



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

**“Control de la pudrición peduncular del fruto de aguacate
(*Persea americana* Mill. cv Hass) con derivados vegetales”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, OPCIÓN EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

M.C. Rosa María Espinoza Madrigal

Directores de tesis:

D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

D.C. Rosa E. del Rio

Morelia, Michoacán, noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme brindado la oportunidad de formarme académicamente y los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo; al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por darme la oportunidad de formar parte del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, opción en Biología Experimental.

Al CONACyT por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A mis asesores, el D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco y la D.C. Rosa E. del Río por abrirme las puertas de sus laboratorios, por sus observaciones y asesoría durante el transcurso de este trabajo, por su apoyo y motivación para seguir adelante y sobre todo por su amistad. Además, por la confianza que tuvieron en mí para llevar a cabo este proyecto.

A la D.C. Elena Stashenko y todo su grupo de trabajo, porque en su laboratorio (CENTVAM y CROM-MASS) realicé una estancia de investigación internacional para la obtención de aceite esencial de la planta medicinal Tagetes lucida a escala piloto y su caracterización. Además, de sus observaciones, consejos y apoyo.

A mis sinodales, la D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez, el D.C. José López Bucio y el D.C. Rafael Lara Hernández por las aportaciones hechas para que este trabajo fuera mejor.

A mis padres: Martín Espinoza Lira y Sara Madrigal Vargas, mis hermanos Paty, Juan, Ana, Marcos y Alejandro, cuñados, sobrinos y familia en general, por su apoyo incondicional en todo momento, por su paciencia, por la confianza que siempre me han brindado, porque sé que siempre cuento con ellos estén donde estén sin importar la situación en la que me encuentre y por mostrarme que con trabajo todo se puede lograr.

A mis amigos del laboratorio de Fisiología Celular y Química de Productos Naturales.

A los laboratorios nicolaitas: bioquímica ecológica, biología del desarrollo vegetal, biotecnología y bioprocesos y resonancia magnética nuclear por el uso de sus instalaciones.

A Martha, Aidee, Tere, Arely, Celia y Leslie por ser amigas incondicionales y porque a pesar del tiempo me siguen brindando su apoyo y su amistad.

Ya todas las personas que han formado parte de mi vida, por los momentos compartidos y darme palabras de aliento cuando lo he necesitado.

A todos ellos GRACIAS

INDICE

Agradecimientos	
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Justificación	7
3. Hipótesis	8
4. Objetivo general	8
4.1. Objetivos particulares	8
5. Estrategia experimental	9
6. Resultados	11
6.1 Potassium bicarbonate on stem end root avocado (<i>Persea americana</i> Mill. Var Hass)	12
6.2 Entre tantas plantas, ¿por qué <i>Caesalpinia</i> ?	21
6.3 Caracterización de aceites esenciales obtenidos a escala piloto de la planta medicinal <i>Tagetes lucida</i>	25
7. Discusión	48
8. Conclusión	57
9. Referencias	58
10. Apéndice	64
10.1 Efecto antifúngico de <i>Caesalpinia platyloba</i>	65
10.2 Efecto antifúngico de <i>Tagetes lucida</i>	66
11. Anexo	67
11.1 Componentes de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> inhiben la dihidrofolato reductasa de hongos y oomicetos	68
11.2 Growth and development of <i>Arabidopsis thaliana</i> seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits	71
11.3 Estudio etnofarmacológico del género <i>Eupatorium</i> : una alternativa medicinal y de control biológico	72

“Control de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass) con derivados vegetales”.

RESUMEN

La enfermedad de pudrición peduncular del aguacate, la cual, se presenta en poscosecha, es uno de los factores que incrementan los costos de producción y limitan su exportación. La restricción al uso de fungicidas convencionales limita el uso de tratamientos poscosecha, por lo cual, el manejo de fruta fresca de aguacate en Michoacán, es un área de oportunidad comercial y académica para proponer componentes vegetales como principios activos en calidad de sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) de una formulación para el control de la pudrición peduncular de aguacate y su conservación hasta su consumo. En este trabajo, la resistencia de los hongos causales de pudrición peduncular a los fungicidas reportados para su control se evaluó *in vitro* e *in situ*. Todos los aislados fúngicos evaluados presentaron resistencia, entre los cuales destacó *Colletotrichum acutatum*. Posteriormente, un estudio biodirigido con especies vegetales arbóreas y medicinales endémicas de Michoacán se realizó en la búsqueda de componentes con actividad antifúngica. De estas especies vegetales, *Tagetes lucida* mostró ser la más efectiva *in vitro*. Esta planta, se seleccionó para el desarrollo de una formulación, compuesta por el extracto cloruro metilénico de flor de *T. lucida* encapsulado en quitosana. La formulación se evaluó con los hongos de la pudrición peduncular y el resultado fue que inhibió el crecimiento de los hongos causales de pudrición peduncular *in vitro* y disminuyó la severidad de la enfermedad en el fruto de aguacate (*in situ*).

Palabras clave: aguacate, pudrición peduncular, antifúngico, derivado vegetal, formulación.



“Control of the peduncular rot in the avocado fruit (*Persea americana* Mill cv Hass) with vegetable derivatives”

ABSTRACT

Stem end rot avocado disease, which, occurs in postharvest, is one of the factors that increase production costs and limit its export. The restriction to the use of conventional fungicides limits the use of postharvest treatments, therefore, the management of fresh avocado fruit in Michoacán is an area of commercial and academic opportunity to propose plant components as active ingredients as GRAS substances (Generally Recognized As Safe) of a formulation for the control of stem end rot in avocado and its conservation until its consumption. In this work, the resistance of the fungal peduncular rot to the fungicides reported for their control was evaluated *in vitro* and *in situ*. All fungal isolates evaluated showed resistance, among which *Colletotrichum acutatum* stood out. Subsequently, a biodirected study with endemic tree and medicinal plant species of Michoacán was carried out in the search for components with antifungal activity. Of these plant species, *Tagetes lucida* proved to be the most effective *in vitro*. This plant was selected for the development of a formulation, composed of the methylene chloride extract of *T. lucida* flower encapsulated in chitosan. The formulation was evaluated with the fungi of the peduncular rot and the result was that it inhibited the growth of the fungi causing peduncular rot *in vitro* and decreased the severity of the disease in the avocado fruit (*in situ*).

Keywords: avocado, peduncular rot, antifungal, vegetable derivative, formulation



1. INTRODUCCIÓN

La importancia en el manejo de fruta fresca (aguacate) en Michoacán demanda sanitizantes naturales para su conveniente y mejor conservación hasta su consumo. Un área de oportunidad comercial y académica es proponer un sanitizante alternativo a base de componentes vegetales. La intención principal de este trabajo, fue la obtención de una formulación sanitizante a base de componentes vegetales para uso en la conservación de la fruta fresca, aguacate. Para ello, las siguientes preguntas se plantearon: ¿Cuál es la resistencia a los fungicidas convencionales de los hongos causales de la pudrición peduncular de aguacate registrados en Michoacán?, ¿Qué componente vegetal tiene la propiedad de inhibir a los patógenos que causan la pudrición peduncular de aguacate? y ¿Una formulación se desarrollaría con el mejor componente vegetal con efecto antifúngico en función de la normatividad para disminuir la pudrición peduncular en frutos de aguacate?

La estrategia de esta investigación, inició con una evaluación comparativa de efectividad antimicrobiana entre extractos vegetales. Aunado a ello, se evaluó la resistencia fúngica de un grupo de aislados que causan pudrición peduncular en el fruto de aguacate (PPA) a los fungicidas que se usan para su control en precosecha. En poscosecha, solo algunos países permiten el uso de fungicidas como el tiabendazol. Sin embargo, su uso aún se encuentra restringido por las normas de calidad y los estándares de inocuidad establecidos por los países importadores de este fruto. La resistencia observada en dos ambientes (*in vitro* e *in situ*) propiciaron la búsqueda de componentes vegetales para el control de esta enfermedad (Espinoza Madrigal *et al.*, 2018). Los resultados de efectividad antimicrobiana de los extractos y los resultados del análisis de factibilidad de la obtención de los mismos, permitieron establecer el criterio de decisión para elegir el componente vegetal que se utilizó para el diseño de obtención de la formulación. Con el mejor componente vegetal bioactivo, se formuló el producto de interés que será el inicio de una nueva línea de productos antimicrobianos formulados, para utilizarlos como conservadores de fruta fresca (aguacate). Esta estrategia de trabajo en el desarrollo tecnológico de extractos vegetales biocidas, es la base para la invención de nuevos desarrollos tecnológicos para ser aplicados en los sectores; agropecuario y de servicios. Los componentes y las concentraciones que se usaron en la formulación se establecieron de acuerdo a la normatividad de salud mexicana vigente,



relacionada al sector al que va dirigido el uso de la formulación. La actividad antifúngica fue la bioguía en la formulación y se utilizaron microorganismos silvestres (aislados puros) de la pudrición del pedúnculo del aguacate (PPA). Una vez establecida la potencial formulación, fue ensayada *in situ*.

El importante progreso en el incremento de la producción de aguacate a nivel mundial, ha significado en los últimos años un aumento en el comercio internacional de este fruto, que satisfacen las demandas de consumo en regiones donde no puede ser cultivado o donde el volumen de producción es insuficiente para el mercado interno. México, es el productor número uno de aguacate, un fruto de valor económico y nutricional en el mundo. Michoacán es líder productor, destina 167 mil 745 hectáreas a este cultivo, en las cuales se producen 195 mil 042 toneladas (94 % de la producción nacional) (SIAP, 2019). Sin embargo, como alimento perecedero, es susceptible al deterioro por microorganismos patógenos como los hongos, los cuales pueden permanecer en un estado quiescente y ocasionar daño cuando el fruto madura, es decir en poscosecha. Las enfermedades son de los factores que incrementan los costos de producción hasta un 40 % y limitan la exportación al demeritar la calidad de la fruta (15-30 %), además de la restricción al uso de plaguicidas convencionales aceptados debido a efectos adversos como daño ambiental e inducción de la resistencia microbiana (APEAM, 2018).

A nivel mundial, para aguacate (*Persea americana* Mill) se reportan 50 agentes fitopatógenos, responsables de 30 enfermedades, así como 12 desordenes fisiológicos. De todos estos problemas fitosanitarios destacan las enfermedades causadas por los hongos por su amplia distribución y fácil diseminación (Téliz, 2000). Una de las enfermedades de mayor incidencia en las plantaciones de la región aguacatera de México que se presenta en poscosecha es la pudrición peduncular o *stem-end rot* y puede ser severa si las condiciones de almacenamiento de los frutos no son las adecuadas (Menge y Ploetz, 2003). La pudrición inicia en la región de unión del fruto con el pedúnculo. En la pulpa se observan lesiones conspicuas definidas de color café oscuro a negro, avanzan desde la parte apical y eventualmente invaden todo el fruto a medida que la maduración progresa. Los patógenos causales de la pudrición peduncular del aguacate (PPA) generalmente son hongos endófitos que forman consorcios con patógenos oportunistas. Las especies fúngicas presentes dependen de las condiciones ambientales, de la zona productora de aguacate y es



extraordinariamente cambiante en composición. El control de la PPA michoacano es obstaculizado por factores biológicos y de manejo de cultivo, así como de comercialización y de sanidad tales como las restricciones arancelarias, fitosanitarias, inocuidad alimentaria e idiosincráticos.

La zona aguacatera michoacana tiene descritos estudios pioneros en los que se reporta la presencia de los hongos *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Diaporthe phaseolorum*, *Oligoporus* sp y *Phomopsis viticola* (Espinoza Madrigal et al., 2018). Sin embargo, la PPA puede ser controlada por otros medios tales como los físicos o bien con sustancias microbidas que no generan resistencia y que son reconocidas como sustancias seguras o sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) catalogadas así por US-FDA (Food and Drug Administration-USA). Este organismo es quien regula la inocuidad alimentaria en los Estados Unidos de América y por ello es la referencia, debido a que es, el principal país importador de aguacate michoacano.

Reportes científicos y patentes, demuestran y proponen que las sustancias GRAS son útiles para la conservación de alimentos vegetales y de productos cárnicos. En ellos, se demuestra que estas sustancias son controladores del crecimiento y proliferación microbiana. Entre las sustancias GRAS se encuentran los compuestos volátiles y los aceites esenciales vegetales. Todos ellos obtenidos de condimentos vegetales y plantas medicinales ampliamente aceptados en las sociedades estadounidense, europea y japonesa, los principales mercados del aguacate michoacano. México es uno de los países con mayor número de especies animales y vegetales, esto lo ubica como la cuarta nación dentro de los países denominados megadiversos. También, se encuentra entre los cuatro con el mayor número de plantas vasculares, de las cuales, se han descrito más de 25 000 de un total de 27 000 y 30 000 estimadas, una gran proporción es endémica del país (Sarukhán *et al.*, 2017). Michoacán, ocupa el quinto lugar a nivel nacional. En la entidad se reconocen 20 tipos de vegetación y se estima una riqueza de aproximadamente 6 000 especies de plantas vasculares, la mayor parte correspondiente al grupo de las angiospermas. Aunque la cubierta vegetal de Michoacán está conformada por una gran cantidad de plantas, destacan las formas arbóreas. A pesar de que no todas las especies arborescentes son elementos dominantes en las asociaciones vegetales, sí contribuyen de manera importante a la estructura y composición



de las mismas. Las especies de plantas, desde briofitas hasta angiospermas, suman más de 225 000 especies.

Las familias con mayor número de especies son las compuestas, las leguminosas o fabáceas y las gramíneas, que en conjunto suman alrededor de 32 %. La familia de las leguminosas cuenta con 95 géneros y 490 especies aproximadamente (Villaseñor, 2005). Esto representa una alternativa para explorar su fitoquímica en la búsqueda de moléculas novedosas con efecto antifúngico para el control de la PPA. Un recubrimiento comestible desarrollado con un polímero como la quitosana que atrapa o mantiene en su superficie al principio activo y lo libera controladamente, representa una forma viable de aplicación. Por ello, se propuso la obtención de una formulación con un componente vegetal como principio activo de plantas utilizadas en la medicina tradicional con propiedades antimicrobianas y de plantas nativas mejor representadas en la flora michoacana que controle la PPA.



2. JUSTIFICACIÓN

Una de las causas que afectan la calidad y la exportación del fruto de aguacate michoacano es la micosis denominada pudrición de pedúnculo. La restricción al uso de productos químicos en poscosecha en los mercados importadores y la idiosincrasia del productor, conlleva a la generación de una formulación con principios activos de origen vegetal en la categoría de sustancias GRAS que permitan el establecimiento de control de la pudrición peduncular y por lo tanto coadyuvar a la solución de este problema.



3. HIPÓTESIS

La pudrición peduncular de aguacate se controla con una formulación a base de un derivado vegetal inocuo.

4. OBJETIVO GENERAL

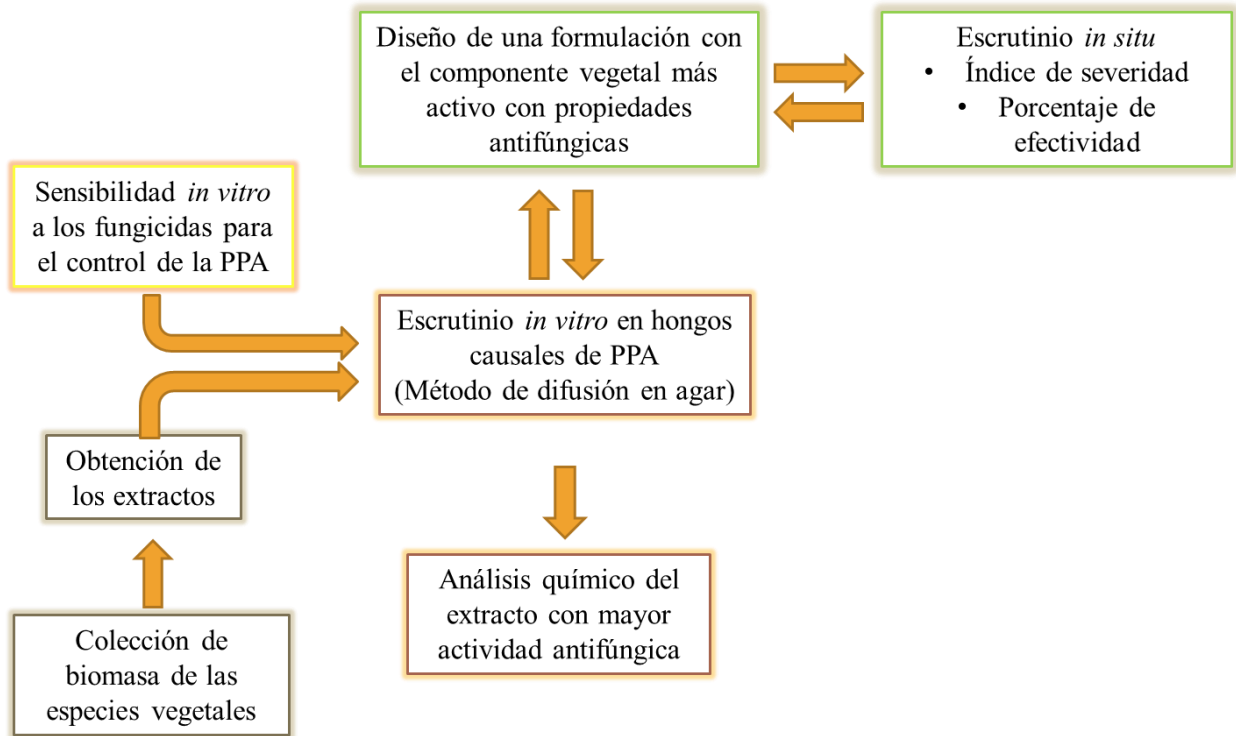
Controlar la pudrición peduncular con una formulación a base de un derivado vegetal inocuo con propiedades antifúngicas.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar la resistencia a los fungicidas convencionales de los hongos causales de la pudrición peduncular de aguacate registrados en Michoacán.
2. Obtener el componente vegetal con efecto antifúngico contra patógenos que causan la pudrición peduncular de aguacate.
3. Diseñar la formulación con el mejor componente vegetal con efecto antifúngico en función de la normatividad.



5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



La estrategia experimental se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. La sensibilidad *in vitro* a los fungicidas para el control de la PPA se evaluó con el método de difusión en agar. Con este método se observó la resistencia de hongos de la pudrición peduncular a fungicidas convencionales. Un grupo de hongos, se seleccionó con los siguientes criterios: 1) un aislado de cada género que se evaluó y 2) con mayor índice de crecimiento (relación entre el crecimiento tratado y el control), los cuales se usaron para los siguientes experimentos.

2. Colección de biomasa de las especies vegetales. Las especies vegetales se colectaron en La Huacana, en la orilla de la carretera Morelia-Pátzcuaro y en un mercado local para adquirir la materia prima y obtener extractos.

3. Obtención de extractos. El material vegetal que se colectó, se secó y se obtuvieron extractos por el método de maceraciones sucesivas. Este método práctico permitió la

extracción de los componentes de la planta de acuerdo a su polaridad para evaluarlos con los hongos de la pudrición peduncular.

4. Escrutinio *in vitro* en hongos causales de PPA. Los extractos que se obtuvieron, se evaluaron con el método de difusión en agar. Es un método práctico para evaluar el efecto antimicrobiano de diversas sustancias en un medio sólido, es este proyecto contra hongos de la pudrición peduncular. Con este método se determinó el índice de crecimiento que relaciona el crecimiento del hongo con un tratamiento y el crecimiento del hongo control. Este índice de crecimiento fue de utilidad para seleccionar los extractos que presentaron efecto inhibitorio.

5. Análisis químico del extracto con mayor actividad antifúngica. Los extractos efectivos se fraccionaron por cromatografía en columna para purificar los compuestos mayoritarios. La fase estacionaria fue gel de sílice y la móvil mezclas de hexano-acetato de etilo. Las fracciones se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y se identificaron los compuestos puros.

6. Diseño de una formulación con el componente vegetal mas activo con propiedades antifúngicas. La formulación se elaboró con quitosana y el extracto más efectivo en el escrutinio *in vitro*. Este polímero se seleccionó por ser sustancia GRAS, es flexible y permite atrapar componentes en su interior. El método de precipitación se utilizó por ser práctico, usa pocos componentes y no requiere infraestructura sofisticada.

7. Escrutinio *in situ*. Este experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de la formulación en la severidad de la pudrición peduncular en el fruto de aguacate inducida por el hongo *Colletotrichum acutatum* por ser el más agresivo y resistente. Los frutos se colocaron en contacto directo tanto con el patógeno como con la formulación en el sitio donde fue retirado el pedúnculo, lo cual, propició a la generación de la pudrición. La efectividad por parte de la formulación se evaluó con la escala de severidad de la enfermedad que denota los grados de avance del daño en el fruto. Es una escala visual con valores establecidos de acuerdo a la pudrición: 0 (fruto sano), 1 (fruto con daño en la parte apical), 2 (fruto con lesiones que avanzan a la parte basal) y 3 (daño total del fruto y ablandamiento de la pulpa).

6. RESULTADOS

Transylvanian Review

Vol XXVI, No. 30, 2018



Transylvanian Review

Centrul de Studii Transilvane | str. Mihail Kogalniceanu nr. 12-14, et.5, Cluj-Napoca

Email: transylvanianreview@gmail.com

Online Submission System: <http://transylvanianreviewjournal.org/>

Potassium Bicarbonate on Stem End Rot Avocado (*Persea americana* Mill. Var Hass)

Rosa María Espinoza Madrigal, Rosa Del Río Torres, Alberto Flores García and *Mauro Manuel Martínez Pacheco

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas Del Río, Morelia, México

Abstract

Background: Strict food safety regulations and a shift of the social trend towards consumption of foodstuffs produced without conventional pesticides motivate the search for new substances safe to humans and effective in the control of stem-end rot (SER) in ripening avocado fruit a damage caused by endophytic fungi, a cause of the loss of the fruit's food quality during storage. The aim of this research was to assess the effect of the potassium bicarbonate (KHCO_3) during the artificial induction of SER in Hass avocado as a possible postharvest application in avocado. **Material and Methods:** Potassium bicarbonate was assessed as a generally recognized as safe (GRAS) substance for control of SER in avocado. We assessed the fungi sensitivity to conventional fungicides azoxystrobin, benomyl, copper sulfate and tiabendazole, role of the presence of peduncle, index of severity of SER, and effectiveness of sodium bicarbonate in 'Hass' avocado fruits (*Persea americana* Mill.) that were artificially infected with the wild fungi *Colletotrichum acutatum* and *Phomopsis viticola*.

Results: Presence in the fruit of peduncles did not prevent colonization by fungi. Of four fungicides used in avocado harvest, azoxystrobin exhibited a major effectiveness value. *P. viticola* was more sensible to assayed fungicides than *C. acutatum*. Potassium bicarbonate prevented artificially induced SER lowering the severity of the fungal damage with 40 to 50 % effectiveness.

Conclusion: These results show that potassium bicarbonate is effective to reduce the incidence and severity of SER in 'Hass' avocado fruits, and motivate to pay more careful attention to the search for alternative disease control measures.

Keywords: Avocado, fungicides, peduncle, potassium bicarbonate, stem end rot (SER).

*Corresponding author: Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas Del Río, Morelia, México.



Introduction

Worldwide, the social movement towards consumption of safe foodstuffs is becoming generalized and their demand is growing. Likewise, implementation of social and industrial actions to achieve an environmentally friendly biotechnological production is currently an accepted social trend. In parallel, the increase in human diseases associate to aging appearing with age in all cultures induces a dedicated care for feeding habits (Stambler *et al.*, 2018), which has generated a new market for consumption of foodstuffs produced without conventional pesticides. These circumstances pose a challenge for the production of high quality and safe foodstuffs that fulfill the consumers' expectations, as in the case of 'Hass' avocado fruits (*Persea americana* Mill.) susceptible of suffering peduncle rot. Stem end rot (SER) in avocado fruits causes' severe postharvest economic loses and is devastating during prolonged storage, because it reduces fruit quality and limit their marketing (Obianom and Sivakumar, 2018). SER manifests itself in the apical and internal parts of the avocado fruit at the insertion of the peduncle. The damage made by the fungi is not seen until the epidermis is removed from the fruit. Several fungal consortia characteristic of different avocado production areas are the cause of SER. In Israel, the main cause of avocado peduncle rot is *Botryosphaeria rhodina*, and in South Africa, it is *Fusicoccum luteum* and *Nectria pseudotrichia* (anamorph: *Tubercularia laterita*), in Australia and New Zealand, *B. ribis* and *F. luteum*, in the USA the most common cause of the disease is *B. dothidea*, and in Italy, it is caused by the fungi *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *C. fructicola* (Guarnaccia *et al.*, 2016, Menge and Ploetz, 2003). The fungal consortium reported to cause SER in Mexico is dominated by *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Oligoporus* sp., and *Phomopsis viticola* (Vidales Fernández and Sánchez Pérez, 1991). Several preharvest practices are applied for the control of these pathogens causing SER in avocado. However, such practices do not always offer postharvest protection to avocado fruits nor they avoid the resulting economic loses. Otherwise, the strict national and international food security regulations motivate producers to use alternative production systems, including the use of bio pesticidal formulations applied as preventive agents of SER, both microbial and biochemical (D'Amico *et al.*, 2016). The latter bio pesticides include, among other active agents, bicarbonates and plant products (Sarkhosh *et*

al., 2017). In recent time, plant extracts and components having antimicrobial activity were evaluated for postharvest use in avocado fruits, either alone or combined with commercial waxes and other polymers (Boonruang *et al.*, 2017, Bill *et al.*, 2014). Also, antimicrobial unconventional molecules have been proposed for pre and postharvest use in the cultivation of avocado, e.g., defense enzymes or carbonates applied by immersion or aspersión are effective controllers of phytopathogens like *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca mors-uvae* or *Venturia inaequalis* that severely attack shoots, leaves, and fruits (Glowacz *et al.*, 2017, Wenneker and Kanne, 2010). Carbonates are compounds that are generally recognized as safe (GRAS) both for humans and for the environment and that are amply used in the food, pharmaceutical, and biotechnological industries. The goal is, therefore, to use traditional safe chemicals with records of use for disease control. There is strong evidence of the antifungal effect of unconventional, not toxic compounds like bicarbonates applied to the production of safe foodstuffs. Information about the efficiency of these compounds against the development of postharvest diseases in avocado is beginning to become available. In consequence, the aim of this research was to assess the effect of the unconventional fungicide potassium bicarbonate (KHCO₃) during the artificial induction of SER in Hass avocado as a possible postharvest application in avocado.

Materials and Methods

Collection and Identification of Tested Organisms Fungi. The used fungal isolates were of *Colletotrichum acutatum* and *Phomopsis viticola*, and were obtained from the fungal culture collection of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo in Morelia, Michoacán, Mexico. The fungi were isolated from 'Hass' avocado fruits (*Persea americana* Mill.) displaying stem end rot disease. The pathogens were identified based on the morphology of colonies and on the characteristics of the caused lesions. The fungi were grown and propagated in potato dextrose agar, potato dextrose broth, and synthetic media. Avocado fruits. A sample of Extra class (export quality) 'Hass' avocado fruits with peduncle from the august flowering season was extracted from a lot of fruits for export from an authorized plantation, which were harvested 24 h before their sampling. The fruits were selected and randomly grouped, were physiologically mature for

their consumption (>21.5 % dry matter), and had a caliber of >265 g (size code 16) (NMX-FF-016-SCFI-2006 agreement with CODEX STAN-197-1995).

Assay of Prevention of Peduncle Rot in Fruits of 'Hass' Avocado

Assays of prevention of peduncle rot were made in 'Hass' avocado fruits with and without peduncles were done with a modification of experimental strategy of Sellamuthua *et al.* (2013). The assays with 50 mM potassium bicarbonate, copper sulfate, azoxystrobin, benomyl, and tiabendazole were made using the fungi *C. acutatum* and *P. viticola*, because these fungi were dominant in the isolation microenvironment of SER in avocado fruits, were more frequently present both during isolation and in the region, and exhibit high virulence. The avocado fruits were washed with water and dried, labeled, and afterwards placed in storage chambers at a relative humidity of 100 % and a temperature of 20 °C. Fruits were grouped based on inoculation and treatment as follows: healthy fruit, fruit inoculated with the pathogen, treated with copper sulfate, treated with azoxystrobin, treated with benomyl, treated with tiabendazole, and treated with potassium bicarbonate. Controls for treatments consisted in uninoculated fruits treated with the above mentioned fungicides and with potassium bicarbonate. The peduncles were removed in sterile conditions and 24 µL of solutions of each one of the treatment substances (fungicides at a

concentration of 1 g/L and 50 mM KHCO_3) were applied in accord to Ordoñez Valencia *et al.* (2009). Afterwards, propagules of 25 mm² of the fungal isolates were applied to fruits. In the case of avocado fruits with peduncle, the applied inoculum was cultured in pine wood splinters. The severity of the disease was assessed according to the index of severity of peduncle rot established in the figure 1.

Data Analysis

Assays of prevention of stem end rot were made with one replicate and nine observations per treatment, in which one avocado fruit represented one observation. The severity index of stem end rot and the percentage of effectiveness were determined according with the following formulae (Abbott, 1925): Index of severity, $IS = [n(0)+n(1)+n(2)+n(3)]/\Sigma n$, where IS = index of severity, n = number of fruits, and 0, 1, 2, and 3 = severity. Percentage of effectiveness: $PE = [(A-B)/A] \times 100$, where PE = percentage of effectiveness, A = IS of absolute control, B = IS of treatment. The remaining experiments were made three times independently and with three replicates for each one. The regression analysis equations were: for *C. acutatum*, $y = 0.86 + 0.45x$ and for *P. viticola*, $y = 0.32 + 0.4x$. The statistical significance of the experimental results was calculated by means of Tukey tests ($\alpha = 0.05$) in the Statistica 8.0 software.

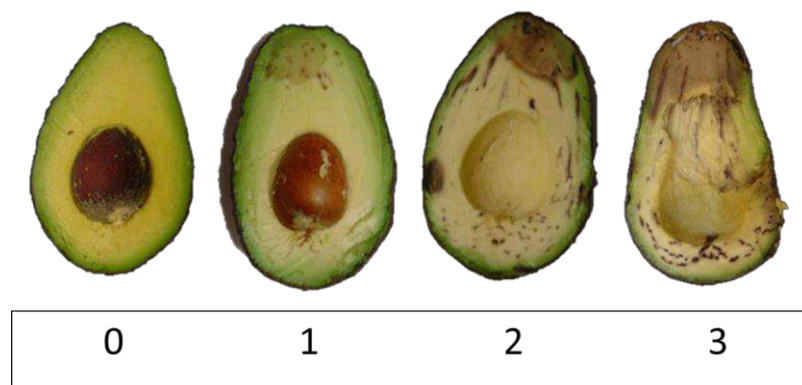


Figure 1: Assessment of the severity of peduncle rot in avocado

Results

Stem End Rot in 'Hass' Avocado Fruits Caused by the Fungi Colletotrichum acutatum and Phomopsis viticola

The SER begins in the stem side of the fruit and develops as the fruit becomes softened. Figures 1 and 4 show the damage in avocado fruits characteristic of the infection by the aggressive peduncle rot causing fungal isolates *C. acutatum* (Ca) and *P. viticola* (Pv).

The evolution of the infection of these two fungi differs. In both cases the SER begins as a slight sinking surrounding the site of insertion of the peduncle in mature fruit, which increases through time, and the mycelium of the fungi can often be seen in the scar left after removal of the peduncle. On the inner side of the insertion of the peduncle, a light to dark brown color appears extending from the site of insertion and into the fruit with undulate margins. The necrotic tissue initially under the epidermis gradually penetrates towards the center of the fruit

until invading it completely, causing the root of the pulp that becomes light brown in color, and if conditions for infection are favorable, the fungi can even colonize the seed. Because the decomposition of the pulp tissue propagates along the vascular tissue of the fruit, brown longitudinal streaks show along the fruit. Small brownish violet spots might appear anywhere inside the fruit, more frequently towards the peduncle. As the fruit becomes older, the lesions on the fruit's surface become larger and turn into dark color depressions. The fruit wilts and the dark colored surface can become covered with fungal mycelium and spores of a greyish brown color. Finally, the rot extends throughout the fruit pulp, which becomes brown and liquefied and acquires an unpleasant odor. The virulence of the pathogenic fungi isolated from avocado fruits with SER infection was demonstrated both by the appearance of the symptoms of the disease by artificial inoculation, and by the reproduction of the symptoms of peduncle rot in avocado fruits by the re-isolation and infection of the fungi.

The Role of the Peduncle in Stem End Rot of 'Hass' Avocado Fruits Caused by the Wild Fungi C. acutatum and P. viticola

The peduncle of the avocado fruit can be an important source of fungal infection, both from the systemic invasion of endophytes as from the contamination of the stem wound caused during the harvesting of the fruit. The SER avocado fruits inoculated with *C. acutatum* exhibited an index of severity of 2.4 and with *P. viticola*, of 1.6 (Figure 2). In order to determine the role of the peduncle in the establishment of SER we made a correlation analysis of the infection in fruits with and without peduncle. The results of the analysis showed a correlation of $r = 0.67$ for infection by *C. acutatum* and of $r = 0.49$ for infection *P. viticola*. The presence of the peduncle did not avoid infection by the fungi. A differential response was observed that showed that *C. acutatum* had a high virulence, while the virulence of *P. viticola* was moderate.

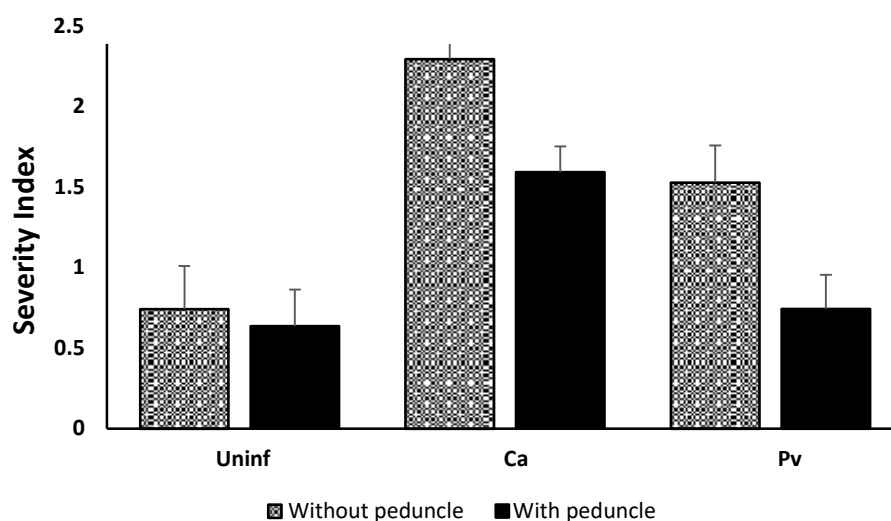


Figure 2: The role of peduncle presence in stem end rot in 'Hass' avocado fruits caused by the wild fungi *Colletotrichum acutatum* (Ca) and *Phomopsis viticola* (Pv). SER was induced by fungal inoculation in the fruit cleft joining the peduncle to the fruit, with an uninfected (Uninf) negative control. Fruits were incubated during eight days at a temperature of 20 °C and 100 % relative humidity.

Effectiveness for the Control of SER in Avocado Fruits of Conventional Fungicides

In situations in which SER can become a serious problem it may be necessary to apply conventional fungicides like those containing the active agents, azoxystrobin (Azo), benomyl (Ben), copper sulfate (CS), and tiabendazole (Tia). We determined the effectiveness for prevention of SER of conventional fungicides in avocado fruits artificially infected by the dominant SER causing fungi *C. acutatum* and *P. viticola* (Figure 3). The results of our evaluation showed that

fungicides had a differential effectiveness in the prevention of the SER produced both by *C. acutatum* and by *P. viticola*. The application of copper sulfate was ineffective for controlling the SER caused by both fungi tested, and application of benomyl and tiabendazole produced an intermediate level of prevention. The conventional fungicide azoxystrobin was effective for the prevention of SER in avocado fruits. Overall, conventional fungicides were partially effective, producing a differential level of prevention of SER in avocado fruits.



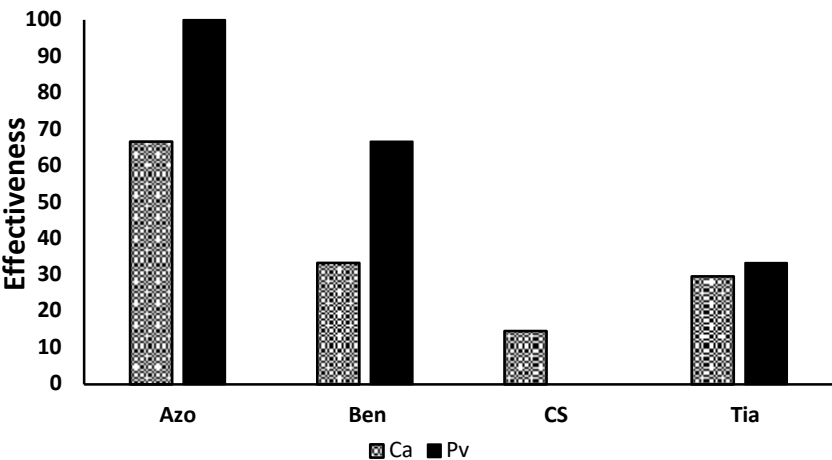


Figure 3: Effectiveness of conventional fungicides for control of peduncle rot in 'Hass' avocado fruits caused by the wild fungi *Colletotrichum acutatum* (Ca) and *Phomopsis viticola* (Pv). The fungicides azoxystrobin (Azo), benomyl (Ben), copper sulfate (CS), tiabendazole (Tia) were tested together with fungal inoculation in the fruit cleft joining the peduncle to the fruit. Fruits were incubated during eight days at a temperature of 20 °C and 100 % relative humidity.

Prevention of Peduncle Rot in Avocado Fruits with Potassium Bicarbonate

An alternative for the control of SER is the use of natural compounds with fungicidal activity and without known adverse effects on human health and the environment (GRAS quality). Bicarbonates are one of these alternative antifungal substances having the above mentioned safety characteristics that have attracted the attention in recent times. In our assays, avocado fruits showed the presence in them of a certain degree of microbial load observed as an index of severity of infection of 0.11 in the control treatment. This infection might have been due to

endophytic microorganisms or to microbial contamination during the harvesting and storage of the fruits. In the presence of potassium bicarbonate, avocado fruits artificially infected with *C. acutatum* and *P. viticola* were susceptible of SER with index of severity values of 2.4 ± 0.10 and 1.6 ± 0.24 , respectively (Table 1). Application of 50 mM potassium bicarbonate to avocado fruits inoculated with *C. acutatum* and *P. viticola* prevented the appearance of signs of induced SER in the positive control (Figure 4), with an effectiveness of between 40 and 50 % (Table 1).

Table 1: Effect of potassium bicarbonate in prevention of peduncle rot in 'Hass' avocado (*P. americana*) fruits. Data shown are averages of nine observations $\pm$ standard error of severity indexes analyzed by the Student's t-test.

Potassium bicarbonate (mM)	Severity index			Effectiveness (%)	
	Control	<i>C. acutatum</i>	<i>P. viticola</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>P. viticola</i>
0	0.11 $\pm$ 0.0 ^a	2.4 $\pm$ 0.10 ^a	1.6 $\pm$ 0.24 ^a	-	-
50	0.22 $\pm$ 0.14 ^a	1.4 $\pm$ 0.17 ^b	0.8 $\pm$ 0.22 ^b	40	50



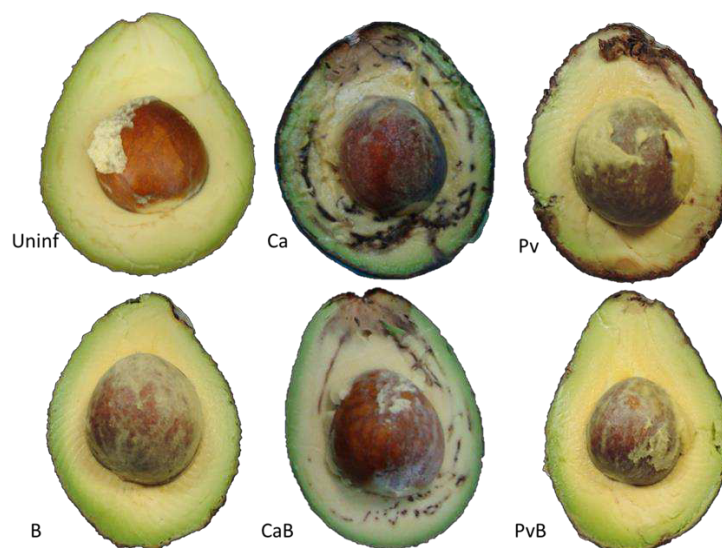


Figure 4: Prevention of SER in 'Hass' avocado (*P. americana*) fruits by potassium bicarbonate. Extra quality fruits were infected with the pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* (Ca) and *Phomopsis viticola* (Pv) in the presence (B) and absence of 50 mM potassium bicarbonate with an uninfected (Uninf) negative control. Fruits were incubated at a temperature of 20 °C and 100 % relative humidity and the severity of rot was evaluated after eight days.

Discussion

The current challenge faced by food producers is to produce safe foodstuffs, of high quality, and attractive enough to fulfill the expectations of consumers. An example are avocado fruits having an important content of nutrients like folates, Selenium, Zinc, Calcium, Iron, Magnesium, Potassium, Sodium, Copper and Manganese (Comerford *et al.*, 2016, Dreher and Davenport 2013, Martinez Pacheco *et al.*, 2011, USDA, 2004). Meeting this challenge implies obtaining foodstuffs without the use of conventional pesticides in an expanding high value market like that of 'Hass' avocado fruits, in which the production of disease free product is evidently implied. In this case, the challenge includes the control of the devastating postharvest stem end rot (SER) disease of avocado fruits. SER can be controlled by means of adequate preharvest practices including appropriate field sanitation, harvesting, and immediate cold storage of harvested fruits. However, these preharvest practices do not always prevent the SER or avoid economic losses. Fungi are one of the causal agents of SER in avocado fruits and poor storage practices favor its propagation, which generates important economic losses. The virulence of fungi previously isolated from avocado fruits with SER symptoms was verified by reproduction of such symptoms by artificial inoculation with these isolates, the disease manifesting both in peduncles and in the zone of its attachment to the fruit. As mentioned above, it may be necessary to apply conventional fungicides in

situations in which SER can be a major issue (Everett *et al.*, 2011). We found a differential preventive effect of SER in avocado fruits artificially infected with *C. acutatum* and *P. viticola* by the application of the tested conventional fungicides copper sulfate, azoxystrobin, benomyl and tiabendazole. Despite the latter conventional fungicides are not applied to harvested avocado fruits, we used them as indicators of fungal resistance. The assayed fungicides partly prevented the rotting of avocado fruits caused by *C. acutatum*, a result that we interpret as fungal resistance to the fungicides. The exhibited resistance to conventional fungicides of *C. acutatum* is due to the pathogen's long term exposure to them. The fact that SER in avocado fruits caused by *P. viticola* was prevented to different extent by the tested conventional fungicides is explained due to the recent arrival of this fungus to the avocado production zone, hence the fungus has not been long enough exposed to conventional fungicides to acquire resistance to them. Another interesting factor regarding the differential protection against SER in avocado fruits is the biological diversity of the fungi (Hewitt *et al.*, 2016). However, the evidence indicates that these fungi dominant in SER disease of avocado fruits produced in the above mentioned region have developed resistance to conventional fungicides that impedes the production of SER free Hass avocado. Therefore it is desirable to achieve control measures that are environmentally friendly for their application in the production of avocado fruits in the local orchards, which are consumed worldwide (Sagarpa, 2015). The peduncle could be an important source of infection of

avocado fruits during their shelf life period because SER can originate from endophytic fungi in peduncles or through contamination during the harvest (Johnson, 1997). The effectiveness for the prevention of SER in avocado fruits of conventional fungicides was similar in fruits that were inoculated with fungal isolates, with or without peduncles. What we found was that SER caused either by systemic endophytic fungi infection or by microbial contamination through stem wounds caused during harvest was differentially prevented by conventional fungicides. If preharvest SER control measures were deficient, then the external layers of the fruit's peduncles will be infected with fungi during cutting, which may disperse fungal inocula on stem wounds. *C. acutatum* showed a severe virulence in avocado fruits either having peduncles or not, which indicates the fungi is a causal agent of SER, while the moderate virulence displayed by *P. viticola* indicates it is an opportunistic agent. The control of the life cycle of phytopathogenic fungi by bicarbonates is recognized since the last century, both in vitro as applied to the fruit and foliar part of sweet red pepper (Fallik *et al.*, 1997, Palmer *et al.*, 1997). The effectiveness of bicarbonates depends on their concentration and the susceptibility of the target fungus. Differential fungal sensitivity to conventional fungicides is generally known between different wild isolates of a fungal species. However, in the case of bicarbonates, it was observed in both *Sclerotinia sclerotium* and *Tricoderma* sp, the latter being mycoparasite of the former (Ordóñez Valencia *et al.*, 2009). Likewise, each avocado producing region harbors its own endophytic and pathogenic fungi that in consortium and optimal conditions cause SER in the Hass avocado (Guarnaccia *et al.*, 2016, Menge and Ploetz, 2003, Vidales Fernández and Sánchez Pérez, 1991). In addition, we tested presence and absence of potassium bicarbonate in artificially induced SER by *C. acutatum* and *P. viticola*, both fungal species found in the avocado producing region because carbonates and bicarbonates have ample spectrum antimicrobial activity and are efficient in postharvest phytopathogen control (Jamar *et al.*, 2008). Our results showed that potassium bicarbonate was between 40 and 50 % effective for controlling SER in avocado fruits caused by the fungi *C. acutatum* and *P. viticola*. Our observation agrees with what Smith *et al.* (2011), found when applying carbonates and bicarbonates to 'Hass' avocado fruits by immersion and aspersion for controlling anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. The main importers of avocado fruit are the US and European Union, where the United States Environment Protection Agency (USEPA) considers bicarbonates as safe for health and

the environment. Also, in several country producers of avocado fruit, carbonates are considered within the authorized products for the control of pests and diseases. Carbonates and bicarbonates can be used together with other practices in the elaboration and processing of agricultural products (NOM-037-FITO-1995). Therefore, the use of bicarbonate could significantly contribute to a substantial reduction in the use of other agrochemicals like fungicides. In conclusion, bicarbonates have gained attention due to their proven natural specificity, biodegradability, low toxicity, and minimal chemical pollution of ecosystems. Likewise, our results show that potassium bicarbonate is effective to reduce the incidence and severity of SER in 'Hass' avocado fruits, and motivate to pay more careful attention to the search for alternative disease control measures.

Acknowledgment

The authors thank the UMSNH and the M3P foundation for the partial funding of this work. RMEM is a CONACyT fellow.

References

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of American Mosquito Control Association, 3, 302-303.
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., Thompson A.K. 2014. The efficacy of combined application of edible coating and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. Crop protection, 64, 159-167.
- Boonruang, K., Kerddonfag, N., Chinsirikul, W., Mitcham, E.J., Chonhenchob, V. 2017. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R-(-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus. Food Control, 78, 85-93.
- Codex Stan-197-1995. Codex Standard for Avocado. Amendment 2005. Review 2013.
- Comerford, K.B., Ayoob, K.T., Murray, R.D., Atkinson, S.A. 2016. The role of avocados in complementary and transitional feeding. Nutrients, 8, 316, doi:10.3390/nu805031.
- D'Amico, M., Di Vita, G., Monaco, L. 2016. Exploring environmental consciousness and consumer preferences for organic wines without sulfites. Journal of Cleaner Production, 120, 64-71. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.014.



- Dreher, M.L., Davenport, A.J. 2013. Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 738-750.
- Everett, K.R., Pak, H.A., Pushparajah, I.P.S., Taylor, J.T., Astill, M.S., King, D.B., Chee, A.A. 2011. Field evaluation of fungicides to postharvest rots of avocados in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 64, 112-118.
- Fallik, E., Ziv, O., Grinberg, S., Alkalai, S., Klein, J.D. 1997. Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting. *Phytoparasitica*, 25, 41-43.
- Glowacz, M., Roets, N., Sivakumar D. 2017. Control of anthracnose disease via increased activity of defence related enzymes in 'Hass' avocado fruit treated with methyl jasmonate and methyl salicylate. *Food Chemistry*, 234, 163-167.
- Guarnaccia, V., Aiello, D., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G. 2016. Characterization of fungal pathogens associated with stem end rot of avocado fruit in Italy. *Acta Horticulturae*, 1114, 133-140. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1144.1
- Hewitt, S.K., Foster, D.S., Dyer P.S., Avery S.V. 2016. Phenotypic heterogeneity in fungi: Importance and methodology. *Fungal Biology Reviews*, 30, 176-184. doi.org/10.1016/j.fbr.2016.09.002.
- Jamar, L., Lefrancq, B., Fassotte, C., Lateur M. 2008. A during infection spray strategy using sulphur compounds, copper, silicon and a new formulation of potassium bicarbonate for primary scab control in organic apple production. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 481-493.
- Johnson, G.I. 1997. Mango disease losses: balancing economy and ecology. *Acta Horticulturae*, 455, 575- 586.
- Martinez Pacheco, M.M., Lopez Gomez, R., Salgado Garciglia, R., Raya Calderon, M., Martinez Muñoz, R.E. 2011. Foliates and *Persea americana* Mill. (Avocado). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23, 204-213.
- Menge, J.A., Ploetz, R.C. 2003. Diseases of avocado. In: Ploetz, R.C. Diseases of tropical fruit crops. (Ed.) pp. 35-72. CABI USA. ISBN 0851993907. Doi.10.1079/9780851993904.000.
- NMX-FF-016-SCFI-2006. None industrialized food products for human use fresh fruit avocado (*Persea americana* Mill.) specifications. Ministry of Economy. México.
- NOM-037-FITO-1995. Official Mexican standard, by which the specifications of the process of production and processing of organic agricultural products are established. Ministry of Agriculture, Livestock and Rural Development. Mexico
- Obianom, C., Sivakumar, D. 2018. Differential response to combined prochloraz and thyme oil drench treatment in avocados against the control of anthracnose and stem end rot. *Phytoparasitica*, 46, 273-28.1
- Ordóñez Valencia, C., Alarcon, A., Ferrara Cerrato, R., Hernández Cuevas, L. V. 2009. *In vitro* antifungal effects of potassium bicarbonate on *Trichoderma* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycoscience*, 50, 380-387.
- Palmer, C.L., Horst, R.K., Langhans, R.W. 1997. Use of bicarbonates to inhibit *in vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81, 1432-1438.
- Sagarpa 2015. Bulletin 034 of National Service for Agrifood Health, Safety and Quality. México: World's first avocado producer. A secretary at of the Mexican state.
- Sarkhosh, A., Vargas, A.I., Schaffer, B., Palmateer, A.J., Lopez, P., Soleymani, A., Farzaneh, M. 2017. Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit with plant extracted oils. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 16-22.
- Sellamuthua, P.S., Sivakumar, D., Soundya, P., Korstenb, L. 2013. Essential oil vapors suppress the development of anthracnose and enhance defense related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 81, 66-72.
- Smith, L.A., Dann, E.K., Leonardi, J., Dean, J.R., Cooke, A.W. 2011. Exploring non traditional products for management of postharvest anthracnose and stem end rot in avocado. In: 7th World Avocado Congress 2011. Conference Proceeding, pp. 215-221. Cairns, QLD, Australia.
- Stambler, I., Jin, K., Lederman, S., Barzilai, N., Olshansky, S.J., Omokaro, E., Barratt, J., Anisimov, V.N., Rattan, S., Yang, S., Forster, M., Byles, J. 2018. Aging health and R&D for healthy longevity must be included into the WHO work program. *Aging and Health*, 9, 331-333.
- USDA, National Nutrients Database for Standard Reference, Publication 17 2004. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- Vidales Fernández, J.A., Sánchez-Pérez J.L. 1991. Identificación de los agentes causales de las enfermedades en postcosecha del aguacate. Sumario (Es). (Spanish). Availability: Inifap. Cir Pacífico Centro. Tte. Isidro Alemán no. 294, C.P. 58260 Morelia, Mich. (México).
- Wenneker, M., Kanne, J. 2010. Use of potassium bicarbonate (Armicarb) on the control of powdery mildew (*Sphaerotheca mors-uvae*) of gooseberry (*Ribes uva-crispa*). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 75, 563-568.



ARTÍCULO

Entre plantas ¿Por qué Caesalpinia?

Rosa María Espinoza Madrigal y Mauro Manuel Martínez Pacheco



Caesalpinia pulcherrima (Fuente CONABIO)

M. en C. Rosa María Espinoza-Madrigal, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas opción en Biología Experimental y becaria de Conacyt.
rousme@hotmail.com

D. en C. Mauro Manuel Martínez-Pacheco, Profesor e investigador, ambos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
mpacheco@umich.mx

Un principio activo vegetal, es una molécula cuya acción en el organismo permite la prevención, el alivio o la cura de una enfermedad. La importancia y el interés en su obtención se enfocan en encontrarlo en las plantas. Para esta difícil labor se hace uso de previo conocimiento antropológico y biológico, integrado en lo que conocemos como medicina tradicional, también, del químico para obtener el principio activo puro y conocer su identidad, así como del bioquímico combinado con herramientas virtuales para determinar su efecto biológico deseado o benéfico.

En este contexto, como resultado de diversas investigaciones realizadas en plantas del género *Caesalpinia*, se ha descubierto que abundan moléculas denominadas vouacapanos, que pueden ser distintivos moleculares de este género vegetal. Estos compuestos son interesantes debido a que se les atribuyen efectos biológicos como la inhibición del desarrollo de organismos que crecen y se reproducen rápidamente, tales como, las células cancerosas humanas y los microorganismos patógenos o los que causan pudrición de los alimentos. Debido a que éstos provocan diversos efectos en los sistemas biológicos, es motivación para conocerlos al máximo detalle posible. Algo extraordinario, es que estas moléculas a concentraciones pequeñas son letales y en otros casos detienen el crecimiento celular.

Empecemos describiendo que son las plantas del género *Caesalpinia*

El botánico italiano Andrea Caesalpinio (latinizado como Andreas Caesalpinus) fue un entusiasta estudioso de estas plantas, razón por la cual se le dio el nombre de *Caesalpinia* al género, al que pertenecen 163 especies que habitan nuestro planeta. Son árboles o arbustos que habitan en zonas tropicales y subtropicales del mundo, con importancia biológica, social y económica. En zonas urbanas las encontramos como árboles de ornato, sin embargo, su hábitat natural son las regiones tropical y subtropical de países del Caribe, México, Colombia, Ecuador, Perú, Paraguay, Argentina, Brasil, Tailandia, Indonesia y China. En México, podemos encontrar 15 especies de *Caesalpinia* y en Michoacán habitan algunas de las más abundantes.

Especies de *Caesalpinia* en Michoacán

En México habitan *C. mexicana*, *C. procax*, *C. molleae* y *C. yucatanensis* que conforman el grupo de las quince especies de este género con las que se distribuyen en Michoacán que forman parte de su abundan-

te, diversa y sobresaliente flora, como: *C. cacalaco*, *C. caladenia*, *C. coriaria*, *C. echinata*, *C. eriostachys*, *C. goumen*, *C. hintoni*, *C. platyloba*, *C. pulcherrima*, *C. sclerocarpa* y *C. velutina*. De éstas, *C. coriaria*, *C. eriostachys*, *C. platyloba*, *C. pulcherrima* y *C. sclerocarpa*, son las más abundantes y habitan en la región de la Tierra Caliente de Michoacán.



Distribución de las especies de *Caesalpinia* que más abundan en la región de la Tierra Caliente, Michoacán (zona verde).

Caesalpinia en la medicina tradicional

Los efectos curativos que se le atribuyen a diversas especies de este género son como antiipérmico, antihelmíntico, nematocida, antimicrobiano, antiviral, anticonvulsivo, antiinflamatorio, antiasmático, antiulceroso, analgésico, antihipertensivo, abortifaciente, emenagogo, menoxenia, anti-

cancerígeno y suelen utilizarse contra el reumatismo, dolor de espalda, diabetes, abscesos, infecciones en piel, para el tétanos, en complicaciones intestinales, tromboisis, tumores y como purga para animales. Lo anterior se debe a la gran cantidad de metabolitos secundarios que produ-



Caesalpinia platyloba (Fotografía propia)

cen, responsables muchos de ellos de los diferentes efectos farmacológicos. Por ello, la fitoquímica de este género se explora activamente tanto de especies de Michoacán como otras de México.

Especies como el cascalote (*C. coriaria*), frijolillo (*C. platyloba*), San Agustín (*C. pulcherrima*), ébano u ojo de venado (*C. sclerocarpa*), son utilizadas en la medicina tradicional de nuestro país:

C. coriaria (cascalote) [Sinonimia: *Caesalpinia thomaea* Spreng., *Libidibia coriaria* (Jacq.) Schtdl., *Poinciana coriaria* (Jacq.)]. En la medicina tradicional la corteza y el fruto son utilizados para curar heridas en animales, la corteza se utiliza en humanos para aliviar el padecimiento de riñones, las vainas tienen actividad antimutagénica y antioxidante, y también se le atribuyen propiedades antimicrobianas. En México se producen toneladas de semillas de cascalote anualmente.

C. platyloba (frijolillo) [Sinonimia: *Broslettia blasiensis* (M.E. Jones) Britton & Rose, *B. pilosa* Britton & Rose, *B. platyloba* (S. Watson) Britton & Rose, *B. pubescens* Britton & Rose, *Caesalpinia blasiensis* M.E. Jones]. La parte aérea de la planta se prepara por decocción, para aliviar los dolores de muelas, se usa en baños y cataplasmas locales contra lepra, sarna y desinfectar heridas. La hoja y corteza se utilizan como purga para animales y también muestran un efecto fungistático.

C. pulcherrima (San Agustín) [Sinonimia: *Poinciana pulcherrima*]. En la medicina tradicional se usa para el tratamiento de fiebre, inflamación, complicaciones intestinales, reumatismo, tratamiento de la menstruación desviada o vicariante, antiviral e infecciones en piel (*C. pulcherrima*).

C. sclerocarpa (ébano, ojo de venado) [Sinonimia: *Libidibia sclerocarpa* (Standl.) Britton & Rose]. La vaina y la corteza se emplean como cicatrizante de heridas. Pero, hay especies de *Caesalpinia* que tienen otros usos.

De algunas especies se obtienen gomas para formular recubrimientos de uso en la conservación de alimentos, como la goma tara que se obtiene de *C. spinoso*. Otras especies, son árboles forrajeros, su madera posee excelente capacidad calorífica por lo que se usa como leña, en la manufactura de diversos utensilios y por las propiedades mecánicas de la madera se utiliza en la construcción. Hay plantas que se utilizan como cerco vivo debido a que repelen insectos y otros animales, asimismo, se utilizan como cortinas rompe vientos, de ornamento al tener flores de color vistoso.

Con estos usos tenemos a *C. eriostachys* (iguadero, hediondilla) [Sinonimia: *Poinciana eriostachys* (Benth.) Britton & Rose, *Schizolobium covilleianum* Pittier]. Este árbol se utiliza en leña, postes

de cerca, apicultura, artesanía, troncos esculturales, ornamental y en construcciones. Pero su mayor



Hoja y fruto de la *Caesalpinia*

atractivo lo dan los horcones y las vigas ornamentales utilizadas en construcciones rústicas.

Además de su uso medicinal, San Agustín es un arbusto que se emplea como cerco vivo y forraje; la madera del ojo de venado se utiliza para la construcción y postes; el cascalote se usa en la industria de la tenería, son cortinas rompe vientos, barreras o cercos vivos; el frijolillo también es un árbol forrajero, se usa como cerco vivo contra insectos, su madera se utiliza para hacer los barandales o patas de los equipales y para el teñido de textiles.

¿Por qué tanto interés en *Caesalpinia*?

Más allá de la contribución al aumento del



aniano (Fuente: CONABIO)

acervo fitoquímico (furanoditerpenos: vouacapanos), del conocimiento botánico y farmacológico de plantas de la región, hay otros aspectos de *Caesalpinia* que se describieron, que motivan nuestra curiosidad por las especies de este género vegetal. Interesantemente, de la fitoquímica de *C. enostachys* y *C. sclerocarpa* no se encontró información, lo que establece una oportunidad de estudio en estos árboles. Además, destacamos cinco especies locales (*C. canana*, *C. enostachys*, *C. platyloba*, *C. pulcherrima* y *C. sclerocarpa*) como las más abundantes que deben ser estudiadas.

En nuestro grupo de investigación, en el Laboratorio de Fisiología Celular estamos interesados en estudiar los metabolitos de estas especies de *Caesalpinia*, responsables de las propiedades antifúngicas, principalmente los que afectan a los frutos de aguacate, como la pudrición peduncular. Nuestro interés radica en que el aguacate es un fruto nutricional y económicamente importante, en el que se desarrolla la pudrición peduncular, causada por hongos patógenos, que se manifiesta durante la vida de anaquel. Estos hongos son multiresistentes a fungicidas sintéticos convencionales, por lo que es de importancia la búsqueda de metabolitos naturales, sobre todo, con las características que presentan los vouacapanos producidos por *Caesalpinia* spp, que pueden ser aplicados para asegurar el control de esta enfermedad y comercializar frutos inocuos, es decir, libres de fungicidas sintéticos convencionales.

«Con esta descripción queda claro del gran interés de realizar estudios con especies de este género: *Caesalpinia*»

Saber Más

Baldin-Zamra, J.L., Corvalán B.A., Salas-Morán P., Deo Santos M.H., Lago J.H., Sartorelli P., Veger C. y Soares M.G. (2022). The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaceae). Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules* 27, 7887-7902. <https://doi.org/10.3390/molecules27077887>

Gómez-Murillo, M.A., Álvarez-Egual, F.E., Rodríguez-García G., Martínez-Pacheco M.M., Espinoza-Medina R.M., Pantoja-Bolaños T., Salazar-Hernández J.L., García-Gutiérrez, H.A., Cárdeno-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P. y Del Río R. E. (2022). Cassare diterpe-

nies from *Caesalpinia platyloba*. *Phytochemistry* p. 337-443. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.09.038>

Rzedowski, G.C. de y Rzedowski J. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2^a Ed., la misma, Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 526 pp. ISBN de edición digital 978-607-7607-26-5. https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/ViveroDigital/Flora_del_Valle_de_Mexico.pdf



“Caracterización de aceites esenciales obtenidos a escala piloto de la planta medicinal *Tagetes lucida*”

RESUMEN

La presente pasantía de investigación se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM) ubicado en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia, a través del programa de becas de movilidad en el extranjero por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México. El propósito de esta estancia, fue conocer el proceso de obtención masiva de aceite esencial de plantas medicinales y la caracterización química de los mismos, así como la conversión del estragol a *trans*-anetol. Diversas actividades experimentales y académicas se llevaron a cabo y dieron como resultado el adiestramiento en técnicas de obtención y caracterización de aceites esenciales de plantas medicinales, la capacitación en la producción de aceites esenciales a escala piloto y en transformaciones químicas (isomerización).

INTRODUCCIÓN

En el marco de la filosofía nicolaita, para establecer un agente de cambio que influya en el interior de la Universidad y al mismo tiempo que vincule la sociedad y sus sectores productivos, a través de nexos académicos, científicos, tecnológicos, sociales y las artes, se buscó establecer una comunicación dinámica y permanente en la ciencia, la tecnología e innovación de todos los programas y cátedras. Un instrumento administrativo se generó en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH): el Programa Institucional de Movilidad que permite a sus alumnos y profesores realizar estancias académicas en una institución diferente, nacional o extranjera. Al mismo tiempo, facilita y promueve la integración de alumnos y docentes de otras instituciones en los propios programas y facultades nicolaitas.

En una acción académico-administrativa paralela, el gobierno de México mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me otorgó una beca de postgrado para

la realización de estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas en la opción de Biología Experimental del 01/09/2015 a 01/09/2019 (cuatro años). Con el proyecto de investigación titulado “CONTROL DE LA PUDRICIÓN PEDUNCULAR DEL FRUTO DE AGUACATE HASS CON DERIVADOS VEGETALES” fui aceptada en UMSNH y con la dirección científica y académica de los profesores D.C. Rosa E. del Río Torres (co-directora) y D.C. Mauro M. Martínez Pacheco (director) ambos adscritos al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

El programa de becas CONACyT ofrece la facilidad de realizar estancias académicas y de investigación en el extranjero. Una facilidad que en su momento se exploró mediante la vinculación existente entre las prestigiadas profesoras e investigadoras; D.C. Rosa E. del Río Torres (UMSNH) y Elena E. Stashenko Ph. D. encargada del Programa de Investigación para Estancia en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

La universidad anfitriona, la UIS, es una institución cuya misión institucional reconoce una participación activa en los procesos de cambio del entorno social, conducentes al mejoramiento de la calidad de vida de la comunidad santanderina y colombiana en general, para una adecuada articulación con la docencia y la investigación, teniendo como referente fundamental los criterios de calidad y excelencia académica. Para el desarrollo de estas actividades, la universidad establece alianzas estratégicas entre varias unidades académico administrativas, que facilitan la interdisciplinariedad y la cultura de trabajo en equipo. En casos específicos, las alianzas se establecen con instituciones externas, que propician a partir de su experiencia un aprendizaje institucional. Por esta filosofía, el gobierno de México aceptó la vinculación entre ambas instituciones universitarias a través de sus distinguidas profesoras e investigadoras y se concretó la vinculación con mi presencia y motivante estancia en UIS de este acogedor e interesante país.

En el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM) y particularmente en el laboratorio bajo la dirección de la profesora Elena E. Stashenko, puse en marcha un proyecto previamente aprobado por ella y motivo de mi estancia denominado “Caracterización de aceites esenciales obtenidos a escala piloto de la planta medicinal *Tagetes lucida*”. Al mismo tiempo, con las facilidades que el ambiente académico, de investigación, tecnológico y

humanístico que ha establecido la profesora Elena S. Stashenko Ph. D. y con su dirección para el fortalecimiento de mi habilitación como joven investigadora: los productos académicos llegaron inmediatamente. Estos son el motivo del presente informe de actividades realizadas en la UIS.

Resultados de la estancia

1. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Tagetes lucida* obtenido a escala piloto.

Los resultados obtenidos se integrarán para conformar un manuscrito.

2. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

En la semana internacional de la ciencia se presentó el trabajo “Caracterización química del aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav.”, donde se expuso la propagación de la planta, la obtención de su aceite por el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y el perfil químico del aceite. También, se asistió a la conferencia titulada “Innovación y patentes en el sector agroindustrial”.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL LABORATORIO

Asistencia a los seminarios y presentación de avances. Tres cursos internacionales teórico-prácticos sobre aceites esenciales y plantas aromáticas se llevaron a cabo, en los cuáles participé como instructora.

4. PARTICIPACIÓN EN CONFERENCIAS

Invitada como ponente de la conferencia titulada “Control de la pudrición peduncular del fruto de aguacate con derivados vegetales”, en la Universidad de La Paz.

5. PERSPECTIVAS

Llevar a cabo un análisis de los compuestos volátiles de la planta *T. lucida* en sus diferentes estadios.

Optimizar los parámetros de destilación por arrastre con vapor para obtener mayor rendimiento de aceite esencial de *T. lucida* y el análisis de costos.

Analizar el material vegetal pos-destilado.

Escalar la reacción de isomerización del estragol a *trans*-anetol.

ANTECEDENTES

Las enfermedades pos-cosecha se encuentran en el grupo de enfermedades de cultivos económicamente importantes y representan un severo problema para la comercialización. El factor común de estas enfermedades es que aparecen cuando el fruto comienza su maduración. De esta forma, los síntomas visibles se presentan cuando los frutos se encuentran en el mercado de consumo. Mientras un fruto se mantiene verde, las infecciones permanecen en quiescencia, lo que hace imposible su remoción en el empaque. Frutos infectados incluso, pueden no ser detectados en las inspecciones de calidad sanitaria que comúnmente se realizan en el empaque. Por lo anterior, el productor queda obligado a producir frutos de excelente calidad, libres de infecciones latentes de patógenos pos-cosecha. Las pérdidas económicas que causan los hongos fitopatógenos inducen a la búsqueda de métodos de control con sustancias GRAS con estrategias microbiológicas y fitoquímicas, para obtener un componente vegetal capaz de controlar los hongos fitopatógenos de cultivos de interés.

La producción agrícola se ha intensificado en las últimas décadas en el mundo debido al uso de plaguicidas que protegen a los cultivos, lo cual, conduce a una estabilidad económica. Sin embargo, el incremento del uso de estos químicos causa severos daños, por ejemplo, induce resistencia de los organismos patógenos y daños irreversibles al ambiente (Gerhardson, 2002). Además, el aumento en el costo de los plaguicidas y la demanda de alimentos libres de ellos, trae como consecuencia que se busquen nuevas alternativas económicas, menos dañinas para el humano y el ambiente. Por otro lado, las enfermedades adquiridas durante el transporte y almacenaje de alimentos perecederos, producen una gran pérdida económica, debido a su contenido de agua, nutrientes y pH, factores fisiológicos que los hace susceptibles al ataque de hongos. A nivel mundial las pérdidas pos-cosecha de alimentos perecederos debido a hongos van del 10 al 50% (FAO, 2015).

Las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre se implicara en preservar aquellas de su interés económico por sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. El proceso para obtener sus metabolitos secundarios y aceites esenciales es variable y se

puede lograr por diferentes métodos de extracción (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2009; Bautista *et al.*, 2003; Abou-Jawdah *et al.*, 2002). Diversos productos derivados de las plantas presentan efecto antimicrobiano (Pino-Benítez y Stashenko, 2009), lo cual representa un área de oportunidad académica y científica para proponer un componente vegetal con propiedades antifúngicas.

Durante el desarrollo del proyecto doctoral, se llevó a cabo una evaluación comparativa de efectividad antifúngica de extractos vegetales, aceites esenciales y fitometabolitos para el control de patógenos fúngicos que causan pudrición pos-cosecha de varios cultivos de interés comercial (Espinoza Madrigal *et al.*, 2017). Los resultados permitieron establecer el criterio de selección de los componentes de *Tagetes lucida* Cav. (Familia: Asteraceae, género: *Tagetes*, especie: *T. lucida* Cav.) que se utilizarán en el diseño experimental para el control de los hongos fitopatógenos. Interesantemente, los aceites esenciales de *T. lucida* (AETI) exhibieron efecto letal y controlador del crecimiento de aislados fúngicos fitopatógenos. Los AETI contienen componentes con variada actividad biológica entre las que destaca la actividad biocida.

Para esta experimentación, se requiere incrementar la cantidad de AETI y, a la vez, la cantidad de biomasa (*Tagetes lucida*) para extraer los AE. De tal manera que, para su aplicación se necesita resolver el problema de la escasez de la biomasa final (AETI). Al respecto, *T. lucida* crece naturalmente en la campiña michoacana, se tiene un relativo fácil acceso a su recolección y extracción de aceites esenciales con rendimiento de aproximadamente 0.01 %, lo que representa una escasa cantidad y es insuficiente para la experimentación que se pretende realizar. Por lo tanto, es necesario conocer la infraestructura primaria para la producción de *T. lucida* que permita aumentar el rendimiento de AETI mínimo requerido. En Colombia, la doctora Elena E. Stashenko trabaja en un robusto modelo de producción de aceites esenciales exitoso. En el cual, involucra la parte social, antropológica y agrícola en la producción de aceites esenciales vegetales a escala piloto mediante un estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias, extractos y derivados naturales en Colombia.

El objetivo de la estancia fue conocer el modelo de obtención industrial de aceite esencial de *Tagetes lucida*, los métodos de caracterización de aceites esenciales y modificación de metabolitos secundarios para utilizarlo en el control de los hongos fitopatógenos.

JUSTIFICACIÓN

La pérdida de frutos pos-cosecha como el aguacate Hass ocasionada por hongos fitopatógenos demanda nuevos componentes para su conservación hasta su consumo. Los fungicidas ofrecen protección contra el deterioro ocasionado por ellos. Sin embargo, su uso se encuentra restringido por su toxicidad. Lo cual, conduce a la búsqueda de una alternativa de origen vegetal para combatir enfermedades en pos-cosecha. *Tagetes lucida* es una planta medicinal con propiedades antimicrobianas reportadas, su aceite esencial no se produce comercialmente en México, lo cual, representa un área de oportunidad para conocer su obtención, caracterización de sus componentes y producción a escala piloto. Por lo tanto, el propósito de esta estancia fue conocer el proceso de obtención industrial de aceites esenciales de plantas medicinales y su caracterización química, así como la conversión del estragol a *trans*-anetol.

OBJETIVOS

1. Adiestramiento en técnicas de obtención y caracterización de aceites esenciales de plantas medicinales.
2. Capacitación en la producción de aceites esenciales a escala piloto en el desarrollo sostenible de plantas medicinales.
- 3.- Transformaciones químicas.

METODOLOGÍA

Propagación de *Tagetes lucida*

Las plantas de *Tagetes lucida*, se compraron en el vivero Follajes de Santander (22 plantas). km 3,7 Vía Piedecuesta-Bucaramanga. Quince plantas se colocaron en el jardín del CENIVAM, las demás, se propagaron por división de pie. Dos métodos de propagación se

llevaron a cabo, por esqueje y por división de pie. En la propagación por esqueje, los esquejes se cortaron dejando de cuatro a cinco nodos, dos nodos sin hojas se introdujeron en la tierra de la bandeja para su enraizamiento (bandejas para 50 esquejes). En la propagación por división de pie, siete plantas se dividieron, se retiró la tierra de la raíz, se separó en manojos que llevaban parte aérea y raíz. Cada división se colocó en una bolsa con tierra de 15 x 20 cm. Las plantas que se propagaron por esqueje se sembraron en el jardín CENIVAM y las propagadas por división de pie en un terreno de 9,3 x 7 m. La siembra se realizó de acuerdo con la figura 1.

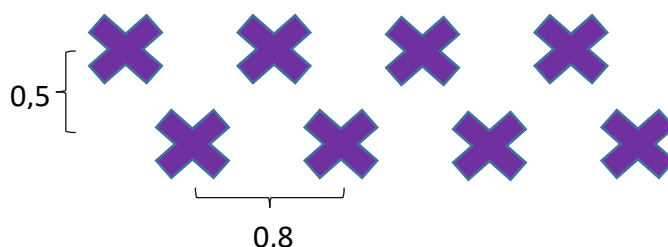


Figura 1: Modelo de siembra, separación entre surcos de 0,5 m y entre planta de 0,8 m.

Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La hidrodestilación asistida por la radiación de microondas se realizó en un aparato tipo Clevenger, con trampa Dean-Stark, adaptado a un horno microondas *Samsung* modelo AMW0113M con potencia de salida de 1200 W y frecuencia de radiación 2,5 GHz. El material vegetal se recolectó, se pesó y se disminuyó el tamaño de partícula. 296 g de material vegetal y 150 g de agua se colocaron en un matraz balón de 2 L. El matraz se colocó en el microondas, con una alargadera se unió a la trampa Dean-Stark. Las hidrodestilaciones se realizaron en tiempos de 15 min, por triplicado a 660 Watts. El aceite obtenido se secó en una pipeta Pasteur con sulfato de sodio anhidro y se guardó en refrigeración a 4 °C.

Obtención de aceite esencial por arrastre con vapor a escala piloto

El aceite esencial de *T. lucida*, se obtuvo por arrastre con vapor en equipos de 100 y 400 L con tapa en cuello de cisne conectado a un condensador de tubos y carcaza, el vapor se

generó en una caldera pirotubular teknik de 6 BHP. El equipo se purgó por 15 min, posteriormente, el material vegetal se pesó y se colocó en el destilador, se cerró y se abrió poco a poco el flujo de vapor. El flujo del condensado se estableció al medir el volumen obtenido en 1 min. La destilación en el equipo de 100 L se llevó a cabo por dos horas, con un flujo de condensado de 120 mL/min y presión de vapor de la caldera de 80 PSI. Mientras que en el equipo de 400 L el flujo de condensado fue de 500 mL/min. A los tres meses, se obtuvieron 10 kg de material vegetal. A los seis meses, se obtuvieron 31 kg, los cuales se dividieron en dos, se cambió la altura del material vegetal para la destilación, uno fue de 0,7 y el otro de 0,4 m. A los nueve meses se obtuvieron 33 kg, en el proceso se colectaron fracciones cada 15 min.

Al finalizar el proceso, la llave de paso del vapor se cerró, el aceite se separó del hidrolato, se secó con sulfato de sodio anhidro y se guardó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Obtención de extractos de *T. lucida*

Los extractos se obtuvieron mediante maceraciones con disolventes de diferente polaridad. La planta se dejó secar a la sombra en el vivero. La planta se pesó y se colocó en un frasco de vidrio por separado, ahí se le adicionó el disolvente hexano, diclorometano o metanol, se dejaron macerar por tres días, se filtraron y se concentraron en un rotavapor Heidolph™ a 27 °C, 80 rpm y 250 mbar para el hexano, 40 °C, y 80 rpm para el diclorometano y 35 °C, 60 rpm y 250 mbar para el metanol. El proceso se realizó tres veces.

Una vez obtenido, el extracto se colocó en un frasco limpio y etiquetado, donde se dejó hasta peso constante para asegurar que no hubiera residuos de disolvente y se obtuvo el rendimiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos de *T. lucida*.

Disolvente	Peso del material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	34	0,2	1
Diclorometano	33	1	2
Metanol	25	3	1

Microextracción en fase sólida (SPME)

Tres mg de extracto o 0,3 g de hojas en fresco se pesaron, cada muestra se colocó en calentamiento a 60 °C junto con 2 mg de tetradecano (patrón interno). Una fibra Carboxen/PDMS se colocó 5 s en el tetradecano y luego se colocó en la muestra de extracto u hojas, donde se expuso por 30 min. Después la fibra se insertó en el GC-MS (Agilent Technologies (AT) 6890 Plus) (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network a 250 °C por 15 min para la desorción de los volátiles.

Caracterización química por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

La identificación de los compuestos del AE se determinó en un equipo GC Agilent Technologies (AT) 6890 Plus (Palo Alto, California, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas AT MSD 5973 Network. La separación de los componentes se realizó en dos columnas capilares, una, con fase estacionaria apolar 5 %-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm d_f; y, otra, con fase estacionaria polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm d_f, en ellas, se empleó helio como gas de arrastre. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C, modo de inyección *split* (30:1). La temperatura del horno se programó de 45 a 150 °C, a 4 °C/min, se aumentó a 250 °C (5 min), a 5 °C/min, y a 275 °C (15 min) a 10 °C/min. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV. La identificación de los compuestos del aceite se realizó por comparación de los espectros de masas y los índices de retención lineales experimentales, con los de las bases de datos ADAMS, NIST y WILEY y los reportados en la literatura (Babushok *et al.*, 2011).

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de extractos de *T. lucida*, se determinó con dos métodos: Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) y decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

A 10 mg (10 000 ppm) de extracto se le adicionó 1 mL de metanol HPLC. Los extractos se sonicaron por media hora y, luego, se centrifugaron por 15 min.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. La reacción contuvo 25 μ L de extracto a 60 o 120 ppm, respectivamente, en *buffer* de fosfato 75 mM, pH 7,4, 150 μ L de fluoresceína ($8,16 \times 10^{-5}$ mM) y 25 μ L de AAPH [2,2'-azobis(2-amidino-propano)-dihidrocloreto]. La fluorescencia se determinó a $\lambda=490$ nm de excitación y $\lambda=510-570$ de emisión con un lector de microplacas Turner Biosystems Inc., Modulis™//Microplate Multimode Reader. El Trolox® (160 μ M en *buffer* de fosfato 75 mM) se utilizó como estándar. Los resultados se expresaron en μ M de Trolox®/mg de extracto o AE.

Decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

Una disolución del catión-radical ABTS^{•+} se preparó a partir de las soluciones de ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM). La mezcla se homogeneizó en ultrasonido por 30 min y se guardó por 24 h a 4 °C, en ausencia de luz. A partir de esta disolución, se preparó un *stock* de trabajo con absorbancia $0,710 \pm 0,003$. Los extractos, se diluyeron en etanol hasta que se adicionó a cierto volumen de la solución de trabajo de ABTS^{•+}, resultó en una inhibición entre el 10 y 90% del blanco de absorbencia. La respuesta-concentración de los extractos, se calculó como porcentaje de la absorbencia del catión-radical ABTS^{•+} sin inhibir (blanco de reacción). La absorbencia se determinó a $\lambda=750$ nm con un lector de microplacas Turner Biosystems Inc., Modulis™//Microplate Multimode Reader. El Trolox® (1000 μ M en agua Tipo I) se utilizó como estándar.

Isomerización de estragol a anetol

La reacción de isomerización de estragol a anetol se realizó con aceite esencial de *T. lucida*, con la metodología descrita por Kadarohman *et al.*, 2008 con algunas modificaciones. En un matraz balón de dos bocas se colocaron 1,2 g de hidróxido de potasio (0,71 M), se disolvió en 30 mL de etanol al 96%, posteriormente, se adicionó 1 mL de aceite esencial y se colocó en agitación por 2 h a 80 °C. Después de las 2 h, se retiró el matraz y se dejó enfriar a temperatura ambiente, se neutralizó el hidróxido de potasio con 3 mL de HCl al 25%. El

producto de la reacción se extrajo con diclorometano y agua. Por último, se concentró en un rotavapor (Heidolph instruments, Basis Hei-VAP HL, Alemania) y se analizó por GC-MS.

Análisis de datos

El aceite esencial y los extractos obtenidos de *T. lucida* se analizaron por GC-MS y SPME por duplicado y se reportó el porcentaje de área relativa de cada compuesto respecto al estándar interno (*n*-tetradecano). La actividad antioxidante se realizó por triplicado. La reacción de isomerización se llevó a cabo por triplicado y se analizó el producto de la reacción (estragol, *trans*-anetol y *cis*-anetol) por GC-MS por duplicado.

RESULTADOS

Propagación de *Tagetes lucida*

La planta *T. lucida* se propagó por dos técnicas: (1) esqueje y (2) división de pie. Los esquejes, se colocaron en bandejas en donde la supervivencia fue de 95% en un mes. Posteriormente, se trasplantaron a bolsa, donde la supervivencia fue de 73% en un mes. Por último, estas se colocaron en suelo, la supervivencia fue de 67%, con un tamaño de 30 cm de altura. En la división de pie, las plantas divididas se colocaron en bolsa y lograron una supervivencia de 98% en un mes. Después, se colocaron en suelo y la supervivencia fue de 95%, con un tamaño entre 40 y 60 cm de altura a los dos meses (Figura 2). Acosta de la Luz y col., 2010 propagaron *T. lucida* por estacas de yemas terminales y obtuvieron un porcentaje de supervivencia alrededor del 98% en campo, las plantas no superaron los 60 cm de altura.



Figura 2. Cultivo de *T. lucida* a los tres meses del trasplante a suelo, plantas en floración. Ubicación: 7°08'31,8"N, 73°07'07,0"O.

Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La hidrodestilación asistida por la radiación de microondas es un método para obtención de aceites esenciales sustentable que utiliza agua como solvente, tiene menor consumo de energía y es más rápido (Chemat *et al.*, 2012). Los aceites esenciales de orégano, romero, albahaca, ylang-ylang y estragón de invierno se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Los rendimientos se encontraron entre los 0,2 a 2,7% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de rendimiento obtenido con diferentes especies vegetales por la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

Material vegetal	Nombre científico	Familia	Rendimiento (%)
Orégano	<i>Lippia origanoides</i>	Verbenaceae	2,7
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	0,6
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	0,2
Ylang-ylang	<i>Cananga odorata</i>	Annonaceae	0,6
Estragón de invierno	<i>Tagetes lucida</i>	Asteraceae	0,5

La cantidad de agua que se adiciona a la muestra, se debe considerar para la extracción de aceite por esta técnica, debido a que hay material vegetal con un elevado contenido de agua y material vegetal seco. Cuando el material vegetal se destila en fresco, la cantidad de agua que se sugiere adicionar es la mitad de su peso y cuando el material vegetal está seco, adicionar el triple de su peso de agua. La compactación del material vegetal se debe evitar si el tamaño de la muestra es pequeño, porque puede llegar a quemarse.

El aceite esencial de *T. lucida* se analizó cada mes y se identificaron once compuestos (Cuadro 3). La planta se encontraba en floración en los meses de octubre, noviembre, diciembre y enero. En el mes de marzo, comenzó de nuevo a florecer y en este mes se encontraron todos los compuestos. Los compuestos β -mirceno, β -ocimeno, metil chavicol y germacreno D se encuentran presentes en el aceite todo el año, destaca el metil chavicol como compuesto mayoritario (>96%). Reglado *et al.*, en el 2011 obtuvieron el aceite esencial de la hoja de *T. lucida* y reportaron como compuesto mayoritario al metil chavicol con el 96,8%. Mientras que, Omer *et al.*, en el 2017 identificaron 22 compuestos, de los cuales destaca el metil chavicol con 93 y 94% de área cromatográfica de plantas crecidas en Bilbas y Nubaria, Egipto, respectivamente.

Cuadro 3. Análisis de la composición química del aceite esencial de *T. lucida* en diferentes meses.

Componente	Índices de retención lineales		GC Área relativa (%)								
	DB-5*	DBWax**	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
β -Mirceno ^{a,b}	989	1160	0,4±0,09	0,4±0,05	0,4±0,05	0,6±0,13	0,6±0,08	0,4±0,08	0,53±0,009	0,8±0,03	0,4±0,07
β -Ocimeno ^{a,b}	1047	1248	0,144±0,006	0,2±0,03	0,2±0,01	-	0,2±0,08	0,2±0,12	0,20±0,003	0,302±0,0003	0,1±0,02
Linalol ^{a,b}	1098	1541	-	-	0,1±0,01	-	-	0,1±0,07	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01
Metil chavicol ^{a,b,c}	1205	1666	96,8±0,58	96,7±0,13	96,8±0,27	97,1±0,5	96,9±0,29	97±0,5	98±0,1	97,7±0,02	98±0,1
Anetol ^{a,b,c}	1292	1818	-	-	0,1±0,02	-	-	-	-	-	-
Eugenol ^{a,b}	1371	2186	-	-	0,1±0,02	-	-	-	-	-	0,07±0,002
β -Cariofileno ^{a,b}	1432	1601	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06±0,0001
β -Farneseno ^{a,b}	1454	1651	0,1±0,09	0,15±0,013	0,2±0,01	0,2±0,1	0,1±0,04	0,1±0,06	-	-	0,10±0,002
Germacreno D ^{a,b}	1492	1711	0,3±0,08	0,2±0,04	0,2±0,02	0,2±0,05	0,30±0,008	0,2±0,12	0,2±0,02	0,15±0,005	0,25±0,008
α -Farneseno ^{a,b}	1504	1743	0,3±0,19	0,1±0,02	0,1±0,02	-	0,2±0,01	0,1±0,06	-	-	0,12±0,001
7-Metoxicumarina ^{a,b}	1740	2910	-	0,2±0,05	0,1±0,04	-	-	-	-	-	0,071±0,009

*Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5 (60 m)

**Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-WAX (60 m)

a Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales

b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV)

c Identificación basada en el uso de sustancias de referencia



Obtención de extractos de *T. lucida*

Los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de *T. lucida* se obtuvieron por medio de maceración, para ello, se utilizó material vegetal secado a la sombra. Los rendimientos variaron de 0,6 a 2% (Cuadro 1) Los compuestos volátiles se identificaron por SPME y se determinó la actividad antioxidante.

Identificación de los compuestos volátiles de *T. lucida* por microextracción en fase sólida

Extractos de *T. lucida* con diferentes solventes se obtuvieron y se identificaron los compuestos volátiles por microextracción en fase sólida. También, hojas en fresco se analizaron. 25 compuestos se identificaron en total, la mayoría se encontraron en las hojas en fresco, 13 en el extracto hexánico, ocho en el extracto diclorometánico y dos en el extracto metanólico. El metil chavicol y anetol se encontraron en las hojas en fresco, en el extracto hexánico y en el extracto diclorometánico. El *p*-alilfenol está presente en las hojas frescas y en todos los extractos. La cumarina solo se identificó en el extracto metanólico (Cuadro 4).

Cuadro 4. Compuestos volátiles en hojas en fresco y extractos obtenidos con hexano, diclorometano y metanol de *T. lucida*.

Compuesto	Índices de retención lineales		GC Área relativa (%)			
	DBWax*	[Ref.]	Hoja fresca	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico	Extracto metanólico
<i>trans</i> -3-Hexenal ^{a,b}	1141	1139	0,1±0,02	-	-	-
β-Mirceno ^{a,b}	1162	1160	1,4±0,5	-	-	-
<i>trans</i> -2-Hexenal ^{a,b}	1218	1216	0,1±0,02	-	-	-
<i>trans</i> -β-Ocimeno ^{a,b}	1250	1250	0,4±0,12	-	-	-
α-Copaeno ^{a,b}	1496	1491	-	0,2±0,03	-	-
Linalol ^{a,b}	1544	1543	0,12±0,02	-	-	-
α-Bergamoteno ^{a,b}	1586	1559	-	0,2±0,03	-	-
<i>trans</i> -β-Farneseno ^{a,b}	1662	1663	-	4,1±0,35	8±1,6	-
Metil chavicol ^{a,b,c}	1683	1671	48±3,6	84±5,5	61±9,9	-
Germacreno D ^{a,b}	1717	1708	-	0,2±0,03	1±0,4	-
Anetol ^{a,b,c}	1833	1826	50±48	0,6±0,4	5±0,8	-
Alcohol fenil etílico ^{a,b}	1910	1922	-	0,1±0,08	-	-
Metil eugenol ^{a,b}	2007	2006	-	0,3±0,2	-	-

Óxido de cariofileno ^{a,b}	2008	1986	-	-	0,3±0,23	-
<i>p</i> -anisaldehído ^{a,b}	2029	2010	-	0,3±0,07	3±0,7	-
Triacetina ^{a,b}	2075	2103	-	-	0,6±0,13	-
1-(4-Metoxifenil)-1-propanona ^{a,b}	2215	-	-	1±0,2	-	-
<i>p</i> -Alilfenol ^{a,b}	2339	2337	0,1±0,03	2±0,8	6±5,2	18±7,8
7-Metoxicumarina ^{a,b}	2910	2910	-	-	-	46±17,5

*Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-WAX (60 m)

a Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales

b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV)

c Identificación basada en el uso de sustancias de referencia

[Ref.] Babushok *et al.*, 2011

Actividad antioxidante ORAC y ABTS

La actividad antioxidante de los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de *T. lucida* se evaluó por dos métodos, capacidad de absorción de los radicales oxígeno (ORAC) y decoloración del catión-radical ABTS^{••} (ABTS). En ambos casos, el extracto metanólico mostró mayor actividad, cinco veces más alta que las sustancias de referencia BHT y α -tocoferol en el ensayo ORAC, mientras que, en ABTS, las sustancias de referencia tuvieron mayor actividad. Los métodos ORAC y ABTS exploran mecanismos de transferencia protónica o transferencia electrónica, respectivamente (Huang *et al.*, 2005), por lo tanto, al haber actividad por el método ORAC de los compuestos contenidos en el extracto, el probable mecanismo por el que actúan es por transferencia de protones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *T. lucida*.

Muestra	ORAC	ABTS
	$\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g de extracto}$	
Extracto hexánico	---	34 ± 0,5
Extracto diclorometánico	410 ± 14	112 ± 1
Extracto metanólico	2821 ± 20	134 ± 6
BHT	660 ± 4	1827 ± 5
α -Tocoferol	550 ± 13	924 ± 8

Caracterización química del aceite esencial de *T. lucida* obtenido por arrastre con vapor a escala piloto

El aceite esencial de *T. lucida* se obtuvo a escala piloto en un alambique de 100 y 400 L. El material vegetal se cortó de forma manual con tijeras de poda, a los seis y nueve meses de colocar las plantas en suelo. Dos destilaciones se realizaron en el alambique de 100 L con 15,5 kg de material vegetal. En la primera destilación (D1), el material tenía una altura en el alambique de 0,7 m y en la segunda destilación (D2), el material se compactó a una altura en el alambique de 0,4 m. El rendimiento del aceite esencial fue de 0,8% a la altura de material vegetal de 0,7 m y de 0,9% a la altura de material vegetal de 0,4 m. El aceite esencial se colectó en fracciones cada 15 min, en la D2 se obtuvo mayor cantidad de aceite esencial que en la D1 y en menor tiempo, la mayor extracción se llevó a cabo con el material a la altura de 0,4 m en 60 min. (Figura 3). En la identificación por GC-MS, se encontraron nueve compuestos, β -mirceno, β -ocimeno, linalol, metil chavicol, β -farneseno, germacreno D, α -farneseno, δ -cadineno y elemol. El metil chavicol, destaca por ser el compuesto mayoritario con un área relativa superior al 96%, el β -mirceno, β -ocimeno y linalol, se obtuvieron en los primeros 30 min., mientras que, el resto fue después de los 45 min (Cuadro 6). También, en la destilación a 0,4 m a los 30 min, el aceite contiene solo tres compuestos (Figura 4). En el alambique de 400 L se procesaron 33 kg de material vegetal y el rendimiento fue de 0,8%. Ocho compuestos se identificaron, destacando el metil chavicol como el mayoritario, en esta destilación no aparecieron el δ -cadineno y elemol (Cuadro 7).

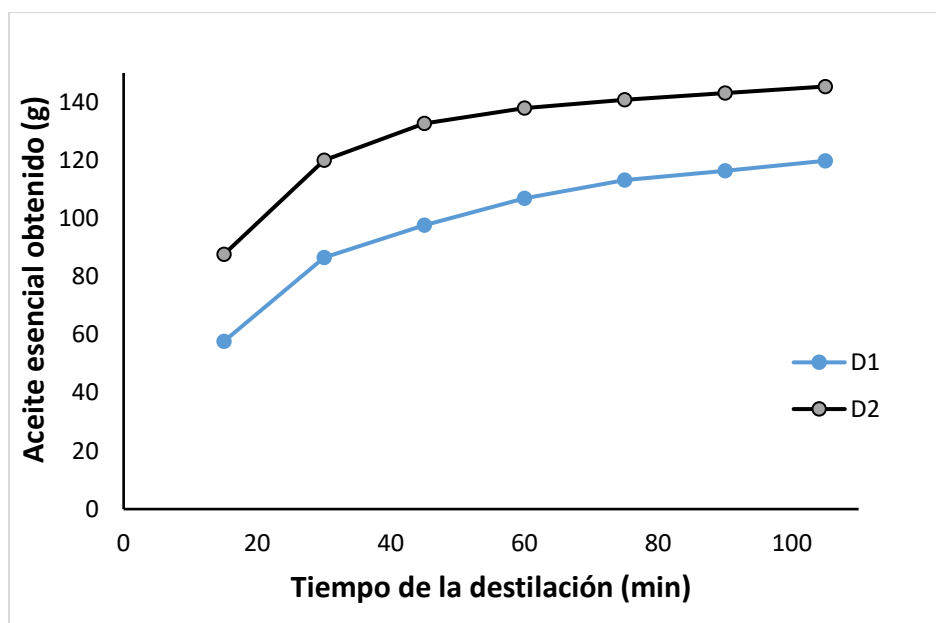


Figura 3. Fracciones del aceite esencial de *T. lucida* obtenidas a diferentes tiempos por arrastre con vapor.

Cuadro 6. Identificación química de los compuestos presentes en el aceite esencial de *T. lucida* obtenidos en diferente tiempo por arrastre con vapor en un alambique de 100 L.

Componente	Índices de retención lineales		GC Área relativa (%), tiempo de destilación (min)													
			15		30		45		60		75		90		105	
	DB-5*	DBWax**	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
β -Mirceno ^{a,b}	989	1160	0,13 ±0,003	0,09 ±0,007	0,6 ±0,03	0,3 ±0,02	0,7 ±0,11	0,4 ±0,05	0,5 ±0,05	0,4 ±0,03	0,4 ±0,03	0,3 ±0,06	0,35 ±0,001	0,3 ±0,02	0,3 ±0,04	0,4 ±0,004
β -Ocimeno ^{a,b}	1047	1248	0,04 ±0,00004	0,03 ±0,002	0,2 ±0,007	0,1 ±0,001	0,2 ±0,02	0,1 ±0,01	0,2 ±0,01	0,11 ±0,004	0,12 ±0,006	0,1 ±0,01	0,11 ±0,001	0,12 ±0,002	0,09 ±0,005	0,14 ±0,0001
Linalol ^{a,b}	1101	1543	0,06 ±0,0008	0,03 ±0,002	0,03 ±0,001	-	0,02 ±0,002	-	0,02 ±0,0004	-	-	-	-	-	-	-
Metil chavicol ^{a,b,c}	1216	1667	99,2 ±0,09	99,5 ±0,06	98,7 ±0,05	99,2 ±0,03	98,5 ±0,16	99,04 ±0,007	98,6 ±0,004	98,9 ±0,02	98,7 ±0,07	98,6 ±0,19	98,59 ±0,016	98,2 ±0,09	98,2 ±0,11	96,9 ±0,34
β -Farneseno ^{a,b}	1454	1685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33 ±0,002	0,03 ±0,008	0,1 ±0,001	0,07 ±0,004	0,3 ±0,2
Germacreno D ^{a,b}	1493	1712	-	-	-	-	0,1 ±0,001	0,1 ±0,01	0,2 ±0,01	0,2 ±0,02	0,3 ±0,01	0,5 ±0,04	0,36 ±0,0001	0,7 ±0,05	0,6 ±0,03	1 ±0,2
α -Farneseno ^{a,b}	1505	1741	-	-	-	-	-	-	0,1 ±0,003	0,1 ±0,006	0,1 ±0,002	0,1 ±0,01	0,12 ±0,003	0,2 ±0,01	0,22 ±0,006	0,4 ±0,04
δ -Cadineno ^{a,b}	1527	1755	0,03 ±0,006	-	-	-	-	-	0,02 ±0,001	-	0,02 ±0,0007	-	0,04 ±0,003	0,04 ±0,003	0,05 ±0,002	0,1 ±0,01
Elemol ^{a,b}	1559	2075	-	-	-	-	-	-	-	0,02 ±0,004	-	0,04 ±0,003	-	0,04 ±0,003	0,04 ±0,003	0,07 ±0,004

*Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5 (60 m)

**Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-WAX (60 m)

a Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales

b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV)

c Identificación basada en el uso de sustancias de referencia



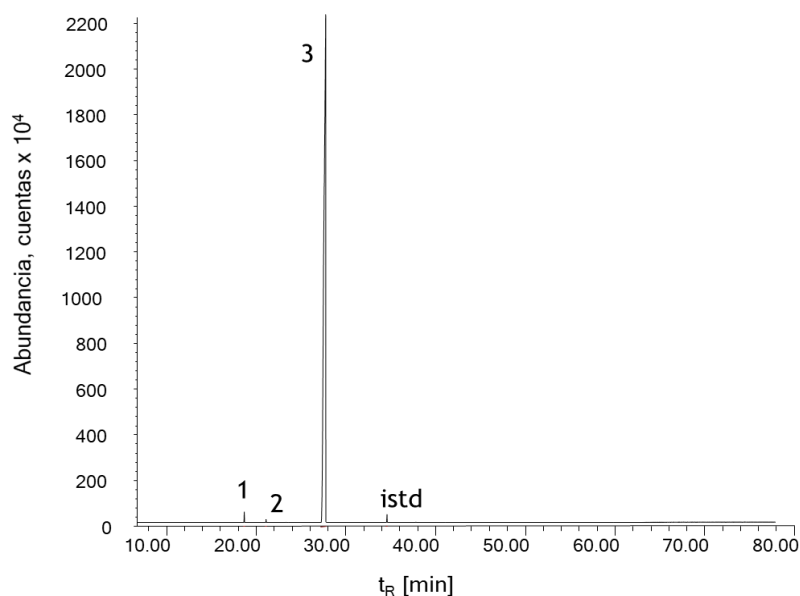


Figura 4. Cromatograma de la fracción obtenida a los 30 min de la destilación con 0,4 m de altura de material vegetal (D2). Las señales cromatográficas (picos) corresponden a (1) β -mirceno, (2) β -ocimeno, (3) metil chavicol y (4) istd.

Cuadro 7. Identificación química de los compuestos presentes en el aceite esencial de *T. lucida* obtenidos en diferente tiempo por arrastre con vapor en un alambique de 400 L.

Componente	Índices de retención lineales		GC Área relativa (%), tiempo de destilación (min)						
	DB-5*	[Lit.]	15	30	45	60	75	90	105
β -Mirceno ^{a,b}	989	989	0,2 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,009	1,5 $\pm$ 0,112	1,6 $\pm$ 0,15	1,3 $\pm$ 0,21	1 $\pm$ 0,02	0,8 $\pm$ 0,32
β -Ocimeno ^{a,b}	1047	1037		0,1 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,12
Linalol ^{a,b}	1101	1086	0,2 $\pm$ 0,01						
Metil chavicol ^{a,b,c}	1216	1195	96 $\pm$ 0,2	97 $\pm$ 0,2	96 $\pm$ 0,1	94 $\pm$ 0,12	93 $\pm$ 1,4	91 $\pm$ 0,9	91 $\pm$ 0,7
Carvacrol ^{a,b}	1302	1300	1,3 $\pm$ 0,06		0,4 $\pm$ 0,07		0,6 $\pm$ 0,14	2 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,5
β -Farneseno ^{a,b}	1454	1445					0,22 $\pm$ 0,055	0,4 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,3
Germacreno D ^{a,b}	1493	1480			0,3 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,009	2 $\pm$ 0,4	3 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 2,7
α -Farneseno ^{a,b}	1505	1504				0,24 $\pm$ 0,003	0,5 $\pm$ 0,05	1 $\pm$ 0,13	2 $\pm$ 1,1

*Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5 (60 m)

a Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales

b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV)

c Identificación basada en el uso de sustancias de referencia

[Ref.] Babushok *et al.*, 2011

Conversión de estragol a anetol

La isomerización de estragol a anetol en el aceite esencial de *T. lucida*, se llevó a cabo en presencia de hidróxido de potasio que funciona como catalizador. Los productos de reacción de isomerización obtenidos fueron *cis*-anetol y *trans*-anetol, los valores que se obtuvieron fueron 9,7 y 83,5% de área relativa, respectivamente (Cuadro 7). Kadarohman et al., en el 2008, utilizaron al KOH como catalizador en la isomerización del estragol puro, ellos obtuvieron como productos finales de la reacción 20,11% de *cis*-anetol y 75,69% de *trans*-anetol. En este estudio, una similitud se observó en la presencia de los productos, aunque se observaron diferencias numéricas en las proporciones de ellos. En general, una observación similar se obtuvo.

Cuadro 8. Área relativa de los compuestos identificados después de la reacción del aceite esencial de *T. lucida* con KOH.

Compuesto	Índices de retención lineales		Área relativa (%)	µg/mL
	DB-5*	[Ref.]		
Metil chavicol ^{a,b,c}	1206	1195	5±4	3861
<i>cis</i> -Anetol ^{a,b}	1263	1249	9,7±2,5	15 976
<i>trans</i> -Anetol ^{a,b,c}	1298	1282	83±6,7	1049

*Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5 (60 m)

a Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales

b Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV)

c Identificación basada en el uso de sustancias de referencia

[Ref.] Babushok et al., 2011

REFERENCIAS

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Salameh, A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3208-3213.
- Acosta de la Luz, L., Rodríguez Ferradá, C., Hechevarría Sosa, I., Milanés Figueredo, M., 2010. Determinación de la fecha de plantación en *Tagetes lucida* Cav. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(4): 236-245.
- Babushok, V.I., Linstrom, P.J., Zenkevich, I.G. 2011. Retention índices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4). doi:10.1063/1.3653552.
- Bautista, S., Garcia D.E., Barrera, N.L., Reyes C.R., Wilson, C.L. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamúchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 29: 81-92.
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G. 2012. Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 8615-8627.
- Espinoza-Madrigal, R.M., Flores-García, A., del Rio, R.E., Martínez-Pacheco, M.M. 2017. Efecto antifúngico de *Tagetes lucida*". Memorias 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales.
- FAO. 2015. Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: www.fao.org/publications.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20: 338 - 343.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Kadarohman, A., Dwiyantri, G., Muchalal, M., Astuti, R.M. 2008. Study of reaction pathway and kinetic of estragole isomerization to *cis*-anethole and *trans*-anethole. *Journal of Mathematics and Natural Sciences*, BIMIPA, 18(1).

- Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V.V., Stashenko, E.E. 2009. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, vol. 41, num. 3. Pp. 287-294.
- Omer, E.A., Hendawy, S.F., Ismail, R.F., Petretto, G.L., Rourke, J.P. Pintore, G. 2017. Acclimatization study of *Tagetes lucida* L. in Egypt and the chemical characterization of its essential oils. *Natural Product Research*, 31(13): 1509-1517.
- Pino-Benítez, N., Stashenko, E.E. 2009. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 8, num. 2. Pp. 145-150.
- Regalado, E.L., Fernández, M.D., Pino, J.A., Mendiola, J., Echemendia, O.A. 2011. Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucida* Cav. From Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 23(5): 63-67.

7. DISCUSIÓN

El fruto del aguacate es un alimento perecedero, susceptible a la pudrición peduncular ocasionada por un consorcio de hongos. Los agroquímicos dan protección al decaimiento en pre y poscosecha. Sin embargo, su uso se encuentra delimitado por los países importadores, debido a la legislación de inocuidad alimentaria. Esto, propicia la oportunidad comercial y académica para proponer componentes vegetales como principios activos de una formulación para el control de la pudrición peduncular de aguacate y su conservación hasta su consumo. Los hongos de la pudrición peduncular se detectan aún con los tratamientos preventivos en campo, muestra de ello, son las pudriciones que se observan en los frutos cuando maduran. El por qué no se eliminan en su totalidad aún no se elucida, una razón es la resistencia y la forma de aplicación de los fungicidas que se utilizan para su control, o bien, los hongos exhiben un comportamiento endofítico.

Cuatro posibles vías de infección se proponen que se llevan a cabo para iniciar la pudrición peduncular: 1) el patógeno llega a las flores y permanece en dormancia hasta que el fruto madura, 2) el sitio de infección es menos resistente o tiene un microambiente favorable para el desarrollo de la infección, 3) el patógeno es endófito de ramas y tronco del árbol y luego crece dentro del fruto y 4) las esporas o fragmentos de micelio presentes dentro o en la superficie de las células externas del pedúnculo llegan al xilema en la cosecha y crecen dentro del fruto al madurar (Hartill y Everett, 2010).

En el mundo se reportan diversos géneros fúngicos que ocasionan la pudrición peduncular en el aguacate. En Chile se reportan especies de la familia Botryosphaeriaceae (Valencia et al., 2019), en Sudáfrica a *Colletotrichum* y *Lasiodiplodia* (Obianom y Sivakumar, 2018), en Sri Lanka a *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis* y *Phoma* (Madhupani y Adikaram, 2017), en Italia a *Neofusicoccum*, *Diaporthe* y *Colletotrichum* (Guarnaccia et al., 2016), en Brasil a *Neofusicoccum parvum* y *Botryosphaeria dothidea* (Firmino et al., 2016) en Colombia a *Colletotrichum* y *Phomopsis* (Ramírez et al., 2015), en Estados Unidos a *Nectria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Glomerella* y *Lasiodiplodia* (Twizeyimana et al., 2013). En la región aguacatera michoacana se ubicaron cuatro géneros de hongos causales de pudrición peduncular; *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Oligoporus* y *Phomopsis* (Vidales-Fernández y Sánchez-Pérez, 1991).

La sensibilidad de los aislados fúngicos a cuatro fungicidas que se utilizan para su control en campo se evaluó en dos ambientes: *in vitro* e *in situ*. *In vitro*, la resistencia de los aislados fúngicos se observó. El género *Colletotrichum* destacó por su dominancia y ausencia de sensibilidad (resistencia). Por ello, su disminución o eliminación aún es un reto por alcanzar. La evolución de la insensibilidad a los fungicidas en un caso de adaptación microbiana a una presión de selección. Los fungicidas pueden eliminar a gran parte de la población fúngica, pero algunas esporas exhiben menor sensibilidad. Un hecho con el que se distingue una cepa tolerante que al estar expuesta a la presión de selección logra resistir la presencia del fungicida (Ortiz-Hernández et al., 2013). En el experimento *in situ*, hubo control de la enfermedad con los fungicidas. Sin embargo, el uso de estos fungicidas se encuentra estrictamente regulado por las agencias nacionales e internacionales del país exportador como del país importador del fruto de aguacate, por ello, las sustancias GRAS, son una alternativa porque cumplen con la reglamentación para su uso seguro en alimentos.

El bicarbonato de potasio es una sustancia GRAS conocida por su uso antifúngico poscosecha en alimentos (NOM-037-FITO-1995, FDA). En un experimento *in situ*, el bicarbonato de potasio, disminuyó la severidad de la enfermedad. Carbonatos y bicarbonatos se aplicaron a frutos de aguacate Hass por el método de inmersión y aspersión y controlaron la antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides* (Smith et al., 2011; Espinoza Madrigal et al., 2018). En nuestro modelo de desarrollo de la enfermedad, en el sitio de unión del fruto con el pedúnculo, después de ser removido, se expuso directamente al hongo para asegurar la interacción patógeno-hospedero. En frutos inmaduros no se aprecia micelio, esto no limita que esporas se encuentren presentes en estado de latencia. Por ello, la confirmación de la efectividad del bicarbonato de potasio con esporas se ensayará en el futuro próximo. Además, en el mejor método de aplicación del bicarbonato de potasio en los frutos se está trabajando. Este modelo de evaluación de la enfermedad a escala laboratorio, se propone llevarlo a cabo en otro nivel del desarrollo tecnológico; un espacio que simule las condiciones de almacenamiento, tal como ocurre en las empacadoras. Esta línea de investigación, contribuye a extrapolar estas observaciones a otros frutales climatéricos y no climatéricos para disminuir las pérdidas poscosecha ocasionadas por microorganismos.

Otra perspectiva, es elucidar la evolución de la resistencia a los fungicidas y dar seguimiento al consorcio fúngico para contribuir a las prácticas de manejo en el uso de antifúngicos

precosecha. El entendimiento del proceso de defensa del fruto de aguacate podría ayudar al manejo de la micosis. Como es el caso de los dienos antifúngicos que el mismo fruto produce, cuya presencia disminuye con la maduración (Bowen et al., 2018). Sin embargo, esto no limita su uso en poscosecha. En frutos inmaduros de aguacate se demostró que los dienos inhiben el desarrollo de apresorios o conidios de *C. gloeosporioides* (Prusky et al., 1991). Por tanto, los dienos procedentes del deshecho semisólido en la fabricación de productos derivados de aguacate es una oportunidad para el manejo del aguacate en poscosecha y adicionalmente en el manejo del fruto residual.

Esta observación condujo a seleccionar derivados vegetales. A partir de un grupo de sustancias GRAS para el control de la PPA, Aun cuando, existen diferentes categorías de moléculas GRAS cuya actividad antifúngica en el fruto de aguacate se desconoce. Aunado a ello, el objetivo es que estas sustancias no modifiquen las características organolépticas, cualidades importantes para la venta y compra del fruto.

Las Caesalpinias son árboles endémicos de la región y pertenecen a la familia Fabaceae (Sarukhán, 2017), se empieza a conocer su fitoquímica. De ellos, llaman la atención, aquéllos con múltiples usos. Por ejemplo, los que se utilizan como cercos vivos, porque además de delimitar físicamente un espacio, brindar sombra, son ornamentales, repelen insectos, lo que nos indica que producen metabolitos secundarios con potencial para ser investigados. Aunque, no todas las especies de *Caesalpinia* evaluadas mostraron actividad antifúngica, no se descarta que presenten otro tipo de actividad como repelente de insectos, antibacteriana, citotóxica y alelopática.

En México, *C. coriaria* conocida como cascalote, es una excelente fuente de fenólicos como el ácido gálico y tánico. Los cuáles, en la industria de la tenería se usan y presentan actividad antioxidante. Extractos hidroalcohólicos de las semillas de este árbol se obtuvieron. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos, en la semilla presentaron efecto fungiestático tanto *in vitro* e *in vivo* con el hongo *C. lindemuthianum* (Veloz-García et al., 2010). Además, el ácido tánico obtenido de la hoja de *C. coriaria*, por sus propiedades antioxidantes se usó para estabilizar nanopartículas de plata que presentaron efecto antimicrobiano (Jeeva et al., 2014), otro uso para el desarrollo de productos. En este trabajo, *C. coriaria*, inhibió a los hongos de la PPA tanto *in vitro* como *in situ* (frutos de aguacate). La parte de la planta con metabolitos antifúngicos efectivos fue la flor. El escaso rendimiento

en la obtención del extracto dificulta continuar el estudio químico, pero no se descarta su uso combinado con otras sustancias GRAS. En sus extractos metanólicos de hoja y fruto se encuentran diversos grupos químicos como los taninos, carbohidratos, saponinas, flavonoides, alcaloides, fenólicos, glucósidos, proteínas y aminoácidos. Algunas propiedades antimicrobianas (Anandhi et al., 2014) y citotóxicas se le reportan (Sánchez-Carranza et al., 2017). Sin embargo, la separación de los compuestos presentes en estos extractos, es un proceso complejo, acompañado de la identificación y purificación de estos a quienes se les atribuye el efecto observado.

De algunas especies de *Caesalpinia* se conoce que contienen moléculas como los vouacapanos o también llamados diterpen cassanos, los cuales presentan actividad antimicrobiana (Baldim-Zanin et al., 2012). Hasta el momento, en este trabajo se confirma que *C. platyloba* y *C. pulcherrima* cuentan con uno. Sin embargo, que otras *Caesalpinias* endémicas los contengan no se descarta. Los diterpen cassanos se distribuyen en varios géneros de la familia Fabaceae (especialmente en el género *Caesalpinia*). Presentan diversas actividades biológicas como anti tumorales, anti maláricos, anti inflamatorios, anti virales, anti microbianas y anti tripanosomiasis (Maurya et al., 2012). El vouacapano que contiene *C. platyloba* mostró efecto antifúngico. El estudio de modificaciones químicas a esta molécula, proporcionará información para incrementar su actividad y evaluar su potencial GRAS y uso en poscosecha.

Otra especie interesante que exhibió efecto antifúngico fue la planta aromática medicinal *Tagetes lucida*. A la cual, todos los aislados fúngicos fueron sensibles *in vitro*. Esta planta tiene diversas propiedades descritas como antimicrobiana (Céspedes et al., 2006), tranquilizante (Pérez-Ortega et al., 2016), antioxidante (Aquino et al., 2002), anti inflamatoria (Monterrosas-Brisson et al., 2019), hipoglucemiante (Abdel-Haleem et al., 2017) y citotóxica. Además, la presencia de cumarinas se reportó (Mejía-Barajas et al., 2012). En los extractos de *T. lucida* se identificaron y aislaron tres cumarinas; la 7-metoxicumarina, la 6,7-dimetoxicumarina y la 2-H-1-benzopiran-2-ona,7-(3-metil-2-buten-1-il), se desconoce si esta última es nueva en el género *Tagetes* y en este momento es un tópico en investigación. También *in vitro*, el aceite esencial presentó efecto antifúngico. *Tagetes* es nativa del Continente Americano, sus especies son cultivadas como plantas ornamentales y estudiadas por sus propiedades medicinales. También, en el campo de la agricultura se estudian por sus

actividades antifúngicas, antibacterianas e insecticidas, por lo que, su cultivo, composición química y propiedades son interesantes (Salehi et al., 2018).

El aceite esencial producido a escala laboratorio no es suficiente para su aplicación a gran escala, debido a que los rendimientos son menores del 1 %. Un método por el cual se obtiene una gran cantidad del aceite esencial es por arrastre con vapor (Arango et al., 2012). Este método se realiza a escala piloto, lo que permite obtener mayor cantidad. En este proceso se propone optimizarlo al modificar los parámetros, flujo de vapor y densidad del material vegetal para la obtención de mayor rendimiento del aceite esencial sin modificar la composición química y escalar su producción a 1:10. Mediante un diseño factorial de experimentos como la metodología de superficie de respuesta para determinar el efecto de los factores de extracción en el rendimiento y contenido del compuesto principal (estragol), como lo reporta Arango et al. (2012) quienes optimizaron el rendimiento y contenido de timol del aceite esencial de orégano.

El análisis de costos de la destilación por arrastre con vapor a escala piloto proporcionaría información en torno a lo factible de la obtención de aceite esencial de *T. lucida*, para el desarrollo de una formulación que disminuya la PPA. Por otra parte, el material vegetal posdestilado es un residuo. A partir del cual, metabolitos no volátiles residuales se pueden extraer, conocer su composición química y evaluar su actividad antifúngica para el aprovechamiento integral de la planta. Por ejemplo, un extracto con CO₂ supercrítico de *Salvia officinalis* L. se obtuvo y se optimizó la extracción de sus antioxidantes (Martínez et al., 2014).

La variabilidad de los compuestos volátiles de la planta, modificada por factores bióticos y abióticos a los que se encuentra expuesta y el estado del desarrollo de la planta, aún quedan por evaluar. Este análisis proporcionaría información de la respuesta de defensa de la planta, la presencia de quimiotipos y la versatilidad química producida en diferentes ambientes.

En México, la planta *T. lucida* crece una vez al año, esto dificulta la obtención de su aceite esencial. Por ello, la propuesta es estudiar su cultivo para propagar la planta en condiciones controladas de invernadero. Para su disseminación en cualquier época del año y extenderlo a otras plantas aromáticas. Al respecto, en los estados mexicanos Morelos y Oaxaca mediante el proyecto Red Cempoalxóchitl se sembró esta especie por semillas y esquejes en terrenos abandonados, sin embargo, el crecimiento aún es anual y silvestre.

Las especies de *Tagetes* que crecen en México se estudian para su aprovechamiento integral y conservación *in situ* y *ex situ* (Serrato-Cruz, 2014). En Cuba, se evaluó el establecimiento de un cultivo de la planta por estacas de yemas terminales, mientras que, en Italia y Egipto, se propagaron por semilla (Acosta de la Luz et al., 2010; Marotti et al., 2004; Omer et al., 2017). La industria de aceites esenciales de plantas aromáticas medicinales en nuestro país es un área de oportunidad para explorar su producción, comercialización y elaboración de productos, para este proyecto una formulación con un derivado natural.

Diferentes sustancias dan lugar a un recubrimiento comestible y se pueden combinar con aditivos antimicrobianos cuyo uso se encuentra permitido por las agencias gubernamentales de México, de Estados Unidos de América (Normas oficiales mexicanas, Food and Drug Administration) e internacional (Codex Alimentarius). De los polímeros que pueden formar un recubrimiento se seleccionó a la quitosana. Este polímero tiene la propiedad de formar pequeñas esferas y encapsular diferentes sustancias en su interior o en la superficie, esto favorece su liberación controlada para prolongar el efecto (Souza et al., 2014). En este universo de estudio no se descarta el uso de otras sustancias GRAS para el control de la PPA y de la pudrición en otros alimentos hortofrutícolas.

El mejor extracto de *T. lucida* en el control fúngico se encapsuló en quitosana. El potencial Z, el tamaño de partícula y el índice de polidispersión se determinaron como indicadores de estabilidad a los cero y tres meses de su elaboración. Sin embargo, en el mejoramiento de esta formulación es necesario evaluar otras características tales como, organolépticas, físico-químicas y microbiológicas, las cuáles, proporcionarían mayor información de la estabilidad de las nanopartículas en suspensión para su producción a mayor escala.

En un ensayo *in situ* se observó una disminución en la severidad de la enfermedad. Debido a que en este experimento, las nanopartículas se colocaron en el sitio de unión del pedúnculo; se sugiere evaluar otros métodos de aplicación. Para que la superficie de contacto aumente y que éste método se replique en un espacio de mayor tamaño que simule las condiciones de almacenamiento del fruto o bien, alguna de las etapas en el proceso de poscosecha. Un recubrimiento comestible con quitosana, carboximetilcelulosa y extracto de hoja de moringa (*Moringa oleífera* Lam.) se aplicó en emulsión a frutos de aguacate Fuerte y Hass, lo cual mejoró la calidad y vida media de los frutos (Tesfay y Magwaza, 2017). También, en perspectiva está, encapsular el aceite esencial. Así como, la evaluación de las características

organolépticas del fruto con la esperanza de que no se alteren por el tratamiento con nanopartículas para que sea aceptado por el consumidor. Aunque, las nanopartículas se encuentren en la superficie del fruto y la cáscara no se ingiere. Aunado a ello, los componentes de la formulación están catalogados como sustancias GRAS, por ello, la propuesta es evaluar la toxicidad aguda y subaguda en modelos animales como lo establece la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). La OCDE es un organismo de cooperación internacional, agrupa a 36 países miembros, entre ellos México y su misión es promover políticas que mejoren el bienestar económico y social de las personas alrededor del mundo. Las directrices de la OCDE para los ensayos de productos, es una colección de alrededor de 150 de los métodos de ensayo acordados a nivel internacional más relevantes utilizados por el gobierno, la industria y los laboratorios independientes para identificar y caracterizar los peligros potenciales de los productos químicos.

Los niveles de madurez de la tecnología (Technology readiness levels TRLS) inicialmente los estableció la NASA. Hoy en día son criterios internacionalmente que acepta y practica el sector industrial para delimitar el grado de madurez de una tecnología. En este contexto, este proyecto se ubica en el nivel 4, que refiere a la validación de componente y/o disposición de los mismos en entorno de laboratorio. El siguiente nivel es la validación del componente y/o disposición del mismo en un entorno relevante. Lo cual, propiciará la producción a escala piloto de nanopartículas y su aplicación en alguna de las etapas poscosecha.

Cualquier sustancia adicionada de manera intencionada a un alimento para conservarlo es un tema controversial. El cambio en el pensamiento en el uso de cualquier sustancia química en alimentos es una limitante para el desarrollo de nuevos productos. Sin embargo, los recubrimientos comestibles son aceptados para su aplicación en algunos frutos. Esto posibilita un estudio de mercado para gestionar con el productor y el comprador el uso de un recubrimiento en el fruto de aguacate. Con la evidencia de su efectividad y que cumpla con la reglamentación en calidad e inocuidad alimentaria sin alterar las características organolépticas del fruto. Para su aceptación por el consumidor y propiciar el desarrollo tecnológico de una formulación que controle la pudrición peduncular.

En conclusión, los resultados de este trabajo y las preguntas señaladas como objetivos del estudio se pueden responder de la siguiente manera para aceptar la hipótesis:

- 1) Los fungicidas pueden eliminar a gran parte de la población fúngica *in vitro* e *in situ*. En el fruto de aguacate, algunos hongos exhiben menor sensibilidad a los fungicidas de los grupos químicos benzimidazoles, sales de cobre y estrobilurinas, mientras que, en el fruto de guayaba a la dicarboximida y ditiocarbamatos. El hongo *C. acutatum* destaca por su resistencia.
- 2) El bicarbonato de potasio como indicador de sustancia GRAS disminuyó la severidad de la pudrición peduncular en frutos de aguacate.
- 3) Algunas especies de *Caesalpinia* presentaron actividad antifúngica *in vitro* e *in situ*, al igual que la planta medicinal *Tagetes lucida*.
- 4) Las Caesalpinias contienen moléculas que las caracterizan; los vouacapanos. *T. lucida* contiene cumarinas.
- 5) La planta medicinal *T. lucida* destacó por su potencial antifúngico, por lo cual, se seleccionó para el desarrollo de nanopartículas con el polímero quitosana.
- 6) Las nanopartículas de quitosana con extracto o aceite esencial de *T. lucida* exhibieron control de la pudrición peduncular.
- 7) Los parámetros de estabilidad de las nanopartículas; potencial Z, tamaño de partícula e índice de polidispersión se determinaron.
- 8) Los componentes que conforman la formulación con nanopartículas de quitosana y el derivado vegetal se encuentran catalogados en el grupo de sustancias GRAS de acuerdo a la FDA y la NOM.
- 9) El control de la pudrición peduncular con una formulación con base en un derivado vegetal, se validó en el entorno de laboratorio.

Por lo tanto, un derivado vegetal con propiedades antifúngicas se encontró en la planta medicinal *Tagetes lucida*, este se encapsuló en quitosana para la generación de nanopartículas. Esta formulación se elaboró con sustancias GRAS y contribuye a controlar la pudrición peduncular en frutos de aguacate.

Estos resultados subrayan la importancia y la necesidad del desarrollo de más experimentos de aplicación, estabilidad, organolépticos, toxicológicos a mediano y largo plazo, optimización y escalamiento. Los estudios de control biológico y preservación de alimentos son la base para el sostenimiento de la salud humana, de la economía y el ambiente en relación con la nanotecnología, los metabolitos secundarios vegetales y la conservación

saludable de los frutos. De la investigación presentada en este estudio, la necesidad de un mayor examen extenso en nanopartículas es clara. Además de los experimentos en ambientes relevantes existe la necesidad de desarrollar y utilizar mejores y rápidas pruebas de detección de efectividad.

8. CONCLUSIÓN

La pudrición peduncular en frutos de aguacate se controla con una formulación que contiene un derivado vegetal de la planta medicinal *Tagetes lucida*.

9. REFERENCIAS

Abdel-Haleem, S.A., Ibrahim, A.Y., Ismail, R.F., Shaffie N.M., Hendawy, S.F., Omer, E.A. 2017. *In-vivo* hypoglycemic and hypolipidemic properties of *Tagetes lucida* alcoholic extract in streptozotocin-induced hyperglycemic Wistar albino rats. *Annals of Agricultural Sciences*, 62: 169-181.

Acosta de la Luz, L., Hecheverría-Sosa, I., Rodríguez-Ferradá, C. 2010. Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1): 38-45.

Anandhi, D., Srinivasan, P.T., Praveen-Kumar, G., Jagatheesh, S. 2014. Influence of flavonoids and glycosides from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) wild as bactericidal compound. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4): 1043-1051. ISSN: 2319-7706.

Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S., Rastrelli, L. 2002. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 65: 1773-1776.

Arango, B.O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, B.A., Toro, I. 2012. Optimization of yield and thymol content of wild oregano essential oil obtained by steam distillation process. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2): 217-226.

Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate México, A. C. (APEAM, A.C.). 2018. <http://www.apeamac.com>.

Balhim-Zanin, J.L., de Carvalho, B.A., Salles-Martineli, P., dos Santos, M.H., Lago, G.J.H., Sartorelli, P., Viegas, Jr. C., Soares, G.M. 2012 The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules*, 17: 7887-7902. DOI:10.3390/molecules17077887.

Bowen, J., Billing, D., Connolly, P., Smith, W., Cooney, J., Burdon, J. 2018. Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of Hass avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 146: 43-50.

Céspedes, C.L., Avila, J.G., Martínez, a., Serrato, B., Calderón-Mugica, J.C., Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of agricultural and food Chemistry*, 54: 3521-3527.

Espinoza Madrigal, R.M., Del Río Torres, R., Flores García A., Martínez Pacheco, M.M. 2018. Potassium Bicarbonate on Stem End Root Avocado (*Persea americana* Mill. Var Hass). *Transylvanian Review*, 26: (30): 8109-8116.

Firmino, A.c., Fischer, I.H., Tozze-Júnior, H.J., Rosa, D.D., Furtado, E.L. 2016. Identification of *Fusicoccum* species causing rot in avocado fruits. *Summa Phytopathologica*, 42(1): 100-102.

Guarnaccia, V., Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G., Polizzi, G. 2016. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with Branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 963-976.

Hartill W.F.T., Everett K.R. (2010). Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of “Hass” avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30 (4): 249-260. DOI: 10.1080/01140671.2002.9514221.

Jeeva, K., Thiagarajan, M., Elangovan, V., Geetha, N., Venkatachalam, P. 2014. *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products*, 52: 714–720.



Madhupani, Y.D.S., Adikaram, N.K.B. 2017. Delayed incidence of stem-end rot and enhanced defences in *Aureobasidium pullulans*-treated avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Journal Plant Diseases and Protection*, 124: 227-234.

Marotti, M., Piccaglia, R., Biavati, B., Marotti, I. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 440–444.

Martínez, J.R., Ruiz, C., Arias, G., Stashenko, E. 2014. Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico. *Revista de la academia Colombiana de Ciencias*, 38: 237-249.

Maurya, R., Ravi, M., Singh, S., Yadav, P.P. 2012. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83: 272-280.

Mejía-Barajas, J. A., Del Rio, R. E. N., Martínez-Muñoz, R. E., Flores-García, A., Martínez-Pacheco, M. M. 2012. Citotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. *Emirates Journal Food and Agriculture*, 24: 142-147.

Menge, J.A., Ploetz, R.C. 2003. Diseases of avocado. In: Ploetz, R.C. (ed.) Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, Cambridge, MA, pp. 35-71.

Monterrosas-Brisson, N., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., Bahena-Pérez, R., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata, M., Martínez-Duncker, I., González-Cortazar, M. 2019. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Natural Product Research*, DOI:10.1080/14786419.2018.1553172.

Obianom, C., Sivakumar, D., 2017. Natural plant volatiles as an alternative approach to control stem-end rot in avocado cultivars. *Journal of Phytopathology*, 1-9. DOI: 10.1111/jph.12653.



Omer, E.A., Hendawy, S.F., Ismail, R.F., Petretto, G.L., Rourke, J.P. Pintore, G. 2017. Acclimatization study of *Tagetes lucida* L. in Egypt and the chemical characterization of its essential oils. *Natural Product Research*, 31(13): 1509-1517.

Ortiz-Hernández M.L., Sánchez-Salinas E., Dantán-González E., Castrejón-Godínez M.L. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, genetics and strategies to enhance the process, biodegradation. Chamy R. and Rosenkranz F., *IntechOpen*, DOI: 10.5772/56098.

Pérez-Ortega, G., González-Trujano, M.E., Ángeles-López, G.E., Brindis, F., Vibrans, H., Reyes-Chilpa, R. 2016. *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 181: 221-228.

Prusky, D., Plumbly, R.A., Kobiler, I. 1991. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant pathology*, 40: 45-52.

Ramírez, R.S., Arias, J.D.M., Bedoya, J.C., Rueda, E.V.L., Sánchez, C.Y., Granada, S.D.G. 2015. Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens *in vitro*. *Agronomía Colombiana*, 33(1): 58-63. Doi: 10.15446/agron.colomb.v33n1.48241

Salehi, B., Valussi, M., Bezerra Morais-Braga, M.F., Pereira-Carneiro, J.N., Alves Borges-Leal, A.L., Melo-Coutinho, H.D., Vitalini, S., Kregiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Cirone-Silva, N.C., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 23: 2847. DOI: 10.3390/molecules23112847.

Sánchez-Carranza J.N., Alvarez L., Marquina-Bahena S., Salas-Vidal E., Cuevas V., Jiménez E.W., Veloz G.R.A., Carraz M., González-Maya L. 2017. Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, 22:666. doi:10.3390/molecules22040666



Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., Halfpeter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., de la Maza, J., Pisanty, I., Urquiza-Haas, T., Ruiz-González, S.P., García-Méndez, G. 2017. Capital Natural de México. Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). México.

Serrato-Cruz, M.A. 2014. El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma de Chapingo. México. ISBN: 978-607-12-0373-1.

Souza, J.M., Caldas, A.L., Tohidi, S.D., Molina, J., Souto, A.P., Fangueiro, R., Zille, A. 2014. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 691-698.

Smith, L. A., Dann, E. K., Leonardi, J., Dean, J. R. & Cooke, A. W. (2011). Exploring non-traditional products for management of postharvest anthracnose and stem end rot in avocado. In: 7th World Avocado Congress 2011 - Conference Proceeding (pp. 215-221). Cairns, QLD, Australia.

Téliz, O.D. 2000. Enfermedades del aguacate. In: Teliz, O.D. (ed.) El aguacate y su manejo integral. Ediciones Mundi-Prensa, México DF, pp. 139-181.

Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S. 2017. Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*, 11: 40–48.

Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D.H., Adaskaveg J.E. and Eskalen A. 2013. Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens Associated with Stem-End Rot of Avocado in California. *Plant Disease*, 97 (12): 1580-1584.



Valencia, A.L., Gil, P.M., Latorre, B.A., Rosales, I.M. 2019. Characteriation and Phatogenicity of Botryosphaeriaceae Species obtained from avocado trees with branch canker and dieback, and from avocado fruit stem end rot in Chile. *Plant disease*, 103(5), DOI: 10.1094/PDIS-07-18-1131-RE.

Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Anaya-López, J.L., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A.A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, R.G. 2010. Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*. 31, 134-138. Doi: 10.1016/j.indcrop.2009.09.013.

Vidales-Fernandez, J. A., Sanchez-Perez J. Luz. Identificación de los agentes causales de las enfermedades en postcosecha del aguacate. Sumario (Es). AVAILABILITY: INIFAP. CIR Pacifico Centro. Tte. Isidro Aleman no. 294, C.P. 58260 Morelia, Mich. (Mexico). 1991. Journal Article.

Villaseñor G., L. E. (editora). 2005. La biodiversidad en Michoacán: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.

10. APÉNDICE

10.1 Efecto antifúngico de *Caesalpinia platyloba*

252

13ª REUNIÓN INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

Efecto antifúngico de *Caesalpinia platyloba*

Rosa María Espinoza-Madrigal, Alberto Flores-García, Rosa E. del Río, Mauro Manuel Martínez-Pacheco

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, Cd. Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México. e-mail: mmpmaz@hotmail.com.

Palabras clave: *Caesalpinia platyloba*, antifúngico.

INTRODUCCIÓN

La pudrición de pedúnculo en el fruto de aguacate es una enfermedad que se presenta en pos cosecha y es ocasionada principalmente por un consorcio de hongos. Una alternativa para la obtención de nuevos antifúngicos son las plantas, por su origen son biodegradables, no dejan residuos tóxicos y pueden ser utilizados por sus propiedades biológicas.

Caesalpinia platyloba (también conocida como frijolillo) es un árbol que se utiliza en la medicina tradicional por ejemplo la parte aérea de la planta se prepara por decocción, para aliviar los dolores de muelas, se usa en baños y cataplasmas locales contra lepra, sarna y desinfectar heridas.¹ La hoja y corteza se utilizan como purga para animales.² Por lo que para este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de *C. platyloba* en hongos que causan pudrición peduncular de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los extractos de fruto, hoja y tallo de *C. platyloba* se obtuvieron por maceraciones sucesivas con tres disolventes de diferente polaridad. El efecto antifúngico se evaluó en los hongos *Colletotrichum acutatum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Phomopsis viticola* y *Oligoporus* sp mediante el método de difusión en disco (0,5 mg/μl). Estos aislados fúngicos se obtuvieron de aguacates que presentaban la enfermedad de pudrición peduncular. El índice de crecimiento se determinó al cuarto día pos inoculación con la siguiente fórmula: IC = cociente del crecimiento del patógeno en el tratamiento y el crecimiento del patógeno en el control negativo. El Tecto 60® se utilizó como control positivo. Los extractos se analizaron por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de nueve extractos de la planta se obtuvieron y se evaluaron en cuatro aislados fúngicos de aguacate, los cuales ocasionan la enfermedad de pudrición peduncular del fruto. El extracto hexánico de tallo y metanólico de hoja inhibieron el crecimiento de *C. acutatum*, *D. phaseolorum* y *Oligoporus* sp. El extracto cloruro metilénico de hoja inhibió el crecimiento de los cuatro aislados evaluados con índices de

crecimiento de 0.36 (*Oligoporus* sp) a 0.98 (*C. acutatum*).

El extracto cloruro metilénico de hoja se analizó por RMN-¹H para identificar el componente mayoritario al cual se le atribuye el efecto observado. En el espectro de RMN-¹H de este extracto se encontraron señales que corresponden a diterpen furano tipo cassano como constituyentes mayoritarios.

Por lo que estos componentes son responsables del efecto antifúngico observado. Este es el primer reporte de inhibición del extracto cloruro metilénico de hoja contra hongos de la pudrición peduncular de aguacate.

CONCLUSIÓN

Caesalpinia platyloba presentó efecto antifúngico contra hongos causales de la pudrición peduncular de aguacate.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CIC, a la UMSNH y a la fundación 3MP por el financiamiento a este trabajo y RMEM es becaria de CONACYT.

REFERENCIAS

1. González-Gómez, J.C., Madrigal-Sánchez, X., Ayala-Burgos, A., Juárez-Caratachea, A., Gutiérrez-Vázquez, E. *Livestock Research for Rural Development*. 2006, 18 (8).
2. Espinoza-Madrigal, R.M. Tesis de maestría. 2010, 95 pp.

10.2 Efecto antifúngico de *Tagetes lucida*

Rev. Latinoam. Quim. 45 / Suplemento especial 251

Efecto antifúngico de *Tagetes lucida*

Rosa María Espinoza-Madrigal, Alberto Flores-García, Rosa E. del Río, Mauro Manuel Martínez-Pacheco

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, Cd. Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México. e-mail: mmpaz@hotmail.com.

Palabras clave: *Tagetes lucida*, antifúngico.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos antifúngicos para el control de enfermedades como la pudrición peduncular de aguacate motiva a obtener nuevas moléculas de origen natural por ser biodegradables.

Tagetes lucida (Asterácea) es una planta medicinal nativa de México y Centroamérica,¹ se le conoce como pericón o hierba anís, utilizada por los mayas y aztecas. Se usa para el tratamiento de la fiebre, tumores, infecciones de la piel, diarrea, reumatismo, asma, resfriado, disentería amebiana y otras infecciones causadas por helmintos.² También, tiene propiedades antioxidantes,³ citotóxicas⁴ y antimicrobianas⁵ e incluso, se utiliza como condimento. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de *T. lucida* con hongos de la pudrición peduncular de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los extractos de flor, fruto, hoja, tallo y raíz de *T. lucida* se obtuvieron por maceraciones sucesivas con tres disolventes de diferente polaridad. El efecto antifúngico se evaluó en los hongos *Colletotrichum acutatum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Phomopsis viticola* y *Oligoporus* sp mediante el método de difusión en disco (0.3 mg/μl) y se determinó el índice de crecimiento (IC = cociente del crecimiento del patógeno en el tratamiento y el crecimiento del patógeno en el control negativo) al cuarto día pos-inoculación. Los extractos se fraccionaron por cromatografía en columna y las fracciones obtenidas se analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) para elucidar los componentes mayoritarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 11 extractos de la planta se obtuvieron y se evaluaron en cuatro aislados fúngicos de aguacate, los cuales ocasionan la enfermedad de pudrición peduncular del fruto. El extracto hexánico y cloruro metilénico de flor, así como el hexánico de hoja inhibieron el crecimiento micelial de los cuatro aislados con los cuáles fueron ensayados con índices de crecimiento de 0 (*Oligoporus* sp) a 0.76 (*C. acutatum*). El extracto cloruro metilénico de flor se fraccionó por presentar el menor índice de crecimiento con los cuatro aislados evaluados (IC=0 con *Oligoporus* sp y *P. viticola*, IC=0.16 con *D.*

phaseolorum e IC=0.53 con *C. acutatum*). En el espectro de RMN-¹H de este extracto se encontraron señales que corresponden a cumarinas. Las señales características de la 7-metoxicumarina se encontraron en 7.63 ppm (señal doble del H-4), en 7.4 ppm (señal doble del H-5), en 6.81 ppm (señal doble de dobles del H-6), en 6.80 ppm (señal doble del H-8) y en 6.23 ppm (señal doble del H-3). En 3.85 ppm se observó una señal simple característica de un grupo metoxi. Las señales características de la 6,7-dimetoxicumarina se encontraron en 7.63 ppm (señal doble del H-4), en 6.86 ppm (señal simple del H-5), en 6.84 ppm (señal simple del H-8) y en 6.30 ppm (señal doble del H-3). En 3.95 y 3.90 ppm se observaron señales simples que corresponden a grupos metoxi. Estos se corroboraron con la literatura. Por lo que estas cumarinas son responsables del efecto antifúngico observado y es el primer reporte de inhibición en hongos de la pudrición peduncular de aguacate.

CONCLUSIÓN

Las cumarinas de *Tagetes lucida* presentan efecto antifúngico contra hongos causales de la pudrición peduncular de aguacate.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CIC, a la UMSNH y a la fundación 3MP por el financiamiento a este trabajo y RMEM es becario de CONACYT.

REFERENCIAS

1. Rzedowski, G. C. *Compañía Editorial Continental* 1979. 144-147.
2. Linares, E.; Bye Jr. R. A. *J. Ethnopharm.*, 1987, 19, 153.
3. Aquino, R.; Cáceres, A.; Morelli, S.; Rastrelli, L. *J. Nat. Prod.*, 2002, 65, 1773-1776.
4. Mejía-Barajas, J.A.; Del Río, R.E.; Martínez-Muñoz, R.E.; Flores-García, A.; Martínez-Pacheco, M.M. *Emir. J. Food Agric.*, 2012, 24, 142-147.
5. Damián-Badillo, L.M.; Salgado-Garciglia, R.; Martínez-Muñoz, R.E.; Martínez-Pacheco, M.M. *Open Nat. Prod. J.* 2008, 1, 27-33.

11. ANEXO

11.1 Componentes de *Enterolobium cyclocarpum* inhiben la dihidrofolato reductasa de hongos y oomicetos

Solo Ciencia . . .

Componentes de *Enterolobium cyclocarpum* inhiben la dihidrofolato reductasa de hongos y oomicetos

R.M. Espinoza-Madriz*, A. Flores-García, R.E.N. Del Río-Torres y M.M. Martínez-Pacheco

* Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Múgica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030. Morelia, Michoacán; México. *rousme@hotmail.com

Resumen

La vía de los folatos es una diana fisiológica para el control del crecimiento de microorganismos particularmente en el sector agrícola. En este trabajo se evaluó el efecto de un extracto acuoso obtenido del duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb (Parota) en la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) de hongos y oomicetos fitopatógenos. El extracto inhibió la actividad enzimática microbiana en más del 57 y el 83 % en oomicetos y hongos, respectivamente. Este resultado indica que el extracto contiene componentes inhibidores de la DHFR.

Introducción

El árbol *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb, mejor conocido como Parota es nativo de la parte central del continente Americano y parte de México (Figura 1).

En la medicina tradicional se usa por sus propiedades curativas. La corteza y las vainas se utilizan en infusiones para curar el salpullido, tienen efecto depurativo; la goma que exuda el tronco (también llamada goma de caro) es empleada como remedio para la bronquitis y el resfriado (Mendieta y del Amo, 1984 y Brook, 2000). Los frutos verdes son astringentes y se utilizan en caso de diarrea (Francis, 1988). La pulpa de las vainas verdes se usa como sustituto del jabón para lavar ropa porque contiene saponinas (Dominguez y Franco, 1979). Su uso tradicional en actividades cotidianas es debido indudablemente, a su diversidad química. En donde es posible encontrar nuevos o novedosos compuestos químicos con la actividad farmacológica deseada, que actúen con nuevos mecanismos de acción y que posean especificidad para la diana farmacológica, aquella que es vital para un microorganismo patógeno y útil para su control. Para con ello tener una posible molécula que sirva en el control de enfermedades causadas por microorganismos.

La importancia de microorganismos incontrolables es que causan severas pérdidas económicas en la producción agrícola. Por ejemplo, los oomicetos del género *Phytophthora* y hongos como *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* que afectan a los cultivos de: aguacate, chile, fresa, frijol, papa y melón (SAGARPA, 2008).

Una diana farmacológica para el control y eliminación de estos microorganismos es mediante la inhibición de la síntesis del ácido fólico y de otros folatos debido a que solo las plantas, los hongos y otros microorganismos los sintetizan, pero los humanos y otros animales superiores no (Green y col., 1995). El tetrahidrofolato y sus derivados, colectivamente denominados folatos, se requieren para la síntesis de aminoácidos (glicina y metionina), purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (timina, citosina y uracilo) que son esenciales para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Mathews y col., 2002).



Fig. 1. Árbol de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb.

La actividad anti-microbiana de los extractos de la madera de duramen de *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb se reportó contra hongos que degradan la madera (Raya, 2007). Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue determinar si *E. cyclocarpum* (Jacq) Griseb posee metabolitos hidrosolubles bioactivos contra la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) de hongos y oomicetos fitopatógenos.

Material y métodos

Las cepas silvestres de hongos filamentosos que se utilizaron fueron: *Colletotrichum acutatum*, *C. lindemuthianum* (cepas AFG1, AFG2, AFG3, 75A y 75B), *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia* sp, así como oomicetos del género *Phytophthora* como *P. cactorum*, *P. capsici* y *P. cinnamomi*.

Con el duramen de *E. cyclocarpum* proveniente de Cuanajo, Michoacán se obtuvo un extracto acuoso. La madera se molió a un tamaño de malla 20, se colocaron 100 g en 550 ml de agua desionizada y se calentó hasta ebullición por 16 a 20 min. El extracto se

concentró por liofilización y se utilizó una concentración de 0.1063 µg/µl de fenólicos totales equivalentes (FTE). El Trimetoprim (1 mM) se utilizó como control positivo al inhibir la enzima DHFR.

El extracto enzimático se obtuvo al triturar el micelio obtenido de cada hongo con 10-20 ml de regulador de fosfato de potasio de concentración 50 mM y pH 6.9, después se centrifugó a 3500 r.p.m., por 5 min, a 5 °C y se recuperó el sobrenadante.

La actividad enzimática se obtuvo de la siguiente manera: en un tubo se colocaron 516 µl de regulador de fosfato de potasio (50 mM), posteriormente se adicionaron 100 µl de β-mercaptoetanol (50 mM), 100 µl de Ditiotritol (50 mM), 82 µl de Dihidrolato (0.4 mM) y 100 µl del extracto enzimático, se pasó a una celda de cuarzo y una vez iniciada la reacción se adicionaron 100 µl de NADPH (0.5 mM). La actividad enzimática con el inhibidor Trimetoprim (1mM) se obtuvo al adicionar 100 µl a la mezcla de reacción, mientras que con el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* se adicionaron 2 µl (0.1063 µg/µl de FTE). La reacción se llevó a cabo en baño de hielo y la lectura en el espectrofotómetro se obtuvo a una longitud de onda de 340 nm.

Los datos obtenidos se expresaron como la media ± Error Estándar (EE), se compararon las medias por la prueba estadística de Tukey ($\alpha = 0.05$) y se hizo un análisis de varianza de una vía con el paquete estadístico Statistic versión 7.0.

Resultados y discusión

Los microorganismos fitopatógenos (por ejemplo hongos y oomicetos) causan enfermedades que deterioran cultivos de importancia económica. Para su control se recurre al uso de plaguicidas, con un consumo anual de más de 45 mil toneladas vertidas en el campo mexicano (INEGI, 2008). Esto ha generado organismos multiresistentes difíciles de controlar y su presencia es considerada como un severo daño ambiental.

Sustancias vegetales se utilizan en medicamentos y plaguicidas, por tener baja toxicidad y efecto farmacológico deseado, además de ser biodegradables. Con estas características se buscan metabolitos secundarios vegetales con propiedad de inhibir enzimas esenciales para el metabolismo de microorganismos.

Una enzima importante es la dihidrolato reductasa (DHFR) la cual forma parte de la vía de síntesis de los folatos. El bloqueo de la funcionalidad o inhibición de la enzima causa la terminación de la división celular y como consecuencia la muerte celular. Este fenómeno fisiológico sirve de base para la búsqueda de moléculas que inhiban el funcionamiento a esta enzima con estructuras moleculares análogas al sustrato que compitan por el sitio de unión enzimático (Polshakov, 2001).

En este trabajo se obtuvo un extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum* para determinar su capacidad de inhibir a la enzima DHFR de hongos y oomicetos que causan el deterioro de cultivos de importancia económica.

La actividad enzimática de la dihidrolato reductasa (DHFR) de oomicetos y hongos se determinó *in vitro* en un extracto libre de células en presencia y ausencia del extracto acuoso de duramen de *E. cyclocarpum*.

La actividad específica de la DHFR en presencia del extracto acuoso de *E. cyclocarpum* fue mayor con respecto al Trimetoprim. Sin

embargo, el extracto inhibe a la enzima, siendo *P. cactorum* el más sensible con una inhibición de 83 %, seguido de *P. cinnamomi* con 81.67 % y *P. capsici* con un 57.78 % (Cuadro 1).

Los hongos que presentaron mayor sensibilidad al extracto acuoso de *E. cyclocarpum* fueron *C. lindemuthianum* AFG3 con un 98.76 % seguido de *Rhizoctonia* sp con 98.60 % y *C. acutatum* con 98.54 %. El hongo menos sensible fue *C. lindemuthianum* AFG2 con 83.51 % (Cuadro 2).

El porcentaje de inhibición de la enzima DHFR con el extracto acuoso de *E. cyclocarpum* fue ligeramente menor que con el Trimetoprim, por lo que se considera que el extracto es un buen inhibidor de la enzima por presentar inhibición del 90 % con la mayoría de los hongos y del 80 % con los oomicetos, lo cual sugiere que el extracto contiene componentes interesantes.

La composición química del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb, ha sido poco estudiada. Las semillas de la Parota son ricas en proteínas (32-41 %), contienen hierro, calcio, fósforo y 234 mg de ácido ascórbico. El tanino obtenido de su corteza, semilla y fruto es excelente para curtir pieles (Niembro Rocas, 1990). Este árbol, se utiliza como forraje para el ganado. Su madera aserrada, lambrín, chapa y triplay es utilizada en la fabricación de canoas, paneles, ruedas, carpintería y ebanistería, muebles y acabados de interiores (Martínez Pacheco y col., 2012).

Raya Gonzalez et al. (2013) reportaron como componentes para la madera de duramen aceites esenciales, fenólicos, terpenos y acetofenonas con efecto biológico antifúngico para insectos barrenadores de madera seca, así como al pinitol y 13-epimanool como componentes mayoritarios del extracto acuoso. Además, el extracto no presentó toxicidad al ser evaluado con aislados microbianos (*Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp.), *Artemia salina*, *Insictermes marginipennis*, ratas Wistar y la línea celular tumoral MCF-7 (Martínez Muñoz et al., 2009).

Por tanto, la DHFR es una enzima esencial en la vía de los folatos para la supervivencia de hongos y oomicetos. Esta enzima es susceptible de ser inhibida al no encontrarse en organismos superiores y por ello de utilidad para el control de microorganismos patógenos. El extracto acuoso de duramen *E. cyclocarpum* al no considerarse tóxico puede aplicarse directamente y también es una alternativa natural para la búsqueda de nuevas moléculas que inhiban a la DHFR.

Cuadro 1. Efecto del extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* sobre la actividad específica de la DHFR y el porcentaje de inhibición de la DHFR de oomicetos del género *Phytophthora*.

Especie	Actividad específica (µmol/min/mg proteína)			
	Enzima DHFR	Trimetoprim (1 mM)	Extracto acuoso (0.1063 µg FTE/µl)	Inhibición del extracto (%)
<i>P. cactorum</i>	8.88 ± 2.18	0.55 ± 0.14	1.51 ± 0.18	83.00
<i>P. capsici</i>	5.25 ± 0.62	1.18 ± 0.22	2.24 ± 0.20	57.78
<i>P. cinnamomi</i>	17.6 ± 2.15	2.47 ± 1.84	3.22 ± 0.32	81.68

Cuadro 2. Efecto del extracto acuoso obtenido de madera de duramen de *E. cyclocarpum* sobre la actividad específica de la DHFR y el porcentaje de inhibición enzimática en los hongos fitopatógenos *Colletotrichum* spp, *F. oxysporum* y *Rhizoctonia* sp.

Especie	Enzima DHFR	Trimetoprim (1 mM)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	
			Extracto acuoso (0.1063 μg FTE / μl)	Inhibición del extracto (%)
<i>C. acutatum</i>	98.48 $\pm$ 9.17	0.13 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.23	98.54
<i>C. lindemuthianum</i> AFG1	38.24 $\pm$ 3.85	1.48 $\pm$ 0.38	3.59 $\pm$ 0.33	90.61
<i>C. lindemuthianum</i> AFG2	27.85 $\pm$ 4.59	0.82 $\pm$ 0.11	4.59 $\pm$ 0.21	83.51
<i>C. lindemuthianum</i> AFG3	67.61 $\pm$ 9.06	0.12 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.16	98.76
<i>C. lindemuthianum</i> 75A	122.44 $\pm$ 12.26	2.10 $\pm$ 0.47	3.94 $\pm$ 0.34	96.78
<i>C. lindemuthianum</i> 75B	173.29 $\pm$ 14.87	0.76 $\pm$ 0.22	7.61 $\pm$ 0.68	95.60
<i>Fusarium oxysporum</i>	180.75 $\pm$ 23.30	1.83 $\pm$ 0.43	3.16 $\pm$ 0.21	98.25
<i>Rhizoctonia</i> sp	62.81 $\pm$ 9.04	0.77 $\pm$ 0.16	0.88 $\pm$ 0.13	98.60

Conclusión

El extracto acuoso de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* inhibió a la enzima dihidrofolato reductasa de hongos y oomicetos que afectan cultivos de importancia económica, por lo cual es de interés continuar con la búsqueda del o los componentes responsables del efecto inhibitorio.

Referencias

Brook C. 2000. Selected plants of medicinal value in Costa Rica. University of New Hampshire. pp 1-4. England.

Domínguez A., Franco R. 1979. Plantas medicinales de México XXXV Estudio químico de la corteza y fruto del guanacaste o parota, *Enterolobium cyclocarpum* Jacq. una leguminosa. Revista Latinoamericana de Química. 10:46.

Francis J.K. 1988. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Guacacaste, earpod-tree. SO-ITF-SM-15. New Orleans, LA. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experimental Station, p. 4.

Green J.R., Pain N.A., Connell M.E., Jones G.L., Lekei C.L., Mc Cready S., Mendgen K., Mitchell A.J., Callow J.L., O'Connell R.J. 1995. Analysis of differentiation and development of the specialized infection structures formed by biotrophic fungal plant pathogens using monoclonal antibodies. Canadian Journal of Botany. 73:408-417.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Encuesta Industrial mensual. Resumen anual 2008, México, 2008.

Martínez Muñoz R.E., Raya González D., Cajero Juárez M., Calderón Raya M., del Río R.E., Martínez Pacheco M.M. 2009. Innocuous use of aqueous extract obtained from the heartwood of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Pharmacologyonline, 2: 1091-1096.

Martínez Pacheco M.M., del Río R.E., Flores García A., Martínez Muñoz R.E., Ron Echeverría O.A., Raya González D. 2012. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.: The biotechnological profile of a tropical tree. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11 (5): 385 - 399.

Mathews C.K., Van Holde H.K., Ahem K.G. 2002. En: Bioquímica. Editorial Addison Wesley. 3ª edición. Madrid, España. pp 821-822.

Mendieta R., Del Amo S. 1984. En: Catálogo de las plantas medicinales del Estado de Yucatán. pp 143. INIREB, CECSA, México.

Niembro Rocas. 1990. En: Árboles y arbustos de México. Naturales e introducidos. Ed. Limusa. México, D.F. 206p.

Poishakov V.I. 2001. Dihydrofolate reductase: structural aspects of mechanisms of enzyme catalysis and inhibition. Russian Chemical Bulletin, International Edition, 50(10):1733-1751.

Raya González D., Martínez Pacheco M.M., Flores García A., Castro Ortiz R., López Villalobos M., Pintau Loeza L. 2006. Control de termitas *Incisitermes marginipennis* (Latreille) (Isoptera: Kalotermitidae), con extractos de duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Entomología Mexicana, pp 1259.

Raya González D. 2007. Las maderas secas de encino (*Quercus* spp) y pino (*Pinus* spp) son protegidas del daño causado por *Lyctus* spp e *Incisitermes marginipennis* (Latreille) con extractos vegetales acuáticos. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Raya González D., Martínez Muñoz R.E., Ron Echeverría O.A., Flores García A., Macías Rodríguez L.I., Martínez Pacheco M.M. 2013. Dissuasive effect of an aqueous extract from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb on the drywood termite *Incisitermes marginipennis* (Isoptera: Kalotermitidae) (Latreille). Emirates Journal of Food and Agriculture, 25 (7): 524-530.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: <http://www.gob.mx/sagarpa>. (Consulta: 2008).

Reacción catalizada por la DHFR

By Boghog2 - Own work created using ChemDraw2009/Inkscape, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5650155>



11.2 Growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits

ARCHIVES OF PHYTOPATHOLOGY AND PLANT PROTECTION
2019, VOL. 52, NOS. 7–8, 681–697
<https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1553473>



Growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits

Melissa Adriana Mendoza-Vázquez, Rosa María Espinoza-Madrigal, Edith Muñoz-Parra, Alberto Flores-García, Pedro Iván Huerta-Venegas, León Francisco Ruiz-Herrera, Mauro Martínez-Pacheco and José López-Bucio

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

ABSTRACT

The influence of *Phomopsis viticola*, *Diaporthe phaseolorum* and *Pseudofusicoccum stromaticum* isolated from avocado stem-end rot on growth of *Arabidopsis* seedlings was investigated. We found responses that are specific for each fungus, whereas *P. viticola* and *D. phaseolorum* strongly repressed root growth, *P. stromaticum* induced growth and branching, and enhanced shoot biomass production. Detailed microscopy and structural analyses revealed that the fungi did not affect cell division in root meristems but rather influenced cell elongation and differentiation, and these responses were related to changes in auxin responsiveness. *P. stromaticum* strongly acidifies the growth medium and this correlated with induction of the jasmonic acid responsive gene construct *LOX2:GUS* in leaves, whereas *P. viticola* and *D. phaseolorum* showed much reduced acidification properties. Taken together, our results show that fungal isolates from the stem-end of avocado fruits interact with *Arabidopsis* plants in highly diverse and contrasting manners influencing growth, patterning and defence.

ARTICLE HISTORY

Received 12 October 2018
Accepted 19 November 2018

KEYWORDS

Stem-end rot; avocado;
Arabidopsis thaliana; plant
growth; root
patterning; defence

1. Introduction

The plant disease stem-end rot of avocado fruits is caused by several fungi. It is characterised by a dark brown to black coloration halo, which further produces dark streaking of the water-conducting tissues, damages the edible mesocarp and reduces quality and economic value post-harvest. *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Diaporthe* and *Colletotrichum* have been related to stem-end rot (Twizeyimana et al. 2013; Guarnaccia et al.

CONTACT José López-Bucio  jlbucio@umich.mx  Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán C. P. 58030, México

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

11.3 Estudio etnofarmacológico del género Eupatorium: una alternativa medicinal y de control biológico

Tópicos sobre materiales lignocelulósicos sustentables

una visión innovadora

Editores:

José Antonio Silva Guzmán - Francisco Javier Fuentes Talavera

La presentación y disposición en conjunto de:

**TÓPICOS SOBRE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS SUSTENTABLES,
UNA VISIÓN INNOVADORA**

Son propiedad de los autores.

Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida o transmitida, mediante ningún sistema o método, electrónico o mecánico (incluyendo el fotocopiado, la grabación o cualquier sistema de recuperación y almacenamiento de información), sin consentimiento por escrito de los autores.

Derechos reservados conforme a la ley:

© 2017 Los autores

© 2017 Departamento de Madera, Celulosa y Papel
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías
Universidad de Guadalajara

ISBN 978-607-8490-39-4

Se terminó de imprimir en los talleres gráficos

de Prometeo Editores, S.A. de C.V.

Calle Libertad 1457, Col. Americana

C.P. 44160, Guadalajara, Jalisco Tels. (0133) 3826 2726 y 82

Capítulo 7

ESTUDIO ETNOFARMACOLÓGICO DEL GÉNERO EUPATORIUM: UNA ALTERNATIVA MEDICINAL Y DE CONTROL BIOLÓGICO

Ramírez López C. B.¹, Espinoza Madrigal R.M.², Del Río Rosa E.², Martínez Pacheco Mauro M.², Bernabé Antonio A.¹, Cruz García J. A.³

¹Departamento de Madera, Celulosa y Papel del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara. ²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ³Estudiante de la Maestría en Ciencia de Productos Forestales

RESUMEN

Con el aumento de la población mundial, también, aumenta la demanda de insumos en todos los sectores económicos y sociales. Sectores como el de salud, agrícola, veterinario y el humano demandan atención en áreas de particular interés tales como la entomológica y la microbiológica debido a la resistencia de insectos y microbios a los controladores químicos convencionales. Por lo que nuevas moléculas controladoras de los organismos resistentes son necesarias para su control. El éxito de ésta acción se basa en el entendimiento de la comunicación química entre los organismos *e.g.* el metaboloma que posee *Eupatorium* sp y que utiliza para comunicarse con los organismos del ecosistema e interpretar los desafiantes factores ambientales. El propósito de este trabajo es colocar en perspectiva el recurrente tema de investigación acerca de la búsqueda incesante de moléculas vegetales con características específicas ambientalmente no tóxicas y efectivas para controlar plagas, algunas afecciones microbianas humanas y para preservar su patrimonio.

**TÓPICOS SOBRE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS SUSTENTABLES,
UNA VISIÓN INNOVADORA**

Se terminó de imprimir en el mes de octubre del 2017
en los talleres de Prometeo Editores S. A. de C. V.

Libertad 1457, Col. Americana C.P. 44160

Guadalajara, Jalisco.

Tiraje: 500 ejemplares