

**(:entro de Investigación en AJintentación y
l)esarrollo, A. C.**

**Actividad antifúngica de extractos con
metabolitos secundarios de semilla de Moringa
oleifera Lam. para el control in vitro de
Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill.**

POR:

ARMENIA VELÁZQUEZ GURROLA

TESIS A I'ROHAJJA POII LA

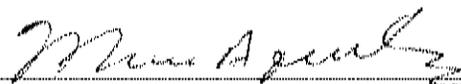
**UNIDAD CIJLIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA V TI:CNOLOGIA
PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y
SUHTROPICALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

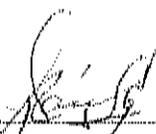
MAESTRiA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

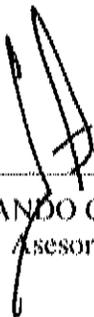
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de ARMENIA VELÁZQUEZ GURROLA, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



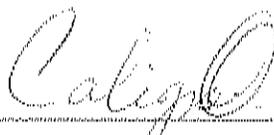
DR. MIGUEL ÁNGEL ANGULO ESCALANTE
Director



DR. RAYMUNDO SAÚL GARCÍA ESTRADA
Asesor



M.C. JOSÉ ARMANDO CARRILLO FASIO
Asesor



M.C. CARMEN ALICIA GUERRERO ONTIVEROS
Asesor

INDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE CUADROS	viii
SÍMBOLOS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	5
Características	5
Distribución	6
Usos	6
Calidad del aceite	7
Actividad biológica	8
Hongos Fitopatógenos	11
Características morfológicas	11
Los hongos como fitopatógenos	11
Impacto en la agricultura	12
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.:Fr.) Vuill	13
Características	13

Métodos de control	14
Alternativas de control contra <i>Rhizopus stolonifer</i>	15
Componentes activos de las plantas como agentes antimicrobianos	18
Fenoles simples	23
Quinonas	23
Taninos	23
Cumarinas	25
Flavonoides	25
Alcaloides	25
Métodos de extracción	26
PROBLEMA	30
JUSTIFICACIÓN	30
PROPÓSITO	30
OBJETIVO GENERAL	31
Objetivos específicos	31
HIPÓTESIS	32
MÉTODO EXPERIMENTAL	33
Preparación del germen de semillas de Moringa	33
Molienda y obtención de extractos	33
Extracto hidroalcohólico	33
Extractos diclorometánico y metabólico	34
Evaluación de la actividad antifúngica	35
Aislamiento, purificación y mantenimiento del cultivo	

monospórico de <i>Rhizopus stolonifer</i>	35
Prueba de inhibición del crecimiento micelial	36
Prueba de inhibición de la esporulación	36
Prueba de germinación de esporas	37
Medición del diámetro de esporas	37
Identificación de los grupos de componentes activos	38
Diseño estadístico	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Inhibición del crecimiento micelial	40
Inhibición de la esporulación	44
Germinación de esporas	49
Diámetro de esporas	51
Identificación de grupos de componentes activos	55
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

DEDICATORIA

A Dios por prestarme vida y entusiasmo para concluir esta etapa.

A mis padres Olimpia y Héctor por confiar en mí.

A mi esposo Marco por su amor, comprensión, esfuerzo y motivación que siempre me animan a seguir.

A mi hija Frida por que es el motivo de todos mis esfuerzos.

A mis hermanos, amigos y maestros... ..mi trabajo es fruto de su valiosa colaboración y finísimo apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al CECYT y CONACYT, por su apoyo económico, que facilitó la adquisición de material y equipo para llevar a cabo esta investigación.

A los integrantes de mi comité de Tesis, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, Dr. Raymundo Saúl García Estrada, M.C. José Armando Carrillo Fasío y M.C. Carmen Alicia Guerrero Ontiveros por su amistad, consejos y apoyo.

Al personal de los laboratorios de Toxicología y Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Culiacán, particularmente a M.C. Yadira López Pantoja, Ing. Isidro Marquez Zequeda e Ing. Beatriz Ibarra Encinas, por su amistad y apoyo técnico en los procesos de extracción y pruebas biológicas.

Al Dr. Tomás Osuna Enciso, por su apoyo en la parte experimental de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mi amigo Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña, por nuestra amistad, por su invaluable colaboración en este trabajo de investigación, y por soportar tantas desveladas conmigo.

A mis amigos, Evangelina, Maribel, Edith, Tanya, Hugo, Luis, Niño, Marcela, Juan Ramón, Mirella, Osvaldo, Olga Payán, Gloria E., Rosalba y Laura Carrasco, por sus ánimos y amistad.

A todas las personas que me animaron, apoyaron y colaboraron para que pudiera concluir este trabajo satisfactoriamente, los tengo siempre presentes.

!!!!Gracias!!!!

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. a) Árbol de <i>Moringa oleifera</i> Lam., b) semillas, c) hojas,	5
Figura 2. Distribución natural del árbol de <i>Moringa oleifera</i> .	6
Figura 3. Esporangióforo de <i>Rhizopus stolonifer</i> .	13
Figura 4. Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas.	21
Figura 5. Estructuras químicas de los principales compuestos antimicrobianos aislados de plantas.	24
Figura 6. Efectos principales para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.	41
Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Rhizopus stolonifer</i> a las 24 h de incubación con los diferentes extractos crudos.	42
Figura 8. Porcentaje de inhibición de la esporulación del hongo <i>Rhizopus stolonifer</i> a las 48 h de incubación con los diferentes extractos crudos.	45
Figura 9. Efectos principales para la variable porcentaje de inhibición de esporulación.	46
Figura 10. Fotografías al microscopio del esporangio de <i>Rhizopus stolonifer</i> en diferentes tratamientos.	47

Figura 11.	Efectos principales para el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas.	50
Figura 12.	Efectos principales para la variable diámetro de esporas.	52
Figura 13.	Observación microscópica del efecto de los extractos metabólico y diclorometánico en la estructura y tamaño de las esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i> .	53
Figura 14.	Grupos de componentes químicos en cromatograma de capa fina del extracto metanólico de semilla de <i>Moringa oleifera</i> bajo UV _{254 nm} .	55

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.	22
Cuadro 2. Solventes usados para la extracción de componentes activos.	27
Cuadro 3. Comparación de diferentes métodos analíticos de extracción sólido-líquido para componentes activos de plantas.	28
Cuadro 4. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> .	40
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición de la esporulación del hongo <i>Rhizopus stolonifer</i> .	44
Cuadro 6. Medias estadísticas para las variables evaluadas.	50
Cuadro 7. Análisis de varianza para diámetro de esporas.	51

SÍMBOLOS

cm	Centímetros
Cl	Cloro
Cu	Cobre
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
lb	Libra
L	Litro
>	Mayor que
<	Menor que
m	Metros
μL	Microlitros
μm	Micrometros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	milímetros
min	Minutos
nm	Nanómetros
#	Número
No.	Número
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
L ⁻¹	Por litro
pH	Potencial de Hidrógeno
plg ²	Pulgada cuadrada
v	Volumen
I	Yodo

ABREVIATURAS

3,5-DCQA	Ácido 3,5-dicafeoilquinico
DCM	Extracto diclorometánico
EIOH,H ₂ O	Extracto hidroalcohólico
MeOH	Extracto metanólico
Rf	Factor de retención
F ₂₅₄	Fluorescencia a 254 nm
log	Logaritmo
<i>M. oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>
Pp.	Páginas
PDA	Papa-Dextrosa-Agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
HSV-1	Virus Herpes simplex tipo 1
<i>et al.</i>	Y colaboradores

RESUMEN

El estudio de la actividad biológica y naturaleza química de las plantas contribuye a la generación de bases científicas para la obtención de principios activos que pueden reducir la aplicación de fungicidas sintéticos y los daños nocivos que provocan al ambiente y a la salud humana. En este trabajo se obtuvieron los extractos diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico de la semilla de *Moringa oleífera* y se incorporaron al medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en concentraciones 1 a 7.5 %, con el objetivo de determinar su efecto en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación, diámetro y germinación de esporas del hongo *Rhizopus stolonifer* causante de la pudrición blanda en hortalizas. Los extractos metanólico y diclorometánico al 7.5 % inhibieron el crecimiento micelial en un 100 y 17.5 % respectivamente, y el extracto hidroalcohólico no afectó de manera significativa este parámetro. Los extractos metanólico y diclorometánico disminuyeron el diámetro de esporas en un 25 % y éstas no se formaron a concentraciones mayores de 5 % de extracto metanólico. Además, se observó un 100 % de inhibición de la esporulación del hongo en estudio expuesto con 5 y 7.5 % de extracto metanólico, mientras que los extractos diclorometánico e hidroalcohólico inhibieron un 98 y 60 % respectivamente, con la concentración de 7.5 %. En la inhibición de la germinación de esporas, no hubo diferencia significativa entre extracto metanólico y testigo, y los extractos diclorometánico e hidroalcohólico al parecer favorecieron este proceso. El efecto del extracto metanólico en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y diámetro de esporas observado en este estudio puede atribuirse a la presencia de compuestos relacionados estructuralmente a alcaloides y terpenoides, caracterizados mediante reacciones y su cromatograma correspondiente en capa fina. Por lo que, el extracto metanólico de las semillas de *Moringa oleífera* podría ser una fuente de metabolitos para desarrollar fungicidas naturales.

de ,ispoms obscrvudo en este estudio puede j[r]ibuirne u la presc.ncia de comr.nlestos rdndonados csln.lcUilment; u nlc,iloirks y l.cpel1nides, wrnctel'izados lmidiantc 1l:acçloncs y su crol1111lograma colTespoll1dknte en capa fina, Por lo que, d ,lxtnwto md1111ólíco de lus s;il11111s dl Moringa ohi/fera podrln ser una filcntc de metabolitos pnra desun·ollar limgiddw; nutumles,

INTRODUCCIÓN

Las pudriciones originadas por hongos fitopatógenos son consideradas la principal causa de enfermedades en plantas y se estima que más de 10,000 especies son responsables de algún tipo de padecimiento (Trapero, 2000). *Rhizopus stolonifer* es un patógeno común en el cultivo de tomate y uno de los mucorales más frecuentes (Alexopoulos y Mims, 1997). Es en apariencia muy similar al moho del pan y crece agresivamente aún en ambientes fríos. Un tomate infectado con *Rhizopus* manifiesta una pudrición acuosa, capaz de infectar frutos vecinos y así extender la infección en menos de 48 horas (Mahovik *et al.*, 2002).

Por más de 6 décadas el uso de plaguicidas ha sido la principal estrategia para reducir las enfermedades en plantas (Müller, 2002); sin embargo, el uso intensivo de estos productos ha provocado dos grandes problemas: el incremento de residuos químicos potencialmente tóxicos al humano y la proliferación de fitopatógenos resistentes (Müller, 2002; Tripathi y Dubey, 2004).

Aunado a los problemas anteriormente citados, el aumento en el costo de los productos químicos, la falta de disponibilidad en áreas remotas y su adulteración al comercializarse, provocan una tendencia global a reducir su uso (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005). Esto ha intensificado la búsqueda de fungicidas de origen natural que sean económicos, efectivos y menos dañinos al ambiente y a la salud humana (Donli y

Dauda, 2003), de manera que se han reportado estudios que demuestran los efectos antifúngicos de extractos de diversas plantas (Koul *et al.*, 1990; Vallejo *et al.*, 1999; Bautista *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2001; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005), llegando a considerar que los productos naturales biológicamente activos tienen el potencial de reemplazar a los fungicidas sintéticos (Tripathi y Dubey, 2004).

Moringa oleifera Lam., es un árbol multiusos introducido en México, con capacidad para crecer en ambientes áridos y semiáridos. Entre los múltiples usos que se le dan a esta planta se pueden citar la utilización de sus semillas para la clarificación del agua (Okuda *et al.*, 2001); uso de las hojas y semillas como alimento por su alto contenido nutrimental y propiedades antioxidantes (Siddhuraju y Becker, 2003; Oliveira *et al.*, 1999). Recientemente se ha reportado la actividad antimicrobiana y antifúngica de las semillas (Donli y Dauda, 2003, Nikkon *et al.*, 2003); siendo este último, un aspecto que está despertando el interés científico que va en búsqueda del sustento de metodologías alternativas para el control de enfermedades en poscosecha.

En este sentido, el presente trabajo pretende contribuir en la generación de información científica acerca del efecto antifúngico de metabolitos secundarios presentes en extractos de semilla de *Moringa oleifera* contra *Rhizopus stolonifer*.

ANTECEDENTES

Moringa oleifera Lam.

Características

Moringa oleifera Lam. es un árbol de tamaño pequeño o tipo arbustivo, de crecimiento acelerado que alcanza de 10 a 12 m de alto (Figura 1). Tiene una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje plumoso de hojas pinadas en tres, y una corteza gruesa, blanquecina y de aspecto corchoso. Sus semillas son oleaginosas, aladas y se acomodan en paniculas triangulares de 12-15 cm de longitud. Sus flores son pequeñas, de color blanco con un ligero tono rosado en el centro (Martínez, 1979).

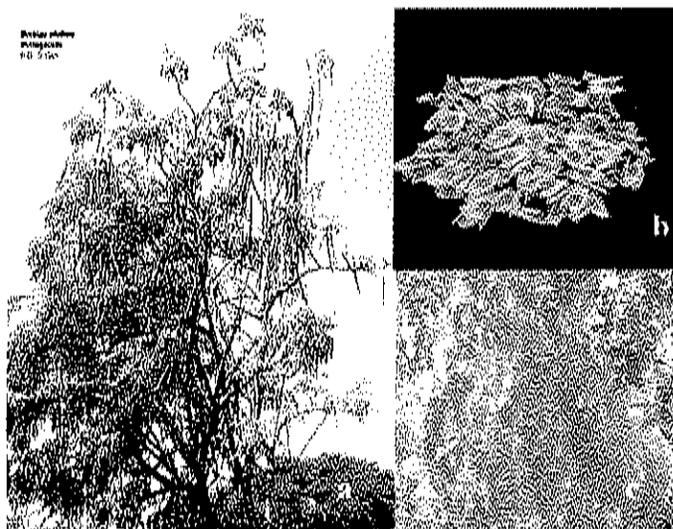


Figura 1. a) Árbol de *Moringa oleifera* Lam., b) semillas, c) hojas.

Distribución

Moringa oleifera es un árbol nativo del sur de Asia, en donde crece desde el noreste de Pakistán hasta el norte de Bengala del Oeste en la India (Figura 2). Se introdujo y se naturalizó en otras partes de la India, Afganistán, Bangladesh, Sri Lanka, el sudeste de Asia, Asia occidental, la península Arábiga, África del este y oeste, sur de la Florida, todas las Indias Occidentales y desde México a Perú, Paraguay y Brasil. En México se cultiva en muy pequeña escala en lugares con climas cálidos como Yucatán, Campeche, Oaxaca, entre otros (Martínez, 1979).

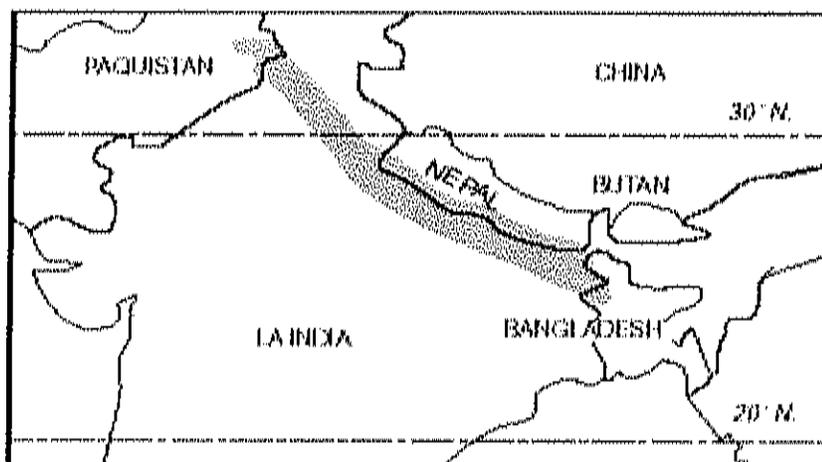


Figura 2. Distribución natural del árbol de *Moringa oleifera* (área sombreada).

Usos

Moringa oleifera es conocido como un árbol multiusos, debido a que casi todas las partes que lo conforman tienen alguna utilidad. El árbol se valora principalmente por sus vainas tiernas y comestibles, que tienen un sabor muy similar al espárrago. Estas

vainas se comen como vegetales nutritivos, ya sea cocidas o curtidas. Las hojas tiernas son ricas en proteína, minerales, beta-caroteno, tiamina, riboflavina y otras vitaminas, particularmente A y C (Nambiar *et al.*, 2003). De acuerdo al estudio realizado por Subadra *et al.* (1997), la cantidad de vitamina C en hojas de Moringa es de 143.6 mg/100 g peso fresco, y con respecto a beta caroteno, reportan 17.4 mg/100 g peso fresco en hojas.

Las semillas inmaduras se consumen crudas o cocidas y su aceite es muy apreciado en perfumería por su bajo índice de oxidación (Tsaknis *et al.*, 1999; Anwar y Bhanger, 2003). Así mismo, una vez machacadas se remojan en agua, y se utilizan en algunas comunidades rurales de Sudán e Indonesia, como un coagulante natural de bajo costo para tratar el agua y reducir su turbidez (Okuda *et al.*, 2001).

Calidad del Aceite

Moringa oleifera es apreciada por el alto contenido de aceite de sus semillas y su rendimiento oscila entre 20 y 40%, dependiendo del método de extracción (Makkar y Becker, 1997; Anwar y Bhanger, 2003). De acuerdo a un estudio realizado por Abdulkarim *et al.* (2005), el aceite de Moringa contiene ácidos oleicos (67.9%), ácido palmítico (7.8-6.8%), ácido esteárico (7.6 -6.5%) y ácido behénico (6.2-5.8%).

Actividad Biológica

A *Moringa oleifera* se le atribuyen innumerables efectos en la salud humana, entre las cuales se encuentran: la propiedad de regular la hormona tiroidea (Tahiliani y Kar, 1999; Francis *et al.*, 2004). La actividad anticarcinogénica de las semillas, *in vivo* e *in vitro* en ratas (Guevara *et al.*, 1999). El efecto hipocolesterolémico en ratas (Ghasi *et al.*, 2000; Mehta *et al.*, 2003). Así mismo, a *Moringa pterygosperma* (sinonimia de *Moringa oleifera*) se le encontró efecto antiulcerogénico (Akhtar y Ahmad, 1995) y tanto a *Moringa oleifera* como a *M. stenopetala* se les atribuye un efecto hipoglucémico en ratas y conejos (Makonnen *et al.*, 1997; Kar *et al.*, 2003).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, Misra y Sahu (1977) realizaron un estudio sobre el efecto antifúngico en dermatofitos por parte de algunas plantas de uso medicinal. Los resultados indicaron que el extracto clorofórmico de las hojas de *Moringa pterygosperma*, a la concentración de 10 mg/mL. mostró una actividad fungistática. A la concentración de 20 mg/mL. mostró actividad fungicida en contra de los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton simii* y *Trichophyton verrucosum*. Por último mencionan que los principios activos a los que se atribuye el efecto antifúngico del extracto clorofórmico de las hojas pueden ser dos alcaloides previamente identificados: Moringina y Moringinina.

Cáceres *et al.* (1991), evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes partes de *Moringa oleifera*. Probaron los extractos acuosos de hojas, raíces, corteza del tallo y

semillas en contra de bacterias, levaduras, dermatofitos y helmintos patógenos al hombre. Demostraron que extractos de hojas frescas y de semillas, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, reportaron que la temperatura de extracción por encima de los 56°C inhibió la actividad bactericida del extracto.

Valsaraj *et al.* (1997), detectaron la actividad antimicrobiana de plantas medicinales nativas de la India, entre las cuales incluyeron la especie *Moringa oleifera*. En dicha investigación se probó el extracto etanólico de la corteza del tallo; encontraron que éste mostró actividad contra *Pseudomonas aureoginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, a concentraciones de 25-12.5 mg/mL, las cuales no mostraron actividad contra *Escherichia coli*.

Satish *et al.* (1999), probaron la actividad antibacterial de extractos de plantas contra *Xanthomonas campestris*. Reportaron que el extracto acuoso esterilizado de hojas de *Moringa oleifera* a una dosis de 50 µL no mostró actividad contra dicha bacteria fitopatógena.

Goun *et al.* (2003), reportaron la actividad antifúngica y antibacterial de extractos de plantas con usos etnomédicos en la región de Indonesia. Estos investigadores probaron extractos metanólicos y diclorometánicos de diversas partes de 20 especies diferentes, entre ellas *Moringa oleifera*, de la cual estudiaron los extractos diclorometánico y

metanólico de las hojas, y concluyeron que éstos no mostraron actividad antibacterial ni antifúngica, contra los microorganismos probados.

Suarez *et al.* (2003), evaluaron la actividad bactericida de un polipéptido aislado del extracto acuoso del germen de semilla de moringa contra especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella*. La actividad antimicrobiana se atribuyó a un compuesto derivado de bencil isotiocianatos que son sintetizados por las plantas y se reconocen como un compuesto antibacterial. Por último, reportaron que el extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* tiene la capacidad de clarificar y provocar cierto grado de desinfección en el agua tratada.

Lipipun *et al.* (2003), estudiaron el efecto viricida del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleifera* contra Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). *Moringa oleifera* retardó el desarrollo y la progresión de lesiones en la piel de las ratas estudiadas, así como también, redujo la mortalidad.

Nikkon *et al.* (2003), evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de un compuesto aislado del extracto clorofórmico de la corteza de las raíces de *Moringa oleifera*, y encontraron que la fracción etanólica mostró un marcado efecto antimicrobiano contra *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus*. También mencionan que la actividad antifúngica del compuesto aislado fue moderada y no tuvo diferencia con respecto a la actividad del extracto crudo contra *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.

Sin embargo, Donli y Dauda (2003), evaluaron el extracto acuoso de las semillas de *Moringa oleifera*, contra tres hongos patógenos del cacahuete (*Arachys hypogea*): *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*. Sus resultados indicaron que las diferentes concentraciones probadas mostraron una inhibición significativa de la incidencia de estos hongos en las semillas de cacahuete. Por lo que concluyeron que el extracto acuoso de *M. oleifera* tiene potencial para su uso como biofungicida en las semillas de cacahuete.

Hongos Fitopatógenos

Características Morfológicas

Los hongos son organismos eucariotas, uni o multicelulares, carecen de clorofila, no utilizan la luz solar como fuente de energía y obtienen los nutrientes por simple absorción desde el sustrato en el cual se desarrollan; ya sea un organismo vivo en el caso de hongos parásitos, o de materia orgánica en descomposición en el caso de los hongos saprófitos (Latorre, 1999).

Los Hongos como Fitopatógenos

Una gran proporción de especies fúngicas están asociadas con las plantas, como saprófitos, simbiontes beneficiosos o parásitos. De éstos, se considera que más de 10,000 especies originan enfermedades en las plantas, constituyendo el grupo más importante de agentes fitopatógenos (Agrios, 1997; Trapero, 2000).

La patogenicidad implica un parasitismo y ello ha motivado que desde los primeros estudios sobre patología vegetal se hayan realizado clasificaciones de los hongos fitopatógenos atendiendo a su relación parasítica con la planta (Trapero, 2000). La especificidad de los hongos fitopatógenos está directamente relacionada con el nivel de parasitismo. Los parásitos obligados presentan una gran especificidad por los hospederos, mientras que un número no menos importante de hongos fitopatógenos son saprófitos o parásitos facultativos y pueden parasitar un amplio rango de hospederos cultivados o silvestres (Latorre, 1999).

Impacto en la Agricultura

En los productos hortofrutícolas existe una gran variedad de especies fúngicas que pueden ocasionar pudriciones y cuantiosas pérdidas económicas al agricultor (Mari y Guizzardi, 1998; Bautista *et al.*, 2000). Debido a su bajo pH, alto contenido de agua y composición nutrimental, los productos hortofrutícolas son muy susceptibles al ataque de hongos fitopatógenos, los cuales además de causar pudriciones, pueden hacerlos inadecuados para el consumo humano debido a la producción de micotoxinas (Tripathi y Dubey, 2004).

Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill

Características

Pertenece a la Subdivisión Zigomicotinas, Clase Zigomicetes, Orden Mucorales, Familia Mucoraceae. Es un patógeno común en el cultivo de tomate y uno de los mucorales más frecuentes. Tiene una distribución amplia en todo el planeta; su temperatura de crecimiento va desde los 10 hasta los 33°C, con una temperatura óptima de 25°C (Alexopoulos y Mims, 1997).

Es en apariencia muy similar al moho del pan y crece agresivamente aún en ambientes fríos (Figura 3). Un tomate infectado con *Rhizopus* manifiesta una pudrición acuosa con abundante micelio recubriendo la superficie, pudiendo infectar frutos vecinos y así extender la infección en menos de 48 h (Mahovic *et al.*, 2002).

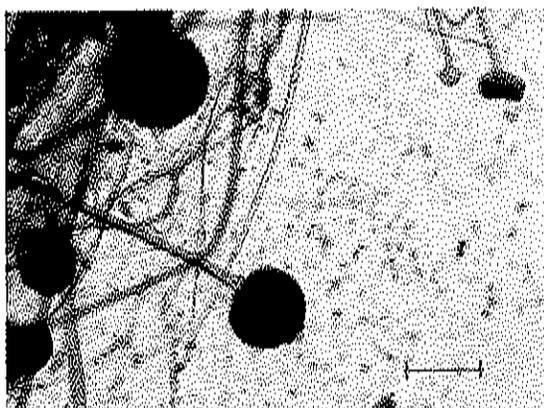


Figura 3. Esporangióforo de *Rhizopus stolonifer*.
(Fotografía tomada con microscopio óptico a 40 X).

Rhizopus stolonifer, es un hongo fitopatógeno típicamente poscosecha. Penetra sólo por daños o heridas. Las fuentes de reservorio de inóculo de este hongo pueden ser el suelo, los cajones o restos de frutas en estado de putrefacción que se presentan en la línea de embalaje o en las cámaras de enfriamiento. Se disemina principalmente por el viento y el agua empleada para el lavado o enfriamiento rápido de la fruta. En segundo lugar, puede dispersarse por contacto de frutos sanos con enfermos y por el avance propio del crecimiento del micelio que aparece en forma de una barba grisácea sobre la fruta, especialmente cuando las condiciones de temperatura y humedad ambiental le son favorables (Latorre, 1999).

Métodos de Control

No obstante la variedad de mecanismos que tienen los patógenos para ocasionar pudriciones, éstos pueden controlarse mediante la implementación de un sistema adecuado de sanidad (Mahovik *et al.*, 2002). Se considera que los tres principales métodos para reducir el número de patógenos en la superficie de frutos son de tipo físicos (hidroenfriado, hidrotérmico, etc.), químicos (compuestos derivados de Cl, I, Cu, entre otros) o biológicos (antagonistas, extractos naturales de plantas) (Parish *et al.*, 2003).

Por más de 60 años y en la actualidad, los métodos más extensamente utilizados para controlar las enfermedades ocasionadas por fitopatógenos son los químicos (Spadaro y Gullino, 2004). Para pudriciones ocasionadas por *Rhizopus stolonifer* se recomienda

tratar la fruta por inmersión o ducha en agua limpia con hipoclorito de sodio o cálcico (150 ppm, pH 7-7.5), o bien, utilizar diclorán (90-125 g/100 L) (Latorre, 1999).

Alternativas de control contra *Rhizopus stolonifer*

Reddy *et al.* (1998), probaron la actividad antifúngica de aceites esenciales de la especie vegetal *Thymus vulgaris* contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Encontraron que en el caso de *Rhizopus*, la máxima inhibición del crecimiento micelial fue de 50.5-65.8%, con dosis de 200 ppm de los aceites esenciales Laval-1 y Laval-2, respectivamente. En este caso, el rango de inhibición fue menor en *Rhizopus stolonifer* que en *Botrytis*.

Ejechi *et al.* (1999), evaluaron el efecto de compuestos fenólicos y aceites esenciales extraídos de la planta *Dennetia tripetala* contra microorganismos fitopatógenos que ocasionan pudriciones en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Entre los microorganismos que fueron aislados de frutos enfermos se encontró *Rhizopus stolonifer*, para el cual se reporta una concentración mínima inhibitoria de 3.5 mg/mL, en el caso de compuestos fenólicos y 1.5 mg/mL, de los aceites esenciales.

Bautista *et al.* (2000), realizaron una evaluación de las propiedades antifúngicas de extractos de plantas para reducir la pudrición ocasionada por *Rhizopus stolonifer* en el fruto de ciruela (*Spondias purpurea* L.), durante su vida poscosecha. Encontraron que los extractos de hojas de *Ammona cherimola*, *Bromelia hemisphaerica* y *Carica papaya*

inhibieron la esporulación y desarrollo de lesiones por pudrición en una de las tres variedades de ciruela estudiadas. Así mismo, reportaron que la severidad del daño dependió del extracto y el tipo de ciruela en estudio, además de que los extractos utilizados no afectaron significativamente las características poscosecha del fruto. Por otra parte, mencionaron que los mejores resultados en cuanto a la actividad fungicida los obtuvieron con extractos de hojas de las plantas estudiadas, mientras que los extractos de tallos fueron menos efectivos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Zahavi *et al.* (2000), investigaron el efecto de 129 cepas de microorganismos antagonistas en la incidencia de *Botrytis*, *Aspergillus* y *Rhizopus* en uvas de mesa y vino en Israel. Encontraron que las cepas epifíticas *Candida guilliermondii* y *Acremonium cephalosporium* inhibieron la incidencia de *Rhizopus* en un 22 y un 30% respectivamente.

Stange *et al.* (2001), evaluaron el efecto antifúngico de extractos de la peridermis y la corteza externa de la raíz de *Ipomoea batatas* en *Rhizopus stolonifer*. Encontraron que la corteza externa de la raíz mostró actividad antifúngica y que ésta se debía a uno de los compuestos activos aislados, el ácido 3,5-dicafeolquinico (3,5-DCQA).

Tian *et al.* (2002), probaron el efecto del calcio en el desarrollo micelial, germinación de esporas y elongación del tubo germinativo del fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, así como también su efecto en la actividad antagonista de las levaduras *Candida*

guilliermondii y *Pichia membranefaciens*. Encontraron que el cloruro de calcio al 2% inhibió significativamente el crecimiento del hongo y no afectó el desarrollo de los microorganismos antagonistas. Por último, sus resultados indicaron que al combinar cloruro de calcio con suspensiones de levaduras, se incrementó significativamente la actividad antifúngica de ambos tratamientos.

Edris y Farrag (2003), evaluaron la actividad antifúngica de los vapores de aceites esenciales de hierbabuena y dos de sus principales constituyentes (mentol y mentona), en los hongos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mucor sp* y *Rhizopus stolonifer*. Encontraron que *Rhizopus* y *Mucor* fueron los más sensibles al tratamiento con los vapores de aceites esenciales y sus constituyentes, mientras que *Sclerotinia* manifestó ser menos sensible. Sin embargo, concluyeron que los aceites esenciales de hierbabuena y sus constituyentes, son recomendables para la prevención de pudriciones en frutos ocasionados por estas especies fúngicas y que la combinación mentol-mentona manifestó mejor efecto antifúngico que los constituyentes probados por separado.

Xuan *et al.* (2003), probaron el efecto del extracto metanólico de la raíz de *Piper methysticum* L. en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*. Estos investigadores reportaron una inhibición del 100% con 100 y 200 g/L.

Qin *et al.* (2004), probaron cuatro cepas antagonistas (*Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* y *Pichia membranefaciens*) contra algunos

de los patógenos más importantes de la cereza (entre los que se encuentra *Rhizopus stolonifer*), bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Encontraron que *Trichosporon pullulans* fue la cepa más efectiva para controlar la incidencia de los patógenos estudiados y que las demás, se vieron afectadas por la temperatura y condiciones de almacenamiento, produciendo un efecto moderado.

Abdelgaleil *et al.* (2005), evaluaron la actividad antifúngica de limonoides aislados de la planta *Khaya ivorensis*, perteneciente a la familia Meliaceae, contra hongos fitopatógenos, incluyendo *Rhizopus stolonifer*. Estos investigadores reportaron una inhibición del 47% con el limonoide 3, 7-Dideacetil-khivorin, y una inhibición del 9% con el limonoide Metil 6-hidroxi-angolensato. Así mismo, sus resultados indicaron que la actividad de los limonoides varía considerablemente, y que una pequeña diferencia estructural puede significar grandes diferencias en la actividad antifúngica.

Componentes Activos de Plantas como Agentes Antimicrobianos

El reino vegetal es el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles y aplicables al tratamiento de enfermedades ocasionadas por microorganismos, tanto al humano como a especies vegetales y animales de interés económico (Hostettmann, 1999). Con respecto a su aplicación en la agricultura, recientemente la explotación de productos naturales para controlar pudriciones y extender la vida de anaquel de productos perecederos ha recibido mayor atención (Tripathi y Dubey, 2004).

En este sentido, en las últimas décadas se ha intensificado la búsqueda de alternativas naturales para controlar una gran diversidad de enfermedades de importancia en la actividad agrícola. Un gran número de estudios *in vitro* demuestran los efectos antifúngicos de extractos de plantas en el control de diversos hongos poscosecha (Koul *et al.*, 1990; Vallejo *et al.*, 1999; Bautista *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2001; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005).

La diversidad estructural de los compuestos activos o metabolitos secundarios es enorme y sólo se conoce una pequeña parte de ellos (20,000 aproximadamente) (Sepúlveda *et al.*, 2003) puesto que las plantas estudiadas representan un porcentaje sumamente bajo del total de especies de plantas en el planeta (entre 200,000 y 250,000 especies de angiospermas).

Desde el punto de vista bioquímico, las plantas han desarrollado dos tipos de compuestos que tienen que ver con su defensa al ataque de los hongos: los llamados compuestos constitutivos o inhibidores y las fitoalexinas que se producen como respuesta a la infección de patógenos más específicos por reacciones bioquímicas rápidas como la hidrólisis enzimática (Montes *et al.*, 2000). La tendencia actual es eliminar esta división y describir estos compuestos como metabolitos secundarios de bajo peso molecular o bien, principios activos.

Los principios activos son metabolitos secundarios de origen natural que se considera no juegan un papel esencial en las plantas. Sus estructuras químicas son muy diversas, pudiendo tratarse de compuestos bien definidos (alcaloides, flavonoides, etc.) o de mezclas complejas (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

Sepúlveda *et al.* (2003), consideraron que por su composición química los metabolitos secundarios se deben clasificar en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos; en tanto que los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Figura 4).

La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin (Domingo y López, 2003).

Los principios activos son metabolitos secundarios de origen natural que se considera no juegan un papel esencial en las plantas. Sus estructuras químicas son muy diversas, pudiendo tratarse de compuestos bien definidos (alcaloides, flavonoides, etc.) o de mezclas complejas (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

Sepúlveda *et al.* (2003), consideraron que por su composición química los metabolitos secundarios se deben clasificar en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos; en tanto que los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Figura 4).

La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin (Domingo y López, 2003).

MÉTODO EXPERIMENTAL

Preparación del Germen de Semillas de Moringa

La recolección de frutos secos se realizó en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Se colectaron 10 kg de frutos que fueron despulpados en el laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.; las semillas se despepitaron y secaron bajo sombra durante 15 días (Jianming *et al.*, 1999). Finalmente, las semillas sin testa se almacenaron en bolsas de plástico a 4 °C.

Molienda y Obtención de Extractos

Se molió un kilogramo de germen de semilla de moringa en una licuadora comercial y se pasaron por un tamiz No. 425 (diámetro de partícula 40 µm). En seguida, la muestra se dividió en dos para realizar los procesos de extracción.

Extracto Hidroalcohólico

Se pesaron 150 g de germen de semilla y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Se adicionaron 1.5 L. de etanol/agua en proporción 7:3 (v:v) y se mantuvieron en reposo durante tres semanas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, el macerado se filtró con tela de organza, para quitar los sólidos grandes, y con papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se evaporó con la ayuda de un rotavapor (Buchi R-205,

Suiza) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C (Cáceres *et al.*, 1991).

Extractos Diclorometánico y Metanólico

Se pesaron 110 g de germen seco y se mezclaron con 5 L de diclorometano. El macerado se dejó reposar durante una semana a temperatura ambiente en la oscuridad y posteriormente, se filtró con tela de organza y papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se evaporó con la ayuda de un rotavapor (Buchi R-205, Suiza) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C (Cufat *et al.*, 1990).

De la extracción antes descrita se recuperó el germen y se maceró con 3 L de metanol. El macerado se dejó reposar y posteriormente se filtró bajo las condiciones descritas anteriormente. Los solventes utilizados en esta investigación fueron marca JT-Baker (en el caso de metanol y etanol) y Fisher (diclorometano), grado HPLC.

Evaluación de la Actividad Antifúngica

Aislamiento, Purificación y Mantenimiento del Cultivo Monospórico de *Rhizopus stolonifer*

Para el aislamiento de *Rhizopus stolonifer* se tomaron frutos de tomate con síntomas de pudrición ocasionados por el hongo. Los tejidos enfermos seleccionados se colocaron en cajas Petri (8 cm de diámetro) con medio PDA (200 g de papa, 10 g de dextrosa y 20 g de agar L⁻¹) y se incubaron a 28°C por 24 h. La identificación se realizó con base a las características morfológicas de micelio y estructuras germinativas. (Alexopoulos y Mims, 1997).

Para la obtención del cultivo monospórico, se preparó una suspensión de esporas (aplanosporas) de 1.5×10^2 . Se inocularon 10 μ L en una caja Petri y se dispersaron con perlas de vidrio estériles. El cultivo se incubó a 28°C por 6 h y se aisló una espora germinada, con ayuda de un estereoscopio (Zeizz) a 80 X y un sacabocado de 9 mm. El trozo de medio de cultivo con la espora se transfirió a una caja Petri con PDA hasta obtener una colonia con esporas. La cepa obtenida se activó cada ocho días durante el transcurso del experimento y se almacenó en tubos inclinados con aceite mineral en el cepario del laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán.

Prueba de Inhibición del Crecimiento Micelial

El medio de cultivo PDA se esterilizó durante 15 min a 15 lb/plg² y se enfrió a 45°C (Misra y Sahu, 1977). Se agregaron los extractos crudos metanólico, diclorometánico e hidroalcohólico a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 7.5%. Posteriormente, se vació en cajas Petri, bajo condiciones asépticas. Se utilizaron cinco cajas por tratamiento incluyendo al testigo que consistió en PDA sin extracto. En la parte central de las cajas Petri se colocó un disco de agar de 0.7 cm de diámetro más *Rhizopus stolonifer* en crecimiento activo (Reddy *et al.*, 1998; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005), incubándose por 24 h a 28°C. El diámetro de crecimiento del micelio se midió cada tres horas hasta que el testigo llenó la caja. El resultado se expresó en % de inhibición del crecimiento micelial y se obtuvo a través de la aplicación de la fórmula descrita por Vallejo *et al.* (1999):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento Micelial Testigo} - \text{Crecimiento Micelial Tratamiento}}{\text{Crecimiento Micelial Testigo}} \times 100$$

Prueba de Inhibición de la Esporulación

El conteo de esporas se realizó a partir de las cajas Petri utilizadas en el experimento anterior con 48 h de incubación. Donde se agregaron 10 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie con un portaobjetos, se filtró la suspensión con una malla de organza, realizando el conteo en la cámara de Neubauer.

La concentración de esporas se determinó con el apoyo de un microscopio compuesto (Carl Zeiss) a 40 X de aumento, y se reportó como # esporas/mL (Bautista *et al.*, 2003). El porcentaje de inhibición de la esporulación se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{No. esporas testigo} - \text{No. esporas tratamiento}}{\text{No. esporas testigo}} \times 100$$

Prueba de Germinación de Esporas

Se utilizó la metodología descrita por Montes y García (1997). Se tomaron cultivos de una semana de incubación y se preparó una suspensión de esporas bajo condiciones similares a la prueba anterior. En portaobjetos excavados, se agregaron 5µL de la suspensión de esporas y 5µL del extracto correspondiente (DCM, MeOH o EtOH.H₂O). Se colocaron en cámara húmeda por 12 h y finalmente se hizo un conteo de esporas germinadas (100 X). Para cada extracto se prepararon tres portaobjetos (réplicas) determinándose la cantidad de esporas germinadas por 100 esporas contadas. Al testigo se le agregó una alícuota de 5µL de agua destilada estéril.

Medición del Diámetro de Esporas

Se tomaron muestras de micelio y esporas de los tratamientos del ensayo de inhibición del crecimiento micelial con 72 h de incubación y se fijaron con lactofenol. El diámetro de diez esporas por tratamiento se midió con el uso de un microscopio óptico marca Carl Zeiss (100 X) acoplado a una cámara digital (Moticam), y se utilizó un software (Moticam, Inc.) para determinar el diámetro de las esporas.

Identificación de los grupos de componentes activos

Se utilizó la metodología descrita por Mareggiani *et al.* (1998) y consistió en el uso de cromatoplaques de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Camag de 20 x 20 cm. Alícuotas de 5µL del extracto metanólico se vertieron con un capilar de vidrio a tres cm del borde inferior de la cromatoplaque; así mismo, se dejaron tres cm de separación entre cada muestra. Las muestras se eluyeron con cloroformo:acetato de etilo (95:5), cloroformo:metanol (90:10), cloroformo:metanol (80:20). La movilidad de los componentes se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta (Camag) a longitudes de onda de 254 y 366 nm respectivamente.

Se utilizó el método de Liebermann-Burchard (reactivo aplicado por aspersion) para la detección de estructuras esteroidales y de glicósidos esteroidales y triterpénicos, así como el de Mayer y Dragendorff para la detección de alcaloides. Se utilizó el reactivo citrobórico para determinar la presencia de flavonoides.

Diseño Estadístico

El estudio de la inhibición del crecimiento micelial se analizó mediante un diseño de tres factores, donde extracto y concentración son factores cruzados, y el tiempo es de medidas repetidas. El factor extracto tuvo tres niveles, diclorometano, metanol y etanol; la concentración, a su vez, contó con cuatro niveles, 1, 2.5, 5 y 7.5%, y el tiempo tuvo

ocho niveles, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 hrs. El estudio de la inhibición en la germinación y esporulación se analizó mediante un diseño de dos factores que fueron extracto y concentración respectivamente, y sus niveles fueron los mismos que en el caso anterior.

Para determinar el efecto de la aplicación de los extractos en el diámetro de esporas de *Rhizopus*, se utilizó un diseño de un factor completamente al azar (Gutiérrez y De la Vara, 2004). Los datos se analizaron con el paquete estadístico Minitab 14.0, y se sometieron a análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey para determinar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición del Crecimiento Micelial

El análisis de varianza de los resultados de la prueba de inhibición del crecimiento micelial indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre extractos, concentraciones, interacción doble y triple, tal como se aprecia en el Cuadro 4. Así mismo, en la gráfica de efectos principales (Figura 6), se observa que la mayor reducción del crecimiento micelial (42.2 %) se observó en cultivos de *Rhizopus stolonifer* expuestos a las distintas concentraciones del extracto metanólico del germen de semilla de *Moringa oleifera*. En el tratamiento del hongo con extracto diclorometánico se obtuvo una inhibición promedio de 24.3 %, y 8.3 % para la exposición con distintas concentraciones de extracto hidroalcohólico.

Cuadro 4. Análisis de varianza para % inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente	Grados de Libertad	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Extracto	2	91801.7	91801.7	45900.9	380.68	0.000
Concentración	3	153594.1	153594.1	51198.0	424.61	0.000
Tiempo	7	97474.0	97474.0	13924.9	115.49	0.000
Extracto*Concentración	6	73251.9	73251.9	12208.6	101.25	0.000
Extracto*Tiempo	14	26583.8	26583.8	1898.8	15.75	0.000
Concentración*Tiempo	21	43855.2	43855.2	2088.3	17.32	0.000
Extracto*Concentración*Tiempo	42	37576.3	37576.3	894.7	7.42	0.000
Error	384	46301.3	46301.3	120.6		
Total	479	570438.3				

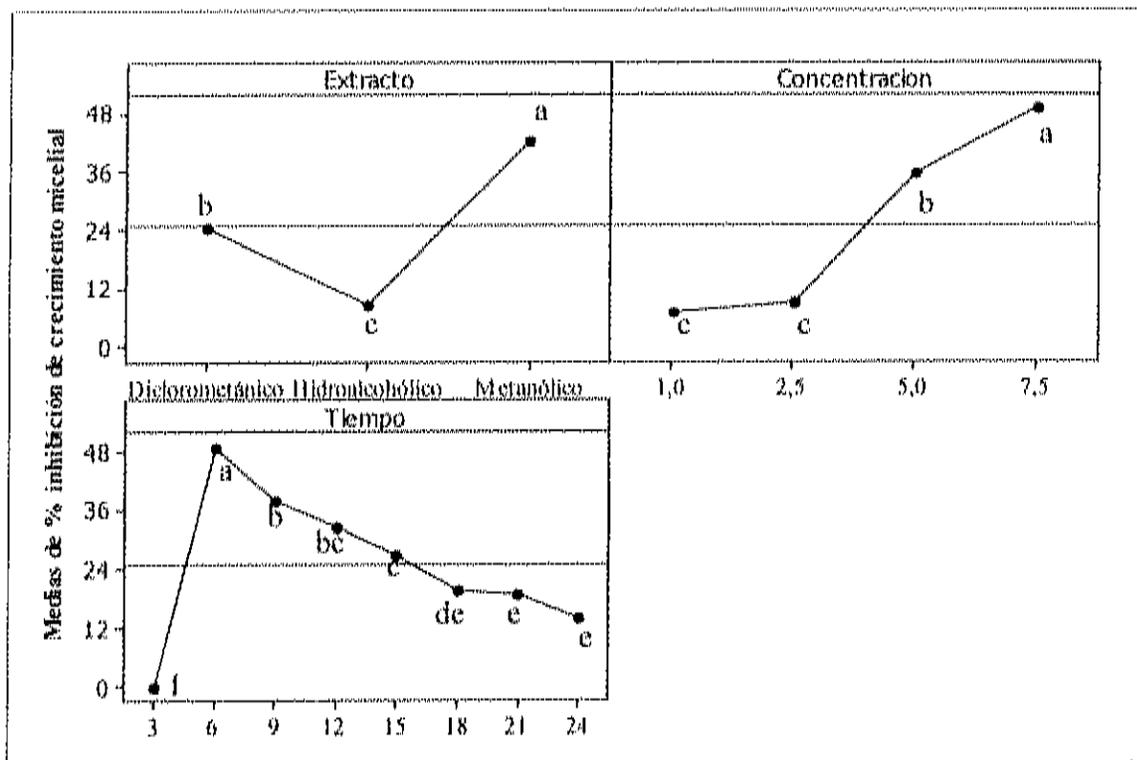


Figura 6. Efectos principales para la variable % inhibición del crecimiento micelial. Los puntos marcados con distintas letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

El extracto metanólico aplicado a una concentración del 7.5% inhibió en un 100% el crecimiento micelial a las 24 h de exposición (Figura 7). Además se observó que la inhibición del crecimiento micelial es proporcional a la concentración de extracto metanólico utilizado (Figura 6). Los resultados obtenidos con el extracto metanólico a la concentración de 7.5%, superan el 70% de inhibición del crecimiento micelial que Dooley (1978) reporta como aceptable para cualquier fungicida.

Con los resultados obtenidos se confirma el efecto antifúngico de las semillas de moringa, reportado previamente por Donli y Dauda (2003), quienes realizaron estudios

relacionados con la actividad antifúngica de extractos acuosos del germen de semilla y encontraron que la inhibición se incrementó de manera proporcional al incremento en las dosis, obteniendo porcentajes de reducción de incidencia entre 8 y 92% con dosis de 1 g semilla/L a 20 g semilla/L, respectivamente.

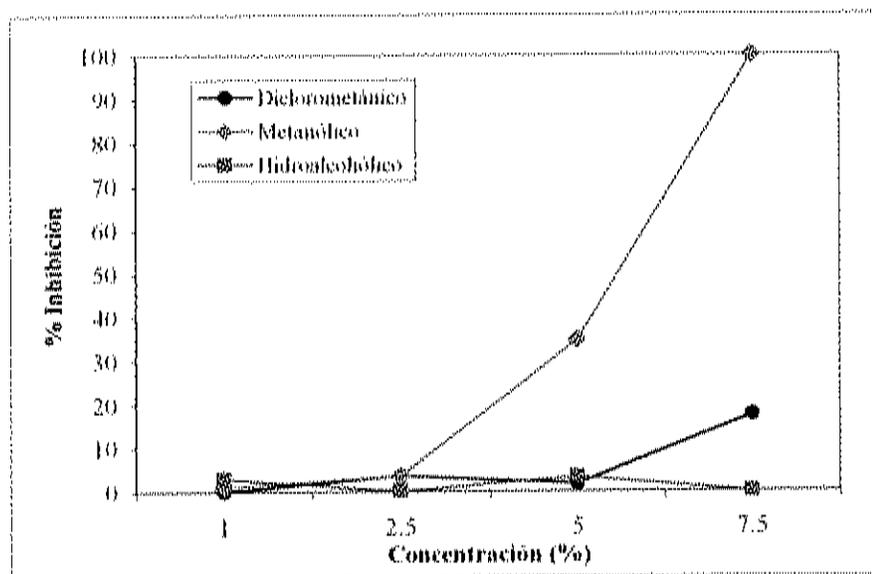


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Rhizopus stolonifer* a las 24 h de incubación con los diferentes extractos crudos.

Con respecto a la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus*, Reddy *et al.* (1998), al evaluar la actividad antifúngica de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, reportaron una inhibición máxima de 50.5 y 65.8% con dosis de 200 ppm de los aceites esenciales Laval-1 y Laval-2. Xuan *et al.* (2003), reportaron un 100% de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* con el extracto metanólico crudo de la raíz de la planta *Piper methysticum* a concentraciones de 100 y 200 g/L, mientras que en esta investigación, a la concentración de 7.5% de extracto metanólico crudo de la semilla de

Moringa oleifera (equivalente a 75 g/L), se obtuvieron resultados similares. Del mismo modo, en dicho estudio se reportó que el efecto de inhibición se incrementó de manera proporcional a la concentración, lo que concuerda con lo observado en este trabajo de investigación.

El efecto de inhibición observado en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* como resultado de la aplicación del extracto metanólico del germen de semilla de *Moringa oleifera*, es superior al reportado por Abdelgaleil *et al.* (2005), quienes aplicaron dos distintos limonoides de la planta *Khaya ivorensis* (Fam. Meliaceae) a este hongo fitopatógeno y reportaron una inhibición de 9,7% con metil 6-hidroxi-angolensato, y 47,2% con 3,7-dideacetyl-khyvorin. En la presente investigación con las concentraciones de 5 y 7,5% de extracto metanólico crudo, se logró la inhibición de 100% del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Inhibición de la esporulación

De acuerdo con el análisis de varianza para la inhibición de la esporulación del hongo *Rhizopus stolonifer* por efecto de la aplicación de los extractos del germen de semilla de *Moringa oleifera*, se apreciaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los factores extracto y concentración, no así en el efecto de interacción que no mostró significancia estadística ($p > 0.05$; Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable % inhibición de la esporulación del hongo *R. stolonifer*.

Fuente	Grados de Libertad	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Extracto	2	18471.0	18471.0	9235.5	129.90	0.000
Concentración	3	2380.1	2380.1	793.4	11.16	0.000
Extracto*Concentración	6	747.0	747.0	124.5	1.75	0.152
Error	24	1706.4	1706.4	71.1		
Total	35	23304.5				

El extracto metanólico, con las diferentes dosis probadas, mostró el mejor efecto en la inhibición de esporulación de *R. stolonifer* a las 48 h (90-100%) (Figura 8). El extracto hidroalcohólico solo logró una inhibición promedio de la esporulación del 45.1%. En el caso de los extractos metanólico y diclorometánico, el efecto de inhibición no se vio afectado por el incremento de dosis, ya que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de 5 y 7.5% (Figuras 8 y 9).

Esto indica, desde el punto de vista estadístico, que para obtener buenos resultados de inhibición de esporulación, las dosis mínimas requeridas son: 2.5% de extracto diclorometánico y 1% de extracto metanólico. Las dosis máximas serían 2.5% de extracto metanólico y 5% de extracto diclorometánico.

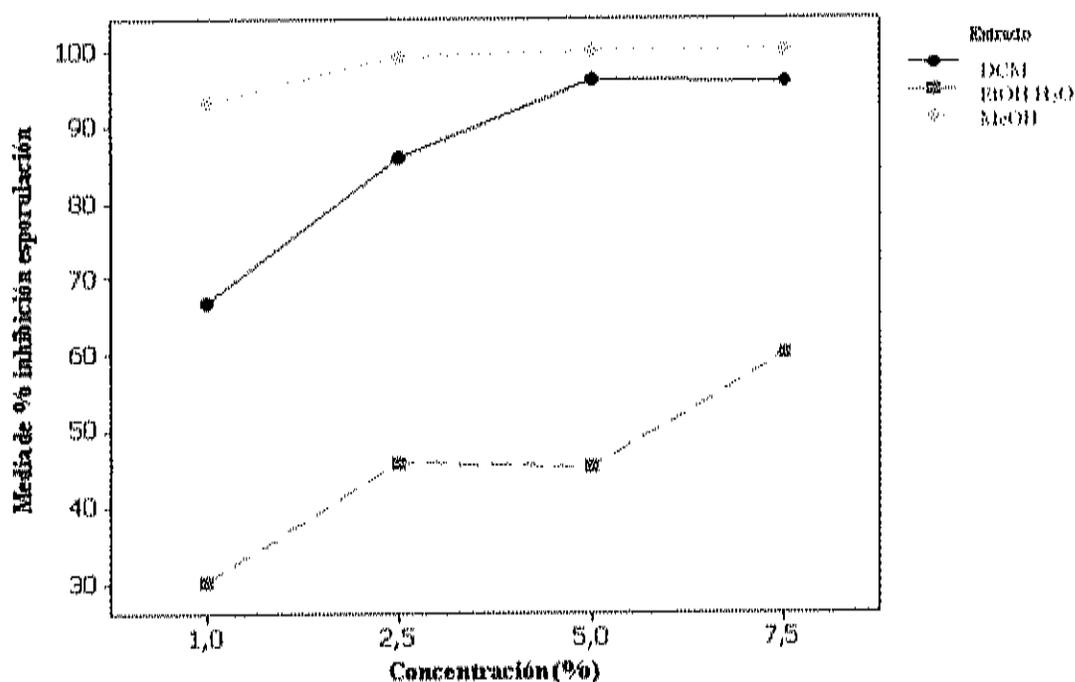


Figura 8. Porcentaje de inhibición de la esporulación del hongo *Rhizopus stolonifer* a las 48 h de incubación con los diferentes extractos crudos.

Aunque la inhibición del crecimiento micelial no se observó a las 48 h de incubación del hongo expuesto al extracto metanólico, si se observó que los tratamientos al 5 y 7.5%, a pesar de presentar micelio, no presentaron formación de esporas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Bautista *et al.* (2000), quienes estudiaron las propiedades

fungicidas de extractos de diversas plantas contra *R. stolonifer* y reportan haber obtenido en condiciones *in vitro* mejor inhibición en esporulación y germinación de esporas que en el crecimiento micelial.

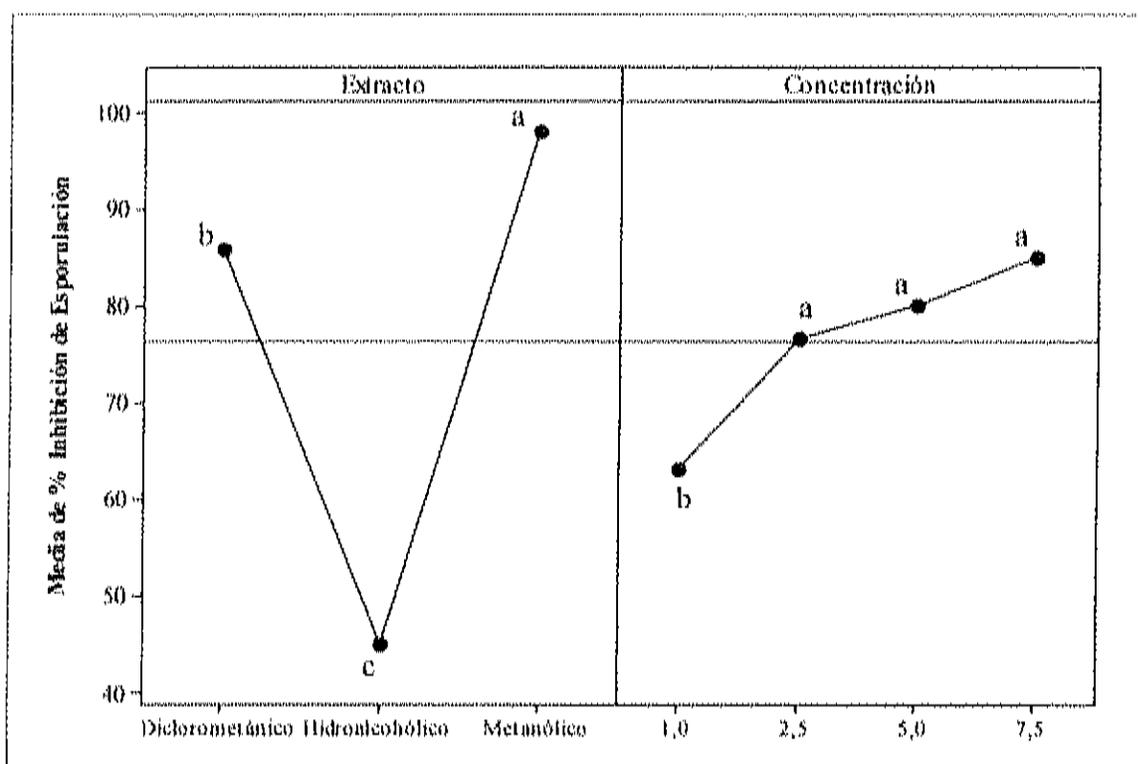


Figura 9. Efectos principales para la variable % inhibición de esporulación. Los puntos marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Los resultados indicaron que el extracto metanólico del germen de *Moringa oleifera*, no logra inhibir el crecimiento micelial transcurridas 48 h de incubación, pero sí bloquea totalmente el proceso de esporulación del hongo a las concentraciones de 5 y 7.5%. Este hecho podría estar relacionado con el modo de acción del fungicida sintético triciclazol, que a concentraciones que no inhiben el crecimiento micelial bloquea ciertas reductasas

que operan en la ruta de policétidos-melanina e interfiere en la función del apresorio (Ragsdale *et al.*, 1993). Estos autores mencionan que la melanización de la pared del apresorio es necesaria para mantener las fuerzas osmóticas así como la arquitectura y rigidez requerida por el patógeno para penetrar en su huésped.

Respecto a este último aspecto, se realizaron observaciones al microscopio de muestras de micelio tratado a diferentes concentraciones de extracto metanólico, y se encontró que las estructuras del hongo (hifas y esporangios), presentaron daños en su estructura y morfología. En la figura 10 se observan los efectos de la aplicación del extracto metanólico al 5 y 7.5% en la estructura del esporangióforo. Cuando se aplicaron dichas concentraciones (fotografías b y c) no se observó formación de esporas y se apreció la deformación de los esporangióforos, rompimiento de pared celular, disminución de tamaño y despigmentación.

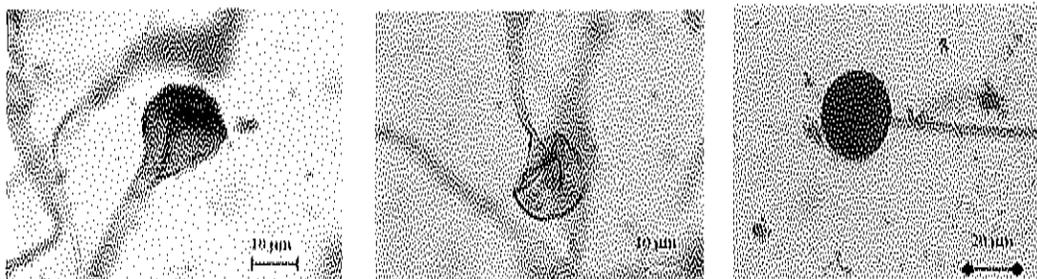


Figura 10. Fotografías al microscopio del esporangio de *Rhizopus stolonifer* en diferentes tratamientos visto con el objetivo de 40 x en el caso de a y b, y con el objetivo de 10 x en c. a) Tratamiento con extracto metanólico al 5%; b) Tratamiento con extracto metanólico al 7.5%; c) Testigo (sin extracto).

En este sentido, Fogarty y Tobin, (1996) y Henson *et al.* (1999), mencionan que si bien la melanina no está directamente relacionada con la patogenicidad de algunos hongos, es un factor importante para que se de este proceso, además de requerirse para la sobrevivencia ante ciertos factores ambientales adversos.

Por otra parte, los estudios relacionados con el efecto de extractos de plantas sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer* son escasos, lo que puede deberse a que la mayoría de los investigadores sólo toman en cuenta el efecto en el desarrollo micelial, debido a que se considera uno de los mejores indicadores de la actividad antifúngica (Hadacek y Greger, 2000). Sin embargo, de acuerdo a los resultados de esta investigación, algunos ensayos con respecto a aspectos morfológicos (estructura) y fisiológicos (esporulación o germinación de esporas) del hongo, podrían ayudar a interpretar el efecto antifúngico de los extractos.

Germinación de Esporas

En esta prueba, no se observó inhibición de la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer* al ser expuesto al extracto metanólico, ya que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo. Los extractos hidroalcohólico y diclorometánico, al parecer favorecieron este proceso (Cuadro 6, Figura 11).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Montes y García (1997), quienes evaluaron el efecto de extractos vegetales en la germinación de esporas de *Alternaria solani*. Estos investigadores señalaron tres tipos de respuesta: una inhibitoria, otras con efecto estimulante, y una tercera con escasa o nula influencia. Así mismo, mencionan que el efecto estimulante de la germinación se puede deber a la presencia de compuestos aleloquímicos.

Respecto a germinación de esporas, no se dispone de información relacionada con el efecto de extractos vegetales en el proceso de germinación de esporas del hongo *Rhizopus stolonifer*. Sin embargo, Tian *et al.* (2002), al evaluar el efecto del calcio en la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*, reportan que la concentración de 2 % redujo significativamente (9 log UFC) la germinación de esporas y el diámetro del tubo germinativo después de 13 h de incubación a 25°C. Estos investigadores, no mencionan el posible mecanismo de acción por el que el calcio inhibe la germinación de esporas.

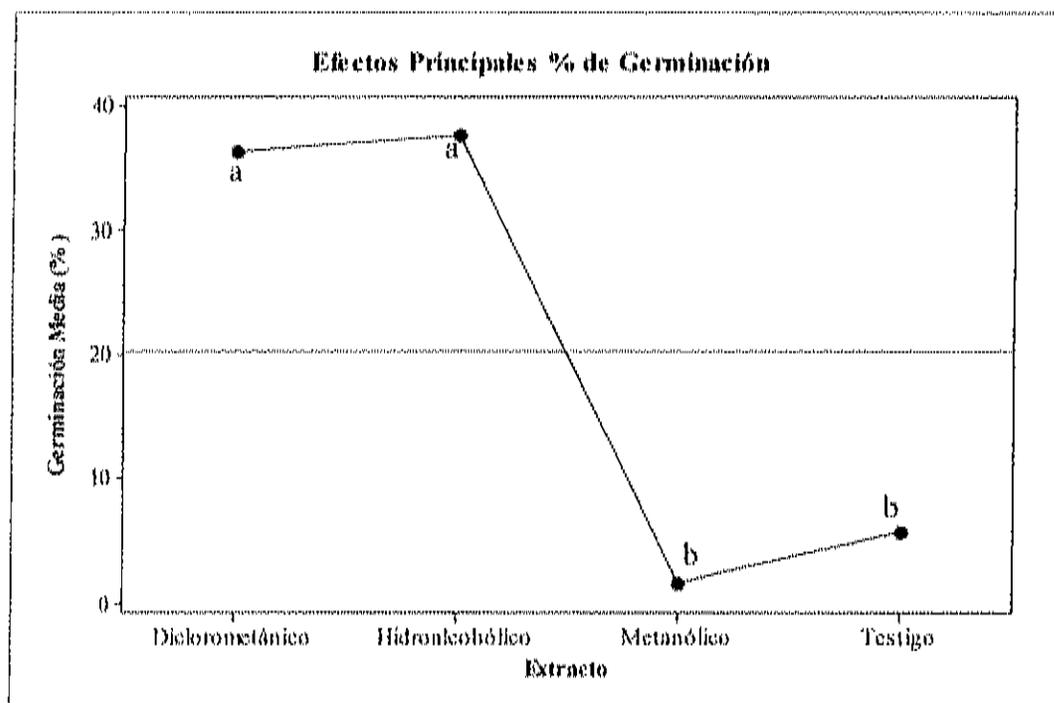


Figura 11. Efectos principales para la germinación de esporas (%). Los puntos marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Cuadro 6. Medias estadísticas para las variables evaluadas. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Extracto	Crecimiento Micelial (% Inhibición)	Esporulación (% Inhibición)	Germinación (%)	Diámetro Espora (μm)
Diclorometánico	24.3 ^b	86 ^b	36.3 ^a	6.1 ^b
Metanólico	42.2 ^a	98.1 ^a	1.6 ^b	3.3 ^a
Hidroalcohólico	8.3 ^c	45.1 ^c	37.6 ^a	6.7 ^c

Diámetro de Esporas

Este ensayo se llevó a cabo con la finalidad de detectar diferencias en el tamaño de esporas de *Rhizopus stolonifer* por efecto de la aplicación de extractos de semilla de *Moringa oleifera*. De acuerdo al análisis de varianza, existen diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los factores extracto y concentración, y en los efectos de interacción (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza para diámetro de esporas.

Fuente	Grados de Libertad	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Extracto	2	260.6	260.6	130.300	193.30	0.000
Concentración	3	156.8	156.8	52.267	77.54	0.000
Extracto*Concentración	6	298.6	298.6	49.797	73.83	0.000
Error	108	72.8	72.8	0.674		
Total	119	788.8				

Así mismo, de acuerdo a la gráfica de efectos principales (Figura 12) y al Cuadro 6, se observó que las esporas tratadas con las diferentes concentraciones de extracto metanólico tuvieron un tamaño mucho menor que las esporas tratadas con los extractos diclorometánico e hidroalcohólico. En este sentido, también se encontró que conforme se incrementó la concentración de los diversos extractos, el tamaño de las esporas disminuyó, pero no en el caso del extracto hidroalcohólico que no manifestó tener efecto en este parámetro.

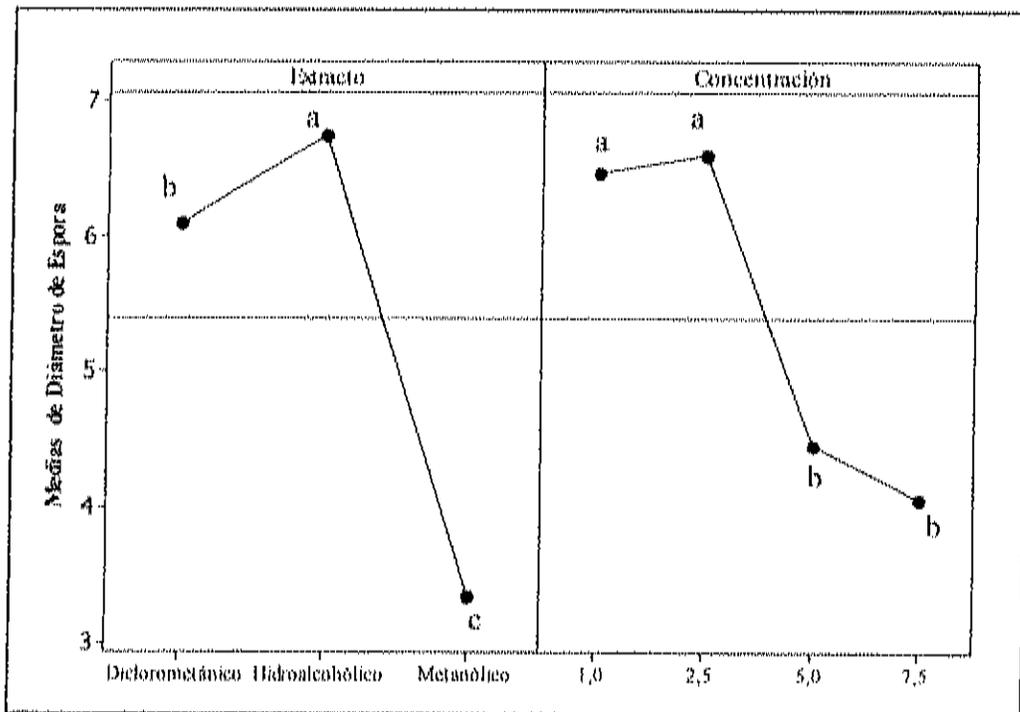


Figura 12. Efectos principales para la variable diámetro de espora (μm). Los puntos marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Aunado a la disminución de tamaño de esporas, también se observó una notable disminución de la pigmentación en relación a las esporas del tratamiento del testigo y tratamiento con el extracto hidroalcohólico, mientras que en los tratamientos con diclorometano y particularmente con metanol a las concentraciones de 5 y 7.5 %, las esporas no mostraron pigmento oscuro (Figura 13). Este aspecto es importante si se toma en cuenta que la pigmentación de algunos fitopatógenos como el caso de *Rhizopus*, se relaciona con la virulencia, además de conferir resistencia a factores ambientales adversos, como se mencionó anteriormente. En este sentido, una espora despigmentada

es menos virulenta o patógena que otra con su pigmentación natural, así como más susceptible a daños por factores externos (Nosanchuck y Casadevall, 2003).

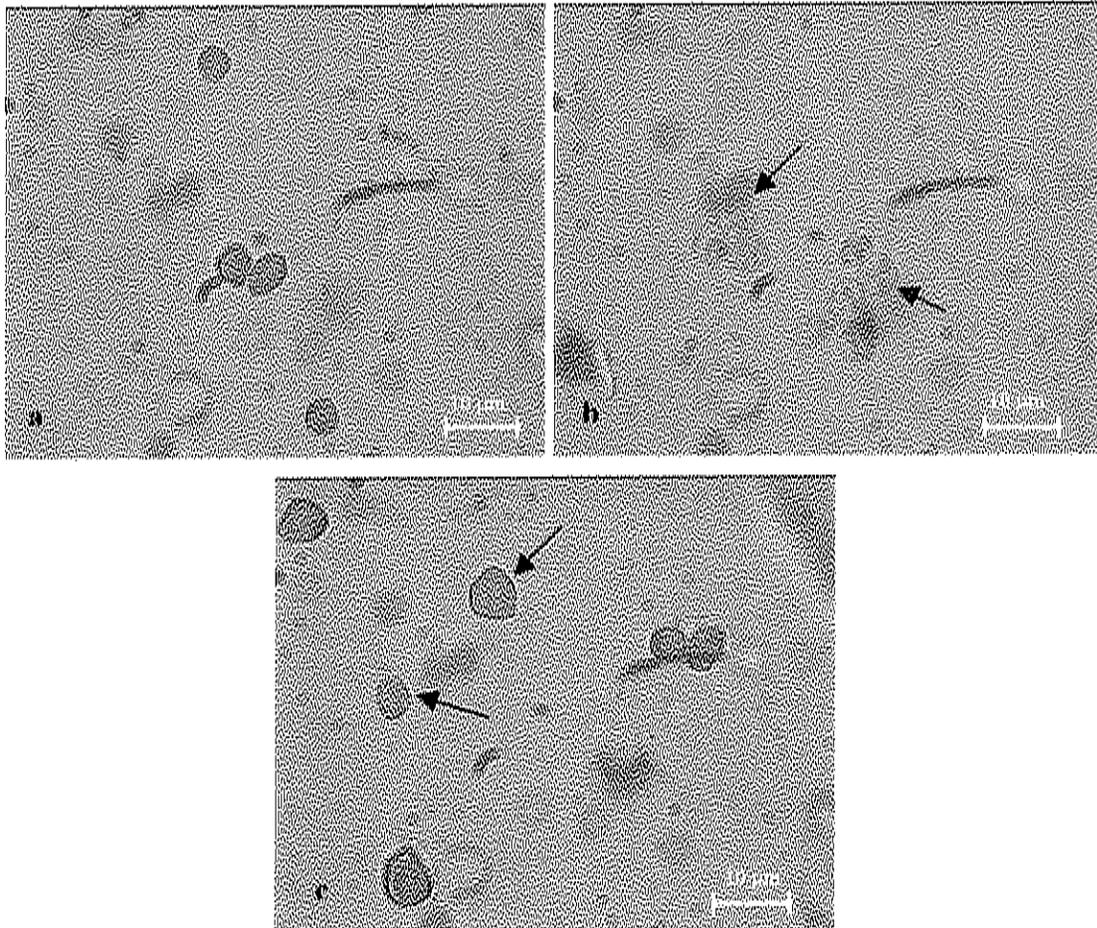


Figura 13. Efecto de los extractos metanólico y diclorometánico en la estructura y tamaño de las esporas de *Rhizopus stolonifer*. a) Esporas del testigo; b) Esporas tratadas con extracto diclorometánico al 5%; c) Esporas tratadas con extracto metanólico al 2.5 %, las flechas indican la anomalía de tamaño (4-5 μm), y la deformación.

Respecto al diámetro de las esporas de *Rhizopus stolonifer*, Van Etten *et al.* (1974), reportaron que de manera natural el tamaño de una spora oscila entre 8-8.8 μm , medida que se incrementa hasta en un 70% en el proceso de germinación. Por otra parte, una spora de menor tamaño, tiene menos reservas y por lo tanto, menos probabilidades de resistir factores adversos. En este sentido, se cuenta con poca información acerca del efecto que pudieran tener los tratamientos químicos o los extractos naturales en el tamaño de las esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Identificación de Grupos de Componentes Activos

De acuerdo a las reacciones de caracterización del extracto metanólico, el efecto antifúngico observado en este estudio puede atribuirse a grupos de componentes activos relacionados con alcaloides y/o triterpenos. Esto se confirmó con la técnica de cromatografía en capa fina donde se detectó la presencia de un grupo de alcaloides con un R_f de 0.423, y 3 grupos de triterpenos con R_f de 0.188, 0.617 y 0.882, en el extracto metanólico (Figura 14). Posteriores estudios permitirán precisar el metabolito secundario responsable de la actividad antifúngica.

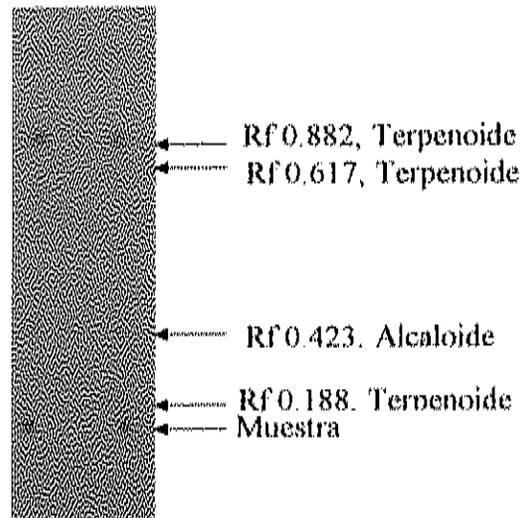


Figura 14. Grupos de componentes químicos en cromatograma de capa fina del extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* bajo $UV_{254\text{ nm}}$ (5 μL).

Estos resultados difieren de lo reportado por Suarez *et al.* (2003), quienes reportaron que la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del germen de semilla de *Moringa oleifera*, se debe a un polipéptido derivado de bencil isotiocianatos, mismos que son sintetizados por las plantas y se reconocen como compuestos antibacteriales. Sin embargo, cabe mencionar, que los métodos de extracción son distintos, así como la polaridad del solvente utilizado, factores que desde luego influyen en los resultados obtenidos.

Por su parte, Misra y Sahu (1977), al evaluar el efecto antifúngico del extracto clorofórmico de las hojas de *Moringa pterygosperma* (Syn. *Moringa oleifera*), reportaron que éste se debió a la actividad de dos alcaloides previamente identificados: Moringina y Moringinina. En este caso, la parte vegetal de la que se hizo la extracción es totalmente diferente a la usada en la presente investigación, sin embargo, también se ha reportado la presencia de alcaloides en las semillas de Moringa.

Makkar y Becker (1997), estudiaron los factores nutrimentales y antinutrimentales de diferentes partes de *Moringa oleifera* y encontraron en el germen de semilla desengrasada, tres alcaloides con valores Rf de 0.227 ± 0.011 , 0.69 ± 0.008 y 0.798 ± 0.021 , sin embargo, no se realizó la caracterización de ellos. Por otra parte, no se ha reportado la presencia de terpenoides con actividad biológica en extractos del germen de semilla de Moringa.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* presentó el mejor efecto en el % de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.
- Los extractos metanólico y diclorometánico de semilla de *Moringa oleifera* presentaron el mejor efecto en el % de inhibición de la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.
- El extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* no afectó la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- Los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de semilla de *Moringa oleifera* favorecieron la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- La aplicación del extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* disminuyó en un 50 % el diámetro de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- Los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica presentes en el extracto metanólico de la semilla de moringa se relacionan con alcaloides y/o terpenoides.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* presentó el mejor efecto en el % de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.
- Los extractos metanólico y diclorometánico de semilla de *Moringa oleifera* presentaron el mejor efecto en el % de inhibición de la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.
- El extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* no afectó la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- Los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de semilla de *Moringa oleifera* favorecieron la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- La aplicación del extracto metanólico de semilla de *Moringa oleifera* disminuyó en un 50 % el diámetro de esporas de *Rhizopus stolonifer*.
- Los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica presentes en el extracto metanólico de la semilla de moringa se relacionan con alcaloides y/o terpenoides.

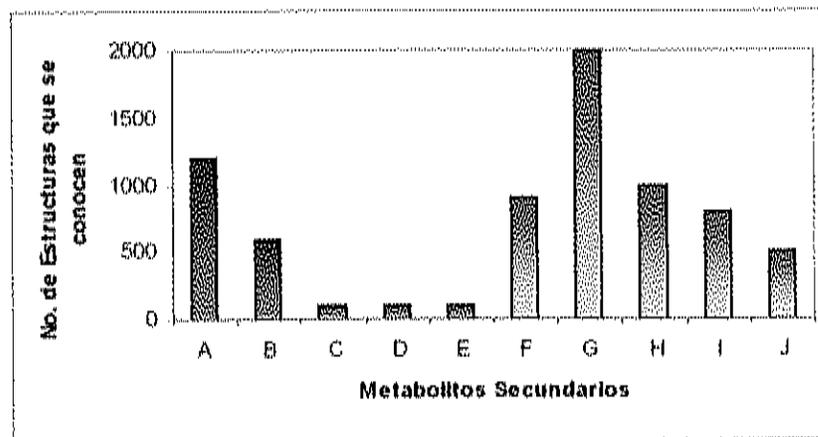


Figura 4. Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas (Sepúlveda *et al.*, 2003). Compuestos nitrogenados (color verde): A, Alcaloides; B, Aminoácidos no protéicos; C, Aminas; D, Glucósidos cianogénicos; E, Glucosinolatos. Compuestos no nitrogenados (barras de color gris): G, Terpenos; H, Flavonoides; I, Poliacetilenos; J, Policétidos; K, Fenilpropanoides.

En algunos casos, los principios activos participan directamente en los mecanismos de defensa de las plantas en contra de microorganismos predadores, insectos o herbívoros, en tanto que otros, tienen la función de dar el color a las plantas, son responsables de los pigmentos (quinonas y taninos), o bien, dan sabor a la planta (terpenoides como la capsaicina (Cowan, 1999).

La mayoría de los compuestos sintetizados por las plantas se relacionan en general con el fenol y sus derivados. Según Domingo y López (2003), entre los principales grupos de compuestos generados por plantas se encuentran los fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (Cuadro 1).

Cuadro 1 Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas (Domingo y López, 2003).

Grupo Químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (Tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. Thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (Hipérico)	VII
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (Roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (Eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (Melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavones	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Milletia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

Fenoles Simples

Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido (Figura 5). Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo, al parecer, están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos. El mecanismo de acción, se ha relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo y López, 2003).

Quinonas

Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto (Figura 5). Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Cowan, 1999; Domingo y López, 2003).

Taninos

Sustancias fenólicas poliméricas, capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Se pueden dividir en hidrolizables o condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias (Cowan, 1999; Domingo y López, 2003) (Figura 5).

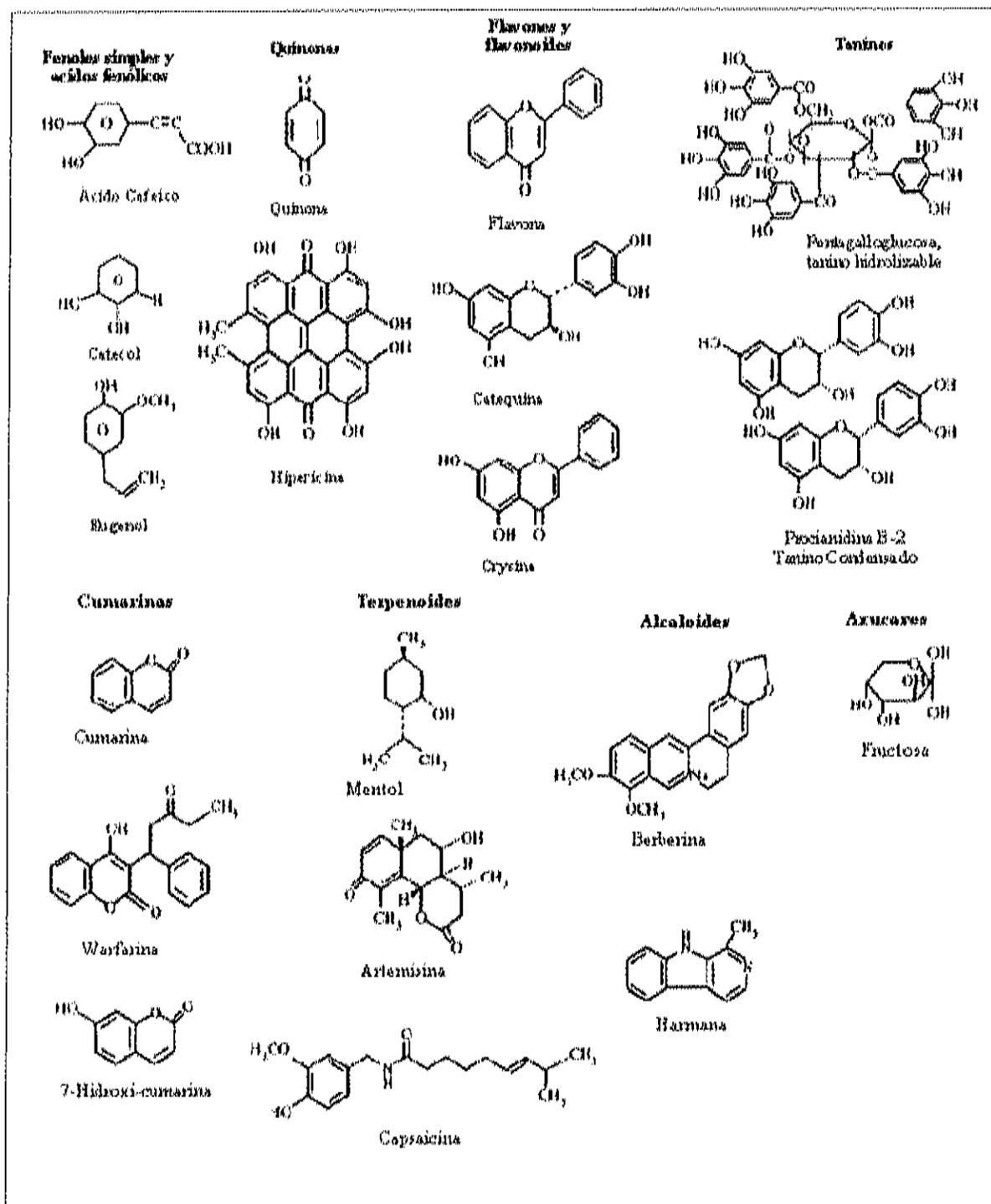


Figura 5. Estructuras químicas de los principales compuestos antimicrobianos aislados de plantas (Cowan, 1999).

Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculentina, la umbeliferona y la escopoletina (Figura 5). Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Cowan, 1999; Domingo y López, 2003).

Flavonoides

Químicamente derivan de la benzo- α -pirona, en ocasiones pueden llevar unido un furano o un pirano (Figura 5). Presentan fluorescencia azul-verde a la luz U.V. (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999). Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales, su actividad antimicrobiana probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (Domingo y López, 2003).

Alcaloides

Se denomina alcaloides a los compuestos nitrogenados heterocíclicos, habitualmente de carácter básico débil (Figura 5). En forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos apolares; en forma de sales ocurre lo contrario y ambas formas son solubles en alcohol. Su diversidad estructural química es muy grande y su actividad farmacológica, por tanto, es también muy diferente. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999; Cowan, 1999; Domingo y López, 2003).

Según la Fundación Alfonso Martín Escudero (1999), entre los diversos grupos de alcaloides destacan: alcaloides isoquinoleínicos, alcaloides indólicos, tropánicos, bases xánticas y alcaloides diterpénicos. La mayoría de estos compuestos proceden de aminoácidos y tienen actividad farmacológica muy marcada, siendo muchos de ellos tóxicos.

Métodos de Extracción

El aislamiento y purificación de los componentes activos de las plantas puede considerarse como un proceso largo y tedioso (Hostettmann, 1999). Sin embargo, el análisis científico de dichos componentes debe llevar una secuencia lógica (Cowan, 1999).

Según Cowan (1999), para iniciar los procesos de extracción, es necesario primeramente, probar los extractos acuosos o alcohólicos crudos y posteriormente llevar a cabo diferentes tipos de extracciones con la finalidad de purificar los componentes activos. Esto se hace tomando en cuenta que a la fecha los compuestos extraídos de plantas con actividad antimicrobiana son principalmente aromáticos o compuestos orgánicos saturados, y que por lo tanto pueden obtenerse en una extracción inicial con etanol o metanol (Cuadro 2).

Cuadro 2. Solventes usados para la extracción de componentes activos (Cowan, 1999).

Agua	Etanol	Metanol	Diclorometano	Eter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Almidones	Polfenoles	Terpenoides		Terpenoides	
Taninos	Poliacetilenos	Saponinas		Cumarinas	
Saponinas	Flavonol	Tannos		Acidos grasos	
Terpenoides	Terpenoides	Xantoxilinas			
Polipéptidos	Esteroles	Totarol			
Lectinas	Alcaloides	Cuasinoïdes			
	Propoleo	Lactosas			
		Flaonas			
		Felonas			
		Polfenoles			

De acuerdo a Nyiredy (2004), la separación de los componentes activos de las plantas se puede clasificar en tres categorías principales: extracción, purificación y cromatografía. En general, las dos primeras fases implican la preparación de la muestra, mientras que los diferentes métodos cromatográficos, aseguran el análisis cualitativo y cuantitativo, así como el aislamiento. Por otra parte, Hostettmann (1999), menciona que la detección de los componentes activos en la complejidad del extracto crudo depende de la confiabilidad y sensibilidad de los métodos usados.

Los métodos de extracción son tan diversos (Cuadro 3), cómo diversa es la gama de componentes activos en una planta. Sin embargo, la elección del método de extracción es una de las etapas más importantes en el proceso de identificación de componentes activos (Nyiredy, 2004). Por otro lado, es importante tomar en cuenta la parte de la planta de la que se va a realizar la extracción y considerar que cualquier parte de ésta puede contener componentes activos (Cowan, 1999).

Cuadro 3. Comparación de diferentes métodos analíticos de extracción sólido-líquido para componentes activos de plantas.

Factor	Soxhlet	Extracción Ultrasonica	Extracción acelerada	Extracción con microondas	Extracción supercrítica de fluidos
Tipo de Extracción	Exhaustivo	No exhaustivo	No exhaustivo	No exhaustivo	Exhaustivo
Inversión	Pequeña	Pequeña	Grande	Mediana	Grande
Tiempo de Extracción	6-48 hrs	< 30 min	< 30 min	< 30 min	< 60 min
Consumo de solvente (mL)	200-600	< 50	< 100	< 40	< 10
Desarrollo del Método	Simple	Simple	Simple	Simple	Difícil
Tratamiento de la muestra	Requerida	Requerida	Requerida	Requerida	No requerida

La efectividad de la actividad biológica de un extracto crudo está íntimamente relacionada con el método de extracción y la parte de la planta de la que se hizo el extracto. Este supuesto está claramente ejemplificado en el caso de los extractos de Moringa que se han reportado con actividad antimicrobiana. De las hojas, se han evaluado extractos clorofórmicos con actividad antifúngica y extractos acuosos esterilizados (autoclave) a los que no se les encontró actividad antimicrobiana (Misra y Sahu, 1977; Satish *et al.*, 1999). De la corteza del tallo Cáceres *et al.* (1991), reportaron que el extracto acuoso no presentaba actividad antimicrobiana, mientras que Valsaraj *et al.* (1997), probaron un extracto etanólico de la misma parte, reportaron una marcada actividad antimicrobiana.

Un estudio acerca de la actividad biológica de diferentes partes de *Moringa oleifera*, indicó que sólo los extractos de hojas frescas y semillas tuvieron efecto inhibitorio contra bacterias, en tanto que raíces y corteza, no manifestaron actividad ante diferentes organismos (Cáceres *et al.*, 1991). Así mismo, al probar diferentes temperaturas de extracción, concluyeron que a temperaturas mayores de 56°C se inhibió la actividad biológica de los diferentes extractos.

Estas investigaciones demuestran que los resultados en actividad biológica, como se mencionó anteriormente dependen en gran medida de los solventes seleccionados para la extracción, los métodos de extracción y la parte de la planta que ha sido seleccionada. Respecto a las estrategias para el aislamiento de los componentes activos de las plantas, se reportan diversas en la literatura (Mareggiani *et al.*, 1998; Nikkon *et al.*, 2003), donde, dependiendo de los compuestos aislados, se usan diferentes métodos de separación. No está de más decir que no existe una estrategia universal para el aislamiento de diferentes metabolitos secundarios con estructuras totalmente diferentes y que los laboratorios e investigadores tienen diversas estrategias basadas en su propia experiencia (Nyiredy, 2004).

PROBLEMA

Se desconoce la naturaleza química y el efecto de la aplicación de diversos extractos crudos del germen de semilla de *Moringa oleifera* en el desarrollo del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

JUSTIFICACIÓN

Se requiere de estudios científicos que sustenten el desarrollo de tecnologías alternativas para el control de hongos fitopatógenos, que tengan las características de ser menos dañinas al ser humano, eficientes y económicas. Por otro lado, se cuenta con antecedentes de que *Moringa oleifera* tiene efecto fungicida (Donli y Dauda, 2003), sin embargo, se desconoce la naturaleza química de los componentes activos y el tipo de efecto que tiene en el desarrollo del hongo *Rhizopus stolonifer*.

PROPÓSITO

Generar información científica acerca de la naturaleza química y el efecto de la aplicación de diversos extractos crudos del germen de semilla de *Moringa oleifera* Lam. en el desarrollo del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica de los extractos del germen de semilla de *Moringa oleifera* en el ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer* e identificar los grupos químicos activos.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los extractos diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico del germen de semilla de *Moringa oleifera* en el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*
- Evaluar el efecto de los extractos diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico del germen de semilla de *Moringa oleifera* en la esporulación del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*
- Evaluar el efecto de los extractos diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico del germen de semilla de *Moringa oleifera* en la germinación de esporas del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*
- Evaluar el efecto de los extractos diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico del germen de semilla de *Moringa oleifera* en el tamaño de esporas del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.
- Identificar por cromatografía en capa fina los grupos de componentes químicos presentes en los extractos con actividad biológica.

HIPÓTESIS

- Al menos uno de los extractos del germen de semilla de *M. oleifera* afecta significativamente los parámetros evaluados: inhibición del crecimiento micelial, esporulación, germinación y tamaño de esporas del hongo *Rhizopus stolonifer*.
- Los componentes químicos aislados del extracto activo contra *Rhizopus stolonifer* se relacionan estructuralmente con alcaloides y terpenoides.

HIPÓTESIS

- Al menos uno de los extractos del germen de semilla de *M. oleifera* afecta significativamente los parámetros evaluados: inhibición del crecimiento micelial, esporulación, germinación y tamaño de esporas del hongo *Rhizopus stolonifer*.
- Los componentes químicos aislados del extracto activo contra *Rhizopus stolonifer* se relacionan estructuralmente con alcaloides y terpenoides.

BIBLIOGRAFÍA

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

Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, S. K. S. and Ghazali, H. M. 2005. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry* 93 (2): 253-263.

Agrios, G. N. 1997. *Plant pathology*, 4th Edition, Academia Press.

Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1997. *Introducción a la micología*, Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. Pp. 638.

Akhtar, A. H. and Ahmad, K. U. 1995. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 1-6.

Anwar, F. and Bhangar, M. I. 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6558-6563.

- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Díaz-Pérez, J. C. y Cano-Ochoa, C. F. 2000. Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of "ciruela" fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology* 20: 99-106.
- Cáceres, A., Cabrera, O., Morales, O., Mollinedo, P. and Mendía, P. 1991. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 33: 213-216.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Cuñat, P. P., Sanz, E., Garcerá, I., March, M. D., Bowers, C. G. and Martínez-Prado, R. 1990. Biocidal activity of some spanish mediterranean plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 497-500.
- Domingo, D. y López, B. M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16 (4): 385-393.

Donli, P. O. and Dauda, H. 2003. Evaluation of aqueous moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. *Pest Management Science* 59: 1060-1062.

Dooley, H. L. 1978. Greenhouse method for screening protective fungicides for apple powdery mildew. 32-33 p. In: Zeher, E. L., Bird, G. W., Fisher, K. D., Hickey, K. D., Lewis, F. H., Line, R. F. and Ritcard, S. F. (Eds.) *Methods for evaluating plant fungicides, nematocides and bactericides*. The American Psychopathological Society. St. Paul Minnesota, 140 pp.

Edris, A. E. and Farrag E. S. 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase. *Nahrung Food* 47 (2): 117-121.

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

Francis, J. A., Jayaprakasam, B., Olson, L. K. and Nair, M. G. 2004. Insulin secretagogues from *Moringa oleifera* with cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation inhibitory activities. *Helvetica Chimica Acta*, 87: 317-326.

- French, E. R. y T. T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Editorial IICA, San José Costa Rica.
- Fogarty, R. V. and Tobin, J. M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 311-317.
- Fundación Alfonso Martín Escudero. 1999. Las plantas de extractos, bases para un plan de desarrollo del sector; Editorial Melissa, S. A., España, p. 20.
- Ghasi, S., Nwobodo, E. and Ofili, J. O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 21-25.
- Goun, E., Cunningham, G., Chu, D., Nguyen, C. and Miles, D. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* 76: 592-596.
- Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tozuda, H. and Nishino, H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research* 440: 181-188.

Gutiérrez, P. H. y De la Vara, S. R. 2004. Análisis y Diseño de Experimentos. Primera Edición. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S. A. de C.V. México, D. F., México. 571 p.

Hadaceck, F. and Greger, H. 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* 11: 137-147.

Henson, J. M., Butler, M. J. and Day, A. W. 1999. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 37: 447-471.

Hostettmann, K. 1999. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. IUPAC. <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann.html>

Jasso de Rodríguez, D., Hernández, C. D., Rodríguez, G. R. and Angulo, S. J. L. 2005. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 21: 81-87.

Jianming, D., Varoujan A. Y., Raghavan V. G. S. and Jocelyn, R. P. 1999. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3738-3742.

- Kar, A., Choudhary, B. K. and Bandyopadhyay, N. G. 2003. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 105-108.
- Koul, O., Murray, B. Isman and Ketkar C.M. 1990. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botanic* 68:1-11.
- Latorre, G. B. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas. Quinta Edición, Alfaomega Ediciones. Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile, Chile.
- Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweechotipatr, P., Pramyothin, P., Hattori, M. and Shiraki, K. 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 60: 175-180.
- 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.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1997. Nutrients and antiquality factor in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 128: 311-322.
- Makonnen, E., Hunde, A. and Damecha, G. 1997. Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. *Phytotherapy Research*, 11: 147-148.

Mareggiani, G., Leicach, S. y Laner, P. 1998. Toxicidad de extractos que contienen metabolitos secundarios de distintos órganos de *Melia azedarach* L. al nematodo del nudo de la raíz. *Fitopatología* 33 (2): 122-126.

Mari, M. and Guizzardi, M. 1998. The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26 (1): 59-66.

Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México.

Martini, N. and Eloff, J. N. 1998. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 62: 255-263.

Mehta, L. K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A. and Gulati, O. D. 2003. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 86: 191-195.

Misra, S. K. and Sahu, K. C. 1977. Screening of some indigenous plants for antifungal activity against dermatophytes. *Indian Journal of Pharmacology* 9 (4): 269-272.

- Montes, B. R. y García, L. R. 1997. Efecto de extractos vegetales en la germinación de esporas y en los niveles de daño de *Alternaria solani* en tomate. *Fitopatología* 32 (1): 52-57.
- Montes, B. R., Cruz, C. V., Martínez, M. G., Sandoval, G. G., García, L. R., Zilch, D. S., Bravo, L. L., Bermúdez, T. K. y Flores, M. E. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 (2): 125-131.
- Müller, U. 2002. Chemical crop protection research. Methods and challenges. *Pure Applied Chemistry* 75 (12):2241-2246.
- Nambiar, V. S., Bhadalkar K. and Daxini, M. 2003. Drumstick leaves as source of Vitamin A in ICDS-SFP. *Indian Journal of Pediatrics* 70: 383-387.
- Nikkon, F., Saud, Z. A., Rahman, M. R. and Haque, Md. E. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of the compound isolated from chloroform extract of *Moringa oleifera* Lam.; *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(22): 1888-1890.
- Nosanchuck, J. D. and Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology* 5(4): 203-223.

- Nyiredy, S. 2004. Separation strategies of plant constituents-current status. *Journal of Chromatography B* 812: 35-51.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W. and Okada, M. 2001. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research* 35 (2): 405-410.
- Oliveira, J. T., Silveira, S. B., Vasconcelos, I. M., Cavada, B. S. and Moreira, R. A. 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lam. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 815-820.
- Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N. and Busta, F. F. 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 161-173.
- Qin, G., Tian, S. and Xu, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 31: 51-58.
- Ragsdale, N. N., Henry, M. J. and Sisler, H. D. 1993. Minimizing nontarget effects of fungicides. pp. 332-341. In: S. Duke, J. Menn, and J. Plimmer (eds.). *Pest control with enhanced environmental safety*. American Chemical Society, Washington, D. C. USA, 357 pp.

Reddy, M. V. B., Angers, P. Gosselin, A. and Arul, J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 47 (8): 1515-1520.

Rivera, C. G., Martínez, T. M. A., Vallejo, S., Alvarez, M. G., and Vargas, A. I. C. 2001. *In vitro* inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19 (2): 214-217.

Satish, S., Raveesha, K. A. and Janardhana, G. R. 1999. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. *Letters in Applied Microbiology* 28: 145-147.

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21 (3): 355-363.

Siddhuraju, P. and Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2144-2155.

Spadaro, D. and Gullino, M. L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185-194.

Stange Jr., R. R., Midland, S. L., Holmes, G. J., Sims, J. J. and Mayer, R. T. 2001. Constituents from the periderm and outer cortex of *Ipomoea batatas* with antifungal activity against *Rhizopus stolonifer*. *Postharvest Biology and Technology* 23: 85-92.

Suarez, M., Entenza, J. M., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marisol, J., Moreillon, P. and Mermoud, N. 2003. Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (1): 13-20.

Subadra, S, Monica J. and Dhabhai, D. 1997 Retention and storage stability of beta-carotene in dehydrated drumstick leaves (*Moringa oleifera*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 48: 373-379.

Tahiliani P. and Kar, A. 1999. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. *Pharmacological Research* 41 (3): 319-323.

- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y. and Jiang, A. L. 2002. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathology* 51: 352-358.
- Trapero, A. 2000. Los hongos fitopatógenos. *Patología Vegetal*. Tomo II, Capítulo 20. MV. Phytoma-España, S. L., Coedición.
- Tripathi, P. and Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32: 235-245.
- Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Dourtoglou, V. and Spiliotis, V. 1999. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbolo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4495-4499.
- Vallejo, C. S., Martínez, T. M. A., y Vargas, A. I. C. 1999. Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de *Tilletia indica*, agente causal del carbón parcial en trigo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17 (2): 128-130.
- Valsaraj, A., Pushpangadan, P., Smitt, U. W., Adersen, A. and Nyman, U. 1997. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology* 58: 75-83.

Van der Watt, E. and Pretorius, J. C. 2001. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76: 87-91.

Van Etten, J. L., Bulla Jr., L. A. and Julian, G. St. 1974. Physiological and morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. *Journal of Bacteriology* 117 (2): 882-887.

Xuan , T. D., Yuichi, O., Junko, C., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, T. D. and Hong, N. H. 2003. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. *Crop Protection* 22: 873-881.

Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkni, J., Ben-Arie, R. and Droby, S. 2000. Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology* 20: 115-124.

Van der Watt, E. and Pretorius, J. C. 2001. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76: 87-91.

Van Etten, J. L., Bulla Jr., L. A. and Julian, G. St. 1974. Physiological and morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. *Journal of Bacteriology* 117 (2): 882-887.

Xuan , T. D., Yuichi, O., Junko, C., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, T. D. and Hong, N. H. 2003. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. *Crop Protection* 22: 873-881.

Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkni, J., Ben-Arie, R. and Droby, S. 2000. Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology* 20: 115-124.