



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

EFFECTO FUNGICIDA DE EXTRACTOS DE FRUTOS DE
AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* Var.
drymifolia) SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS

T E S I S

Que presenta:

ALEJANDRO CASTRO MERCADO

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS:
Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

ABRIL DEL 2016
MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia. Formó parte de un Proyecto de Investigación apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (CIC 2.10 RSG 2015).

Este trabajo se lo dedico:

A Elena Mercado Palmerín y Argimiro Castro Inocencio ya que fueron padres, amigos y consejeros al mismo tiempo, porque con amor, comprensión, paciencia, esfuerzo y su apoyo contribuyeron en el cumplimiento de la meta más importante en mi vida. Les agradezco por haber velado mi bienestar físico, emocional y económico, además de fomentarme buenos sentimientos, valores y hábitos que se vinculan con el deseo de superación y el anhelo de triunfo. Gracias por estar a mi lado sobrellevando los desafíos y soportando las tribulaciones que se me presentaron lo largo de este camino.

A mis hermanas Margarita Castro y Gabriela Castro por su apoyo incondicional y las palabras de aliento que me motivaron a continuar luchando por mis sueños.

A mis amigos Landon, Claudio, Gustavo y Néstor que más que amigos son como hermanos; les agradezco su confianza proporcionada, porque nunca dudaron de mi capacidad intelectual, además de ser las personas con quienes comparto mis alegrías, mis aflicciones, mis triunfos y mis fracasos del diario vivir.

Al DC Rafael Salgado Garciglia que gracias a sus amplios valores, su conocimiento y su experiencia logró prepararme para mi trayecto como profesionalista.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios quien es mi amigo inseparable, le doy gracias por todas sus bendiciones y otorgarme la oportunidad culminar con éxito una etapa más en mi vida.

De igual manera deseo agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal y al personal docente por contribuir en mi formación académica.

Asimismo extiendo mi agradecimiento al DC Rafael Salgado Garciglia Director de mi tesis por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, gracias por toda la confianza, paciencia, comprensión y por el conocimiento ofrecido en el transcurso de esta investigación.

Además agradezco a mis revisores el DC Héctor Eduardo Martínez Flores, DC Patricia Ríos Chávez, MC Rafael Torres Martínez, MC Rosa Elena Torres Ruíz y en especial a mi revisora y técnica del Laboratorio de Biotecnología Vegetal la MC Alejandra Hernández García. También un agradecimiento a la Biól. Yolanda García Rodríguez por el asesoramiento y desarrollo del análisis por las técnicas de cromatografía.

Por último debo agradecer a mis compañeros de la Facultad de Químico Farmacobiología y del Laboratorio de Biotecnología Vegetal por su amistad, apoyo y porque fueron para mí un ejemplo de constante perseverancia, humildad, tolerancia, y solidaridad.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I.INTRODUCCIÓN	1
II.ANTECEDENTES	4
II.1. CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS	4
II.1.1. Principales hongos causantes de enfermedades en plantas	7
II.1.1.1. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.....	7
II.1.1.2. <i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds	9
II.1.1.3. <i>Fusarium solani</i> Mart. (Sacc.)	11
II.2. ANTIFÚNGICOS DE ORIGEN VEGETAL	14
II.3. AGUACATE (<i>Persea americana</i> Miller)	17
II.3.1. Etnobotánica y farmacología de aguacate	17
II.3.2. Metabolitos secundarios de aguacate biológicamente activos	19
II.3.3. Aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i>)	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. OBJETIVOS	25
V.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
V.1.1. Objetivos específicos	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	26
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
VI.2. MEDIO DE CULTIVO	26
VI.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	27
VI.3.1. Obtención de fracciones	28

	Página
VI.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS	29
VI.4.1. Bioensayos antifúngicos	29
VI.4.2. Determinación de la MIC.....	30
VI.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE LA FRACCIÓN CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	31
VI.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM)	31
VI.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
VII.1. EFECTO ANTIFÚNGICO DE LAS FRACCIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE AGUACATE NATIVO MEXICANO	34
VII.2. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	41
VII.3 IDENTIFICACIÓN. DE COMPUESTOS EN FRACCIONES ACTIVAS POR CG/EM	44
VII.3.1. Análisis de la fracción metanólica de semilla	44
VII.3.2. Análisis de la fracción etanólica de fruto	47
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Medio de cultivo Papa-dextrosa-agar comercial (Bioxon®).	27
Cuadro 2. Porcentajes de inhibición con la concentración mínima inhibitoria de las fracciones más activas del extracto metanólico de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>) sobre <i>B. cinerea</i> , <i>C. acutatum</i> , y <i>F. solani</i> . A 8 días de cultivo.	43
Cuadro 4. Compuestos mayoritarios de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>), por tiempo de retención del cromatograma correspondiente (Figura 8).	45
Cuadro 5. Compuestos mayoritarios de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>), por tiempo de retención del cromatograma correspondiente (Figura 9).	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A) Ciclo de la enfermedad de <i>Botrytis cinerea</i> , B) Moho gris en frutos, C) en flores y D) en hojas de fresa (INFOAGRO, 2002).	8
Figura 2. Ciclo de la enfermedad de <i>Colletotrichum acutatum</i> en aguacate (Whiley et al., 2002).	10
Figura 3. Ciclo de la enfermedad de <i>Fusarium solani</i> en plantas de soya (Westphal et al., 2008).	13
Figura 4. Frutos de aguacate nativo mexicano (<i>Persea americana</i> Mill. Var. <i>drymifolia</i>), se señala la cáscara (pericarpio), pulpa (mesocarpio) y semilla (endocarpio).	21
Figura 5. Porcentaje de inhibición de fracciones (100µL de 50 mg/L) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>), a los 8 días de cultivo de <i>C. acutatum</i> . Letras diferentes significan diferencia significativa (n=3, p<0.05).	35
Figura 6. Porcentaje de inhibición de fracciones (100µL de 50 mg/L) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>), a los 8 días de cultivo de <i>F. solani</i> . Letras diferentes significan diferencia significativa (n=3, p<0.05).	36
Figura 7. Porcentaje de inhibición de fracciones (100µL de 50 mg/L) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>), a los 8 días de cultivo de <i>B. cinerea</i> . Letras diferentes significan diferencia significativa (n=3, p<0.05).	37
Figura 8. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de difusión en placa con 100 µL de las fracciones con mayor efecto inhibitorio (50 mg/L) sobre <i>C. acutatum</i> (A), <i>F. solani</i> (B) y <i>B. cinerea</i> (C), a los 8 días de cultivo.	38
Figura 9. Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>) sobre <i>C. acutatum</i> , <i>F. solani</i> y <i>B. cinerea</i> . A 8 días de cultivo.	42

	Pág.
Figura 10. Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>) sobre <i>C. acutatum</i> , <i>F. solani</i> y <i>B. cinerea</i> . A 8 días de cultivo.	43
Figura 11. Cromatograma de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>).	45
Figura 12. Cromatograma de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (<i>P. americana</i> Var. <i>drymifolia</i>).	48

ALEJANDRO CASTRO MERCADO.2016. Efecto fungicida de extractos de frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Var. *drymifolia*) sobre hongos fitopatógenos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México (Director de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia), 58 p.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron las propiedades antifúngicas de tres diferentes fracciones (metanólica, etanólica y DMSO1%) de frutos, cáscara (pericarpio), pulpa (mesocarpio) y semilla (endocarpio) de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Mill. Var. *drymifolia* `Schltdl. & Cham.' S.F. Blake). Cada muestra fue sometida a nitrógeno líquido y pulverizada en licuadora a alta velocidad (en frío). La extracción inicial para los frutos y cada parte de éstos fue realizada por maceración metanólica en frío durante 7 días. A cada uno de ellos, se adicionó 50 mL de solvente por cada 10 g de muestra pulverizada. Cada uno de los diferentes extractos fueron evaporados a sequedad para posteriormente ser fraccionados por disolución progresiva con los solventes: metanol, etanol y DMSO1%, adicionando 20 mL de cada solvente. Cada fracción fue resuspendida en el solvente correspondiente en concentraciones de 50 mg/mL y fueron probadas *in vitro* en contra de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani* por el método de difusión en agar. En cada ensayo se aplicó un volumen de 100 µL de cada fracción en el centro de la caja Petri (4.5 cm de diámetro) sobre el medio de cultivo sólido PDA, en una concentración de 50 mg/mL. El porcentaje de inhibición fue medido a los 8 días del cultivo. Las fracciones de mayor efecto antifúngico fueron la metanólica de semilla y la etanólica de fruto, con la mayor inhibición sobre los tres hongos en estudio. Con la concentración de 50 mg/mL de la fracción metanólica se inhibió en un 40% a *C. acutatum*, en un 50% a *F. solani* y en un 70% a *B. cinerea*. Los porcentajes de inhibición con la concentración de 100 mg/mL de la fracción etanólica de fruto fueron de un 40% para *F. solani*, de un 70% para *C. acutatum* y de un 82% para *B. cinerea*. Con el análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM), se determinaron los compuestos mayoritarios de ambas fracciones, encontrando al ácido heptadecanoico como el compuesto más abundante de la fracción metanólica de semilla, seguidos por el ácido octadecadienoico (ácido linoleico), ácido hexadecanoico y el ácido octadecenoico (ácido oleico) y a las acetogeninas persina, persenona y persedieno. En la fracción etanólica de fruto, también se identificaron los ácidos hexadecanoico, heptadecanoico, octadecadienoico (ácido linoleico), octadecanoico (ácido esteárico) y tetracosanoico (ácido lignocérico), así como los triterpenos: escualeno y lupeol. Debido a las propiedades ya reportadas para este tipo de compuestos, se les considera que participan de manera sinérgica en contra del crecimiento de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. solani*.

Palabras clave: Aguacate, antifúngicos, hongos fitopatógenos, CG/EM, bioensayo.

ALEJANDRO CASTRO MERCADO. 2016. Antifungal effect of mexican avocado fruits (*Persea americana* Var. *drymifolia*) against phytopathogenic fungi. BSc Thesis, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 58 p.

ABSTRACT

In this research was evaluated the antifungal properties of three different fractions (methanol, ethanol and DMSO1%) of fruits, peel (pericarp), pulp (mesocarp) and seed (endocarp) of native Mexican avocado (*P. americana* Mill. Var. *drymifolia* 'Schltdl. & Cham.' S.F. Blake). Each sample was subjected to liquid nitrogen and pulverized in blender at high speed (in the cold). Initial extraction for fruit and every part of the avocado fruit, was performed by maceration methanolic under cold for 7 days. Each one of them, added 50 mL of solvent per 10 g of powdered sample. Each of the different extracts were evaporated to dryness to subsequently be fractionated by progressive dissolution with the solvents methanol, ethanol and DMSO1%, adding 20 mL of each solvent. Each fraction was suspended in corresponding solvent concentrations of 50 mg/mL, and were *in vitro* probed against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani* by agar diffusion method. In each assays a volume of 100 μ L of each fraction was applied in the center of the Petri dish (4.5 cm in diameter) on the PDA culture medium solid, at a concentration of 1 mg/mL. The percentage of inhibition was measured at 8 days of culture. Most antifungal effect were with the seed methanolic and the fruit ethanolic fractions, with the highest inhibition on the three fungi in study. With the concentration of 50 mg/mL of seed methanolic fraction was inhibited 40% *C. acutatum*, 50% to *F. solani* and 70% to *B. cinerea*. The percentages of inhibition with the concentration of 100 mg/mL of fruit ethanolic fraction were 40% to *F. solani*, 70% for *C. acutatum* and 82% for *B. cinerea*. With the analysis by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS), were determined the majority compounds of both fractions, finding the heptadecanoic acid as the most abundant compound in seed methanolic fraction, followed by octadecadienoic acid (linoleic acid), hexadecanoic acid and acid octadecenoic (oleic acid) and acetogenins persina, persenona and persediene. In the fruit ethanolic fraction, also identified acids hexadecanoic, heptadecanoico, octadecadienoic (linoleic acid), octadecanoic (stearic acid) and lignoceric (lignoceric acid) as well as the triterpenes squalene and lupeol. Because of the properties already reported for this type of compounds, are considered participating in a synergistic manner against the growth of *B. cinerea*, *C. acutatum* and *F. solani*.

Keywords: Avocado, antifungal, phytopathogenic fungi, GC/MS, assay

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 20 años se ha retomado el uso y aplicación de los metabolitos secundarios vegetales como una alternativa en el control de hongos y oomicetos fitopatógenos, que por sus características, es una medida viable para la regulación de poblaciones de microorganismos patógenos conservando al mismo tiempo la calidad ambiental. Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de muchos de estos compuestos, los que en su mayoría han sido caracterizados químicamente (Jeandet *et al.*, 2002). Es por ello, que extractos vegetales, aceites esenciales o metabolitos secundarios derivados de éstas, pueden ser utilizados en el control de enfermedades vegetales, principalmente las causadas por hongos fitopatógenos (Fiori *et al.*, 2000). Estos compuestos presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, tales como una baja toxicidad, menor residualidad y una alta selectividad por lo que son candidatos potenciales para su uso como agroquímicos (Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004).

En México, uno de los países con mayor riqueza florística en el mundo, se han iniciado algunas investigaciones en donde se han encontrado numerosas especies de plantas que producen metabolitos antifúngicos. Mediante bioensayos *in vitro*, se ha demostrado el efecto fungicida de diversos metabolitos vegetales, comprobándose que éstos inhiben el desarrollo de diversos hongos patógenos, por lo cual se propone a estos metabolitos para utilizarse como antifúngicos en plantas. El anetol (Kubo y Himejima, 1991), los isoflavonoides colutequinona y la colutehidroquinona (Grosvenor y Gray, 1996), la afinina (Molina-Torres *et al.* 2000; Ramírez-Chávez *et al.* 2000), y la azadiractina entre muchos más compuestos, han

sido reportados con propiedades antifúngicas (Amadioha y Uchendu, 2003). Se ha demostrado que diversos extractos vegetales derivados de plantas medicinales poseen efecto antifúngico contra hongos fitopatógenos, tal es el caso de los compuestos de orégano (*Origanum vulgare* L.), el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) y el maguey morado (*Tradescantia spathacea* Swartz), que inhiben el crecimiento tanto *in vitro* como en campo de hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. lindemuthianum*, que causan la enfermedad de la antracnosis en gran número de plantas (Bertelli *et al.*, 2003; Nguetack *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004).

Un ejemplo de este conocimiento sobre el uso de plantas como fuente de antifúngicos es el aguacate (*Persea americana* Miller), ya que con los estudios fitoquímicos y farmacológicos que se han realizado en diferentes cultivares comerciales del aguacate, se ha demostrado la presencia de compuestos con actividad antifúngicos en la cáscara del fruto y en la semilla. En particular, el aguacate contiene entre muchos otros compuestos químicos, fenoles, carbohidratos, ácidos grasos y aceites esenciales (Napralert, 1990), entre éstos, algunos metabolitos terpénicos y derivados de ácidos grasos son los responsables del efecto antifúngico (Domergue *et al.*, 2000). También, recientemente se han reportado péptidos antimicrobianos con principal actividad sobre bacterias, como la defensina PaDef o snakina de aguacate (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013), de la que se desconoce su efecto antifúngico. Con el propósito de buscar alternativas orgánicas en el control de enfermedades que los hongos fitopatógenos ocasionan,

los extractos de aguacate muestran un gran potencial por sus efectos antifúngicos, por lo que es necesario probar dicha actividad.

Las propiedades antifúngicas del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. Var. *drymifolia*) no han sido claramente establecidas, las investigaciones con esta variedad son pocas y algunas de éstas han sido realizadas en nuestro grupo de trabajo. Fulgencio-Negrete (2011) reportó solamente un efecto antibacteriano por los extractos de hoja, tallo y fruto (completo), infiriendo esta actividad a la acetogenina persina, la que se encontró como mayoritaria en los extractos, obtenidos por maceración en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1).

Es por ello, que en la presente investigación, con el fin de estudiar las propiedades antifúngicas del aguacate nativo mexicano, se realizaron bioensayos *in vitro* para determinar el efecto de diversos tipos de extractos de fruto completo, pulpa (mesocarpo), semilla (endocarpo) y cáscara (pericarpo) contra tres hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani*).

II. ANTECEDENTES

Los agentes que causan enfermedades en las plantas se caracterizan por ser infecciosos (bióticos o vivos) y no infecciosos (abióticos o no vivos). Estos agentes bióticos incluyen las bacterias, hongos, micoplasmas, nematodos y virus, aunque los agentes patógenos más comunes en las plantas son los hongos. Los hongos son organismos filamentosos simples, no tienen clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Son más grandes que las bacterias y se identifican más fácilmente, algunas de las estructuras que producen se pueden ver a simple vista y sirven en su identificación. Los hongos atacan las plantas hospederas susceptibles a través del movimiento de sus estructuras reproductivas, como lo son los esclerocios y las esporas. Las esporas se diseminan fácilmente por medios mecánicos y en el viento y el agua. En adición, los hongos se transfieren fácilmente en las macetas con suelo contaminado y en plantas o partes de estas que tienen el patógeno.

II.1. CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS

En México se ha identificado un gran número de enfermedades en las plantas causadas por hongos patógenos, que con diversa intensidad afectan a los diferentes cultivos. Entre algunas de las enfermedades más importantes podemos mencionar la mancha negra o antracnosis del aguacatero ocasionada por los hongos *Colletotrichum gloesporioides* y *C. acutatum* (Guillén-Andrade *et al.*, 2007), la antracnosis y la pudrición gris en fresa causadas por *Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente (Averre *et al.*, 2003) y la fusariosis o punta seca

del tallo en frijol cuyo causal es *Fusarium solani* (Navarrete-Maya *et al.*, 2009). Estos hongos ocasionan estas enfermedades en una gran diversidad de plantas de valor agrícola u hortícola como papa, tomate, cucurbitáceas y frutillas (zarzamora, arándano, frambuesa) entre otras más.

Durante las últimas décadas, ha cambiado el significado de algunos términos usados en la protección de los cultivos. Así, control es un término amplio que se aplica a cualquier procedimiento empleado para reducir las poblaciones de plagas (fitopatógenos en nuestro caso) o prevenir sus efectos nocivos. Se ha impulsado un enfoque más racional de manejo conocido como Manejo Integrado de Plagas (MIP). Se trata de un sistema de manejo de plagas que en el contexto de la conjugación del ambiente y la dinámica de población de la especie plaga, utiliza todas las técnicas y métodos más apropiados para mantener en lo posible, las poblaciones de plagas a niveles por debajo de aquellos que ocasionan daño económico. El MIP tiene bases ecológicas, depende de gran manera de los factores naturales de mortalidad y del clima, y busca estrategias de control que perturben lo menos posible a esos factores. Sin embargo, en el caso de las enfermedades de las plantas, el MIP debe ser cuidadosamente revisado y permanentemente ajustado debido a la variabilidad de los fitopatógenos en la naturaleza, particularmente los hongos (Achicanoy-López, 2001).

El control de este tipo de enfermedades se realiza mediante control químico, control biológico, control cultural y control físico. El control químico se realiza principalmente utilizando plaguicidas sintéticos, denominados fungicidas, los hay

específicos y de amplio espectro, de contacto y sistémicos (se traslocan por el interior de la planta). También se debe manejar la nutrición del hospedero, la temperatura, la humedad y el uso seguro de plaguicidas, para tener un control integrado de las enfermedades (Cortinas *et al.*, 1996). Se estima que si no se utilizaran los plaguicidas para detener el efecto que los patógenos tienen sobre los cultivos, habría pérdidas de hasta un 45% en la cosecha total. Aún con el uso intensivo de fungicidas, las pérdidas en las cosechas a causa de los hongos es un grave problema en el ámbito mundial. De ahí que cualquier metodología que ayude en la resolución de este problema puede tener repercusiones tanto alimenticias como económicas, especialmente si se ayuda también a disminuir las fuertes cantidades de fungicidas sintéticos aplicados en el campo (Herrera y Carsolio, 1998).

Desde hace 15 años, existe una creciente preocupación de la sociedad acerca del uso de plaguicidas sintéticos. El uso irracional de estos agroquímicos, esto es, el incremento en la frecuencia y en la dosis de aplicación, uso de mezclas, deficiente aplicación y el uso de químicos muy persistentes, ha propiciado el surgimiento de múltiples efectos negativos en el ambiente. Como consecuencia de estos disturbios biológicos y ecológicos se han provocado cambios de un cultivo a otro menos rentable, ha disminuido la actividad agrícola y en algunos casos se ha abandonado. Ante esta situación, se considera impostergable el uso de medidas ecológicas en el combate de plagas (Rodríguez, 2000).

Con el afán de disminuir el uso de este tipo de fungicidas, se han intensificado los esfuerzos encaminados a identificar agentes de control biológico potenciales así como otras alternativas, además de desarrollar los procedimientos de producción y aplicación de esos agentes. Asimismo, aunque es considerada otra rama de control de plagas, las plantas han sido estudiadas también como un gran potencial de ser utilizadas como fuente de compuestos biocidas (Duke, 1990).

II.1.1. Principales hongos causantes de enfermedades en plantas

II.1.1.1. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

El nombre del género *Botrytis* se deriva del griego por la organización de las esporas en forma de racimos, ya que en griego *botrys* significa grupos de uvas. Mientras que el nombre de la especie *B. cinerea* deriva del latín por *uvas* como *cenizas*; aunque poético, las *uvas*, decepcionantemente, se refiere al racimo de las esporas del hongo en los conidióforos, y las *cenizas* se refieren al color grisáceo de las esporas acumuladas. Normalmente se refiere al hongo por el nombre anamorfo (forma asexual), porque la fase sexual raras veces se observa. El teleomorfo (forma sexual) es un ascomiceto, *Botryotinia fuckeliana* (INFOAGRO, 2002).

B. cinerea se caracteriza por las abundantes conidias (esporas asexuales) de forma oval en el extremo de conidióforos grises ramificados. El hongo además produce esclerocios altamente resistentes como formas de resistencia en cultivos viejos. Pasa el invierno en forma de esclerocio o como micelio intacto, ambas

formas germinan en primavera para producir conidióforos. Las conidias se dispersan por el viento y la lluvia y causan nuevas infecciones (Figura 1A) (Phillips *et al.*, 1994).

B. cinerea daña el fruto principalmente de vid o de fresa, produciendo un ablandamiento, y cuando es muy severo se cubre completamente con vello gris (Figura 1B). Su desarrollo se ve favorecido con la alta humedad y bajas temperaturas, puede penetrar en el fruto sin necesidad de heridas y durante la cosecha los frutos sanos pueden ser contaminados con esporas provenientes de otros infestados. Las flores abiertas son fácilmente infectadas debido a la humedad aprisionada entre sus estructuras y a la exudación de jugos azucarados en los estigmas (Figura 1C). También daña tejidos vegetativos como hojas y tallos, denominados tizones o pudriciones (Figura 1D) (Pérez *et al.*, 1991).

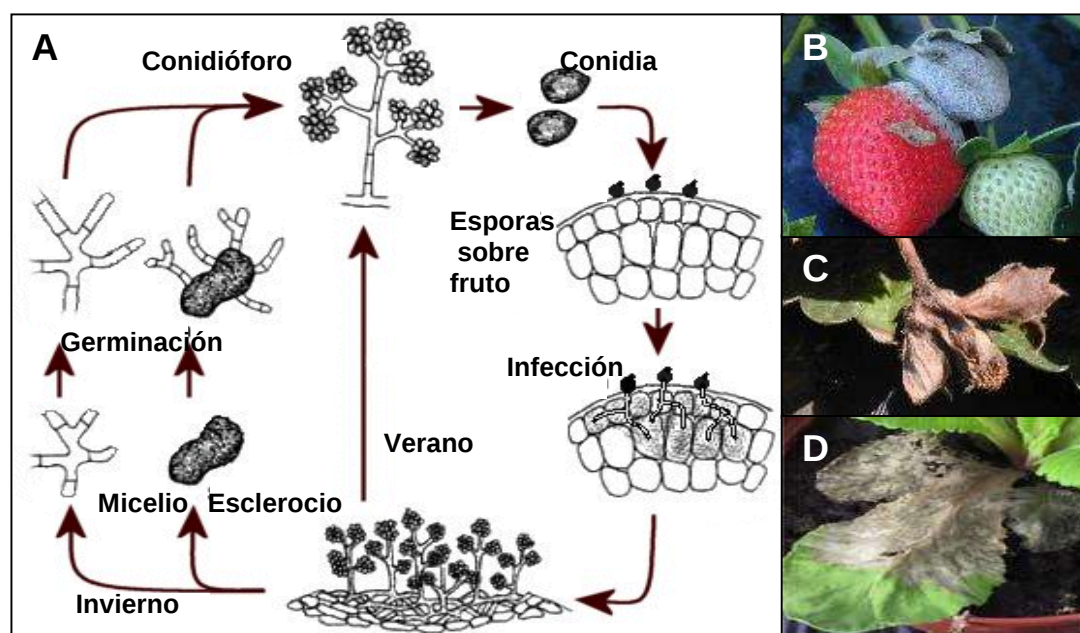


Figura 1. A) Ciclo de la enfermedad de *Botrytis cinerea*, B) Moho gris en frutos, C) en flores y D) en hojas de fresa (INFOAGRO, 2002).

Taxonomía (Fiallos, 2012)

Reino: Fungi
División: Amastigomycota
Clase: Deuteromycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Botrytis*
Especie: *Botrytis cinerea*

***II.1.1.2. Colletotrichum acutatum* Simmonds**

Presenta colonias densas con micelio aéreo blanco, que se va volviendo gris rosado con la edad. Las conidias en masas tienen color rosa salmón. Sin esclerocios, pero con setas en la planta huésped. Sus conidias son aseptadas, hialinas, cilíndricas, fusiformes, ocasionalmente constreñidas en el centro, de 12.8 x 4.2 µm. Los huéspedes son diversos pero mayormente se asocia con enfermedades de aguacate, arándano y fresa. Provoca una podredumbre de color pardo-rojizo en cuello de la raíz, la sección longitudinal de ésta, muestra una coloración negruzca del córtex. Los síntomas también incluyen marchitez de las flores debido a la infección de las mismas y podredumbre de las infrutescencias verdes y en proceso de maduración. En las infrutescencias las lesiones redondas aparecen cubiertas por masas de esporas de color salmón. En hojas, las lesiones son redondas, de 5 a 10 mm de diámetro, de color marrón claro con bordes rojizo-

púrpura. En condiciones de altas humedades aparece sobre las lesiones unas masas mucosas de tonalidad rosada que se van oscureciendo progresivamente (De los Santos y Romero, 1999; Barrau *et al.*, 2001).

El proceso de infección de *Colletotrichum* spp. inicia con la adhesión de las esporas, que una vez que germinan, forman el apresorio, el cual se desarrolla y forma la hifa infectiva que penetra la células vegetal. Después de la penetración se forma una red de hifas por debajo de la cutícula en hojas (Perfect *et al.*, 1999) (Figura 2).

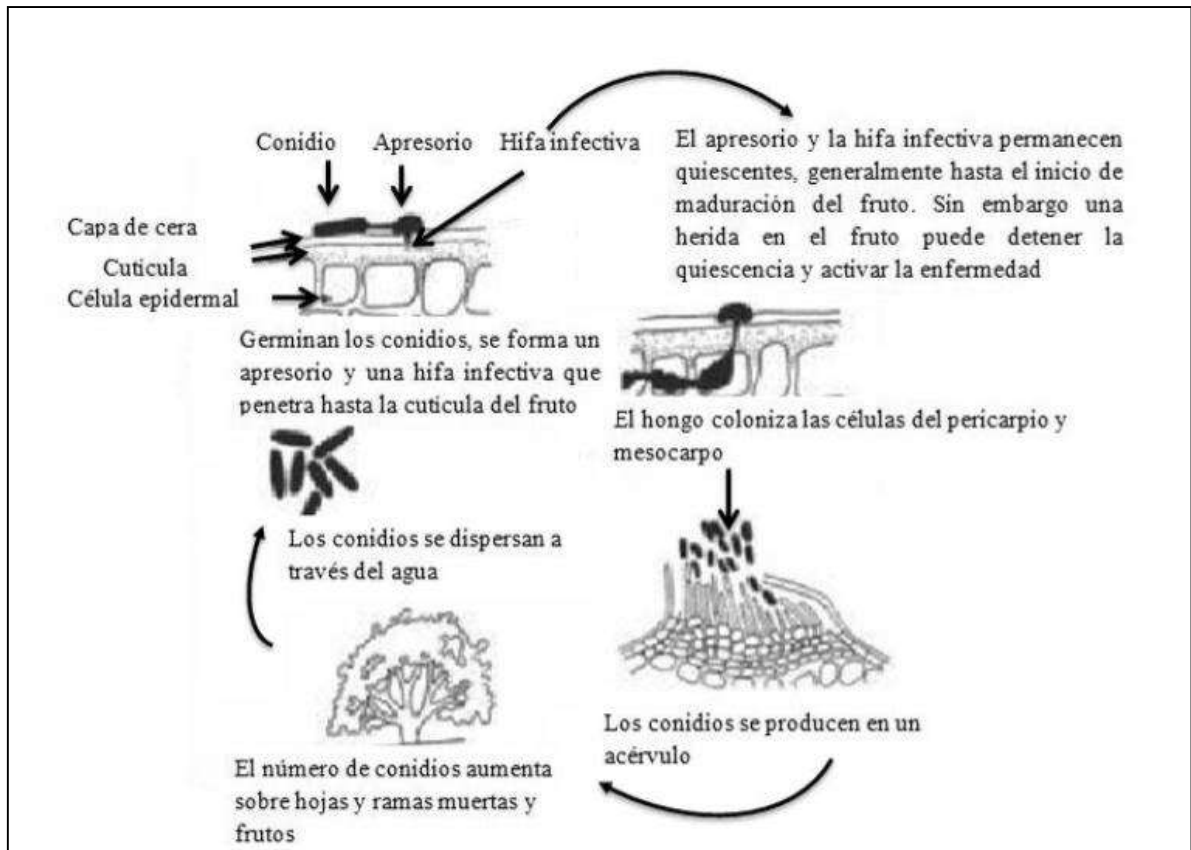


Figura 2. Ciclo de la enfermedad de *Colletotrichum acutatum* en aguacate (Whiley *et al.*, 2002).

Taxonomía (Villanueva, 2004)

Reino: Fungi
División: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Phyllachorales
Familia: Phyllachoraceae
Género: *Colletotrichum*
Especie: *C. acutatum*

***II.1.1.3. Fusarium solani* Mart. (Sacc.)**

La fusariosis es una enfermedad causada por el hongo *Fusarium solani* que produce daños directos en el cuello del tallo y en el sistema radical de las plantas. En la base del tallo, a nivel del suelo, se producen pudriciones secas que más tarde invaden a las raíces, los tejidos se tornan rojizos y se oscurecen paulatinamente hasta necrosar. *F. solani* puede causar importantes mermas en los rendimientos, afectando al sistema radicular y vascular de las plantas. *F. solani* se encuentra universalmente en el suelo y es polífago, causando pudrición de la planta, raíz y tallo en muchísimas especies de plantas (pertenecientes a 65 familias botánicas) (Martínez-González *et al.*, 2006).

No obstante, es preciso evidenciar que dentro de esta especie, existen “formas especiales”, cada una de las cuales afecta solo a un número limitado de especies

pertenecientes a una (o a pocas) familia botánica. Por ejemplo, *F. solani* f.sp. pisi afecta al chícharo, *F. solani* f.sp. fabae a *Vicia* spp (habas), *F. solani* f.sp. phaseoli al frijol y *F. solani* f.sp. cucurbitae a las cucurbitáceas, aunque se conocen casos de infección cruzada con otras especies, especialmente entre especies pertenecientes a la misma familia. *F. solani* permanece en el suelo creciendo de forma saprofítica sobre los residuos de plantas hospedantes; en la zona radicular de plantas susceptibles el hongo puede desarrollarse de forma saprófita, antes de invadir las raíces; la diseminación de las esporas y del micelio ocurre por el traslado de residuos infectados y al arrastre por el agua; las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad pueden variar con el cultivo (Martínez-González *et al.*, 2006).

Taxonomía (EcuRed, 2015)

Reino: Fungi
División: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Nectriaceae
Género: *Fusarium*
Especie: *Fusarium solani* W.C. Snyder & H.N. Hansen

Además de conidios (macro y microconidios) en el suelo, el hongo produce esporas (clamidosporas) que le permiten superar condiciones adversas; la germinación de las clamidosporas es estimulada por los exudados producidos por las raíces de

numerosas plantas, incluso de especies no hospedantes; la persistencia de este patógeno en el suelo es muy larga y puede durar varios años, por lo que una vez que se ha establecido en el suelo se hace necesario adoptar rotaciones muy largas (5-6 años) (Martínez-González *et al.*, 2006) (Figura 3).

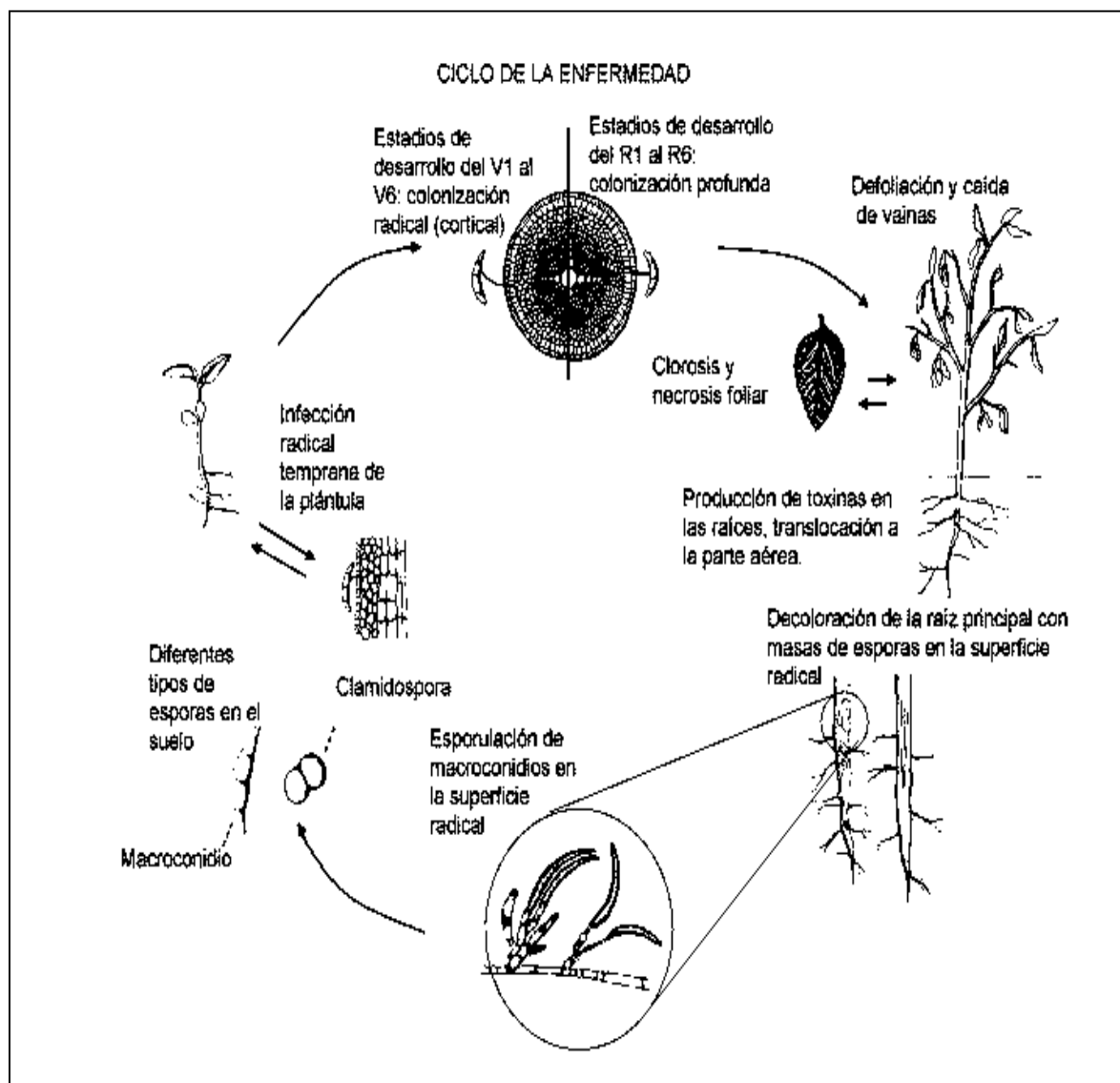


Figura 3. Ciclo de la enfermedad de *Fusarium solani* en plantas de soja (Westphal *et al.*, 2008).

II.2. ANTIFÚNGICOS DE ORIGEN VEGETAL

Diversos estudios realizados sugieren que la propiedad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por las plantas, es un fenómeno muy frecuente y la diversidad de hongos fitopatógenos ha generado también diversidad de respuestas al interactuar con los vegetales. A partir de información recabada se ha calculado que existen alrededor de 50 familias de plantas en las que se han encontrado especies con características antifúngicas destacando la familia Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae (Bowers y Locke, 1999). Las plantas están compuestas de un gran número de metabolitos secundarios, algunos autores mencionan que pueden llegar a existir más de 100000 metabolitos secundarios involucrados en la defensa de todas las especies de plantas y de los cuales solo se conoce el 10% (Mazid *et al.*, 2011).

Son varios los tipos de compuestos secundarios que tienen propiedades antifúngicas, entre ellos: terpenos, fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, entre otros más. De éstos, se han identificado diversos metabolitos antifúngicos, aunque los del grupo terpénico o fenoles, mayormente han sido estudiados.

Entre los de origen fenólico está el timol y algunos taninos del tomillo (*Thymus vulgaris*), taninos de bardana (*Arctium lappa*), cumarinas de comino (*Carum carvi*), taninos de cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) y el resveratrol de la uva (Van Baarlen *et al.*, 2004; Giovinazzo *et al.*, 2012). Los aceites esenciales de plantas aromáticas como albahaca (*Ocimum basilicum*), del laurel (*Laurus nobilis*), del

clavo (*Syzygium aromaticum*), de la menta (*Mentha piperita*), de la ajedrea (*Satureja montana*) y del tomillo (*Thymus vulgaris*), presentan actividad sobre hongos (Montes, 1996; Murphy, 1999).

La presencia de algunos compuestos nitrogenados y alcaloides con actividad antifúngica como la piperina de la pimienta negra (*Piper nigrum*), la colchicina del lirio glorioso (*Gloriosa superba*), la berberina del sello de oro (*Hydrastis canadensis*), la serpentina de raíces de *Rauvolfia serpentina*, la reserpina de vincapervinca (*Vinca minor*), la mescalina del peyote (*Lophophora williamsii*), el opio de la amapola (*Papaver somniferum*) y la alicina del ajo (*Allium sativum*), presentan actividad antifúngica de amplio espectro (Montes, 1996; Murphy, 1999).

El uso de extractos vegetales como alternativa de control biológico de hongos patógenos de plantas se ha comprobado por diversas investigaciones. Hernández *et al.* (2007) reportan la eficacia de diversos extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos: Extractos de ajo (*Allium sativum*), acuyo (*Piper auritum*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus*), inhibieron el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* en 54.3, 48.8, 47.7 y 39% respectivamente; el guamúchil (*Pithecellobium dulce*) redujo el desarrollo de *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotia* spp. y *Rhizopus* spp.; en el caso de *B. cinerea*, la inhibición se presentó entre un 50 y 78%. Así mismo, extractos crudos de *Allium* y *Capsicum* afectaron la germinación de esporas de *B. cinerea* mientras que los extractos de nogal negro (*Juglans nigra*), liquidámbar (*Liquidambar*

styraciflua), *Matricaria* spp., durazno (*Prunus persica*), peral (*Pyrus communis*) y tejo inglés (*Taxus canadensis*) inhibieron su germinación entre 90 y 99%.

Wilson *et al.* (1997), realizaron una rápida evaluación de diferentes extractos de especies de plantas como chile (*Capsicum annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*), ajo (*Allium ampeloprasum*, *A. ramosum* y *A. sativum*), presentando actividad antifúngica en *B. cinerea*, inhibiendo la germinación de esporas en 48 h en una dilución del 10% del extracto crudo. Bautista-Bañosa *et al.* (2000), evaluaron la actividad antifúngica de diversos extractos foliares de planta de *Annona muricata*, *Iris spuria*, *Chrysophyllum cainito*, *Pithecellobium dulce* y *Psidium guajava*, los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium*; extractos foliares de *Crataegus mexicana*, *Iris spuria* y *Pithecellobium dulce* redujeron el crecimiento de *Pestalotiospsis* en un 50%.

La especificidad de los extractos hacia ciertos patógenos es muy interesante, además de que algunos de los extractos mencionados, presentan mayor actividad en cierta etapa de desarrollo de la planta. Por lo que aún es necesario seguir realizando investigaciones a partir de extractos de plantas que presenten actividad antimicrobiana hacia patógenos de interés económico en la agricultura, ya que la mayoría de los extractos analizados son probados *in vitro* y solo pocos estudios se evalúa su efecto en el control de enfermedades en plantas y en postcosecha.

Dado el evidente potencial de algunos extractos vegetales para inhibir el crecimiento de ciertos fitopatógenos, surge el interés en este trabajo de explorar el

potencial de extractos derivados de los frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. Var. *drymifolia*) para controlar el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos.

II.3. AGUACATE (*Persea americana* Miller)

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae y es considerado como uno de los cultivos más importantes para México, puesto que nuestro país es el principal productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2005) lo que permite una entrada importante de divisas por la exportación de su fruto. Por otro lado, México forma parte del centro de origen de la especie, por lo que alberga una amplia diversidad genética, sobre todo de variedades nativas entre las más importantes está la variedad Mexicana (aguacate “criollo Mexicano”, *P. americana* Mill. Var. *drymifolia*) por su uso como portainjerto del cultivar Hass y por su alto potencial como planta medicinal (Sánchez-Pérez, 2001; Bello-González, 2006).

II.3.1. Etnobotánica y farmacología de aguacate

Hernández (1570-1577; Obras completas, tomo I, cap.CIII ed. 1959) indica el nombre azteca del aguacate *Ahuacacuahuatl* (“árbol de los testículos”) y señala algunos de sus usos medicinales durante la época prehispánica: las hojas empleadas en baños como tónico corpóreo y el aceite del hueso contra el salpullido, la disentería y como cicatrizante de llagas (Alfaro, 1984).

El banco de datos del IMEPLAN en 1990 (citado por Ortíz de Montellano, 1993) enlista las siguientes propiedades terapéuticas populares de la especie en el país: afrodisíaco, contra abscesos, aftas, anginas, anticatarral, antidiarreico, antidisentérico, antineurálgico, contra la sarna, el paludismo y los empeines, como antiparasitario, antitumoral, antirreumático, aperitivo, astringente, catártico, cicatrizante y regenerativo de llagas y heridas, emenagogo, eupéptico, hemostático, pectoral y expectorante, carminativo, contra contusiones, dermatosis, enfermedades exantemáticas, sordera, tiña, como tónico capilar y para aumentar la secreción espermática. En diferentes investigaciones se ha comprobado que diversas partes de la planta de aguacate tienen propiedades antimicrobianas (Lozoya, 1994), en archivos del IMSS se enlistan las siguientes propiedades medicinales de esta especie (Alfaro, 1984):

Hojas.- Tomadas en infusión como vermífugo intestinal (nahuas de Puebla), tomadas en decocción contra la diarrea (Quimixtlán, Puebla); tomadas en infusión contra los dolores de estómago (mixes de Oaxaca y en Ixcacautitla, Veracruz); tomadas en infusión y frotadas en el cuerpo contra cólicos, parásitos intestinales y reumatismos (Culiacán y El Dorado, Sinaloa); hervidas en agua y aplicadas en baños de temazcal como desinfectante de la mujer después del parto (Xoloxtoc, Morelos); tomadas en decocción contra los dolores de muelas y odontálgico (Jesús del Monte, Michoacán).

Semillas.- Molidas y aplicadas con aceite como antiinflamatorio sobre fracturas y moretones (otomíes del Estado de México); se muele en agua y se aplica en todo

el cuerpo contra el “susto” (nahuas de Puebla); también se raspa y se macera en agua, tomándose como vermífugo intestinal (Tenampilco, Puebla).

Ramas.- Hervidas en agua y aplicadas en baños para desinfectar la matriz después del parto (Guerrero).

Cáscara del fruto.- Macerada en agua y tomada como vermífugo intestinal (Misantla, Veracruz).

II.3.2. Metabolitos secundarios de aguacate biológicamente activos

Se han aislado varios metabolitos secundarios biológicamente activos de aguacate, aunque los reportes generalmente se refieren a variedades o cultivares comerciales como el “Hass” (*P. americana* Mill.) o variedades como la Guatemalteca (*P. americana* Var. *guatemalensis*). Las propiedades antifúngicas han sido atribuidas a diferentes compuestos: Cuatro compuestos aislados de la cáscara de frutos inmaduros de aguacate identificados como: 1,2,4-trihidroxieptadeca-16-ino, 1,2,4-trihidroxieptadeca-16-eno, y 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-16-ino, (este último ya se había detectado previamente en semillas de aguacate) y el más potente 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15-dieno, poseen notable actividad contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Domergue *et al.*, 2000).

II.3.3. Aguacate nativo mexicano (*P. americana* Mill. Var. *drymifolia*)

La variedad mexicana de aguacate es de origen, cultivo y distribución del centro y sur de México (*P. americana* Mill. Var. *drymifolia* `Schltdl. & Cham.` S.F. Blake), de

manera común se le conoce como aguacate criollo Mexicano, el aguacate nativo de México. Esta planta se caracteriza por ser un árbol perennifolio extremadamente vigoroso (tronco potente con ramificaciones vigorosas), pudiendo alcanzar hasta 30m de altura. Su sistema radical es bastante superficial. Hojas alternas, pedunculadas, muy brillantes; con flores perfectas en racimos subterminales; sin embargo, cada flor abre en dos momentos distintos y separados, es decir los órganos femeninos y masculinos son funcionales en diferentes tiempos, lo que evita la autofecundación. Por esta razón, las variedades se clasifican con base en el comportamiento de la inflorescencia en dos tipos A y B (protándrica y protoginia), en ambos tipos, las flores abren primero como femeninas, cierran por un período fijo y luego abren como masculinas en su segunda apertura. Su fruto es una baya de forma periforme, ovoide, globular o elíptica alargada. Su color varía del violeta al negro, son de más de 5 cm de longitud, con sabor a anís, la cáscara es delgada, lisa y suave; las hojas en su mayoría son membranosas, presentan venas laterales divergiendo por lo general menos de 40 grados, son de color verde oscuro; tanto las hojas como la corteza del tallo tienen esencia a anís, los ápices de las ramillas muestran pubescencia subaracnoidal; la lámina foliar usualmente contiene secreciones cerosas granuladas en la superficie del envés (Bergh, 1992).

Su fruto es una baya de forma periforme, ovoide, globular o elíptica alargada. Su color varía del violeta al negro, son de más de 5 cm de longitud, con sabor a anís, la cáscara es delgada, lisa y suave (Figura 4). La semilla representa 2/3 del tamaño del fruto, es única, puede ser ovoide, redonda o cónica, de 5 a 6.4 centímetros de largo, dura y pesada, de color marfil rosado, envuelta en dos capas como papeles

de color café, frecuentemente adheridas a la cavidad pulposa (Figura 4) (Bergh, 1992).

La semilla contiene un fluido lechoso con el olor y gusto de almendra. A causa de su contenido de taninos, se vuelve rojo cuando se expone al sol, proveyendo un rojo indeleble, tinta marrón o negra que fue usada para escribir muchos documentos en los días de la Conquista Española, estos archivos se conservan ahora en Popayán. La tinta también se usaba para marcar algodón y lienzos textiles(Alfaro y Evangelista, 1995).



Figura 4. Frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. Var. *drymifolia*), se señala la cáscara (pericarpio), pulpa (mesocarpio) y semilla (endocarpio) (Imagen: LabBiotecVeg/UMSNH).

En Guatemala, la corteza se hierva con tinturas para extraer el color (Alfaro y Evangelista, 1995). Se ha reportado el uso de esta planta y sus productos como terapéuticos, artesanal e insecticida y fungicida, por lo cual diversas investigaciones se han realizado cubriendo aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos.

III. JUSTIFICACIÓN

Con base en las evidencias de las propiedades antifúngicas atribuidas a diferentes partes de la planta de aguacate, pero en específico a la de los frutos, el aguacate puede considerarse una fuente potencial de metabolitos antifúngicos. En México, principalmente en la región aguacatera del Edo. de Michoacán, se cuenta con diversas accesiones o individuos de aguacate nativo mexicano por lo que resulta importante evaluar la actividad en contra de hongos fitopatógenos, de extractos de frutos completos o partes de éste, con el fin de generar conocimiento acerca de que parte posee la mayor parte antifúngica y señalar los posibles metabolitos con mayor actividad.

IV. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios de extractos del fruto de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Var. *drymifolia*) poseen propiedades antifúngicas sobre hongos fitopatógenos.

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antifúngico de extractos del fruto del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Var. *drymifolia*) y las partes de éstos sobre hongos fitopatógenos.

V.1.1. Objetivos específicos

- 1) Realizar extracción por maceración en metanol de fruto, semilla, pulpa y cáscara de aguacate nativo mexicano y obtener fracciones por disolución en metanol, etanol y DMSO.
- 2) Determinar el efecto antifúngico de las diferentes fracciones de los extractos de aguacate nativo mexicano en bioensayos *in vitro* sobre tres hongos fitopatógenos.
- 3) Seleccionar la fracción activa del extracto con mayor actividad antifúngica en bioensayos *in vitro* sobre tres hongos fitopatógenos.
- 4) Obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la fracción activa y del extracto con mayor efecto antimicrobiano.
- 5) Identificar los compuestos mayoritarios de la fracción más activa mediante un perfil cromatográfico.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Frutos de aguacate: Las plantas fuente de los frutos de aguacate nativo mexicano pertenecen a huertos de Tingambato, Michoacán. La colecta de los frutos se realizó en el mes de junio de 2014 y fueron congelados a -20°C hasta la obtención de extractos. De éstos se obtuvo el pericarpio (cáscara), el mesocarpio (pulpa) y el endocarpio (semilla), de los que se obtuvieron los extractos.

Hongos: Los hongos (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani*) fueron obtenidos del cepario del Lab. de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Cada una de las cepas fúngicas fueron cultivadas en Agar PDA (Papa-Dextrosa-Agar) a un pH de 5.05 ($\pm$ 0.05), para posteriormente incubarlas de acuerdo a los requerimientos de temperatura para su crecimiento. La cepa de *B. cinerea* fue incubada a temperatura ambiente (20 a 25 °C), mientras que las cepas de *C. acutatum* y *F. solani*, se cultivaron a 28°C; se empleó el método de siembra sucesiva por micelio en cajas de Petri, cada 15 días.

VI.2. MEDIO DE CULTIVO

Bajo toda la experimentación fue utilizado el medio PDA, que fue preparado en base al medio de cultivo deshidratado (Agar-Dextrosa-Papa) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Bioxon®) (39g por cada litro de agua), ajustando el

pH a 5.05 (± 0.05), mediante la adición ácido clorhídrico al 1 N (solución ácida) y/o tras agregar hidróxido de sodio al 1N (solución básica) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medio de cultivo Papa-dextrosa-agar comercial (Bioxon®).

Formulación (g/L de agua)	
Infusión de papa	4.0
Dextrosa	20.0
Agar bacteriológico	15.0
pH 5.6 $\pm$ 0.2	

VI.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Frutos completos, cáscara, pulpa y semilla de aguacate nativo mexicano fueron pulverizados, sometiéndolos a nitrógeno líquido y posterior molienda en licuadora a alta velocidad (en frío). La extracción inicial para los frutos y cada parte de éstos, fue realizada por maceración metanólica en frío durante 7 días, contenidos cada macerado en un frasco distinto. Cada frasco fue cerrado herméticamente y almacenado a temperatura de refrigeración (de 2 a 4°C), en ausencia de luz para evitar posibles reacciones que originen la degradación de sus compuestos. A cada uno de ellos, se adicionó 50 mL de solvente por cada 10 g de muestra pulverizada.

VI.3.1.Obtención de fracciones

Cada uno de los diferentes extractos, posteriormente fueron fraccionados por disolución progresiva con los solventes metanol, etanol y DMSO1%, de la siguiente manera:

- a) Cada extracto se filtró a través de papel filtro W.1.
- b) El extracto se llevó a evaporación, con remoción al vacío en un rotavapor (60°C) a sequedad, obteniendo los extractos en el matraz de evaporación.
- c) Se realizó un fraccionamiento del extracto, adicionando diferentes solventes en orden de polaridad. Primeramente se adicionó un volumen de 20 mL de metanol y los compuestos solubles fueron removidos del matraz de evaporación, considerando éste como la fracción metanólica (FMeOH); al mismo matraz de evaporación de cada extracto, se le adicionó 20 mL de etanol, consiguiendo la fracción etanólica (FEtOH); finalmente, los residuos que permanecieron en el matraz de evaporación, fueron disueltos en una solución de dimetilsulfóxido 1% (FDMSO1%), con el fin de disolver metabolitos menos polares.
- d) Cada fracción de los diferentes extractos fueron de nuevo llevadas a evaporación al vacío en rotavapor para lograr extractos o fracciones más concentradas. La evaporación de las fracciones metanólicas y etanólicas fue a 50°C, mientras que la del DMSO1%, se realizó a 70°C.
- e) Cada fracción fue resuspendida en el solvente correspondiente en concentraciones de 50 mg/mL.

- f) Cada fracción de los frutos y diferentes partes de éste, se mantuvieron en refrigeración hasta su uso en los bioensayos.

VI.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

VI.4.1. Bioensayos antifúngicos

Los ensayos se realizaron mediante la técnica de difusión en placa, con cada uno de los extractos fraccionados, para los tres hongos en estudio (*B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. solani*). Con este ensayo se determinó el efecto antifúngico, llevándose a cabo con la aplicación de 100 µL de cada fracción en el centro de la caja Petri (4.5 cm de diámetro) sobre el medio de cultivo sólido PDA, en una concentración de 50mg/mL.

Previo a la siembra de los respectivos hongos, cada solvente se permitió evaporar o difundirse en el medio de cultivo, para posteriormente sembrar un segmento circular de micelio (5 mm de diámetro), cortado con tubo de vidrio estéril.

Además de los extractos fraccionados, fueron ensayados el efecto del fungicida comercial sintético, Tecto 60® (Tiabendazol) a una concentración de 100 mg/mL, considerado el control positivo. Los controles negativos fueron aquellos en que se aplicaron 100 µL de los solventes vehículo según la fracción: metanol, etanol y DMSO1%.

Una vez inoculadas las cajas Petri, fueron incubadas de acuerdo a los requerimientos de cada hongo, 20-25°C para *B. cinerea* y 28°C para *C. acutatum* y *F. solani*, durante 8 días. Se invirtieron las placas al ser incubadas para evitar alteración en el crecimiento de los hongos a consecuencia de la humedad existente. Cada experimento se realizó con una n=3, por duplicado.

A los 8 días de cultivo, se determinó el crecimiento del micelio sobre el extracto en placa, tiempo de máximo de crecimiento del hongo en medio PDA en cajas Petri de 4.5 cm de diámetro. Estos valores se presentan en porcentaje (%), tomando como control el crecimiento de *B. cinerea* o de los otros dos hongos, sobre el solvente de dilución de los extractos, con un 100% de crecimiento de micelio, correspondiente a 0% de inhibición.

VI.4.2. Determinación de la MIC

La determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada en los extractos con mayor actividad antifúngica, ésta se obtuvo probando el efecto con la aplicación de diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL), en bioensayos de difusión en placa sobre los tres hongos en estudio.

Mediante la difusión en placa se obtuvo la MIC, sobre una placa con medio de cultivo (agar PDA) aplicando 100 µL de cada extracto en las concentraciones antes mencionadas, permitiendo la evaporación de solventes del medio de cultivo, para posteriormente sembrar un segmento de micelio en el centro de la zona de

aplicación de cada extracto. También fueron utilizados los solventes correspondientes de cada fracción como tratamientos control negativo.

Realizados los ensayos, las placas inoculadas fueron incubadas de acuerdo a los requerimientos de temperatura para su crecimiento, las cepas de *Botrytis cinerea* se incubaron a una temperatura ambiente (20 a 25 °C), mientras que las cepas de *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium solani* a una temperatura de 28°C, durante 8 días.

VI.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE LA FRACCIÓN CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La identificación fue realizada por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

VI.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM)

La identificación de los compuestos presentes en la fracción más activa del extracto de aguacate, se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 series II; Agilent, Foster City, Ca. U.S.A.) con detector de masas 5973 (Agilent Technologies), utilizando la columna HP-5MS, con una longitud de 30 metros y un diámetro interno de 250 µm con 0.25 µm de film. El gas acarreador fue helio ultra puro en flujo constante de 1 mL/min. El volumen de inyección de la muestra fue 1 µL, tipo Split a una temperatura del inyector de 270°C, la temperatura del detector fue de 300°C. Las condiciones de operación del horno fueron las siguientes: la

temperatura inicial fue de 150°C por 3 min, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C mantenida por 12 minutos (tiempo total de 40.6 minutos) y una post-corrida a 300°C por 3 minutos. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, “Chem Station” (Agilent Technologies) (Báez-Magaña, 2014).

VI.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de diferenciación de medias de TUKEY (0.05), analizando una n=6. Para realizar la prueba de ANOVA, los datos de los experimentos se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980), donde X es el valor en porcentaje a transformar:

$$\sqrt{X + 0.5}$$

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación, el principal objetivo fue determinar el efecto antifúngico de los extractos de fruto completo, cáscara, pulpa y semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Mill. Var. *drymifolia*), específicamente contra tres hongos fitopatógenos de fresa (*B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. solani*), considerados como algunos de los hongos más importantes como patógenos de plantas de alto valor agronómico.

Lo anterior fue basado en la necesidad de obtener y usar nuevos fungicidas, alternativos a los existentes, debido a la resistencia biológica hacia los químicos sintéticos y a los efectos secundarios, provocados por su uso irracional (Russell y McDonnell, 2000).

La búsqueda incesante de nuevas moléculas con características específicas no tóxicas y altamente efectivas para controlar plagas y enfermedades en plantas de valor agrícola, son temas de investigación recurrente, con impacto científico económico y social sin discusión (Molina-Torres *et al.*, 2000; Giordani *et al.*, 2001).

Dentro de las alternativas para esta búsqueda, los frutos de aguacate fueron considerados como una potencial fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, debido a los reportes encontrados al respecto (Domergue *et al.*, 2000). Debido a esto, los frutos completos y sus diferentes partes fueron seleccionados para realizar el presente estudio con el propósito de

determinar que parte del fruto contiene los metabolitos mayormente con propiedades antifúngicas.

VII.1. EFECTO ANTIFÚNGICO DE LAS FRACCIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE AGUACATE NATIVO MEXICANO

A los 8 días de los bioensayos de inhibición de las fracciones (FMeOH, FEtOH y FDMSO1%) de los extractos metanólicos de fruto, cáscara, pulpa y semilla de aguacate nativo mexicano a una concentración de 50 mg/mL, sobre *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. solani*, se obtuvieron los porcentajes de inhibición para determinar el efecto antifúngico. El efecto inhibitorio fue dependiente de la fracción, pero también del comportamiento del crecimiento de cada hongo en estudio.

Aunque con ninguna de las fracciones se logró un 100% de inhibición, el mayor efecto inhibitorio sobre *C. acutatum* se observó con la fracción metanólica de semilla, con un porcentaje de inhibición del 40%, sin embargo una alta inhibición fue mostrada por las fracciones etanólicas de pulpa, semilla, cáscara y fruto con porcentajes de 18, 32, 28 y 42%, siendo ésta última la de mayor efecto antifúngico de la fracción etanólica. Porcentajes menores de inhibición fueron ejercidos por las demás fracciones metanólicas y las de DMSO 1% de cada una de las partes del fruto de aguacate (Figura 5).

Para *F. solani*, la mayor diferencia significativa fue obtenida con el fungicida comercial (Tecto60), seguidos por los valores de la fracción metanólica de semilla y la fracción etanólica de fruto.

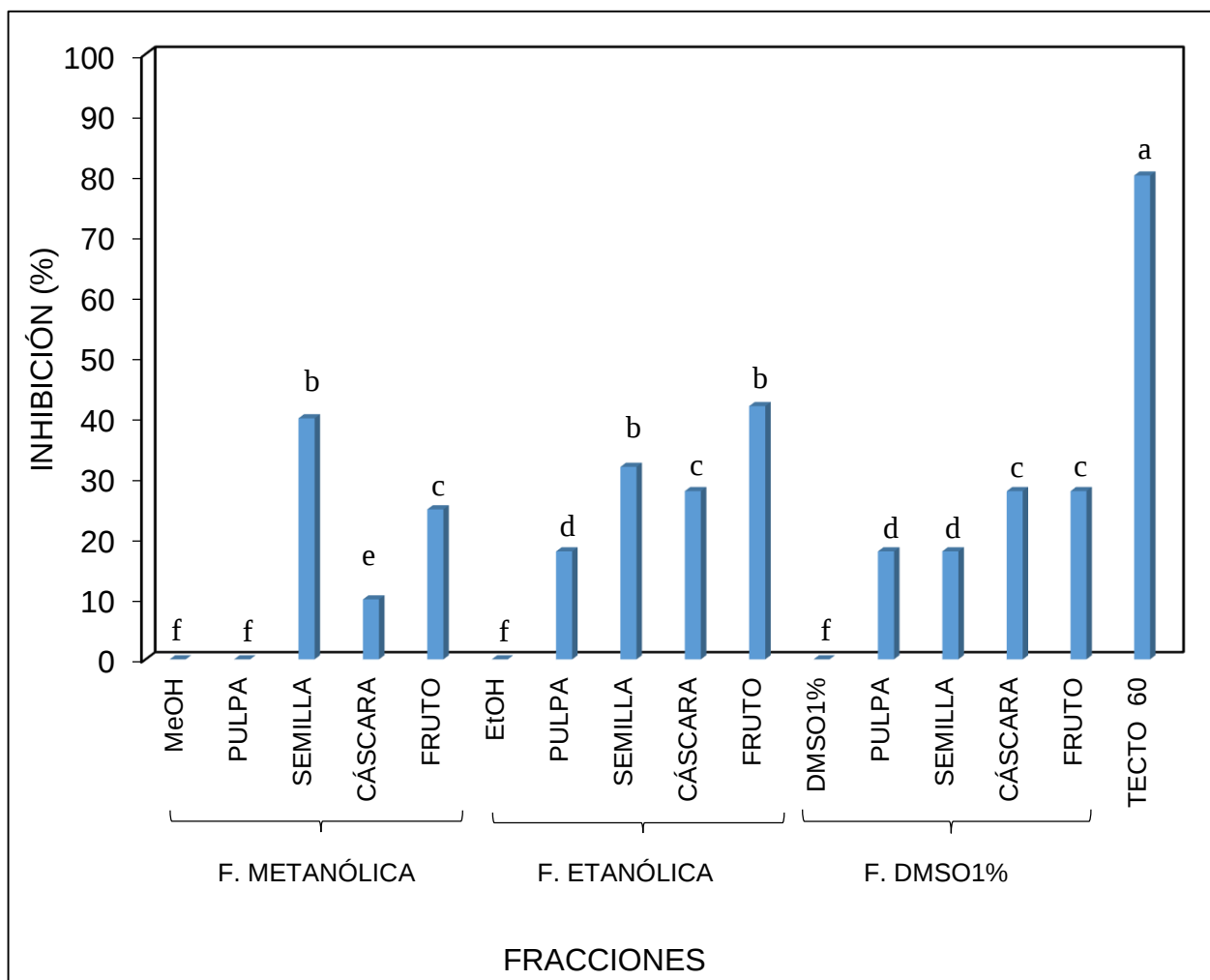


Figura 5. Porcentaje de inhibición de fracciones (100 μ L de 50 mg/mL) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*), a los 8 días de cultivo de *C. acutatum*. Letras diferentes indican diferencia significativa (n=3, p<0.05).

Los resultados observados sobre el efecto inhibitorio de las fracciones de aguacate nativo mexicano sobre *F. solani*, también fueron mayormente por las fracciones tanto metanólicas como etanólicas, principalmente de semilla con un 50 y 40%, respectivamente; y por las de fruto con 30 y 45%, respectivamente. Las fracciones disueltas con DMSO1% no tuvieron efecto antifúngico y el fungicida comercial inhibió en un 90% a este hongo. Las fracciones con mayor efecto antifúngico,

fracción metanólica de semilla y fracción etanólica de fruto no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero si con las demás fracciones (Figura 6).

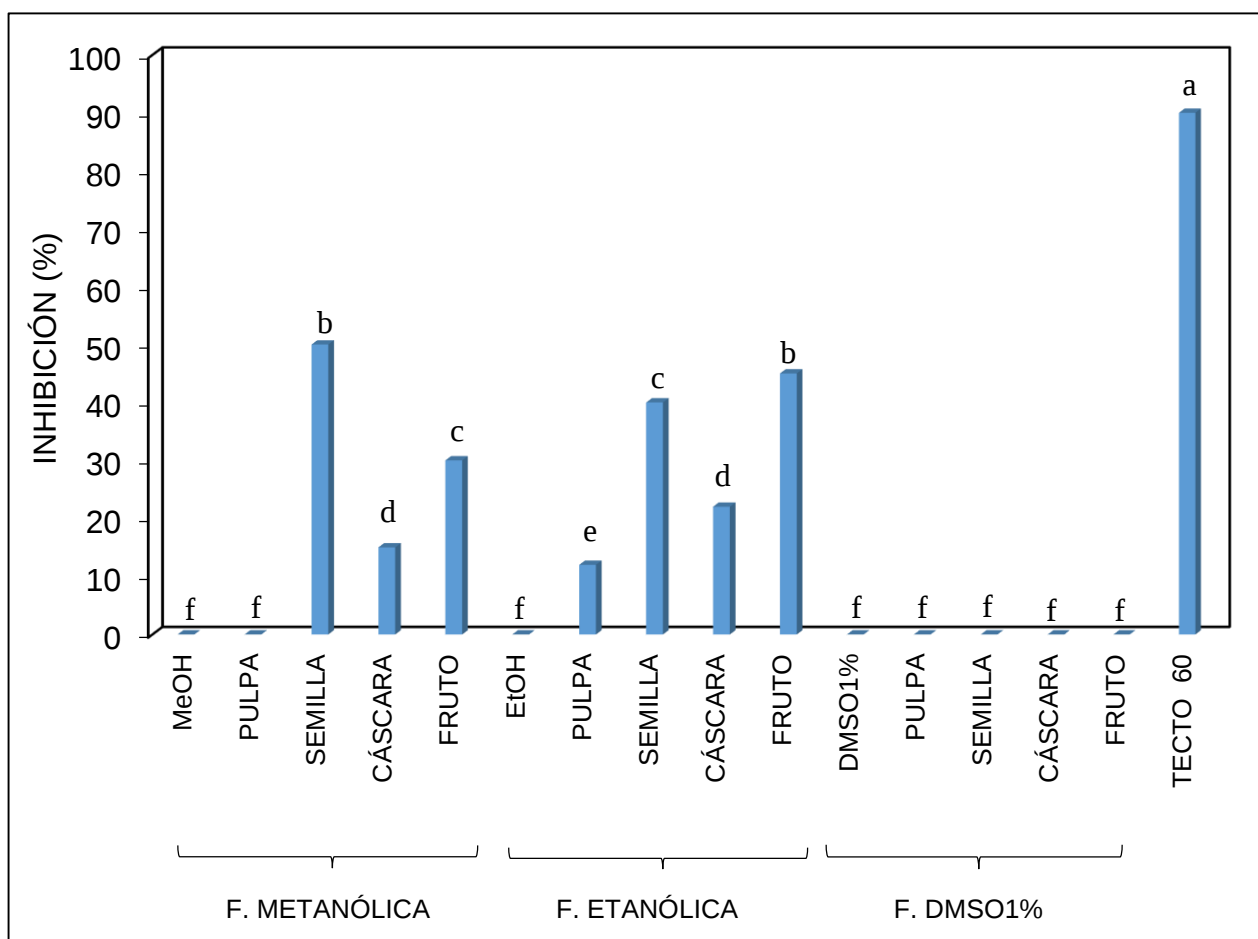


Figura 6. Porcentaje de inhibición de fracciones (100µL de 50 mg/mL) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*), a los 8 días de cultivo de *F. solani*. Letras diferentes indican diferencia significativa (n=3, p<0.05).

El efecto inhibitorio de las fracciones de aguacate nativo mexicano sobre el crecimiento de *B. cinerea*, también fue mayor con el extracto metanólico, alcanzando el mayor porcentaje de inhibición con la fracción de semilla, con un 70%, seguidos por la fracción etanólica de fruto con un 64% de inhibición. Estos valores no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero si con todas los

demás fracciones. De manera similar al efecto en *F. solani*, las fracciones de DMSO1% no tuvieron efecto inhibitorio. El Tecto60 mostró un 100% de inhibición del crecimiento de micelio (Figura 7).

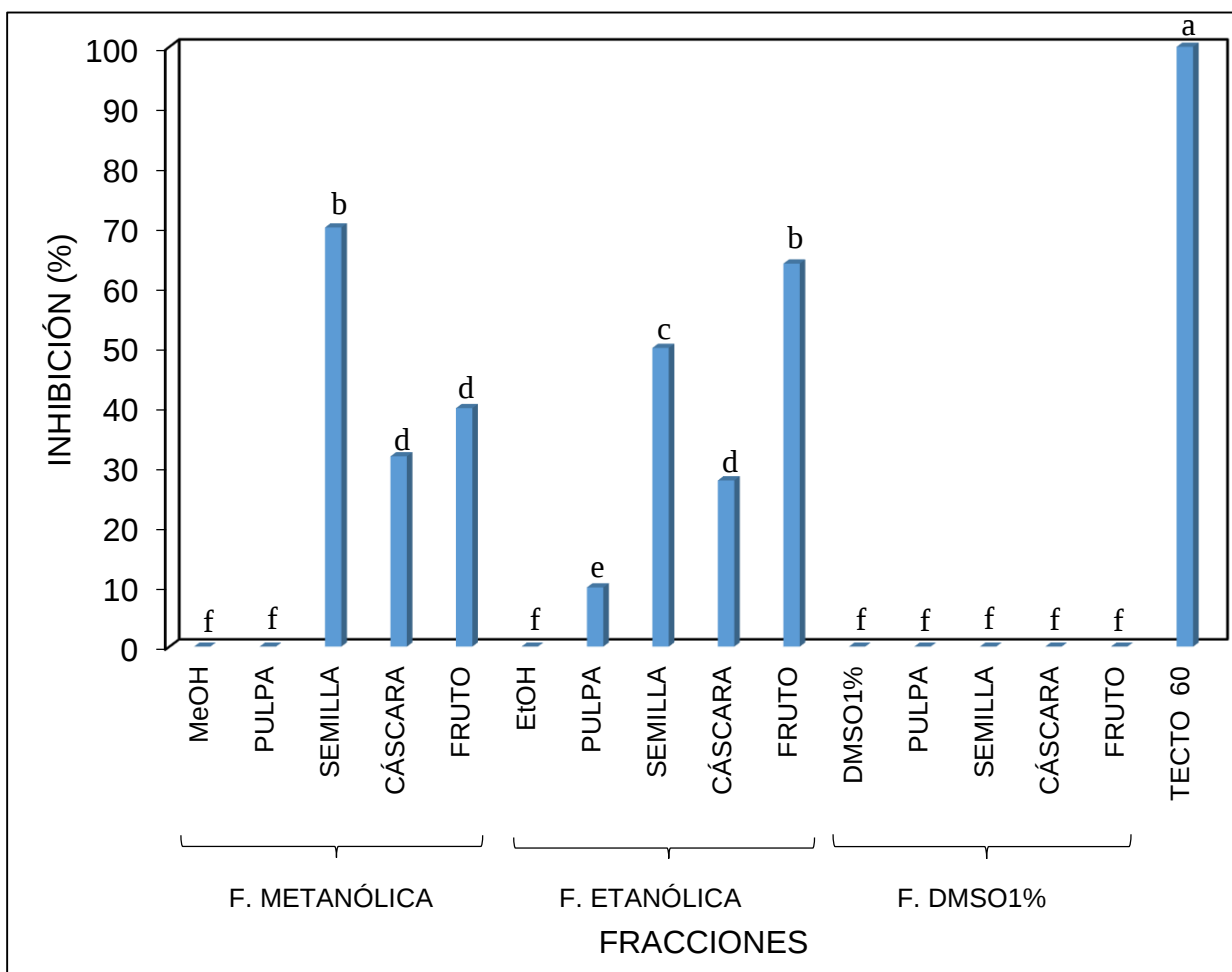


Figura 7. Porcentaje de inhibición de fracciones (100μL de 50 mg/mL) de mesocarpio (pulpa), endocarpio (semilla), pericarpio (cáscara) y fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*), a los 8 días de cultivo de *B. cinerea*. Letras diferentes indican diferencia significativa (n=3, p<0.05).

En la figura 8 se muestran imágenes sobre el efecto de las fracciones más activas del extracto metanólico de aguacate nativo mexicano, sobre los tres hongos bajo

estudio. En ésta puede notarse el mayor efecto inhibitorio ejercido por las fracciones metanólicas de semilla y fracciones etanólicas de fruto sobre *C. acutatum* (Figura 8A), sobre *F. solani* (Figura 8B) y sobre *B. cinerea* (Figura 8C).

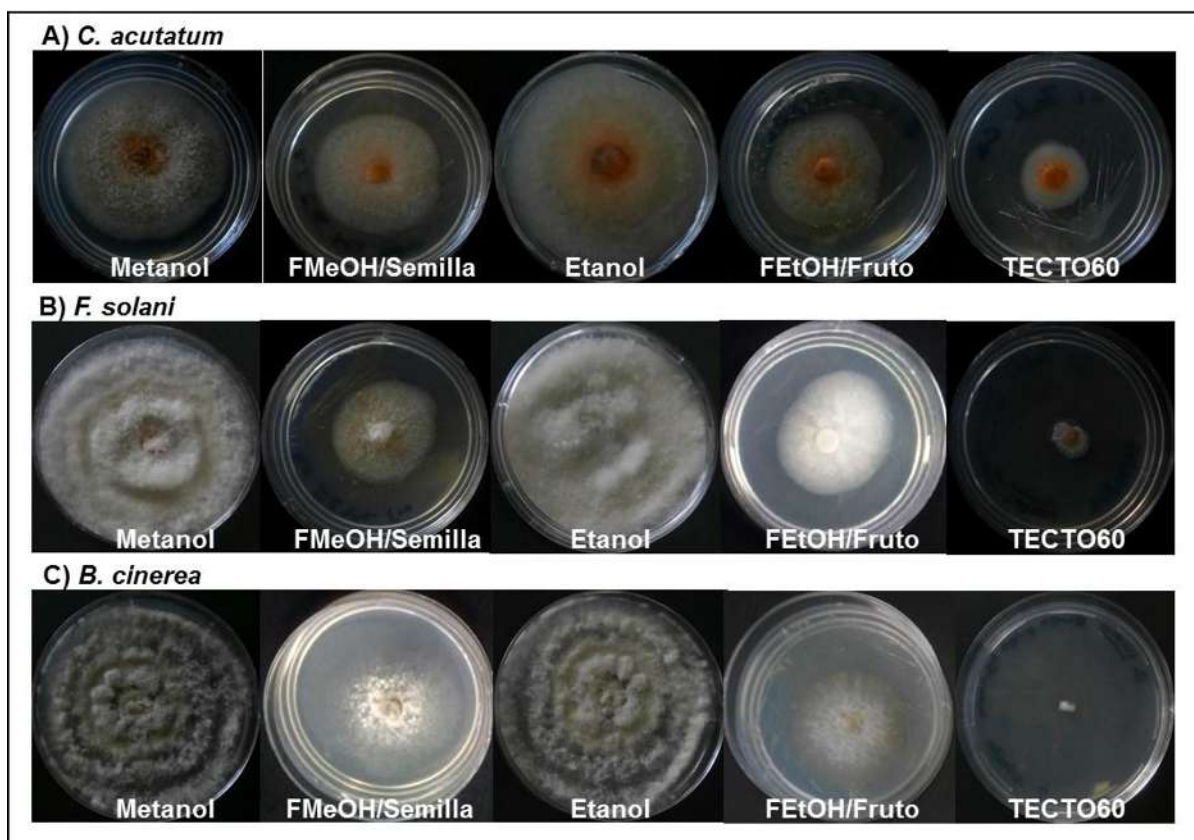


Figura 8. Bioensayos *in vitro* con el método de difusión en placa con 100 μ L de las fracciones con mayor efecto inhibitorio (50 mg/mL) sobre *C. acutatum* (A), *F. solani* (B) y *B. cinerea* (C), a los 8 días de cultivo.

Los resultados en esta primera etapa de determinación del efecto antifúngico de las diferentes fracciones del extracto metanólico de pulpa, semilla, cáscara y fruto de aguacate nativo mexicano, indican que la fracción metanólica de semilla y la etanólica de fruto, son las que mayor inhibición presentaron a una concentración de 50 mg/mL sobre los tres hongos en estudio.

El efecto antifúngico con las fracciones antes mencionadas, como se observa en las figuras, no alcanzó en ningún caso el 100% de inhibición, debido a la concentración con la que se realizaron los bioensayos (50 mg/mL). En diversas investigaciones, un 100% de inhibición se ha obtenido con valores por arriba de 1 mg/mL de aceite esencial o de ciertos extractos vegetales, dependiendo del contenido de éstos (Momin y Nair, 2001).

Aunque algunos aceites esenciales derivados de plantas aromáticas son efectivos antifúngicos a concentraciones iguales o menores a 1 mg/mL, como los de *Tagetes lucida* (Fulgencio-Negrete, 2013) o los del neem (*Azadirachta indica*) (Govindachari *et al.*, 1996), muchos extractos muestran efectividad a mayores concentraciones. Tal es el caso del extracto metanólico de *Cowania plicata*, sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum coccodes*, donde fue necesaria una concentración de hasta 16 mg/mL para inhibir en un 90% a *C. coccodes* y 28 mg/mL para *F. oxysporum* (Contreras-Arredondo *et al.*, 2011). Asimismo, un extracto metanólico de *Larrea tridentata* fue capaz de inhibir en un 100% a *Alternaria solani* con una concentración de 8 mg/mL (Lira-Saldivar *et al.*, 2002).

La actividad antifúngica de aguacate (*P. americana* Mill.) ha sido reportada pero hacia el hongo fitopatógeno causal de la antracnosis en aguacate (*Colletotrichum gloesporioides*). Los estudios se han realizado con diferentes tipos de extractos, utilizando hojas, frutos, cáscara de frutos y semillas, principalmente de aguacate cultivar Hass (Adikaram *et al.*, 1992; Prusky *et al.*, 1991). Otros estudios indican el efecto antifúngico de frutos y semillas de aguacate contra los hongos *C. albicans*,

Aspergillus glaucus y *Penicillium notatum* (Neeman *et al.*, 1970; Carman y Handley, 1999). Es importante resaltar que todos estos trabajos se han realizado con aguacate cultivar Hass o no se especifica la variedad en muchos de los trabajos reportados. Giffoni-Leite *et al.* (2009) señalan que los compuestos borbonol y persina son los responsables de dicho efecto antifúngico.

De las pocas investigaciones sobre la actividad antifúngica de extractos de aguacate nativo mexicano, se ha reportado que un extracto cloroformo-metanólico derivado de tallo y fruto, inhiben el crecimiento de hongos como *Candida albicans* y *Tricophyton rubrum*, pero a porcentajes menores del 40% (Fulgencio-Negrete, 2010). El efecto inhibitorio de las fracciones del extracto metanólico de semilla o fruto de aguacate nativo mexicano, sobre hongos fitopatógenos, es el primer reporte que demuestra sus propiedades antifúngicas.

Con nuestros resultados se demuestra que el efecto antifúngico sobre los tres hongos utilizados en los ensayos, depende de la parte del fruto y del tipo de metabolitos presentes con esta actividad. Mayormente los metabolitos con menor polaridad, disueltos en metanol (con un valor de 33 de constante dieléctrica) derivados de semilla, mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento micelial de los tres hongos en estudio (*C. acutatum*, *F. solani* y *B. cinerea*); lo mismo ocurrió pero con la fracción etanólica derivada de frutos de aguacate nativo mexicano, en la cual están presentes metabolitos con polaridad intermedia debido a su constante dieléctrica (24) (Figuras 5, 6 y 7).

Aunque los porcentajes del efecto inhibitorio de las fracciones evaluadas más activas de aguacate nativo mexicano no alcanzaron el 100% de la inhibición, se procedió a realizar ensayos con éstas, aplicando una concentración mayor (100 mg/mL), y otras menores (1 y 10 mg/mL) para determinar la concentración mínima inhibitoria de inhibición.

VII.2. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Mediante los bioensayos de difusión en placa, se aplicaron las concentraciones de 1, 10, 50 y 100mg/mL en un volumen de 100 μ L de la fracción metanólica de semilla y etanólica de frutos sobre los tres hongos bajo estudio, con las que se determinó el crecimiento del micelio a los 8 días del cultivo. En las figura 9 se muestran los resultados de la inhibición con la fracción metanólica de semilla, donde se aprecian porcentajes de inhibición similares a la concentración inicial (50 mg/mL) para los tres hongos en estudio, sin observar un aumento de la inhibición en relación a la concentración de 100 mg/mL. Sin embargo, se mostró una disminución de la inhibición en las concentraciones de 1 y 10 mg/mL.

Al determinar el efecto inhibitorio con la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano, pudo observarse un ligero aumento en los porcentajes de inhibición, de 42 a 70% en *C. acutatum* y de 65 a 82% en *B. cinerea*. Para *F. solani* no hubo cambios, manteniéndose un 50% de inhibición. De igual manera que la fracción metanólica, a concentraciones menores, los porcentajes de inhibición disminuyeron (Figura 10).

Con esto se corroboró que no hay una inhibición del 100% en las concentraciones probadas, considerando la concentración de 50 mg/mL de la fracción metanólica como la mínima para inhibir al menos en un 40% a *C. acutatum*, en un 50% a *F. solani* y en un 70% a *B. cinerea*; fue necesaria la concentración de 100 mg/mL de la fracción etanólica de fruto para inhibir en un 40% a *F. solani*, en un 70% a *C. acutatum* y hasta en un 82% a *B. cinerea* (Cuadro 3).

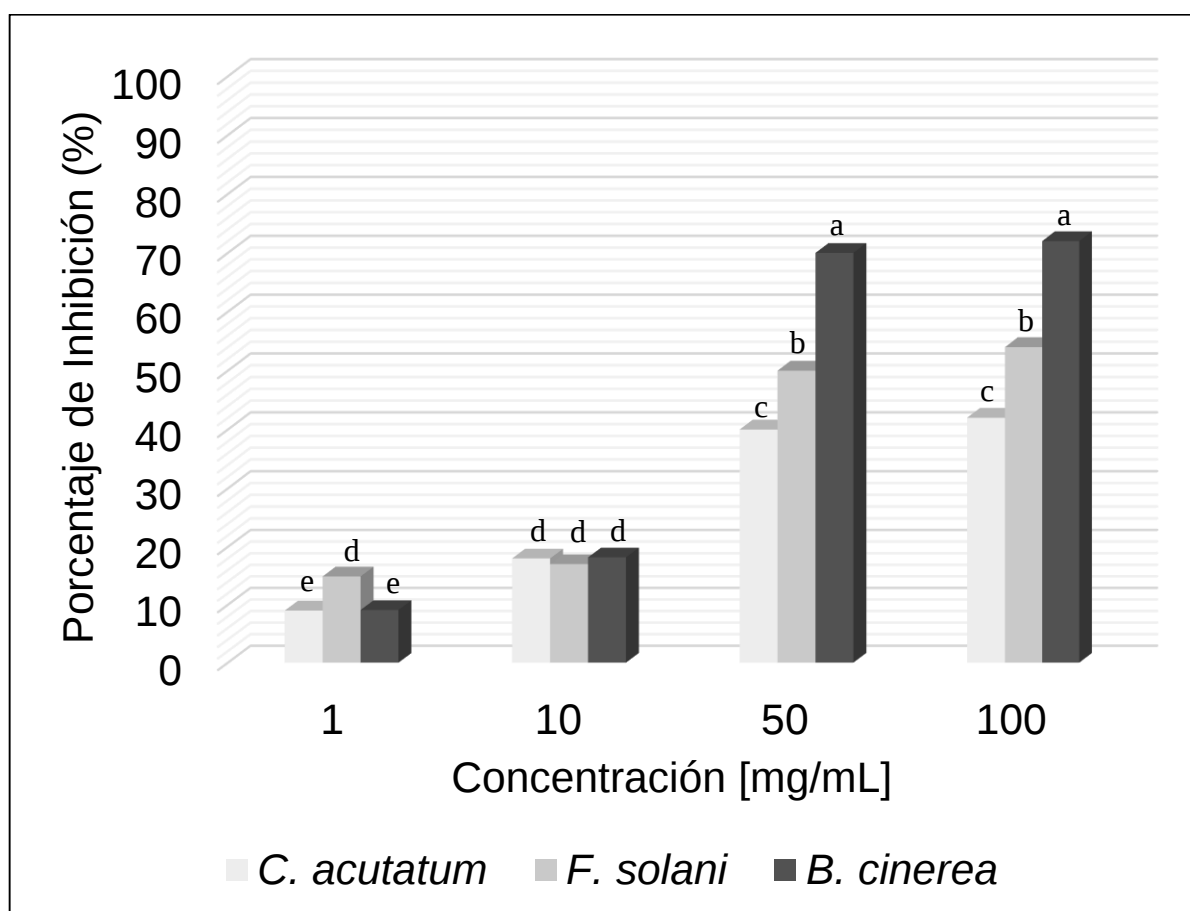


Figura 9. Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*) sobre *C. acutatum*, *F. solani* y *B. cinerea* a 8 días de cultivo.

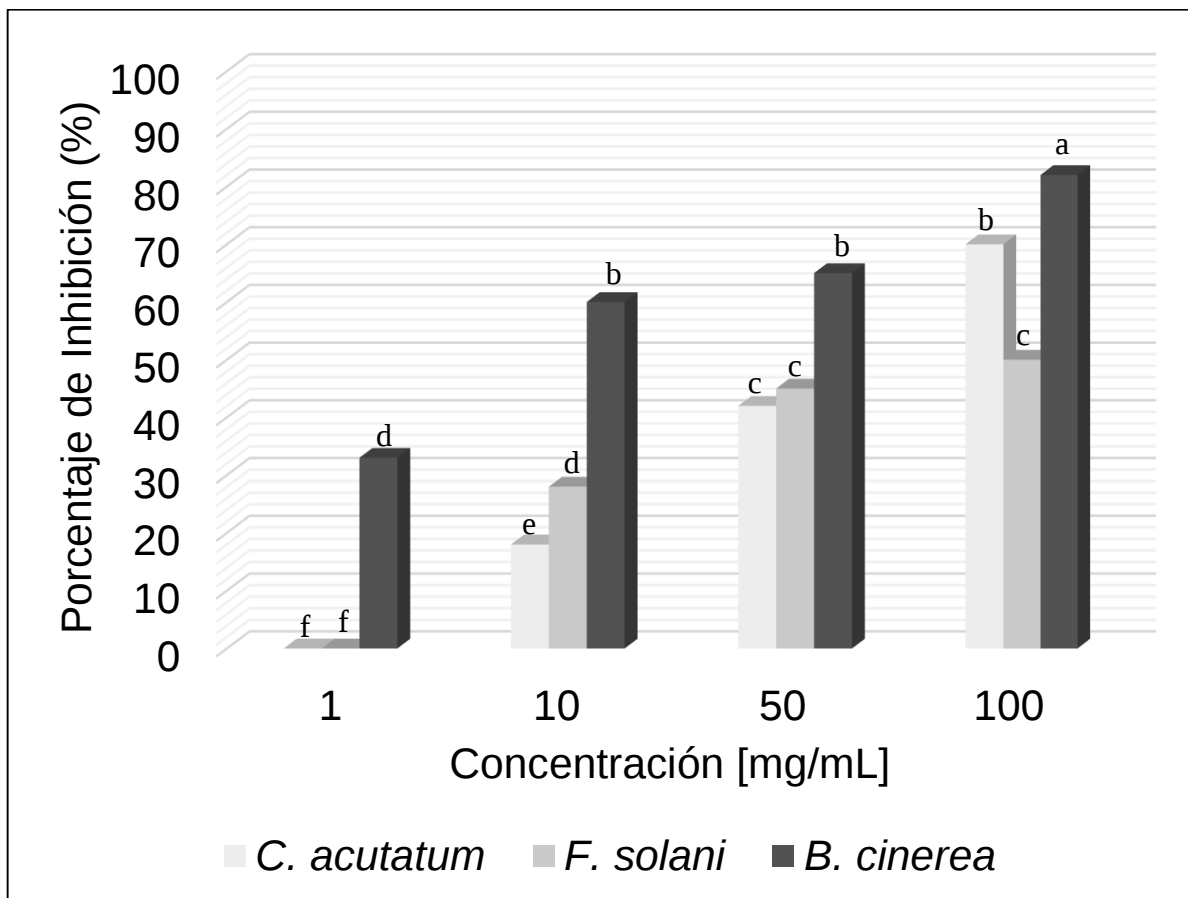


Figura 10. Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*) sobre *C. acutatum*, *F. solani* y *B. cinerea* a 8 días de cultivo.

Cuadro 3. Porcentajes de inhibición con la concentración mínima inhibitoria de las fracciones más activas del extracto metanólico de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*) sobre *B. cinerea*, *C. acutatum*, y *F. solani* a 8 días de cultivo.

Fracción	<i>B. cinerea</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>F. solani</i>
FMeOH Semilla [50 mg/mL]	70	40	50
FEtOH Fruto [100 mg/mL]	82	70	40

VII.3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN FRACCIONES ACTIVAS POR CG/EM

Las fracciones más activas contra los hongos en estudio, la fracción metanólica de semilla y la fracción etanólica de fruto, de aguacate nativo mexicano, fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), con fines de determinar los compuestos mayoritarios y relacionarlos con la actividad fungicida.

VII.3.1. Análisis de la fracción metanólica de semilla

En la figura 11 se muestra el cromatograma representativo de la fracción metanólica de semilla, en el que se observan 10 sobresalientes picos, indicativos de los compuestos mayoritarios de esta fracción. Éstos corresponden a compuestos lipídicos de diferentes grupos como ácidos grasos de 16, 17 y 18 átomos de carbono; y, acetogeninas ya caracterizadas en aguacate, los que se especifican en el Cuadro 4. Cada compuesto fue identificado por el espectro de masas y su relación con la base de datos NIST, mostrando la estructura molecular para cada uno de ellos.

Por porcentaje de abundancia, el ácido heptadecanoico mostró ser el más abundante, seguidos por el ácido octadecadienoico (ácido linoleico), ácido hexadecanoico y el ácido octadecenoico (ácido oleico); por el efecto antifúngico observado por esta fracción, éstos pueden ser considerados como los responsables de dicha actividad, sin embargo las acetogeninas como persina,

persenona y persedieno, aunque están en una menor concentración, en conjunto están participando en la propiedad antifúngica.

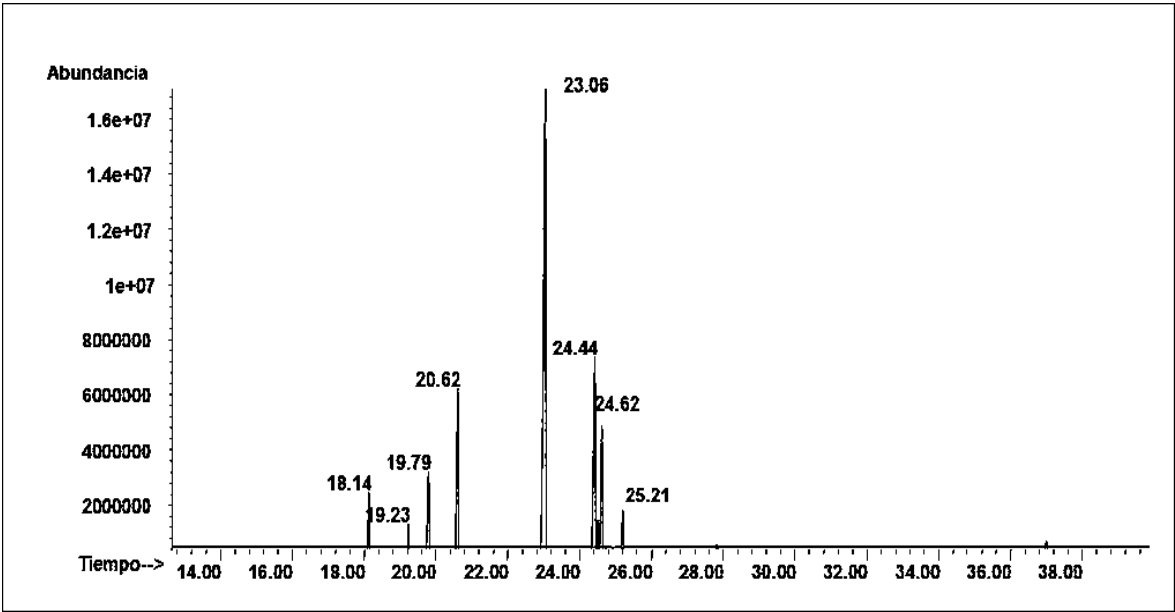


Figura 11. Cromatograma de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*).

Cuadro 4. Compuestos mayoritarios de la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*), por tiempo de retención del cromatograma correspondiente (Figura 8).

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Abundancia (%)	Estructura molecular
18.14	Persina	5	
19.23	Persenona	3	
19.79	Persedieno	9	
20.62	Ac. Hexadecanoico	14	
23.06	Ac. Heptadecanoico	44	
24.44	Ac. Octadecadienoico	18	
24.62	Ac. Octadecenoico	8	
25.21	Ac. Octadecanoico	2.5	

Este resultado demuestra que el efecto fungicida contra los tres hongos en estudio, puede deberse al efecto sinérgico de todos estos compuestos encontrados en la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano, ya que a estos compuestos se les atribuye actividad antifúngica.

La persina ha sido reportada como antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Domergue *et al.*, 2000). Esta molécula inhibe la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* a 0.790 mg/mL (Prusky *et al.*, 1991).

Muchos de los ácidos grasos orgánicos son fungicidas y se han utilizado durante siglos como agentes antimicrobianos, originalmente en la fabricación de jabones. En los últimos 50 años, sin embargo, se ha encontrado su actividad tanto *in vitro* como en alimentos, contra hongos y levaduras. Un ejemplo de éstos, es el ácido undecilénico, un ácido graso monoinsaturado de 11 carbonos (C₁₁H₂₀O₂) (Shapiro y Rothman, 1945).

En investigaciones más actuales, se ha comprobado la actividad antifúngica de este tipo de ácidos grasos, McGaw *et al.* (2002) reporta que los ácidos láurico, palmítico, linolénico, linoleico, oleico, estérico y mirístico son agentes antifúngicos; Black *et al.* (2013) han mostrado que el ácido monohidroxi octadecenoico ejerce inhibición del crecimiento de hongos en el pan; en particular, los ácidos heptadecenoico (Avis y Bélanger, 2001), oleico, linoleico y linolénico (Walters *et al.*, 2004), son potentes antifúngicos contra hongos fitopatógenos de plantas como

Botrytis cinerea, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*, e incluso contra el hongo *Candida albicans*.

En específico, el ácido hexadecanoico que es encontrado como uno de los ácidos grasos mayoritarios en la fracción metanólica de semilla de aguacate nativo mexicano, se mostró su potencial antifúngico contra *Alternaria solani* y *Aspergillus erithrocephalus*, y ha sido encontrado como uno de los principios activos de *Annona muricata* (Soursop) (Abubacker y Deepalakshmi, 2013).

VI.3.2. Análisis de la fracción etanólica de fruto

Con el análisis por CG/EM de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano, se determinó la presencia de al menos 7 compuestos, la mayoría son ácidos grasos como el ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecadienoico (ácido linoleico), ácido octadecanoico (ácido esteárico), ácido tetracosanoico (ácido lignocérico), y los triterpenos escualeno y lupeol (Cuadro 5, Figura 12).

Los más abundantes son el ácido linoleico y el ácido lignocérico, con 35% y 24% de abundancia, respectivamente (Cuadro 5), que como se describió antes, este tipo de moléculas poseen propiedades antifúngicas. A diferencia de la fracción metanólica de semilla, en la etanólica de fruto se encuentran el escualeno y lupeol con porcentajes de abundancia de 14% y 6%, los que también pueden contribuir al efecto fungicida.

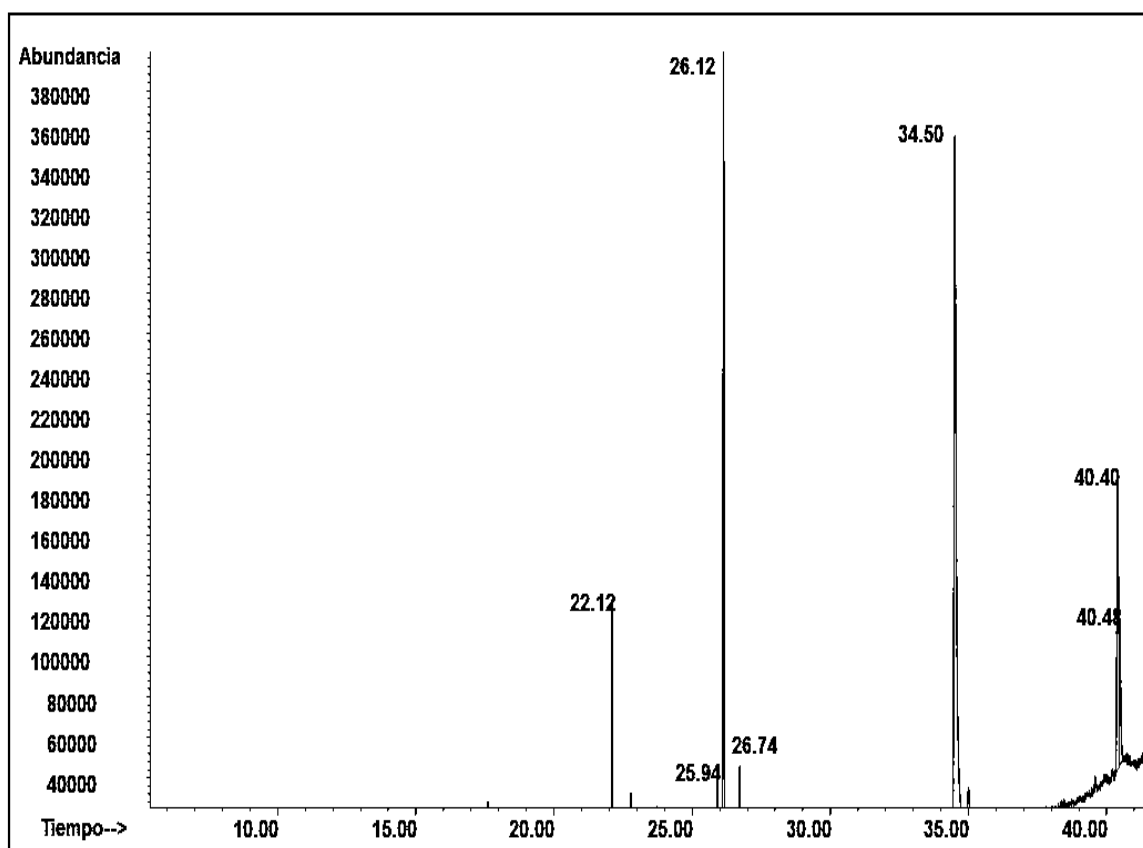


Figura 9. Cromatograma de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*).

Cuadro 5. Compuestos mayoritarios de la fracción etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano (*P. americana* Var. *drymifolia*), por tiempo de retención del cromatograma correspondiente (Figura 9).

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Abundancia (%)	Estructura molecular
22.12	Ac. Hexadecanoico	9	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
25.94	Ac. Heptadecanoico	3	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)OC</chem>
26.12	Ac. Octadecadienoico	35	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)OC</chem>
26.74	Ac. Octadecanoico	5	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OC</chem>
34.50	Ácido Tetracosanoico	24	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
40.40	Escualeno	14	<chem>CC(C)=CCCC(C)=CCCC(C)=CCCC(C)=C</chem>
40.48	Lupeol	6	<chem>CC(C)(C)CCC12CCC3C(C1CC4=C(C(C3)C)C)C5C2C(=C(C=C5)C)C</chem>

El escualeno, es un triterpenoide de cadena lineal de 30C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos, ampliamente distribuido en la naturaleza. Aunque en plantas se encuentra en relativamente pequeñas cantidades, es encontrado en el ajo y en los aceites virgen de oliva, de lino, de palma, de cacahuate, de maíz, de girasol, de soya, y también está presente en los frutos de aguacate (Gutfinger y Letam, 2000). A esta molécula se le atribuyen propiedades fungicidas, sin embargo, solo se ha comprobado su efectividad contra *Candida albicans* y no sobre hongos fitopatógenos (Popa *et al.*, 2015).

El lupeol (fargarsterol) es un constituyente de las diferentes partes del fruto de aguacate (Adelusi-Temitope *et al.*, 2014), forma parte del grupo de los fitoesteroles, que se ha encontrado en diferentes frutas como fresa, mango y uvas rojas, en diferentes plantas medicinales, así como en pepino, tomate, aceituna y pimiento, al cual se le atribuyen principalmente propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antidiabéticas (Saleem, 2009). Además, el lupeol ha mostrado tener actividad antifúngica contra *Fusarium graminearum* y *Fusarium verticillioides* (Aristimuño-Ficoseco *et al.*, 2014).

Los resultados de esta investigación muestran que las fracciones metanólica de semilla y etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano presentan actividad antifúngica, en las cuales diversos metabolitos son los responsables. En la primera fracción, las acetogeninas junto con los ácidos grasos son los responsables de dicha actividad y en la segunda fracción, correspondería a esos mismos ácidos grasos pero en conjunto con el lupeol, ya que las acetogeninas no están presentes.

El haber determinado que la mezcla de acetogeninas o fitoesteroles y ácidos grasos de aguacate nativo mexicano son eficaces como fungicidas, su uso potencialmente plantea menos efectos secundarios para su consumo que otros fungicidas químicos o sintéticos. No sólo son biodegradables, si no que exhiben un alto grado de especificidad. Además, los ácidos grasos son aditivos alimentarios aceptados y lo importante, hay menos riesgo que los patógenos se vuelvan resistentes a los ácidos grasos antimicóticos

Se sabe que el blanco de la acción fungicida de los ácidos grasos es la membrana celular. Causan un aumento en la fluidez de la membrana, que resulta en la fuga de los componentes intracelulares y muerte celular. También pueden actuar sobre la síntesis de proteínas, que puede ser inhibida por análogos de ácido mirístico, sobre el metabolismo de ácidos grasos así como actividad de la topoisomerasa que puede ser inhibida por entre otros ácidos grasos acetileno. Los ácidos grasos antifúngicos pueden sustituir a los productos químicos que se utilizan para controlar enfermedades de las plantas, que impactan negativamente el medio ambiente al afectar a organismos que no son el blanco como animales, incluyendo al ser humano (Avis y Bélanger, 2001; Pohl *et al.* 2011).

VIII. CONCLUSIONES

Las fracciones metanólica de semilla y etanólica de fruto de aguacate nativo mexicano presentaron la mayor actividad antifúngica. Este efecto fue dependiente de la concentración y de la sensibilidad de cada hongo a ambas fracciones.

Con 50 mg/mL de la fracción metanólica de semilla y 100 mg/mL de la fracción etanólica de fruto, se inhibió el crecimiento mayormente de *B. cinerea*, en un 70 y 82%, respectivamente. Ambas fracciones se consideran con actividad antifúngica contra los tres hongos en estudio.

Se logró la identificación de los compuestos mayoritarios de ambas fracciones, correspondientes a ácidos grasos de C16, C17, C18 y C24, al escualeno, lupeol, así como de las acetogeninas persina, persenona y persedieno, considerando que éstos participan de manera sinérgica en contra del crecimiento de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. solani*.

IX. LITERATURA CITADA

- Abubacker, M.N. & Deepalakshmi, T. 2013.** *In vitro* antifungal potentials of bioactive compound methyl ester of hexadecanoic acid isolated from *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaves. Biosciences Biotechnology Research Asia, 10(2):879-884.
- Achicanoy, H. 2001.** Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 54(1 y 2):1251:1273.
- Adelusi, I., Oboh, G., Jacobson, A., Akinlolu, R. & Olalekan, B. 2014.** Avocado pear fruits and leaves aqueous extracts inhibit α -amylase, α -glucosidase and snp induced lipid peroxidation – an insight into mechanisms involve in management of type 2 diabetes. International Journal of Applied and Natural Sciences, 3(5):21-34.
- Adikaram, N.K.B., Ewing D.F., Karunaratne A.M. & Wijeratne E.M.K. 1992.** Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. Phytochemistry, 31:93-96.
- Alfaro, M. 1984.** Medicinal plants used in a totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México. Journal of Ethnopharmacology, 11(2):203-221.
- Alfaro, M. y Evangelista O.V. 1995.** Catálogo de las plantas útiles de la sierra norte de Puebla. UNAM, México. 117p.
- Amadioha, A. & Uchendu P. 2003.** Post-harvest control of tomato fruit rot caused by *Fusarium solani* with extracts of *Azadirachta indica*. Discovery and Innovation, 15(1):83-86.
- Apablaza, G., Díaz, M., San Martín R. & Moya E. 2002.** Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria, 29:83-90.
- Aristimuno, M.E., Vattuone, M.A., Audenaert, K., Catalan, C.A.N. & Sampietro, D.A. 2014.** Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in Anacardiaceae species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Fusarium* species. Journal of Applied Microbiology, 116:1262-1273.
- Averre, Ch., Jones, R. & Milholland, R. 2003.** Strawberry diseases and their control. Fruit disease information. Note 5. Plant pathology extension. North Carolina State University, Raleigh, NC. 9 p

- Avis, T.J. & Bélanger, R.R. 2001.** Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Applied and Environmental Microbiology, 67:956-960.
- Báez, M., Salgado R., Macías, L., Ochoa, A. y López, J.E. 2014.** Efecto de los ácidos grasos y derivados de aguacate sobre la regulación de la inmunidad en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*. 9º. Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Mich. 16 – 17 de octubre.
- Barrau, C., De los Santos, B. & Romero, F. 2001.** First report of *Colletotrichum acutatum* in blueberry plants in Spain. Plant Disease, 85:1285-1285.
- Bautista, S., Hernández, M. & Barrera, L.L. 2000.** Antifungal screening of plants of the state of Morelos, Mexico, against four postharvest pathogens of fruits and vegetables. Revista Mexicana de Fitopatología, 18:36-41.
- Bello, G.M.A. 2006.** Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- Bergh, B.O. 1992.** The origin nature and genetic improvement of the avocado. California Avocado Society Yearbook, 70:135-145.
- Bertelli, D., Plessi, M. & Miglietta, F. 2003.** Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. LWT- Food Science and Technology, 36(6):555–560.
- Black, B.A, Zannini, E., Curtis, J.M. & Gänzle, M.G. 2013.** Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. Appl. Environ. Microbiol., 79(6):1866-1873.
- Bowers, J.H. & Locke, J.C. 1999.** Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* Wilt in the greenhouse. Plant Disease, 84(3):300-305.
- Carman, R.M. & Handley, P.N. 1999.** Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. Phytochemistry, 50:1329-331.
- Contreras, M.E., Hernández, F.D., Sánchez, A., Gallegos, G. y Jasso, D. 2011.** Actividad fungicida de extractos de *Cowania plicata* D. Don. contra *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. y de *Pistacia lentiscus* L. contra *Colletotrichum coccodes* Wallr. Hughes. Revista Agraria -Nueva Epoca, 8(1):6-13.

- Cortinas, N.C., Cristán, F.A. y Loredó, M.O. 1996.** Los plaguicidas. Gaceta Ecológica, México, INE-SEMARNAP, 40:62-70.
- De los Santos, B. & Romero, F. 1999.** Occurrence of *Colletotrichum acutatum*, causal organism of strawberry anthracnose in Southwestern Spain. Plant Disease, 83:301-301.
- Domergue, F., Helms, G.L., Prusky, D. & Browse J. 2000.** Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. Phytochemistry, 54:183-189.
- Duke, S.O. 1990.** Natural pesticides from plants. En: Advances in new crops (Janick J. y Simon J.E., Eds.), Timber Press, Portland, OR. pp. 511-517.
- EcuRed, 2015.** Fusariosis. http://www.ecured.cu/Fusarium_solani
- FAOSTAT. 2005.** Aguacates superficie cultivada (Ha). http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp
- Fiallos, H. 2012.** Inhibición de *Botrytis cinerea* en rosas a base de extractos alcohólicos y acuosos de hierba mora (*Solanum nigrum*). Tesis pregrado. <http://hdl.handle.net/123456789/1828>.
- Fiori, A.C.G., Schwan, K.R.F., Stangarlin, J.R., Vida J.B., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S. & Pascholati, S.F. 2000.** Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. Journal of Phytopathology, 148:483-487.
- Fulgencio, R. 2011.** Determinación del contenido de persina en diferentes accesiones de aguacate criollo Mexicano y evaluación de la actividad antimicrobiana. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología-UMSNH.
- Fulgencio, R. 2013.** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría, PIMCB-UMSNH.
- Giffoni, J.J., Salles, E.H., Aguiar, R., Nogueira, R.S., Costa, J.J., Medeiros, S.L. & Gadelha, M.F. 2009.** Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(2):110-113.
- Giordani, R., Trebauz, J., Masi M. & Regli, P. 2001.** Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology, 78:1-5.
- Giovinazzo, G., Ingrosso, I., Paradiso, A., De Gara, L. & Santino, A. 2012.** Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional

improvement of food. Original paper. Journal Plant Foods for Human Nutrition, 1-9pp.

Govindachari, T.R., Gobalakrishnan, G. & Suresh, G. 1996. Isolation of various Azadirachtins from neem oil by preparative high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr. and Rel. Technol., 19:1729-1733.

Grosvenor, P.W. & Gray, D.O. 1996. Colutequinona and colutehydroquinona, antifungal isoflavonoids from *Colutea arborescens*. Life Sciences, 42:377-380.

Guillén, H., Lara B.N., Gutiérrez, M., Ortiz, M. y Ángel M.E. 2007. Cartografía Agroecológica del Cultivo del Aguacate en Michoacán. Morevallado Editores de Morelia, Michoacán, México 141 p.

Gutfinger, T. y Letan, A. 1974. Studies of unsaponifiables in several vegetable oils. Lipids, 9(9):658-663.

Guzmán, J.J., López, R., Suárez, L.M., Salgado, R., Rodríguez, L.C., Ochoasa, A. & López, J.E. 2013. Antibacterial Activity of Defensin *PaDef* from Avocado Fruit (*Persea americana* Var. *drymifolia*) Expressed in Endothelial Cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, 10:1155-1164.

Hernández, T., Canales, M., Flores C., García, A.M., Durán, A. & Ávila, J.G. 2007. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. Pharmaceutical biology, 44:19-22.

Herrera, E.A. y Carsolio, C. 1998. Contaminación y Conservación del Medio Ambiente. En Medio Ambiente, Control Biológico y Hongos Parásitos. Avance y Perspectiva. CINVESTAV, 17:195-204.

InfoAgro. 2002. Plagas de los cultivos. España Disponible en: <http://www.tusplantas.com/jardin/jardines/>

Jeandet, P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. & Adrian M. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem., 50:2731-2741.

Kubo, I., Himejima, M. & Muroi, H. 1991. Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. J. Agric. Food Chem., 39(11):1984-1986.

Lira, R.H., Gamboa, R., Villarreal, L.A., Lopez, R.G. & Jimenez, F. 2002. Hydrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the

north of México and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*.
Phyton, 167-172.

- Lozoya, X. 1994.** Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs In: Ethnobotany and the Search for New Drugs. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.
- Martínez, E., Barrios, G., Rovesti, L. & Santos R. 2006.** Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba.
- Mazid, M., Khan, T. & Mohammad, F. 2011.** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Journal Biology and Medicine, 3(2):232-249.
- McGaw, L.J., Jäger, A.K. & Van Staden, J. 2002.** Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. Fitoter., 73:431-433.
- Molina, J., García, A. & Ramírez, E. 2000.** Antimicrobial properties of alkalamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. J. Ethnopharm., 64:241-248.
- Momin, R.A. & Nair, M.G. 2001.** Mosquitocidal, nematocidal and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. Journal Agricultural and Food Chemistry, 49:142-145.
- Montes, B.R. 1996.** Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. Fitopatología. México D. F. Instituto Politécnico Nacional, 14 (1): 9-14.
- Murphy, M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. Journal Clinical Microbiology, 12(4):564-582.
- Napralert (Natural Product Alert). 1990.** Program for collaborative research in the Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago.
- Navarrete, R., Trejo, E., Navarrete, J., Prudencio, J. M. y Acosta J.A. 2009.** Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. Agricultura técnica en México, 35(4):459-470.
- Neeman, I., Lifshitz, A. & Kashman, Y. 1970.** New antibacterial agent isolated from the avocado pear. Appl. Microbiol., 19:470-473.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P.H. & Mathur, S.B. 2004.** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food

spoilage and mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology, 94:329-334.

- Ortiz de Montellano, B. 1993.** Medicina, salud y nutrición aztecas, Siglo XXI, México.
- Perez, L., Valcarcel M.J., Gonzalez, P. & Domecq, B. 1991.** Influence of *Botrytis* infection of the grapes on the biological aging process of Fino Sherry. American Journal of Enology, 42:58-62.
- Perfect S.E., Bleddyn Hughes, H., O'Connell, R.J., Green, J.R. 1999.** *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genet Biol., 27:186-198.
- Phillips, O., Gentry, A., Reynel, C., Wilkin, P. & Gálvez, C. 1994.** Quantitative Ethnobotany and Amazonian Conservation. Conservation Biology, 8 (1): 225-248.
- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. 1970.** Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55:158-161.
- Pohl, C.H., Kock, J.L.F. & Thibane, V.S. 2011.** Antifungal free fatty acids: A Review Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances (A. Méndez-Vilas, Ed.). 61-71 p
- Popa, O., Băbeanu, N.E., Popa, I., Niță, S. & Dinu, C.E. 2015.** Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources. BioMed Research International, 2015: 16 p.
- Prusky, D., Plumbley, R.A. & Kobiler, I. 1991.** The relationship between antifungal diene level and fungal inhibition during quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides*. Physiological Plant Pathology, 40:279-285.
- Ramírez, E., Lucas V.L, Virgen, C.G. y Molina, J. 2000.** Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. Agrociencia, 34: 207-215.
- Rodríguez, C. 2000.** Plantas contra plagas. RAPAM. Texcoco. México. 133 p.
- Russell, A.D. y McDonnell, G. 2000.** Concentration: a major factor in studying biocidal action. Journal of Hospital Infection, 44:1-3.
- Sahin, F., Güllüce M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. y Özer, H. 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15(7): 549-557.

- Saleem, M. 2009.** Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.*, 285(2):109-115.
- Sánchez, J. de la L. 2001.** Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México.
- Shapiro, A.L. & Rothman, S. 1945.** Undecylenic acid in the treatment of dermatomycoses. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, 52:166-171.
- Singh, G., Marimuthu, P., Catalan, C. & De Lampasona, M.P. 2004.** Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of Science Food Agriculture*, 84:1878-1884.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. 1980.** Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.). McGraw-Hill Book Co., New York. 622 p.
- Van Baarlen, P., Legendre, L. & Van Kan, J. 2004.** Plant defense compounds against *Botrytis* infection. En: *Botrytis: Biology, pathology and control* (Elad, Y., Williamson B, Tudzynski P. y Delen N., Eds.), pp 143-161, Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Villanueva, R. 2004.** Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum spp.*, e histopatología de la antracnosis causada por *C. fragariae* en frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Tesis de doctorado. Colegio de postgrados. Estado de México.
- Walters, D., Raynor, L, Mitchell, A., Walker, R. & Walker K. 2004.** Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*, 157:87-90.
- Westphal, A., Abney, T.S., Xing L.J. & Shaner, G.E. 2008.** Sudden Death Syndrome of Soybean. The Plant Health Instructor. On line: DOI:10.1094/PHI-I-2008-0102-01.
- Whiley, A.W., Schaffer, B. & Wolstenholme, B.N. 2002.** APA (6th ed.). The avocado: Botany, production, and uses. Wallingford: CABI Pub.
- Wilson, C., Solar, J., El Ghaouth, A. & Wisniewski, M. 1997.** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Journal Plant Disease*, 81(2):204-210.