecto antifúngico se asoció con la presencia de aceites esenciales en los extractos evaluados.

Walters *et al.* (2003), encontraron que el ácido láurico (ácido graso saturado) posee efecto antifúngico contra fitopatógenos y patógenos de humanos. Al evaluarlo sobre tres hongos distintos observaron inhibición en el crecimiento micelial y en la germinación de esporas.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Presentarán efecto inhibitorio los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*?
2. ¿Ejercen efecto inhibitorio los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer*?
3. ¿Presentan efecto inhibitorio los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*?
4. ¿Qué alteraciones producen los extractos de semillas de *Swietenia humilis* Zucc, sobre las estructuras de *Rhizopus stolonifer*?
5. ¿Cuál de los extractos a evaluar de semillas de venadillo produce el mayor efecto inhibitorio sobre la formación de las estructuras de *Rhizopus stolonifer*?
6. ¿Es fungicida o fungistático el efecto de los extractos de semillas de Venadillo al aplicarlos sobre *Rhizopus stolonifer*?
7. ¿Qué grupos químicos están presentes en el extracto con mejor actividad inhibitoria sobre *Rhizopus stolonifer*?

## PROBLEMA

Determinar el efecto antifúngico de extractos de semillas de *Swietenia humilis* sobre *Rhizopus stolonifer* para su control *in vitro*.

## JUSTIFICACIÓN

Existe información de especies estrechamente relacionadas a *S. humilis* que evidencia la presencia de compuestos con efecto antifúngico (Govindachari *et al*, 1999; Abdelgaleil *et al*, 2005). Aunado a esto, se requiere de información científica que pueda sustentar la relación de los grupos de componentes químicos presentes en el germen de *S. humilis*, con su efecto inhibitorio sobre hongos fitopatógenos, como *Rhizopus stolonifer*. En base a los antecedentes, los resultados de este trabajo pueden permitir proponer al árbol de Venadillo como una fuente para el futuro desarrollo de fungicidas.

## META

Generar información científica respecto al efecto de extractos crudos provenientes de semillas de *Swietenia humilis*, sobre *Rhizopus stolonifer*, así como determinar si alguno de los extractos presenta efectividad inhibitoria igual o mayor al 60% respecto al testigo e identificar los grupos de componentes activos presentes en él.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico de extractos de semillas de *Swietenia humilis* Zucc. para el control *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fr.) Vuill.

### Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.
2. Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.
3. Evaluar el efecto de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de *Swietenia humilis* Zucc sobre la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

4. Identificar y evaluar una característica que evidencie la alteración de las estructuras de *Rhizopus stolonifer*, producida por los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y/o metanólico de las semillas de *Swietenia humilis* Zucc.
5. Seleccionar el extracto de semillas de *Swietenia humilis* Zucc que produzca el mayor efecto inhibitorio sobre la formación de las estructuras de *Rhizopus stolonifer*.
6. Determinar si el efecto producido por el extracto seleccionado es fungicida o fungistático.
7. Identificar los grupos de compuestos químicos presentes en el extracto de semillas de *Swietenia humilis* Zucc con mejor efecto inhibitorio sobre *Rhizopus stolonifer*.

## HIPÓTESIS

1. Al menos uno de los extractos, hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico, de semillas de *Swietenia humilis* Zucc poseen efecto antifúngico sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.
2. Al menos uno de los extractos, hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico, de semillas de *Swietenia humilis* Zucc poseen efecto antifúngico sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.
3. Al menos uno de los extractos, hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico, de semillas de *Swietenia humilis* Zucc poseen efecto antifúngico sobre la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
4. Al menos uno de los extractos (hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico) de semillas de *Swietenia humilis* Zucc alterará la formación de estructuras de *Rhizopus stolonifer*.
5. El extracto hidroalcohólico produce el mayor efecto inhibitorio sobre *Rhizopus stolonifer*.

6. El efecto de él o los extractos activos es fungistático.
  
7. En el efecto inhibitorio de los extractos de semilla de *Swietenia humilis* Zucc están involucrados compuestos de tipo terpenoides, alcaloides, cumarinas, flavonoides y/u otros ácidos fenólicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y Preparación de las Semillas de Venadillo

Para el desarrollo de este trabajo se colectaron los frutos en estado maduro, preferentemente antes de abrirse. La cosecha se realizó entre los meses de marzo y mayo del 2004, de diversos puntos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Los frutos se llevaron a las instalaciones del laboratorio de Toxicología del CIAD, A.C., Unidad Culiacán. Se dejaron a la sombra hasta que abrieron, para posteriormente extraer las semillas. De ellas se desechó la cubierta y se expusieron 6 horas al sol y 15 días a la sombra, con el propósito de reducir la humedad en ellas, hasta un 5%. Se almacenaron en bolsas plásticas y cerradas, a una temperatura menor de 5°C, en refrigerador convencional hasta su utilización.

### Obtención de Extractos Crudos de las Semillas de Venadillo

Las semillas deshidratadas se trituraron con licuadora convencional, hasta tamaño homogéneo inmediatamente antes de someterlas a maceración. Se utilizaron tres solventes distintos (y agua destilada para la mezcla etanol:agua). Los solventes utilizados fueron marca JT Baker, para etanol y diclorometano, y Fisher, para diclorometano, todos de grado HPLC.

### **Extracto Hidroalcohólico**

El primer extracto se obtuvo macerando el germen con una mezcla de etanol:agua, en proporción 7:3 (v/v). Por cada 100 g de germen se adicionó 1 L de la mezcla de solventes. Se dejó en reposo durante 7 días, en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró sucesivamente con gasa y papel filtro Whatman # 5. Se llevó a evaporación para extraer el solvente con rotavapor (Buchi R-205 S) a presión reducida y temperatura de 40°C. El concentrado se etiquetó como Extracto I. Se le determinó el rendimiento y se almacenó en frascos color ámbar a temperatura menor a 5°C, hasta su utilización (Reyes-Báez, 2000).

### **Extractos Diclorometánicos y Metanólicos**

Se utilizó la técnica de extracción secuencial para suspender tóxicos de matrices en alimentos (Martínez *et al.*, 1994), adaptada para material vegetal.

Se procedió en forma similar a la anterior. En este caso se emplearon 110 g de germen seco por cada 5 L de diclorometano. Se dejó en reposo por 7 días, a temperatura ambiente, en la oscuridad. A continuación se filtró con gasa y papel Whatman # 5, sucesivamente. Se concentró mediante rotavapor (Buchi R-205 S), a 40°C y presión reducida. Se obtuvo así el Extracto II. Se le determinó el rendimiento y se almacenó en frascos ámbar a menos de 5°C

El residuo obtenido en el extracto anterior se maceró con 3 L de metanol. Se le realizó el mismo proceso hasta obtener el Extracto III. Se determinó igualmente el rendimiento y se almacenó en frascos ámbar hasta su utilización en los bioensayos.

#### Obtención y Mantenimiento del Hongo en Condiciones de Laboratorio

El hongo a evaluar (*Rhizopus stolonifer*), se aisló y purificó de tomate enfermo por pudrición blanda, en el Laboratorio de Fitopatología del CIAD, Unidad Culiacán. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de sus estructuras vegetativas y germinativas con las reportadas por Schipper (1984) y Romero-Cova (1993).

#### **Preparación de Medios de Cultivo PDA**

Los medios de cultivo se emplearon para el mantenimiento del hongo y como base para la dilución de extractos. Se utilizó medio de cultivo semisintético, Papa-Dextrosa-Agar (PDA), con las siguientes proporciones: 200 g de papa, 10 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico por cada litro de agua destilada. Se esterilizó en autoclave, manteniendo una presión de 15 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 min. Se dejó enfriar hasta 40-45°C y se procedió a vaciar en cajas Petri plásticas estériles, de 8 cm de diámetro, todo según técnicas descritas (SSA, 1979; French y Hebert, 1980).

### **Preparación de Suspensión de Esporas y Cultivo Monoespórico**

A partir del aislamiento y purificación de *R. stolonifer*, se realizó una suspensión de esporas a la concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de agua destilada esterilizada. Esta suspensión se agitó en un vórtex Like, se vació en caja Petri con medio PDA, y se esparció con ayuda de perlas de vidrio. Se incubó por 24 horas y se observó al microscopio para verificar la germinación. Se delimitó una espora, con ayuda del objetivo 40x y una asa de platino. Se cortó la porción de medio con la espora, se transfirió a otra caja Petri con PDA y se incubó a 28°C hasta que el micelio llenó la caja. Finalmente se transfirieron porciones del micelio en crecimiento activo a tubos inclinados con medio PDA y se cubrieron con aceite mineral esterilizado, para su conservación (Estrada, 1997).

### Bioensayos de Evaluación Antifúngica en Condiciones de Laboratorio

#### **Evaluación de Crecimiento Micelial**

Se prepararon concentraciones al 1.0, 2.5, 5 y 7.5 % (peso/volumen) mezclando los extractos hidroalcohólico, diclorometánico o metanólico, con el medio PDA esterilizado a 40°C. Enseguida se vaciaron en cajas Petri esterilizadas dejaron solidificar. Posteriormente se inocularon al centro, con discos de 7mm de diámetro, con PDA y *R. stolonifer* de 48 horas de crecimiento. El hongo se colocó hacia el medio nutritivo. Para el testigo se siguió el mismo procedimiento, sin aplicación de extracto. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a 28°C, por 24 horas, tiempo de

crecimiento del testigo al 100%. Cada 6 horas se registraron 4 lecturas radiales en ángulos de 90° por caja. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, respecto al testigo (Vallejo-Cohen *et al.*, 1999; Reyes-Báez, 2000)

### **Evaluación de Esporulación**

Este ensayo se realizó empleando los tratamientos de la evaluación anterior, después de 48 horas de inoculación. A cada caja Petri se agregaron 10 mL de agua destilada para desprender micelio y esporas. Se raspó la superficie con ayuda de un portaobjeto. La mezcla que se obtuvo se filtró a través de una tela de organza. El filtrado se recuperó en un vaso de precipitado de 50 mL. Posteriormente se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L de cada suspensión de esporas para transferirse a una cámara de Neubauer. Se determinó la concentración de esporas (esporas/mL), con ayuda de un microscopio compuesto, utilizando el objetivo de 40x. El resultado se registró como porcentaje de inhibición de esporas, respecto al testigo (Bautista-Baños *et al.*, 2000; Vargas-Arispuro *et al.*, 1997).

### **Evaluación de Germinación de Esporas**

Los ensayos para la evaluación de la germinación de esporas se llevaron a cabo en portaobjetos excavados con dos concavidades. Para ello se preparó una suspensión de esporas de *R. stolonifer*, a una concentración de  $1 \times 10^4$  esporas/mL. De esta se agregaron 10  $\mu$ L a cada una de las concavidades y enseguida los extractos hidroalcohólico, diclorometánico o metanólico, al 5 y 7.5 %, para un volumen de 20  $\mu$ L.

totales. A cada testigo se le adicionó 10  $\mu$ L de agua destilada estéril. Los portaobjetos se colocaron en cámara húmeda por 12 horas, después de lo cual se realizó el conteo de esporas germinadas por cada 100, leídas en tres campos microscópicos (100x). El resultado se expresó como porcentaje de esporas germinadas. Se emplearon tres réplicas (portaobjetos) por tratamiento (Montes y García, 1997).

### **Evaluación de Viabilidad de Esporas**

El efecto fungistático se evaluó a partir de la suspensión de esporas que se empleó para la germinación de esporas. Para ello la dilución se agitó en vórtex. Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L, que se esparcieron sobre la superficie de medio PDA solidificado contenido en cajas Petri. La dilución se esparció con ayuda de perlas de vidrio y se dejó en incubación por 24 horas. El resultado se expresó como efecto fungistático o fungicida, dependiendo de la viabilidad de las esporas (Coventry y Allan, 2001).

### **Identificación y Evaluación de Estructuras Alteradas**

Se seleccionaron muestras de estructuras vegetativas y germinativas de los tratamientos con 72 horas de inoculación. Se observaron al microscopio y se buscaron alteraciones medibles en base a la revisión de literatura. Se determinó el diámetro de esporangio como parámetro a evaluar y se procedió a fijar las muestras. En cada portaobjetos se colocó la muestra sobre una gota de lactofenol, se cubrió con el cubreobjetos y se selló con barniz. Los diámetros se determinaron mediante cámara de Neubauer y un

microscopio óptico a 40x y 100x, marca Carl Zeiss. Se realizaron comparaciones de fotografías entre testigo y tratamientos para comprobar las alteraciones de la estructura. Los resultados se reportaron como promedio de diámetro de esporangios y descripción de alteraciones.

#### Identificación de Grupos de Componentes Químicos Activos

Por los resultados obtenidos se seleccionó el extracto metanólico para la determinación de componentes activos. Se llevó a cabo la técnica descrita por Mareggiani *et al.* (1998), para determinar la presencia de grupos químicos por reacciones de caracterización específicas y por cromatografía de capa fina.

Para reacciones de caracterización se utilizó el Método de Liebermann-Burchard para detección de estructuras esteroidales y de glucósidos esteroidales y triterpénicos y el de Mayer y Dragendorff para la detección de alcaloides, donde se comparó contra el alcaloide nicotina como control positivo y contra agua destilada como control negativo.

Para cromatografía en capa fina se utilizó la técnica ascendente en placas de vidrio recubiertas con Sílica Gel 60 F<sub>254</sub>, marca Camag, con dimensiones de 20 x 20 cm. Se depositaron muestras de 2 µL del extracto, a 3 cm del borde de la placa y separadas 3 cm entre cada una. Los eluyentes fueron las mezclas: cloroformo:acetato de etilo (95:5), cloroformo:metanol (90:10), cloroformo:metanol (80:20). Se procedió a registrar la

movilidad de los compuestos arrastrados, mediante lámpara de luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 y 266 nm. Como reveladores se emplearon yodo sublimado (universal) y anhídrido acético:ácido sulfúrico (para glucósidos terpenoides).

### Diseño Estadístico

La evaluación para inhibición del crecimiento micelial se analizó mediante un diseño de tres factores: extracto, concentración y tiempo. En este diseño los dos primeros factores son cruzados, y el tiempo es de medidas repetidas. El factor extracto tuvo tres niveles: diclorometano, metanol y etanol; la concentración, presentó cuatro niveles, 1, 2.5, 5 y 7.5%, y para el tiempo se establecieron cuatro niveles, 6, 12, 18, y 24 hrs.

Para la evaluación de inhibición de esporulación se tomó en cuenta un diseño de dos factores: extracto y concentración, cuyos niveles correspondieron a la evaluación anterior. Finalmente, en la evaluación de germinación de esporas se tuvieron los mismos factores anteriores, pero el factor concentración tuvo tres niveles, 0, 5 y 7.5%.

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Minitab versión 14.0. Se llevaron a cabo análisis de varianza y de comparación múltiple de medias, estas últimas mediante pruebas de Tukey, para determinar diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimiento de los Extractos

La cantidad de extractos recuperados a partir de semilla de venadillo (*S. humilis*), indican variabilidad en la cantidad de componentes arrastrados por cada solvente, donde la mayor proporción se obtuvo para el extracto diclorometánico, seguido por el metanólico y en tercer lugar el hidroalcohólico.

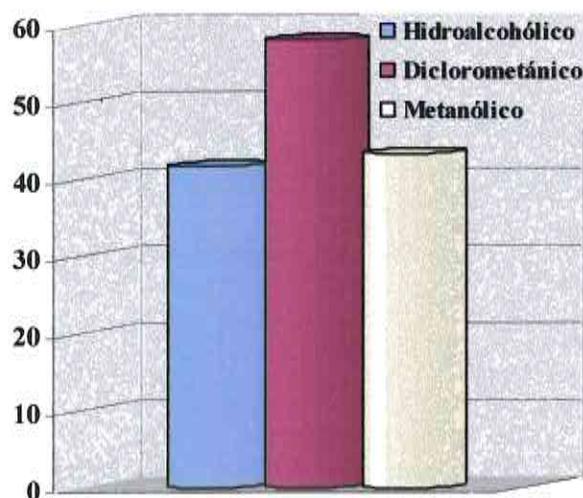
De acuerdo al proceso de extracción, por cada 300 g de semilla se obtuvieron 124.96 g de extracto hidroalcohólico, correspondiente a un rendimiento del 41.65%. A partir de 110 g de semilla, resultaron 63.88 g de extracto diclorometánico, que representan un rendimiento del 58%. Finalmente, de 38 g del residuo diclorometánico se recuperaron 15.32 g de extracto metanólico, dando un rendimiento de 43.21%.

Para tener una relación que concuerde con la literatura disponible se consideraron los 110 g de semilla macerados con diclorometano. Así, el rendimiento del extracto metanólico fue del 13.92%. Segura-Correa *et al.* (1993), obtuvieron 952 g de extracto metanólico a partir del desengrasado de 7.3 kg de semilla con hexano. De acuerdo a estos datos su rendimiento fue del 13.04%. Este porcentaje concuerda con el rendimiento obtenido para el extracto metanólico a partir de la semilla macerada con

diclorometano. Jiménez *et al.* (1997 y 1998), llevaron a cabo un proceso de desengrasado con hexano a 1 kg de semilla, previo a la obtención de extracto triclorometánico, del que se recuperaron 125 g. En base a estos datos el rendimiento final fue del 12.5%, muy similar a los indicados anteriormente.

No se encontraron reportes de un proceso de extracción para semillas de venadillo, comparable al del presente trabajo. Existen metodologías similares como la de Almada-Ruiz (2003), quien obtuvo extractos hidroalcohólicos, diclorometánicos y metanólicos a partir de partes aéreas de *Baccharis glutinosa*. Sin embargo, no se pueden realizar comparaciones adecuadas ya que no se trata de la misma especie, ni parte vegetal evaluada.

Los rendimientos encontrados para el presente trabajo se presentan en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Rendimiento de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de semillas de venadillo (*S. humilis* Zucc.).

4. Identificar y evaluar una característica que evidencie la alteración de las estructuras de *Rhizopus stolonifer*, producida por los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y/o metanólico de las semillas de *Swietenia humilis* Zucc.
5. Seleccionar el extracto de semillas de *Swietenia humilis* Zucc que produzca el mayor efecto inhibitorio sobre la formación de las estructuras de *Rhizopus stolonifer*.
6. Determinar si el efecto producido por el extracto seleccionado es fungicida o fungistático.
7. Identificar los grupos de compuestos químicos presentes en el extracto de semillas de *Swietenia humilis* Zucc con mejor efecto inhibitorio sobre *Rhizopus stolonifer*.

Efecto de Extractos Crudos de *S. humilis* sobre *R. stolonifer*

A continuación se describen los resultados correspondientes a la evaluación antifúngica. La presentación sigue el mismo orden de la metodología. Para cada uno de los experimentos el orden de presentación y discusión es: análisis de varianza, efecto de interacciones y efectos principales, según se establece en la tabla del análisis de varianza.

**Efecto sobre el Crecimiento Micelial**

Según el modelo establecido en este ensayo, el análisis de varianza de los resultados para la inhibición de crecimiento radial de micelio, arroja diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para extractos, concentraciones y tiempos, así como en sus todas sus interacciones dobles y triples. Estos resultados se resaltan en el **Cuadro 1**.

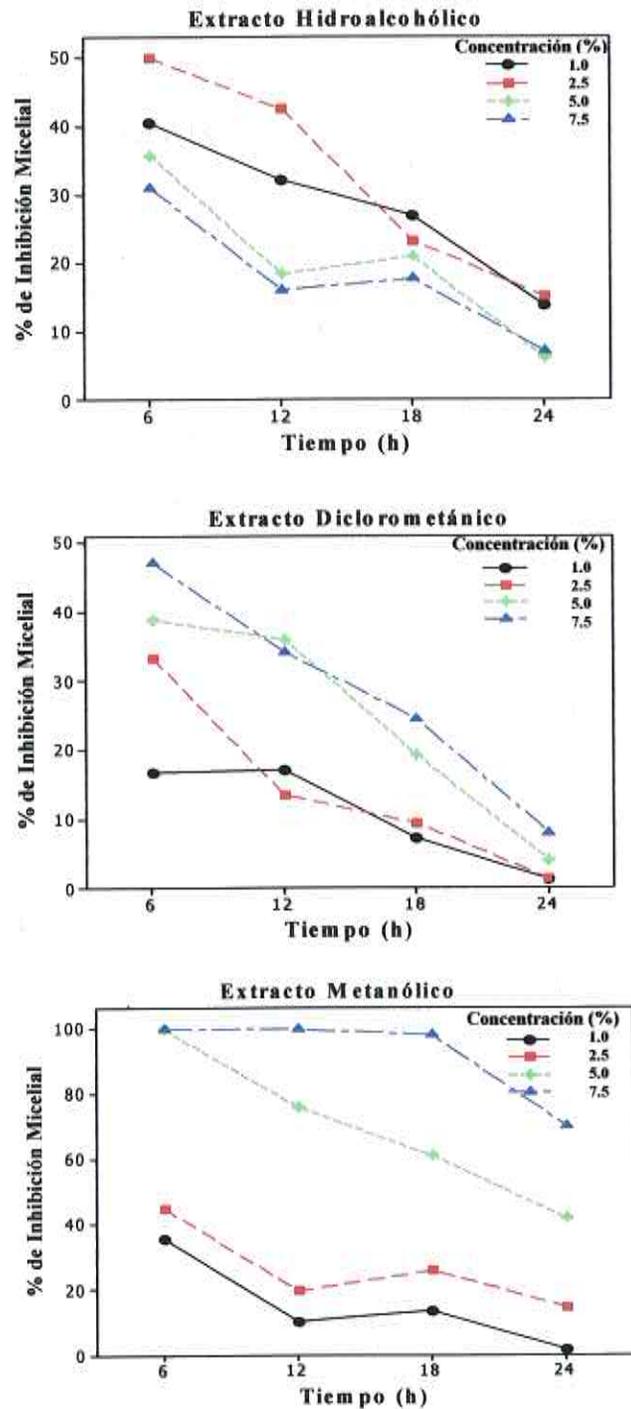
**Cuadro 1.** Análisis de varianza para la inhibición micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente de Error	GL	SC	CM	F	P
Extracto	2	27225.8	13612.9	278.15	0.000
Concentración	3	17592.2	5864.1	119.82	0.000
Caja (Extracto*Concentración)	24	1174.6	48.9	1.38	0.147
Tiempo	3	19425.7	6475.2	183.2	0.000
Extracto*Concentración	6	33617.7	5603.0	114.48	0.000
Extracto*Tiempo	6	527.5	87.9	2.49	0.030
Concentración*Tiempo	9	1009.2	112.1	3.17	0.003
Extracto*Concentración*Tiempo	18	2517.8	139.9	3.96	0.000
Error	72	2529.5	35.3		
Total	143	105805.7			

GL= Grados de Libertad    SC= Suma de Cuadrados    CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de interacción triple. La comparación de las medias de porcentajes de inhibición de micelio en esta interacción se puede observar en las gráficas tiempo-concentración elaboradas para cada uno de los extractos. Se observó que todos los extractos afectaron el crecimiento micelial del hongo. De ellos, el extracto metanólico (al 7.5%) produjo la mayor inhibición, de 70.3%, seguido por el extracto hidroalcohólico (al 2.5%) y el diclorometánico (al 7.5%), con valores de inhibición de 15% y 8% respectivamente, a las 24 horas de tratamiento. Respecto al factor tiempo, se observó una relación inversa entre este y el porcentaje de inhibición, es decir, el efecto de los extractos disminuyó a través del tiempo.

Adicionalmente, se observó que los tres extractos siguieron perfiles de inhibición distintos entre sí, exceptuando el extracto hidroalcohólico al 5 y 7.5% que mostró conductas y valores de inhibición muy similares a las concentraciones de 1 y 2.5% del extracto metanólico. Respecto al extracto hidroalcohólico, se observó un comportamiento diferente a los extractos diclorometánico y metanólico, ya que los valores de inhibición mayores se presentaron con las concentraciones más bajas (1 y 2.5%). El comportamiento gráfico de estos resultados, en su interacción triple, puede apreciarse en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Efectos de interacción triple de los extractos hidroalcohólico, diclorometánico y metanólico de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

De los mismos gráficos se puede determinar que a las 24 horas se obtuvieron las diferencias más marcadas de inhibición micelial entre los extractos. Sin embargo, dado que estos efectos no siguieron un perfil dosis-respuesta en relación directa en todos los casos, las comparaciones de medias por la prueba de Tukey se discuten en base a las diferencias entre concentraciones para cada uno de los extractos y a las diferencias entre extractos para cada una de las concentraciones, a las 24 horas de evaluación.

En el **Cuadro 2** se resumen las diferencias entre las concentraciones para cada uno de los extractos.

**Cuadro 2.** Diferencias de medias entre concentraciones, para cada extracto de *S.*

*humilis*, a las 24 horas de inhibición micelial de *R. stolonifer*

Concentración % (p/v)	Extracto		
	Hidroalcohólico	Diclorometánico	Metanólico
1.0	13.7800 a	1.3300 a	1.7900 d
2.5	15.1133 a	1.3300 a	14.8667 c
5.0	6.2200 a	4.0000 a	44.5967 b
7.5	7.1100 a	8.0000 a	70.3000 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición micelial seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

De acuerdo con el cuadro anterior sólo con el extracto metanólico se obtuvieron diferencias significativas ( $P = 0.000$ ) entre las cuatro concentraciones, en la inhibición de micelio, al final de la evaluación.

Por otra parte, también se analizaron las diferencias de medias inhibitorias entre los tres extractos, para cada concentración aplicada. Los resultados se resumen en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis*, para cada concentración a las 24 horas de inhibición micelial de *R. stolonifer*

Extracto	Concentración			
	1%	2.5%	5%	7.5%
<b>Hidroalcohólico</b>	13.7800 a	15.1100 a	6.2200 b	7.1100 b
<b>Diclorometánico</b>	1.3300 b	1.3300 b	4.0000 b	8.0000 b
<b>Metanólico</b>	1.7900 b	14.8667 a	44.5967 a	70.3000 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición micelial seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

En el análisis se encontró que para la concentración del 1% no hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los extractos diclorometánico y metanólico, pero sí entre estos y el hidroalcohólico. A la concentración del 2.5% el efecto fue distinto, ya que los extractos que no presentaron diferencias entre sí fueron el hidroalcohólico y el metanólico, siendo diferentes del diclorometánico. Para las concentraciones del 5 y 7.5%, los resultados fueron más homogéneos y determinantes, ya que en ambos se encontró diferencia estadística entre el extracto metanólico y los extractos hidroalcohólico y diclorometánico, y estos fueron iguales entre sí.

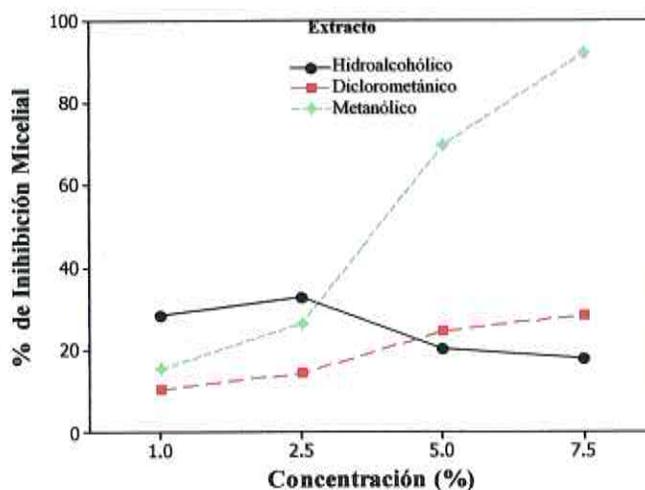
Los resultados de los efectos de interacción triple muestran que los tres extractos sí presentan efecto inhibitorio contra *R. stolonifer* y que este efecto es diferente para cada extracto, básicamente debido a la polaridad del solvente empleado.

En relación a la efectividad en la inhibición micelial de *R. stolonifer*, respecto a la meta inicialmente planteada, el único extracto que logró inhibir en más del 60 % al hongo fue el extracto metanólico, ya que los otros dos no superaron el 50% a ningún tiempo ni concentración. Para el extracto metanólico, el porcentaje deseado del efecto inhibitorio se mantuvo hasta las 18 horas de tratamiento, al 5 y 7.5%, y hasta las 24 horas para el 7.5%

La discordancia de los valores inhibitorios encontrados en el extracto hidroalcohólico pueden deberse a que no fue desengrasado previamente y los compuestos activos presentes en él probablemente fueron enmascarados por los compuestos grasos que se arrastraron durante la maceración. Además, considerando que en este extracto deben estar presentes los limonoides de alta polaridad, es de tomar en cuenta que en las semillas estos compuestos se presentan como glucósidos terpenoides. Este tipo de compuestos se hidrolizan al entrar en contacto con el agua (Lenz-del-Río, 1981), liberando la porción glucosídica, que pudo servirle de alimento a hongo. En este caso a concentraciones altas, el hongo probablemente tuvo más materia prima para elaborar sus propios metabolitos de defensa contra los posibles compuestos inhibitorios de su crecimiento.

Efectos de interacción doble. La interacción doble extracto-concentración, correspondiente a la evaluación de inhibición micelial de *R. stolonifer*, se representa en

la **Figura 9**. En ella se grafican los valores medios de cada una de las concentraciones en cada extracto, para todos los tiempos analizados.



**Figura 9.** Efectos de interacción doble extracto-concentración de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

En la **Figura 9** se muestra claramente que el extracto metanólico fue el que alcanzó los dos valores de media inhibitorios más altos, a las concentraciones del 5 y 7.5%, mientras que el menor valor se encontró en el extracto diclorometánico a la concentración del 1%. También se observa que al promediar los valores inhibitorios de los 4 tiempos analizados, el extracto hidroalcohólico muestra un efecto dosis-respuesta de relación inversa, ya que la inhibición mayor se presenta a las concentraciones más bajas, y viceversa. En tanto que los extractos diclorometánico y metanólico sí mantienen en general el perfil de relación directa dosis-respuesta.

En el **Cuadro 4** se resumen los valores de las medias encontrados para cada concentración y extracto, junto con la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey correspondiente.

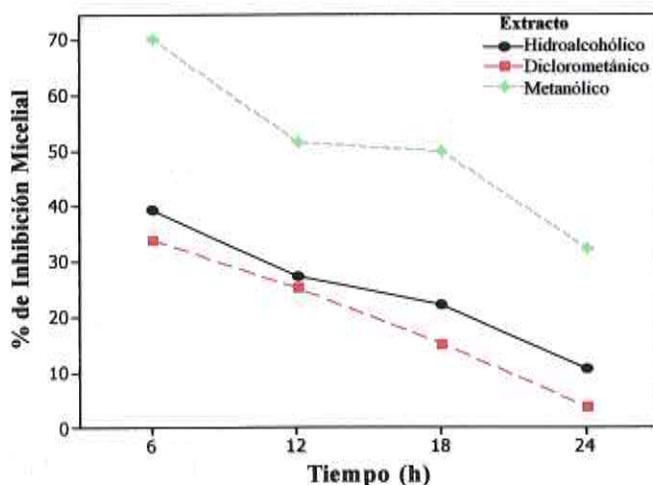
**Cuadro 4.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis* para cada concentración evaluada en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

Extracto	Concentración			
	1.0%	2.5%	5.0%	7.5%
<b>Hidroalcohólico</b>	28.3217 a	32.7217 a	20.3167 b	17.9558 c
<b>Diclorometánico</b>	10.6017 b	14.3892 b	24.5500 b	28.4850 b
<b>Metanólico</b>	15.4058 b	26.4983 a	69.8500 a	92.1250 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición micelial seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Las comparaciones de medias entre extractos para la interacción extracto-concentración (**Cuadro 4**), muestran la variación señalada anteriormente, del comportamiento de los extractos en cada concentración. A las 18 horas de tratamiento se observa la diferencia estadística entre el extracto metanólico y los extractos diclorometánico e hidroalcohólico. A las 24 horas de tratamiento los tres extractos mostraron diferencias significativas ( $P=0.000$ ).

Enseguida se llevó a cabo el análisis de efectos en la interacción extracto-tiempo. En este gráfico los valores de medias representan el promedio de todas las concentraciones de cada extracto, para cada tiempo evaluado. Estas se grafican en la **Figura 10**, donde se comprobó la disminución del efecto inhibitorio de los tres extractos en el tiempo.



**Figura 10.** Efecto de interacción doble extracto-tiempo de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

En el gráfico 10 se aprecia un comportamiento muy cercano al paralelismo entre los efectos de los tres extractos, a través del tiempo. Sin embargo, se observan diferencias entre las curvas de los extractos metanólico e hidroalcohólico, respecto al extracto diclorometánico. Este último, mostró la mayor linealidad en el comportamiento a través del tiempo, así como los menores valores de inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer*. Por otro lado, los comportamientos de los extractos hidroalcohólicos y metanólicos son muy similares entre sí, aunque los metanólicos muestran el mayor efecto inhibitorio. Finalmente, se observó que los valores de medias graficados fueron muy similares entre sí para cada tiempo evaluado, entre los extractos hidroalcohólicos y diclorometánicos.

Por lo anterior se realizó el análisis de diferencias de medias entre los tres extractos a través del tiempo, que se resumen en el **Cuadro 5**.

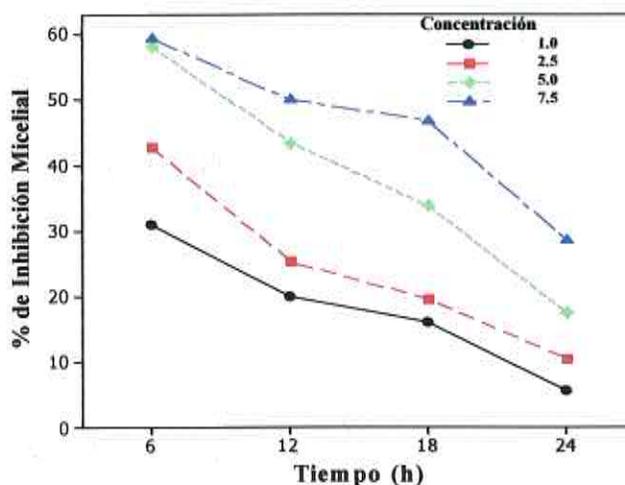
**Cuadro 5.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis* para cada tiempo evaluado en la inhibición micelial de *R. stolonifer*..

Extracto	Tiempo (h)			
	6	12	18	24
<b>Hidroalcohólico</b>	39.2933 b	27.3092 b	22.1575 b	10.5558 b
<b>Diclorometánico</b>	34.0283 b	25.2258 b	15.1050 b	3.6667 b
<b>Metanólico</b>	70.2392 a	51.5650 a	49.8042 a	32.2708 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición micelial seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

La comparación de medias mediante la prueba de Tukey mostró un perfil general en donde las diferencias significativas se encontraron entre el extracto metanólico y los extractos hidroalcohólico y diclorometánico. Además, estos dos últimos, resultaron sin diferencias entre ellos para todos los tiempos. A las 24 horas de evaluación la  $P=0.000$ , entre todos los extractos.

Por último, el gráfico para el análisis de medias relacionado con los efectos de interacción doble concentración-tiempo se puede observar en la **Figura 11**. En este gráfico se demostró que a pesar de las particularidades de cada extracto mostradas en la **Figura 8**, en general los extractos presentaron un efecto dosis-respuesta de relación directa para todos los tiempos. Por otra parte, también se manifestó una relación inversa entre el efecto inhibitorio y el incremento del tiempo, para todas las concentraciones.



**Figura 11.** Efectos de interacción doble concentración-tiempo de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

Las comparaciones de medias entre concentraciones para cada tiempo evaluado, se resumen en el **Cuadro 6**.

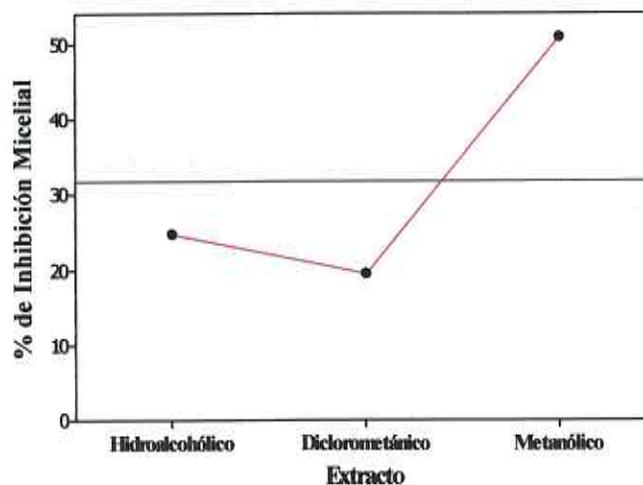
**Cuadro 6.** Diferencias de medias entre concentraciones para cada tiempo evaluado en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

Concentración (%)	Tiempo (h)			
	6	12	18	24
1.0	30.9589 b	19.9078 b	15.9356 b	5.6367 b
2.5	42.8556 ab	25.2867 ab	19.5656 b	10.4378 ab
5.0	58.2044 a	43.4933 ab	33.8111 ab	17.4467 ab
7.5	59.3956 a	50.1122 a	46.7767 a	28.4700 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición micelial seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

De acuerdo a los resultados de las comparaciones de medias se aprecian diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) principalmente entre la concentración de 1% y del 7.5% a todos los tiempos analizados. A las 24 horas de tratamiento, las concentraciones del 2.5 y 5% no presentan diferencias significativas entre sí, como tampoco respecto a la concentración del 1% ni a la del 7.5%. La diferencia estadística que presentó la concentración del 7.5% estuvo probablemente influenciada por la actividad del extracto metanólico, que impidió el paralelismo de las curvas ya que presentó un efecto inhibitorio más prolongado.

Efectos principales. Las diferencias en la inhibición micelial de *R. stolonifer* producidas por los extractos de semillas de *S. humilis* se pueden apreciar en la **Figura 12**, que corresponde al efecto principal del factor extracto. En esta figura se observa que el extracto metanólico presentó el valor de media inhibitorio (50.97%), más alto, mientras que la inhibición media para los extractos hidroalcohólico y diclorometánico fue de 24.83% y 19.51%, respectivamente.



**Figura 12.** Efecto principal del factor extracto de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

La gráfica muestra una diferencia ligera entre los valores de inhibición de los extractos hidroalcohólico y diclorometánico y una diferencia marcada entre estos y el promedio de inhibición micelial producido por el extracto metanólico. La diferencia se confirmó al realizar la prueba de Tukey, cuyos resultados se indican en el **Cuadro 7**.

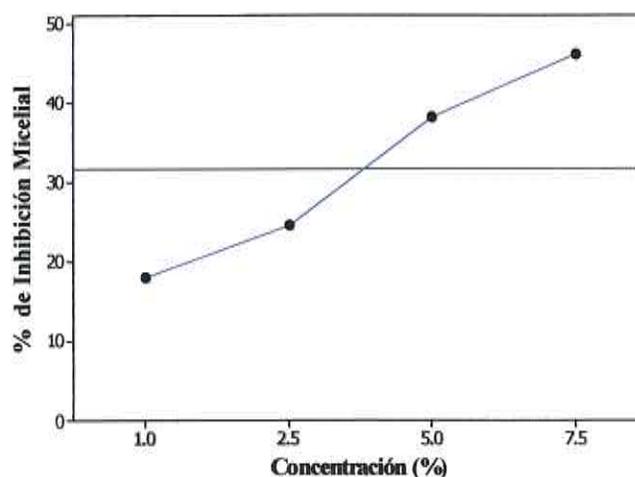
**Cuadro 7.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis* en la inhibición micelial de *R. stolonifer*

Extracto	Promedio de Medias
Hidroalcohólico	24.8290 c
Diclorometánico	19.5065 b
Metanólico	50.9698 a

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Las comparaciones del promedio de medias para el efecto principal del factor extracto indicaron que los tres extractos presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre sí.

En la **Figura 13** se muestra el efecto principal del factor concentración en la inhibición micelial de *R. stolonifer*. En él se observó que a la concentración promedio del 7.5% se obtuvo el mejor efecto inhibitorio (46.19%) sobre el crecimiento micelial del hongo.



**Figura 13.** Efecto principal del factor concentración de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

El gráfico muestra además que el efecto del factor concentración fue prácticamente proporcional a la inhibición del micelio.

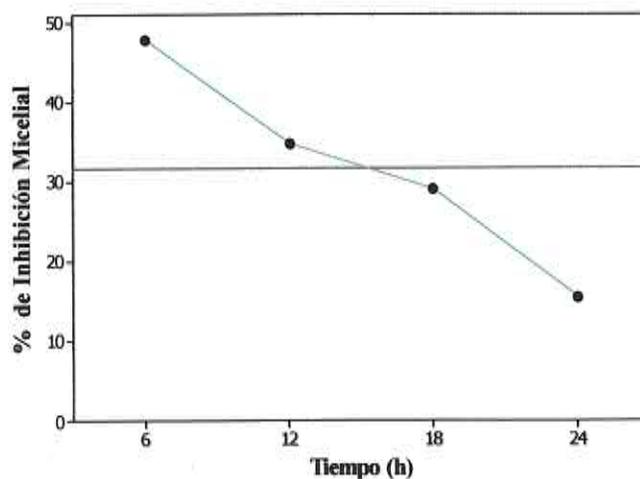
Al llevar a cabo el análisis de medias mediante la prueba de Tukey (**Cuadro 8**), las comparaciones mostraron que los valores de medias para todas las concentraciones fueron diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 8.** Diferencias de medias entre concentraciones en la inhibición micelial de *R. stolonifer* con extractos de *S. humilis*

Concentración (%)	Promedio de Medias
1.0	46.1886 a
2.5	38.2389 b
5.0	24.5364 c
7.5	18.1097 d

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Respecto al factor tiempo, la gráfica de efectos principales (**Figura 14**), muestra como disminuyó la capacidad inhibitoria de los extractos a través del tiempo, desde 47.85 % a las 6 horas de tratamiento hasta un 15.5 % a las 24 horas. Aquí se presentó una relación de proporcionalidad inversa entre el tiempo y el porcentaje de inhibición micelial de *R. stolonifer*.



**Figura 14.** Efecto principal del factor tiempo de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición micelial de *R. stolonifer*.

Los valores inhibitorios se analizaron para comprobar las diferencias entre los valores de medias y se registran en el **Cuadro 9**.

**Cuadro 9.** Diferencias de medias entre tiempos en la inhibición micelial de *R. stolonifer* con extractos de *S. humilis*

Tiempo (h)	Promedio de Medias
6	47.8536 a
12	34.7000 b
18	29.0222 c
24	15.4978 d

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Los resultados señalados anteriormente en el Cuadro 9 demuestran que para todos los tiempos analizados, los valores de medias fueron diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

Los resultados de la inhibición micelial del hongo *R. stolonifer*, coinciden con los reportados por Goun *et al.* (2003), donde prueban extractos diclorometánicos y metanólicos de 20 plantas, entre ellas *S. mahogani*, contra diversos hongos y bacterias patógenos, encontrando efecto inhibitorio de 50% o más en los extractos metanólicos al usar 100 ppm. Los extractos metanólicos de *S. humilis* superan estos resultados al lograr un 70% de inhibición antifúngica a 50 ppm (50 g/L).

Abdelgaleil *et al.* (2005), evaluaron los compuestos limonoides metil-6-hidroxiangolensato y 3,7-dideacetylkhivorina, ambos a 1 g/L, sobre *R. stolonifer*, y encontraron inhibición micelial del 9.7 y 47.2%, respectivamente. Estos limonoides se obtuvieron a partir de los extractos de corteza de *K. ivorensis*, empleando éter dietílico (solvente de baja polaridad). En el presente trabajo los extractos crudos de baja polaridad provocaron inhibiciones del 10% a 10 g/L y de 28.5% a 75 g/L. Por otro lado los extractos metanólicos (alta polaridad), a 75 g/L, lograron inhibir en un 92% el crecimiento micelial del hongo.

### Efecto sobre la Esporulaci3n

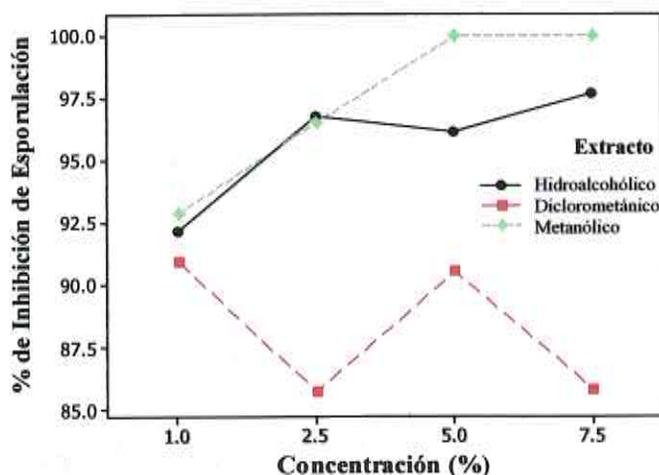
El an3lisis de varianza para evaluar la inhibici3n de la esporulaci3n de *R. stolonifer* con los extractos de semilla de *S. humilis*, muestra diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), para los factores extracto y concentraci3n, y su interacci3n, seg3n se muestra en el Cuadro 10.

**Cuadro 10.** An3lisis de varianza para los resultados del porcentaje de inhibici3n de la esporulaci3n de *Rhizopus stolonifer*, con extractos de *S. humilis*

Fuente de Error	GL	SC	MC	F	P
Extracto	2	562.052	281.026	102.17	0.000
Concentraci3n	3	66.972	22.324	8.12	0.001
Extracto*Concentraci3n	6	164.025	27.338	9.94	0.000
Error	24	66.013	2.751		
Total	35				

GL= Grados de Libertad    SC= Suma de Cuadrados    CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacci3n Doble. La gr3fica de interacci3n extracto-concentraci3n (**Figura 15**), muestra las diferencias en el comportamiento del hongo respecto a la inhibici3n de la esporulaci3n para cada extracto aplicado.



**Figura 15.** Efectos de interacción doble extracto-concentración de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer*.

En general, se presentaron valores promedio altos en la inhibición de cuerpos fructíferos de *R. stolonifer* para todos los extractos y a las cuatro concentraciones evaluadas. El extracto metanólico provocó inhibición total de formación de esporas al 5% y 7%. Aunado a ello el comportamiento de este extracto fue uniforme y lineal, hasta llegar a la inhibición total, por lo que el efecto dosis-respuesta puede considerarse directamente proporcional. Por otra parte, los extractos hidroalcohólico y diclorometánico mostraron variaciones en su comportamiento y no lograron inhibir completamente la formación de esporas, a pesar de presentar valores por arriba del 88%.

En el Cuadro 11 se presentan las comparaciones de medias de Tukey entre los extractos, para cada concentración evaluada en la inhibición de la esporulación.

**Cuadro 11.** Diferencias de medias, entre extractos de *S. humilis*, para cada concentración en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer*

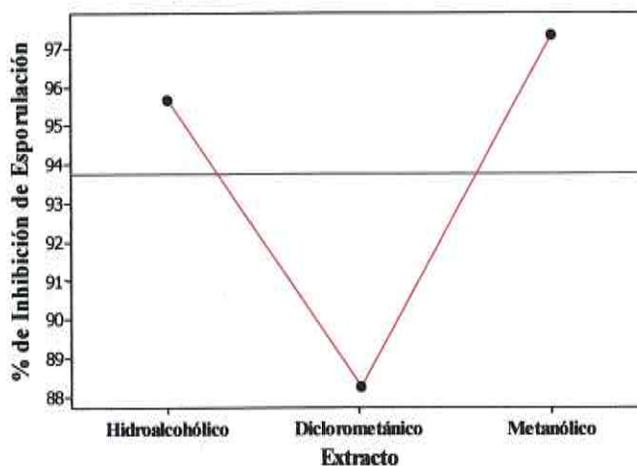
Extracto	Concentración (%)			
	1.0	2.5	5.0	7.5
<b>Hidroalcohólico</b>	92.1333 a	96.7433 a	96.1567 c	97.6600 a
<b>Diclorometánico</b>	90.9500 a	88.7433 b	90.5433 b	85.8067 b
<b>Metanólico</b>	92.9033 a	96.5467 a	99.9767 a	100.0000 a

Para una misma columna, los porcentajes de inhibición de esporulación seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

El análisis de diferencias de medias entre extractos, para cada concentración muestra que no hay diferencia significativa estadística ( $P < 0.05$ ) entre los extractos hidroalcohólico y metanólico en casi todas las concentraciones (excepto al 5%), donde el extracto hidroalcohólico muestra una disminución en la inhibición de la esporulación. Por lo contrario, el extracto diclorometánico, muestra diferencia significativa en casi todas las concentraciones frente a los extractos hidroalcohólico y metanólico, excepto para la concentración del 1%, en donde los tres extractos no muestran diferencia estadística.

Efectos Principales. En primer término se muestra en la **Figura 16**, el efecto principal del factor extracto sobre la inhibición de la esporulación de *R. stolonifer*. Aunque los extractos inhibieron a las esporas de *R. stolonifer* en un rango de 88% al 98%, destaca el efecto producido por el extracto metanólico, con una media del 97.6% para todas sus concentraciones. El extracto hidroalcohólico logró inhibir en promedio el 95.7% de las

esporas, mientras que el extracto diclorometánico fue el más bajo, con un promedio de inhibición del 88.3%.



**Figura 16.** Efecto principal del factor extracto de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer*.

En base a los datos se obtuvieron las diferencias de medias entre los extractos mediante la prueba de Tukey. Estas se resumen en el **Cuadro 12**.

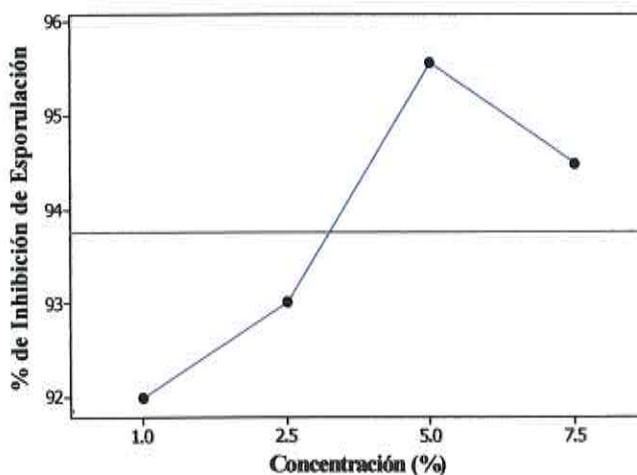
**Cuadro 12.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis* en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer*.

Extracto	Promedio de Medias
Hidroalcohólico	95.6733 a
Diclorometánico	88.2608 b
Metanólico	97.3567 a

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Los resultados de la comparación de medias para el factor extracto muestran que estadísticamente el extracto diclorometánico fue diferente de los extractos metanólico e hidroalcohólico y que estos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre sí.

La **Figura 17** corresponde al efecto principal del factor concentración sobre la inhibición de la esporulación de *R. stolonifer*. En ella se graficaron los promedios de los tres extractos para cada concentración.



**Figura 17.** Efecto principal del factor concentración de los extractos de *S. humilis* evaluados en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer*.

El comportamiento gráfico del efecto principal concentración muestra que no hubo una relación dosis-respuesta de proporción directa entre la concentración y el porcentaje de

inhibición de la esporulación. Este efecto se debió a las variaciones en la inhibición de esporulación de los extractos hidroalcohólico y diclorometánico.

Las diferencias de medias que se desprendieron del efecto principal de la concentración se indican en el Cuadro 13.

**Cuadro 13.** Diferencias de medias entre concentraciones en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer* con extractos de *S. humilis*.

Concentración (%)	Promedio de Medias
1.0	91.9956 c
2.5	93.0111 bc
5.0	95.5589 a
7.5	94.4889 ab

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

El análisis de Tukey para los promedios de las concentraciones demostró la diferencia estadística que presentó la concentración del 1% respecto a las concentraciones del 5 y 7.5%. También mostró que no hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones de 5 y 7.5%, ni entre esta última y la de 2.5%.

A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre algunas de las concentraciones o entre el comportamiento de los extractos metanólico e

hidroalcohólico, las diferencias prácticas si fueron importantes. De acuerdo con Silveira *et al.* (2001), para que *R. stolonifer* produzca un 100 % de incidencia en pudriciones sobre frutos de tomate, requiere que la concentración de inóculo sea de  $1 \times 10^4$  esporas/ml, aunque con 10-100 esporas/ml, la incidencia es del 35% de pudriciones. En el presente trabajo se encontró que para los tratamientos testigo se presentaron hasta  $1.7 \times 10^6$  esporas/ml, por lo que aún la reducción del 97.6% (reducción hasta  $4 \times 10^4$  esporas/ml), producida por el extracto hidroalcohólico al 7.5%, se consideró insuficiente. De acuerdo con estos resultados el extracto metanólico al 5 y 7.5%, fue el único que logró reducir a menos de 100 esporas/ml, la esporulación del hongo.

#### Efecto sobre la Germinación de Esporas

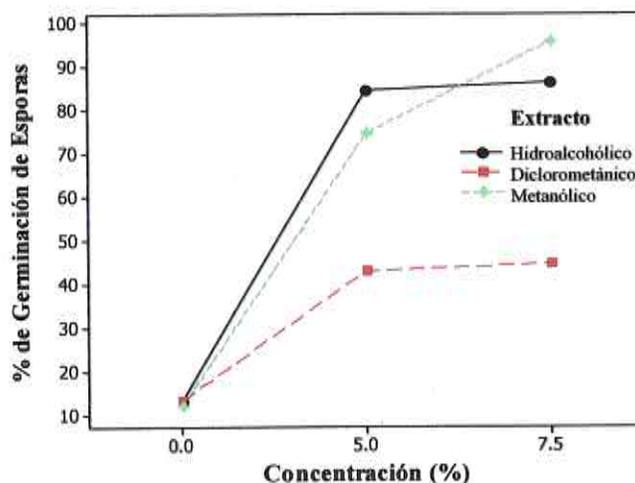
El análisis de varianza para evaluar la germinación de esporas de *R. stolonifer* con los extractos de semilla de *S. humilis*, indicó diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), para los factores extracto y concentración, y su interacción, según lo indica el Cuadro 14.

**Cuadro 14.** Análisis de varianza para los resultados del porcentaje de germinación de *Rhizopus stolonifer*, con extractos de *S. humilis*

Fuente de Error	GL	SC	CM	F	P
Extracto	2	4483.6	2241.8	71.55	0.000
Concentración	2	20954.9	10477.4	334.39	0.000
Extracto*Concentración	4	2748.2	687.1	21.93	0.000
Error	18	564.0	31.3		
Total	26	28750.7			

GL= Grados de Libertad SC= Suma de Cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de interacción doble. En la **Figura 18** se muestra la gráfica de interacción extracto-concentración que compara las diferencias entre concentraciones sobre la germinación de *R. stolonifer* para cada extracto aplicado.



**Figura 18.** Efectos de interacción doble extracto-concentración de los extractos de *S. humilis* sobre la germinación de *R. stolonifer*.

La gráfica de doble interacción extracto-concentración, muestra uniformidad en los promedios de germinación de los tratamientos testigo para los tres extractos, mientras que a las concentraciones del 5 y 7.5%, los tres extractos incrementaron los valores de germinación. Para las concentraciones del 5 y 7.5% se presentó una diferencia marcada entre el extracto diclorometánico y los extractos hidroalcohólico y metanólico. Entre estos dos extractos se observó un comportamiento similar. Por otra parte, en el comportamiento individual para cada extracto en la germinación de *R. stolonifer*, se observó un efecto de relación directa dosis-respuesta para el extracto metanólico,

mientras que en los extractos hidroalcohólico y diclorometánico, este efecto es independiente de la concentración aplicada, después de los 50 g/L.

Los resultados gráficos se confirmaron con el análisis de comparación de medias, mediante la prueba de Tukey, cuyas diferencias se indican en el Cuadro 15.

**Cuadro 15.** Diferencias de medias, entre extractos de *S. humilis*, para cada concentración evaluada en la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Extracto	Concentración (%)		
	0.0	0.5	7.5
Hidroalcohólico	13.3333 a	84.3333 a	86.3333 a
Diclorometánico	13.3333 a	43.0000 b	44.6667 b
Metanólico	12.0000 a	74.6667 a	95.6667 a

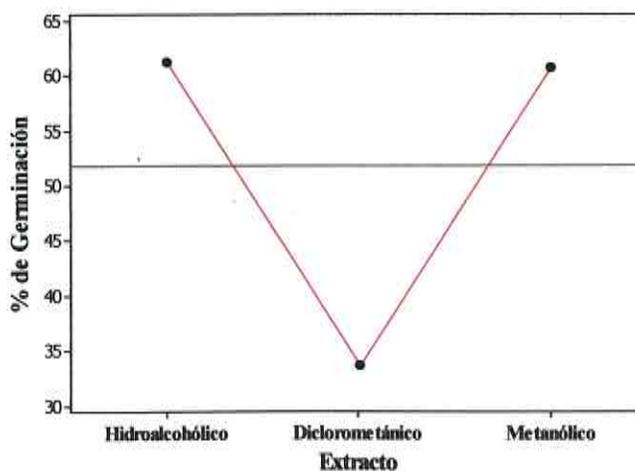
Para una misma columna, los porcentajes de inhibición de esporulación seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Montes y García (1997), determinaron que los extractos vegetales provocaron tres diferentes respuestas en los hongos en que se aplicaron. Estas fueron: inhibición, potenciación o de efecto nulo o escaso. Respecto a los extractos de semillas de *S. humilis*, se observó que los tres tipos evaluados corresponden a los que potencian el desarrollo de la germinación. En este caso los extractos en lugar de inhibir la germinación del hongo incrementaron su crecimiento, respecto al testigo.

Una posible razón del incremento en la germinación de esporas es que *R. stolonifer* empleó los nutrientes presentes en los extractos y que estos se encontraron en los

extractos hidroalcohólico y metanólico de forma más disponible que en el diclorometánico. Este efecto es similar al reportado por Coventry y Allan (2001), quienes encontraron que extractos acuosos de neem (*A. indica*) potenciaron el desarrollo del hongo *Gaeumannomyces graminis tritici*, y consideraron que ese extracto actuó como fuente de nutrientes, donde la concentración de los compuestos inhibitorios fue más baja que su dosis efectiva.

Efectos principales. En la **Figura 19** se observa el efecto principal provocado por el factor extracto, sobre la germinación de las esporas. Los resultados demostraron la similitud de los efectos producidos por los extractos hidroalcohólico y metanólico y la diferencia entre ellos y el efecto del extracto diclorometánico.



**Figura 19.** Efecto principal del factor extracto de los extractos de *S. humilis* evaluados sobre la germinación de esporas de *R. stolonifer*.

La comparación entre los porcentajes medios de germinación del hongo para los extractos evaluados confirmó las diferencias que se encontraron en el gráfico de efectos principales, las cuales se muestran en el **Cuadro 16**.

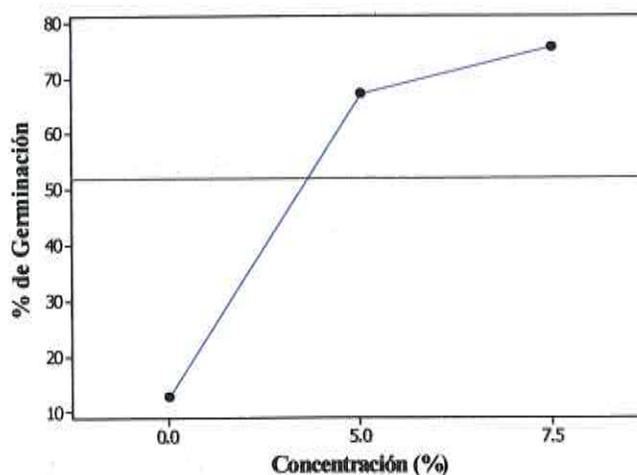
**Cuadro 16.** Diferencias de medias entre extractos de *S. humilis* en la evaluación de germinación de esporas de *R. stolonifer*.

Extracto	Promedio de Medias
Hidroalcohólico	61.2222 a
Diclorometánico	33.6667 b
Metanólico	60.7778 a

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

El análisis de diferencias por la prueba de Tukey indicó que los porcentajes de germinación de *R. stolonifer* provocados por los extractos hidroalcohólico y metanólico no presentan diferencias significativas entre sí ( $P < 0.05$ ), pero ambos son estadísticamente diferentes de la media de germinación que se obtuvo con el extracto diclorometánico.

Respecto al comportamiento del hongo en cuanto a las concentraciones aplicadas, la **Figura 20** muestra un incremento notorio entre el promedio de germinación de los tratamientos testigo y los promedios de las concentraciones al 5 y 7.5%. Entre estas últimas la diferencia de germinación es menor pero apreciable.



**Figura 20.** Efecto principal del factor concentración de los extractos de *S. humilis* evaluados sobre la germinación de esporas de *R. stolonifer*.

Las diferencias de los porcentajes de germinación se analizaron mediante pruebas de Tukey, y se muestran en el cuadro **Cuadro 17**.

**Cuadro 17.** Diferencias de medias entre concentraciones en la evaluación de germinación de esporas de *R. stolonifer* con extractos de *S. humilis*.

Concentración (%)	Promedio de Medias
0.0	12.7778 c
5.0	67.3333 b
7.5	75.5556 a

En una misma columna, los promedios de medias seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Para el caso de las diferencias entre concentraciones el análisis mostró que el efecto principal no fue diferente significativamente entre las tres concentraciones ( $P < 0.05$ ).

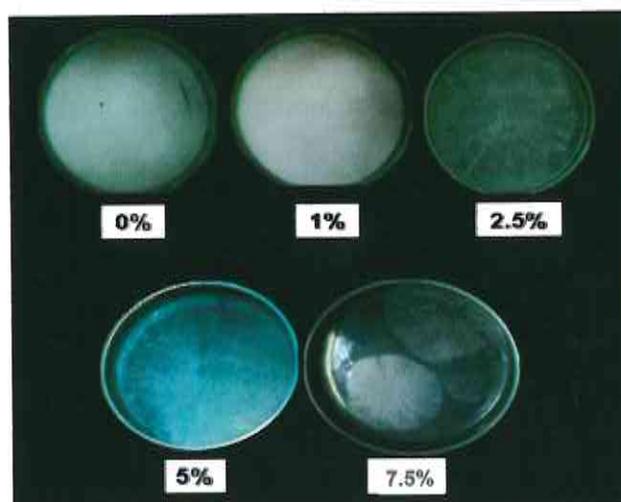
No se encontraron referencias en relación a la inhibición de germinación de esporas de *R. stolonifer* con extractos vegetales en las condiciones que se llevaron a cabo para el presente trabajo. Sin embargo, se pueden realizar comparaciones en relación al tipo de extracto, en estudios sobre germinación de esporas de otros hongos.

Si se considera que en el extracto diclorometánico se retiene la mayor cantidad de compuestos grasos (baja polaridad), los resultados pueden ser comparables con los reportados por Abou-Jawdah *et al.* (2002), quienes encontraron mejor efecto inhibitorio de la germinación de esporas fúngicas, al emplear extractos con éter de petróleo que en los metanólicos. Ellos asociaron la baja germinación de esporas con la presencia de aceites esenciales en seis de nueve extractos evaluados (entre ellos *Melia azedarach*, *Meliaceae*) sobre ocho hongos.

Este tipo de efecto también lo señalan Walters *et al.* (2003), quienes encontraron que el ácido láurico inhibe la germinación de conidios y el desarrollo de apresorios de algunos hongos como *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. En el presente trabajo, la germinación de *R. stolonifer* en los extractos fue mayor que en el testigo. Sin embargo, la germinación de las esporas fue menos intensa en los extractos que retuvieron más los compuestos grasos. Los resultados que se encontraron confirman la asociación de la inhibición en la germinación de las esporas con la presencia de compuestos grasos en extractos vegetales de baja polaridad.

### Efecto sobre la Viabilidad de Esporas.

La determinación del tipo de efecto antifúngico de los extractos se llevó a cabo sólo con esporas del tratamiento con extracto metanólico. La selección del extracto se basó en los resultados previos de evaluación de inhibición micelial. La **Figura 21** muestra que las esporas fueron viables al inocularlas en medio nutritivo (PDA), sin extracto. Esto demuestra que el extracto metanólico tuvo un efecto de tipo fungistático sobre *R. stolonifer*. La capacidad germinativa de las esporas también se afectó ya que no lograron un desarrollo del micelio similar al del testigo. Este resultado coincide con lo reportado por Coventry y Allan (2001). Ellos reportaron efecto antifúngico de tipo fungistático al aplicar extractos etanólicos de neem (*A. indica*), en pruebas de germinación del hongo *Gaeumannomyces graminis tritici* en condiciones similares



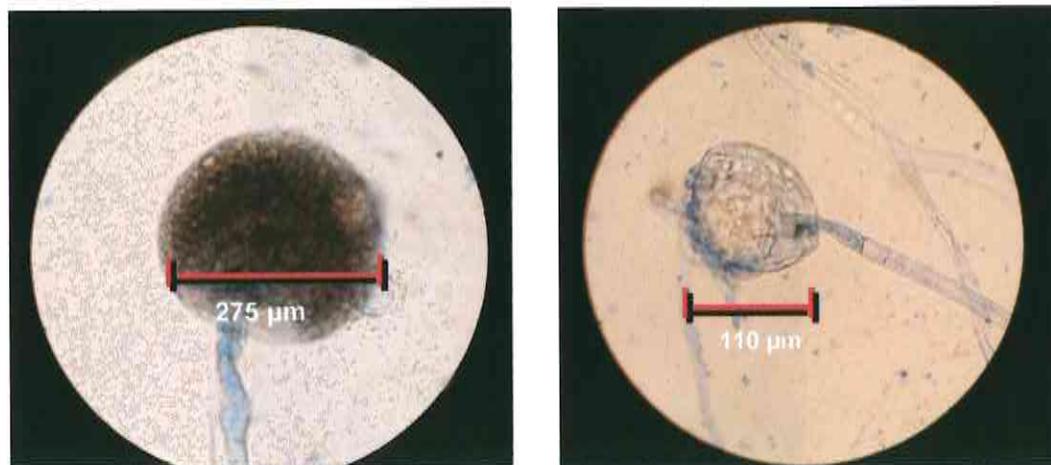
**Figura 21.** Efecto fungistático del extracto metanólico de *S. humilis* sobre *R. stolonifer*.

### **Efecto sobre Estructuras Vegetativas y Germinativas**

Durante los ensayos realizados se observaron diversas alteraciones en las estructuras vegetativas y germinativas de *R. stolonifer*, dignas de resaltarse ya que forman parte de los efectos producidos por los extractos sobre el hongo. Estas alteraciones se observaron en el estudio de inhibición micelial. En este caso se presentaron diferencias en cuanto al tamaño y color del micelio en los tratamientos respecto al testigo

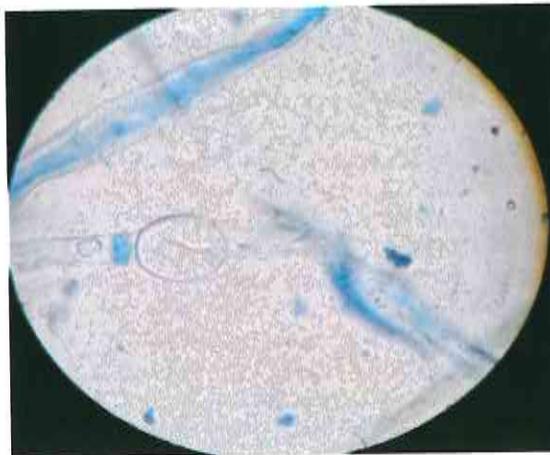
Las alteraciones se presentaron en distinto grado para los tres extractos, sin embargo, dado que los resultados de inhibición de micelio y esporas no fueron satisfactorios en dos de ellos, solo se detallan las alteraciones más relevantes y que pudieron medirse en los tratamientos con extracto metanólico.

Una de las alteraciones que más efecto puede causar en el hongo *R. stolonifer* es la disminución en el tamaño y color de sus esporangios cuando ya están completamente desarrollados. Los valores de las muestras tratadas apreciados mediante microscopio (**Figura 22**), no coinciden con los reportados por Shipper (1984) y Ribbes *et al.* (2000), quienes basan las diferencias entre especies del género *Rhizopus* en sus dimensiones y características estructurales. Ellos indican que para *R. stolonifer*, el diámetro normal de los esporangios varía entre 250 y 300  $\mu\text{m}$ . Este dato coincide con los 275  $\mu\text{m}$  de diámetro encontrados en promedio para el tratamiento testigo, mientras que los esporangios desarrollados en el extracto metanólico a 2.5% disminuyeron en 1.5 veces sus dimensiones, ya que el diámetro fue de 110  $\mu\text{m}$ .



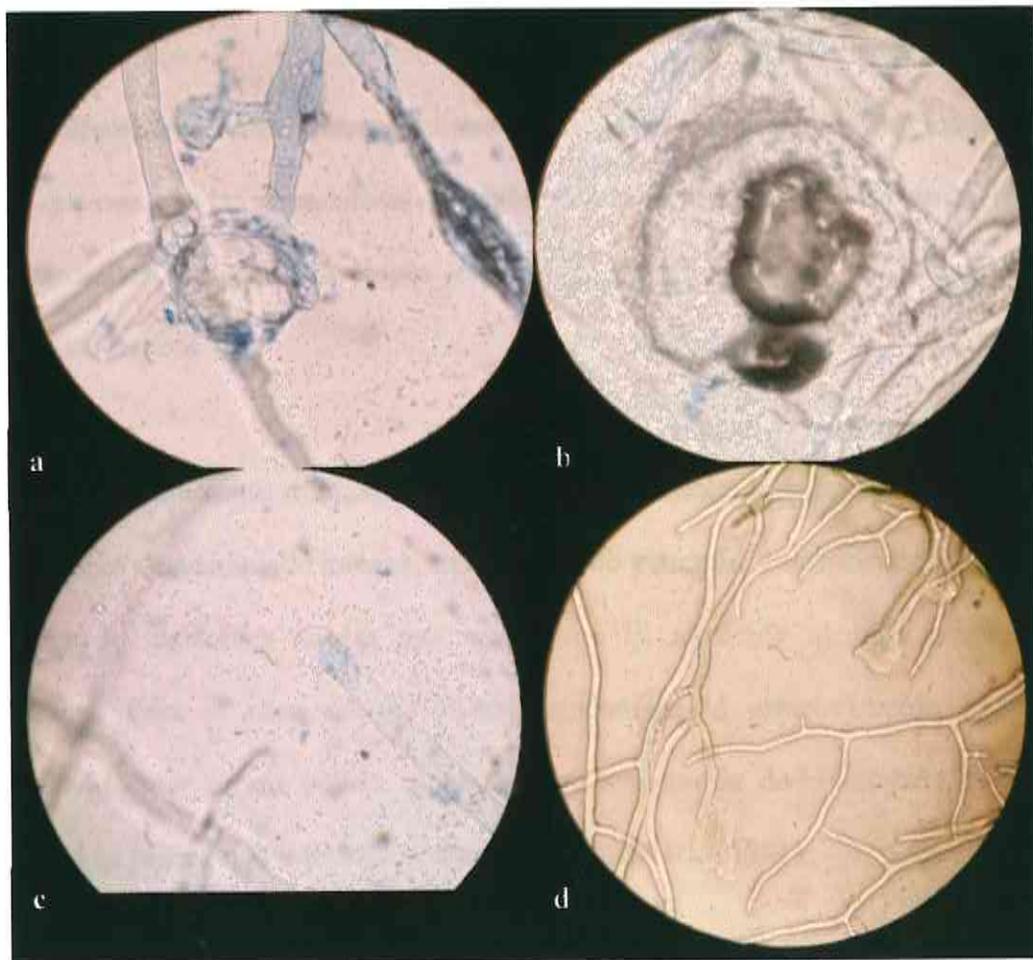
**Figura 22.** Comparación entre esporangios de *R. stolonifer* sin tratar y tratados con extracto metanólico de *S. humilis*. (a) Esporangios sin tratar vistos al microscopio a 40x. (b) Esporangios tratados con extracto metanólico al 2.5%, visto al microscopio a 100x

Otra alteración de las características de *R. stolonifer* observada en el desarrollo de este trabajo fue la formación de estructuras de resistencia, es decir zigospangios (**Figura 23**). Agrios (2001), indica que las zigosporas sólo se presentan en *R. stolonifer* cuando se enfrenta a condiciones adversas que le impiden seguirse reproduciendo de manera asexual. Estas estructuras se presentaron en los tratamientos con extracto metanólico al 5% y justifican la germinación que se observó en la evaluación de viabilidad, ya que a esa concentración no se encontraron esporas asexuales. La formación de zigospangios es preferible a la formación de esporangios y sus correspondientes aplanosporas (esporas asexuales), ya que en cada esporangio se desarrollan 30,000 esporas, mientras que los zigospangios sólo desarrollan una zigospora (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).



**Figura 23.** Formación de zigospangios de *R. stolonifer* en los tratamientos con extracto metanólico de *S. humilis* al 5%. Fotografía vista al microscopio óptico a 40x.

Al aumentar la concentración del extracto metanólico, las alteraciones estructurales fueron más drásticas (**Figura 24**). En la concentración al 7.5%, el hongo no logró desarrollar zigospangios ni esporangios adecuadamente. Además se observó ramificación del esporangióforo, que no corresponde con la estructura típica de *Rhizopus*, ya que según Shipper (1984) y Ribbes *et al.* (2000), este género desarrolla de uno a tres esporangióforos sin ramificación a partir del rizoide. Finalmente, también se observaron alteraciones como desorganización de la pared celular en los esporangióforos, puntas sin cerrar con vaciado de líquido citoplasmático (concentración del 7.5%) y falta de pigmentación en las concentraciones del 2.5 al 7.5%. Estas alteraciones disminuyen la patogenicidad del hongo e impiden la continuidad de su desarrollo.



**Figura 24.** Alteraciones producidas por el extracto metanólico de *S. humilis* sobre *R. stolonifer*. (a) Ramificación del esporangióforo (extracto metanólico, 7.5%); (b) despigmentación e inadecuada formación de la pared del esporangio; (c) esporangio sin desarrollar y (d) Ruptura de pared del esporangióforo con vaciado de líquido citoplasmático. Fotografías a, b y c, vistas a 100x y d a 40 x, en microscopio óptico.

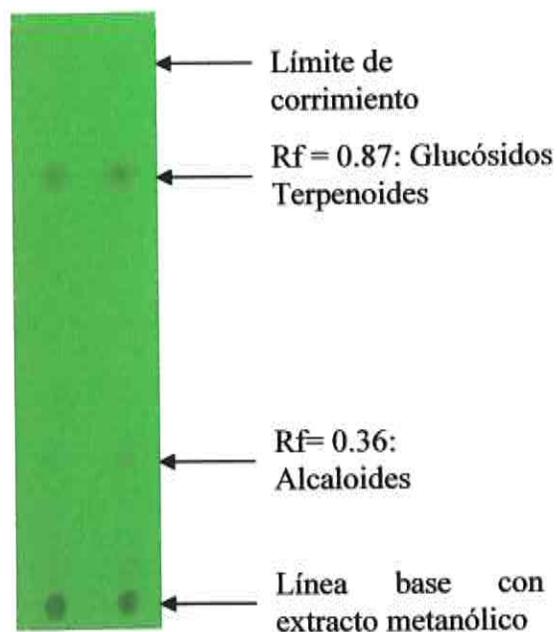
### Identificación de Grupos de Componentes Químicos Activos

La identificación de componentes activos se realizó en el extracto metanólico por ser el único que cumplió las expectativas de inhibición micelial. Los resultados de los ensayos de caracterización por reacciones específicas dieron positivo para alcaloides y glucósidos terpenoides.

En la caracterización de compuestos alcaloides se formaron precipitados de cristales con coloraciones de anaranjado intenso, amarillo pálido y marrón, confirmando la formación de sales de alcaloides en las tres reacciones. El alcaloide nicotina reafirmó los resultados. Para el caso de glucósidos terpenoides la caracterización mostró el precipitado color crema pálido esperado, que muestra la deshidratación de grupos hidroxilo en posición tres de los terpenoides (Lenz del Río, 1981).

La identificación por cromatografía en capa fina mostró un grupo de alcaloides con  $R_f$  de 0.36. Este valor es muy cercano al de 0.37 reportado por Payo *et al.* (2001), el cual reporta que corresponde a un alcaloide cuya estructura es similar a la de n-metil flindersina, un alcaloide presente en la familia Meliaceae. Además, según Lenz del Río, (1981), de acuerdo a los solventes empleados, este grupo de alcaloides corresponde los de tipo oxigenados, que son solubles en alcoholes y cloroformo, entre otros solventes.

Respecto al grupo de terpenoides, estos se encontraron a un valor de Rf de 0.87. No se encontraron reportes de valores Rf para terpenoides similares a los presentes en la especie *S. humilis*. Sin embargo, se esperaba la presencia de ellos debido que ya están ampliamente reportados en la literatura por Okorie y Taylor, (1970); Segura-Correa *et al.* (1993) y Jiménez *et al.*, (1997 y 1998). Estos compuestos se reportan tanto en extractos metanólicos como en triclorometánicos. Así mismo, López, (2003), reportó limonoides para extractos de diferentes polaridades, pero en mayor proporción en extractos etanólicos. El cromatograma correspondiente a estos ensayos, se presenta en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Cromatograma para detección de grupos terpenoides y alcaloides en extracto metanólico de *S. humilis*. Vista en cámara UV a 254 nm.

No se encontraron reportes específicos del efecto fungicida de alcaloides similares a los presentes en la familia Meliaceae, ni de alcaloides con efecto sobre *R. stolonifer*. En cuanto a los limonoides, existen referencias del efecto antifúngico sobre diversos hongos al emplear extractos de *A. indica*, *S. mahogani* y *K. senegalensis*, todas meliáceas (Suresh *et al.*, 1997; Govidanchari *et al.*, 1999; Goun *et al.*, 2003 y Abdelgaleil *et al.*, 2004). Así como también existe evidencia del efecto antifúngico de limonoides presentes en *K. ivorensis* sobre *R. stolonifer*. Algunos de estos limonoides, como swietenina, también se han reportado en *S. humilis* (Abdelgaleil *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

- El extracto metanólico produjo el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *R. stolonifer*.
- El extracto con mejor efecto inhibitorio sobre la esporulación fue el extracto metanólico.
- Todos los extractos mostraron un efecto positivo en la germinación de esporas.
- El extracto metanólico alteró la formación de las estructuras vegetativas del hongo y esto fue determinante para la inhibición de la esporulación.
- El extracto metanólico fue el que provocó los mayores resultados inhibitorios sobre el fitopatógeno *R. stolonifer* en las evaluaciones llevadas a cabo.
- El efecto inhibitorio sobre *R. stolonifer* fue de tipo fungistático.
- El efecto inhibitorio está relacionado con la presencia de compuestos terpenoides y alcaloides en el extracto metanólico.

## LITERATURA CITADA

**Abdelgaleil, S.A.M., Iwagawab, T., Doec, M. and Nakatani, M. 2004.** Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *Fitoterapia*. 75: 566-572.

**Abdelgaleil, S.A.M., Hashinaga, F. and Nakatani, M. 2005.** Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. *Pest Management Science*. 61: 186-190.

**Abdu-Jawdah, Y., Sobh, H. and Salameh, A. 2002.** Antimycotic activities of selected plant flora, growing in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3208-3213.

**Adaskaveg, J. 1995.** Postharvest decay control. *Central Valley Postharvest newsletter*. 4: 1-4.

**Adaskaveg, J., Michailides, T., Gubler, D. 2004.** Fungicide efficacy and timing for deciduous tree fruit and nut crops and grapevines. *Fungicide Tables for Fruit and Nut Crops and Grapevines*. Edited by University of California. pp.1-27.

**Adaskaveg, J.E., Förster, H., Gubler, W.D., Teviotdale, B.L. and Thompson, D.F. 2005.** Reduced-risk fungicides help manage brown rot and other fungal diseases of stone fruit. *California Agriculture*. 59: 109-114.

**Agrios, G.N. 2001.** *Fitopatología*. Ed. Limusa UTHEA. Noriega Editores. México. pp. 273-312.

**Almada-Ruiz, E.A., 2003.** Compuestos antifúngicos aislados de *Baccharis glutinosa*, para el control *in vitro* de *Collectotrichum gloeosporoides*. *Tesis de Maestría*. CIAD, Unidad Hermosillo, México. pp. 48-50.

**Bautista-Baños, S., Hernández, L.M. and Barrera, N.L. 2000.** Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18: 36-41.

**Bautista-Baños, S., García, D.E., Barrera, N.L.L., Reyes, Ch.R. and Wilson, C.L. 2003.** Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 29: 81-92.

**Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K. and Bandyopadhyay, U. 2002.** Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*. 82: 1336-1345.

**Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G. and Palacios, S.M. 2003.** Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2506-2511.

**Coventry, E. and Allan, E.J. 2001.** Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica*. 29: 1-10.

**Domingo, D. y López-Brea, M. 2003.** Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16: 385-393.

**Ejechi, B.O., Nwafor, O.E. and Okoko F.J. 1999.** Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolics acids and essential oil extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala*). *Food Research International*. 32: 395-399.

**Estrada, V.M.N., Vélez, A.P.E. y López, N.J.C. 1997.** Estandarización de una metodología para obtener cultivos monoespóricos del hongo *Beauveria bassiana*.

*Cenicafé*. 48: 59-65.

**FAO. 1989.** Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. Parte II. Ed. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile. *Serie Tecnología Postcosecha*. 7 p. 87

**French, E.R. y Hebert, T.T. 1980.** *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Editorial IICA. Costa Rica. pp. 51-53,165.

**Goun, E., Cunningham, G., Chu, D., Nguyen, C. y Miles, D. 2003.** Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia*. 76: 592-596.

**Govindanchari, T.R., Suresh, G., Banumathy, B., Masilamani, S., Geetha Gopalakrishnan and Krishna Kumari, G.N. 1999.** Antifungal activity of some B,D-seco limonoids from two meliaceous plants. *Journal of Chemical Ecology*. 25: 923-933.

**Grayer, R.J. and Harborne, J.B. 1994.** A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 37: 19-42.

**Hahn, F. 2004.** Spectral bandwidth effect on a *Rhizopus stolonifer* spores detector and its on-line behavior using red tomato fruit. *Canadian Biosystems Engineering*. 46: 49-54.

- Helgason, T., Russel, S.J., Monro, A.K. and Vogel, J.C. 1996.** Is there a future for *mahogany*? What is *mahogany*? The importance of a taxonomic framework for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 122: 47-59.
- Jiménez, A., Mata, R., Pereda-Miranda, R., Calderón, J., Isman, M.B., Nicol, R. and Arnason, J.T. 1997.** Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 1225-1234.
- Jiménez, A., Villarreal, C., Toscano, R.A., Cook, M., Arnason, J.T., Bye, R. and Mata, R. 1998.** Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae) taken in part from de Ph. D. and MS theses of C. Villarreal and M.A. Jimenez, respectively. *Phytochemistry*. 49: 1981-1988.
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D. and Brugère, H. 1999.** Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue Méd Vétérinaire*. 150: 413-430.
- Lenz-del-Río, A. 1981.** Química orgánica elemental. Editorial Patria. 10a. edición, México. p 552.
- López, P.Y. 2003.** Efecto antimicrobiano de extractos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia Humilis* Zucc) contra microorganismos modelo. Tesis de Maestría. CIAD, Culiacán. Sinaloa, México. p 93.

**Mahovik, M., Sargent, S.A. and Bartz, J.A. 2002.** Guide to identifying and controlling tomato diseases in Florida. Series of Horticultural Sciences Department. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Florida, U.S.A. p 866

**Mareggiani, G., Leicach, S. y Laner, P. 1998.** Toxicidad de extractos que tienen metabolitos secundarios de distintos órganos de *Melia azedarach* L. al nemátodo del nudo de raíz. *Fitopatología*. 33: 122-126.

**Martinez, A.J., Weng, C.Y. and Park, D.L. 1994.** Distribution of ammonia/ aflatoxin reaction products in corn following exposure to ammonia decontamination procedure. *Food Additives and Contaminants*. 11: 659-667.

**Mlikota, G.F., Mansour, M.F., Smilanick, J.L. and Mackey, B.E. 2004.** Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 1354-1360.

**Montes, B.R. y García, L.R. 1997.** Efecto de extractos vegetales en la germinación de esporas y en los niveles de daño en *Alternaria solani* en tomate. *Fitopatología*. 32: 52-57.

**Mulholland, D.A., Parel, B. and Coombes, P.H. 2000.** The chemistry of the

Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. *Current Organic Chemistry*. 4: 1011-1054.

**Navarro-García, V.M., González, A., Fuentes, M., Avilés, M., Ríos, M.Y., Zepeda, G. and Rojas, M.G. 2003.** Antifungal activities of nine traditional mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 85-88.

**Niembro, R.A. 1990.** *Árboles y arbustos útiles de México- naturales e introducidos*. Editorial Limusa-Noriega. México pp. 172-173.

**Okorie, D.A. and Taylor, D.A.H. 1971.** Meliaceae. Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*. 10: 469-470.

**Payo, H.A., Sandoval, L.D., Vélez, C.H. y Oquendo, M. 2001.** Alcaloides en la especie cubana *Croton micradenus* Urb. *Revista Cubana Farmacéutica*. 35: 61-5.

**Pietrosemoli, S., Olavez, R., Montilla, T. y Campos, Z. 1999.** Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en control de nematodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. *Revista Facultad de Agronomía* (Universidad del Zulia, Venezuela). 16: 220-225.

**Puia, C., Oroian, I. and Florian, V. 2004.** Effect of ozone exposure on phytopathogenic microorganisms on stored apples. *Journal of Agricultural Sciences*. 15: 9-13.

**Qing, F. and Shiping, T. 2000.** Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Disease*. 84: 1212-1216.

**Reyes-Báez, F.R. 2000.** Aislamiento de compuestos de *Larrea tridentata* (Gobernadora) y *Chenopodium ambrosioides* (Epazote rojo) con actividad fungicida y antiaflatoxigénica para el control de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Tesis de Maestría*. CIAD. Unidad Hermosillo, México. pp. 20-21.

**Ribes, J.A., Vanover, S.C.L. y Baker, D.J. 2000.** Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 236-301.

**Roller, S. 2003.** Natural antimicrobial for the minimal processing of food. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. USA. pp. 202-203.

**Romero-Cova, S. 1993.** Hongos Fitopatógenos. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Editor Luciano Tress V. México. pp. 105-110.

- Schipper, A.A. 1984.** A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. *Studies in Mycology*. 25: 1-19.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M., Bye, R. and Linares, E. 1993.** New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *Journal of Natural Products*. 56: 1567-1574.
- Silveira, S.S., Michereff, S.J., Mariano, R.L.R., Tavares, L.A. e Maia, L.C. 2001.** Influencia da temperatura, período de molhamneto e concentraçao do inòculo de fungus na incidencia de podridoes pós-colheita em frutos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 26: 33-38.
- SSA (Secretaria de Salubridad y Asistencia). 1979.** Técnicas Generales para el Análisis Microbiológico de Alimentos. México. p 35
- Stevens, C., Liu, J., Khan, V.A., Lu, J.Y., Kabwe, M.K., Wilson, C.L., Igwegbe, E.C.K., Chalutz, E. and Droby, S. 2004.** The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*. 23: 551-554.
- Suresh, G., Narasimhan, N.S., Masilamani, S., Partho, P.D. and Gopalakrishnan, G. 1997.** Antifungal fractions and compounds from uncrushed green leaves of

*Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. 25: 33-39.

**Tamayo, P.J. y Becerra, D.M. 2002.** Nuevas enfermedades del Brevo (*Ficus carica* L.) en el departamento de Antioquía. *Ascolfi Informa*. 28: 46-47.

**Vallejo-Cohen, S., Martínez-Téllez, M.A. y Vargas-Arispuro, I.C. 1999.** Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de *Tilletia indica*, agente causal de carbón parcial en trigo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17: 128-130.

**Van Etten, J.L., Bulla, Jr. L.A. and St. Julian, G. 1974.** Physiological and morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. *Journal of Bacteriology*. 117: 882-887.

**Vargas-Arispuro, I., Araujo-Bernal, S. y Martínez-Téllez, M.A. 1997.** Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 15: 91-95.

**Walters, D.R., Walker, R.L. and Walker, K.C. 2003.** Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*. 151: 228-230.

**Zhao, W., Wolfender, J.L., Hostettmann, K., Xu, R. and Qin, G. 1998.** Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry*. 47: 7-11.