



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**



**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA  
"PRESIDENTE JUÁREZ"**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO**

**ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE FRUTO Y ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE MAMUYO  
(*Styrax ramirezii* Greenm)**

**T E S I S**

Que como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en  
Ciencias Biológicas presenta:

**Ing. Rodrigo Omar Mendoza Tafolla**

**Director de tesis:  
Doctor en Biotecnología en plantas  
Pedro Antonio García Saucedo**

**Uruapan, Michoacán. Febrero de 2016**

**BIOACTIVIDAD DE MAMUYO (*Styrax ramirezii* Greenm)**

**TESIS**

Que somete a consideración y aprobación del H. Jurado examinador como  
requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**ING. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo

**APROBADA:**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

---

**Dr. Pedro Antonio García Saucedo  
DIRECTOR / ASESOR**

---

**Dra. Berenice Yahuaca Juárez  
SINODAL**

---

**Dra. Consuelo de Jesús Cortés Penagos  
SINODAL**

---

**Dr. Edgardo Federico Hernández Valdés  
SINODAL**

---

**Dr. Rafael Salgado Garciglia  
SINODAL**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" bajo la dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo y la valiosa colaboración de la Biol. Yolanda García Rodríguez del Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) de Morelia, Michoacán.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (número de becario: 305248) por apoyarme con su beca para continuar mis estudios.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por permitirme estudiar por más de 10 años en la única y más importante casa de estudios del estado.

A la Facultad de Agrobiología por darme la oportunidad de estar en ella y brindarme los conocimientos para mi formación.

Al Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) perteneciente a la UNAM por abrirme las puertas y llevar a cabo los análisis cromatográficos.

Al Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Uruapan (ITESU) por permitirme realizar parte de las determinaciones fisicoquímicas en sus instalaciones.

A los laboratorios de Ecología química, Bioquímica ecológica, Biotecnología en alimentos, Fitopatología, Suelos, Interacciones planta-ambiente, Cultivo de tejidos, Genética molecular y Fisiología vegetal de los diferentes centros educativos por la contribución en las distintas etapas, ya sea con material biológico o reactivos.

Al Dr. Pedro Antonio García Saucedo por confiar en mí para la realización de este proyecto y permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Berenice Yahuaca Juárez, el Dr. Rafael Salgado Garciglia, la Dra. Consuelo de Jesús Cortes Penagos y el Dr. Edgardo Federico Hernández Valdés, quienes con sus acertadas observaciones y valiosas sugerencias enriquecieron este trabajo de tesis.

A la Biol. Yadira García Rodríguez por su ayuda invaluable y consejos en el desarrollo de los análisis cromatográficos.

A Rigoberto, Raymundo y su familia por la hospitalidad y amabilidad en todo momento durante las colectas en Hidalgo.

A Jesús Ochoa, Elva Cervantes y Susana Mendoza por facilitar las cepas.

Al M.C. Rafael Tapia Aparicio por facilitar el manejo de los equipos del ITESU.

A la Dra. Ana Tziziqui Chávez Bárcenas por su todo su apoyo y aportes.

Al M.C. Atahualpa Guzmán de Casa, Dra. Maribel Gutiérrez Contreras y la Dra. Teresita del Carmen Ávila Val por el apoyo logístico y su convivencia.

A mis compañeros de área temática, Salvador Castillo, Liliana García y Violeta Campos por sus aportes de experiencias.

A Luis Ángel Hernández Cruz por creer en mí, a veces más que yo mismo.

A Susana Mendoza y Cristobal García por sus consejos y apoyo en todo momento, gracias a los tres.

A Isaac, Cristina, Ángel, Chuy, Flor, Esteban, Cristian, Jhonny, Selma, Laura, Itzia, Mayra, Abraham, Angélica, Ale, Nacho etc. (son muchos y ya me canse) por su desmadre y quienes (la mayoría) a partir de la pizza del Cecti entraron en confiancita, sin ustedes no hubiese sido lo mismo.

A Clarie Ramírez, Andrés Romero, Kenia Martínez, Ernesto Valencia y Efraín Corral por su apoyo logístico en momentos cruciales.

A Tsanda, Lauro, Laura, Olmedo (pos ya que), Erendira, Alexander, Miriam y Gris por ser excelentes compañeros de laboratorio.

Agradezco a TODOS y TODAS las personas que (son demasiadas y espero no haber omitido a nadie) contribuyeron moral, económico, social, cultural, medica y científicamente durante esta TAFO-AVENTURA llamada maestría, sin su apoyo tal vez no se hubiese logrado esto, por lo cual MUCHAS GRACIAS y que el poder de la fuerza los acompañe siempre!!!

## Índice de contenidos

|  |          |
|--|----------|
| Contenido  | i        |
| Índice de figuras                                      | iv       |
| Índice de tablas                                       | vi       |
| Resumen  | vii      |
| Abstract   | viii     |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                 | <b>1</b> |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>                      | <b>3</b> |
| 2.1 <i>Styrax</i>                                      | 3        |
| 2.1.1 Generalidades                                    | 3        |
| 2.1.2 Descripción botánica                             | 3        |
| 2.1.3 Importancia                                      | 4        |
| 2.1.4 Actividad biológica                              | 4        |
| 2.2 <i>Styrax ramirezii</i>                            | 6        |
| 2.2.1 Generalidades                                    | 6        |
| 2.2.2 Clasificación y descripción botánica             | 7        |
| 2.2.3 Distribución                                     | 8        |
| 2.2.4 Fenología  | 9        |
| 2.2.5 Importancia de <i>Styrax ramirezii</i>           | 9        |
| 2.3 Metabolitos secundarios como agentes de biocontrol | 10       |
| 2.3.1 Alcaloides                                       | 10       |
| 2.3.2 Polifenoles                                      | 11       |
| 2.3.3 Terpenos   | 12       |
| 2.3.3.1 Generalidades                                  | 12       |
| 2.3.3.2 Localización                                   | 12       |
| 2.3.3.3 Estructura                                     | 13       |
| 2.3.3.4 Biosíntesis                                    | 14       |
| 2.3.3.5 Clasificación                                  | 16       |
| 2.3.3.6 Separación                                     | 17       |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.3.7 Identificación y cuantificación                               | 18 |
| 2.3.3.8 Usos  | 18 |
| 2.4 Caracterización de frutos   | 18 |
| 2.4.1 Análisis fisicoquímicos y bromatológicos                        | 19 |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN</b>   | 22 |
| <b>IV. OBJETIVOS</b>  | 23 |
| 4.1 Objetivo general  | 23 |
| 4.2 Objetivos específicos   | 23 |
| 4.3 Hipótesis   | 23 |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 24 |
| 5.1 Esquema general de trabajo  | 24 |
| 5.2 Material biológico  | 24 |
| 5.2.1 Selección y colecta del material vegetal                        | 25 |
| 5.2.2 Microorganismos para la realización de bioensayos               | 25 |
| 5.2.2.1 Mantenimiento de los microorganismos                          | 25 |
| 5.3 Preparación del material vegetal para la extracción               | 26 |
| 5.4 Obtención de extractos crudos (EC)                                | 26 |
| 5.5 Bioensayos con microorganismos <i>in vitro</i>                    | 27 |
| 5.5.1 Actividad antibacteriana  | 27 |
| 5.5.2 Actividad antifúngica   | 29 |
| 5.6 Bioensayos con microorganismos en invernadero                     | 31 |
| 5.6.1 Actividad antibacteriana  | 31 |
| 5.7 Preparación de muestra para cromatografía (CG-EM)                 | 33 |
| 5.8 Metodología para la identificación y cuantificación de compuestos | 34 |
| 5.9 Metodología para el fraccionamiento de los extractos crudos       | 35 |
| 5.10 Análisis fisicoquímicos del fruto                                | 35 |
| 5.11 Análisis estadísticos  | 44 |
| <b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>                                   | 46 |
| 6.1 Colecta del material vegetal                                      | 46 |
| 6.2 Extractos crudos (EC)   | 47 |
| 6.3 Bioensayos con microorganismos <i>in vitro</i>                    | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 6.3.1 Actividad antibacteriana                    | 50 |
| 6.3.2 Actividad antifúngica                       | 53 |
| 6.4 Bioensayos con microorganismos en invernadero | 57 |
| 6.4.1 Actividad antibacteriana                    | 57 |
| 6.5 Identificación de compuestos                  | 60 |
| 6.6 Cuantificación de compuestos                  | 63 |
| 6.7 Fraccionamiento de los extractos crudos       | 66 |
| 6.8 Análisis fisicoquímicos del fruto             | 67 |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b>                          | 79 |
| <b>VIII. FUENTES DE CONSULTA</b>                  | 80 |
| <b>IX. ANEXOS</b>                                 | 87 |

## Índice de figuras

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Diferentes órganos de <i>Styrax ramirezii</i>   | 8  |
| 2  | Células glandulares con aceite esencial   | 13 |
| 3  | Isopreno  | 14 |
| 4  | Biosíntesis de terpenoides  | 15 |
| 5  | Estructuras de terpenoides  | 17 |
| 6  | Esquema general de trabajo  | 24 |
| 7  | Preparación de la calabacita para el bioensayo  | 32 |
| 8  | Porcentajes de inhibición registrados por hoja, tallo y fruto de <i>S. ramirezii</i>  | 47 |
| 9  | Porcentajes de inhibición registrados por los extractos crudos extraídos por n-hexano y cloroformo  | 48 |
| 10 | Porcentajes de inhibición registrados por los extractos crudos extraídos por el método de maceración y el sistema soxhlet                               | 49 |
| 11 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de aguacate 26 (AA26)                          | 51 |
| 12 | Inhibición del aislado de aguacate 26 a causa de los extractos n-hexánicos de hoja macerada de <i>S. ramirezii</i>                                      | 51 |
| 13 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de aguacate 34 (AA34)                          | 53 |
| 14 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de <i>Armillaria</i> sp. ZC4                   | 54 |
| 15 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de <i>Armillaria</i> sp. ZC5                   | 55 |
| 16 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de <i>Armillaria</i> sp. SJN                   | 56 |
| 17 | Inhibición de los tres aislados de <i>Armillaria</i> spp. (ZC4, ZC5 Y SJN) a causa de los extractos n-hexánicos de hoja macerada de <i>S. ramirezii</i> | 57 |
| 18 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos n-hexánicos de hoja macerada contra el aislado de aguacate 26 (AA26) en calabacita                     | 58 |
| 19 | Grados de daño ocasionados por el aislado de aguacate 26 en calabacita  | 59 |
| 20 | Porcentaje de inhibición de los extractos crudos n-hexánicos de hoja  | 60 |

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | macerada contra el aislado de aguacate 26 (AA26) en pepino   |    |
| 21 | Cromatograma del extracto n-hexánico de hoja macerada de <i>S. ramirezii</i>                                 | 64 |
| 22 | Cromatograma del extracto n-hexánico de hoja por soxhlet de <i>S. ramirezii</i>                              | 64 |
|    | Porcentajes de inhibición registrados por las distintas fracciones del                                       |    |
| 23 | extracto de hoja con la mezcla entre n-hexano y cloroformo expresadas en proporción de volumen/volumen (v/v) | 67 |
| 24 | Escala de madurez de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 68 |
| 25 | Peso de frutos de <i>S. ramirezii</i>  | 69 |
| 26 | Tamaño ecuatorial de <i>S. ramirezii</i>   | 70 |
| 27 | Tamaño longitudinal de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 71 |
| 28 | Volumen de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 72 |
| 29 | Densidad de frutos de <i>S. ramirezii</i>  | 73 |
| 30 | Porcentaje de semilla de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 74 |
| 31 | Color de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 75 |
| 32 | Firmeza de frutos de <i>S. ramirezii</i>   | 76 |

## Índice de tablas

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | Clasificación taxonómica de <i>Styrax ramirezii</i>  | 8  |
| 2 | Clasificación de los terpenos.   | 16 |
| 3 | Tratamientos y controles evaluados en actividad antibacteriana   | 29 |
| 4 | Tratamientos y controles evaluados en actividad antifúngica  | 31 |
| 5 | Tratamientos y controles evaluados en el invernadero   | 33 |
| 6 | Ubicación del sitio de colecta   | 46 |
| 7 | Compuestos presentes en los extractos n-hexánicos de hoja macerada de <i>Styrax ramirezii</i> y su bioactividad reportada                                | 62 |
| 8 | Composición porcentual de extractos hexánicos de hoja obtenidos por maceración y soxhlet de <i>Styrax ramirezii</i> ordenados por su tiempo de retención | 65 |
| 9 | Promedios de peso, tamaño y color de los distintos estadios inmaduros  | 68 |

## Resumen

El mamuyo ó *Styrax ramirezii* Greenm es una especie endémica de México y se distribuye en los bosques centro occidentales del país, pero a diferencia de las otras especies reportadas dentro del mismo género, el mamuyo es la única especie que produce drupas comestibles, pero hasta el momento no existen estudios realizados sobre las propiedades químicas, físicas y/o funcionales del fruto ni de la planta. Por tal motivo, el objetivo principal fue analizar fisicoquímicamente el fruto y determinar la actividad antimicrobiana de extractos de de *Styrax ramirezii*. Para la elaboración de los extractos se colectaron hojas, tallos y frutos, los cuales fueron sometidos a extracción por maceración y en aparato de soxhlet con dos solventes (n-hexano y cloroformo); los microorganismos utilizados fueron bacterias (*Pseudomonas* sp., *Pantoea stewartii*, aislados de aguacate AA26 y AA34) y hongos (*Rhizoctonia* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum glosporoides*, *Colletotrichum acutatum* y tres aislados de *Armillaria* sp. ZC4, ZC5 y SJN) fitopatógenos. La actividad antibacteriana fue determinada por diluciones seriales y siembra en placa, mientras la actividad antifúngica y antioomiceto se evaluó mediante difusión por discos y los extractos crudos de los tres tejidos vegetales se ensayaron en concentraciones desde 100 hasta 4000 µg/mL. Los resultados de la actividad antibacteriana mostraron que la mayor inhibición (94 %) se tuvo en los extractos n-hexánicos de hoja macerada (400 µg/mL) contra el aislado de aguacate 26 y en la actividad antifúngica la mayor inhibición (68 %) fue obtenida nuevamente con el extracto n-hexánico de hoja macerada (3200 µg/mL), además los extractos de hoja, el solvente n-hexano y el método maceración tuvieron los mayores valores (51, 48 y 43 % respectivamente) de las variables evaluadas. Por otro lado, algunos de los parámetros fisicoquímicos fueron: sólidos solubles (17.63 °Bx), ceniza (0.62 g) y proteína (0.98 g), valores superiores a los reportados en arándano, lo que sitúa a *Styrax ramirezii* con potencial económico y apto para proponerse en programas de fitomejoramiento.

**Palabras clave:** bioactividad, antibacteriano, antifúngico, análisis fisicoquímicos, mamuyo.

## Abstract

The mamuyo or *Styrax ramirezii* Greenm is endemic to Mexico and is distributed in the western woodlands of the country, but unlike other reported species within the same genus, the mamuyo is the only that produces edible drupe, but so currently there are not studies on the chemical, physical and functional properties of the fruit or plant. Therefore, the aim of this work analyzes the fruit physicochemically and determines the antimicrobial activity of extracts of *Styrax ramirezii*. For preparing extracts leaves, stems and fruits were collected, which were subjected to extraction by maceration and soxhlet apparatus with two solvents (n-hexane and chloroform); the organisms used were bacteria (*Pseudomonas* sp., *Pantoea stewartii*, avocado isolated AA26 and AA34) and fungi (*Rhizoctonia* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *glosporoides Colletotrichum*, *Colletotrichum acutatum* and three isolates of *Armillaria* sp. ZC4, ZC5 and SJN) plant pathogens. The antibacterial activity was determined by serial dilutions and antifungal activity was evaluated by diffusion disk and crude extracts of the three plant tissues were tested in concentrations of 100-4000 mg/mL. In the fruit physicochemical analysis techniques and the AOAC Official Mexican Standards they were used. The results of antibacterial activity showed the greatest inhibition (94 %) was taken in n-hexánic extracts macerated leaf (400 ug/mL) against of isolated avocado 26 and antifungal activity in the greatest inhibition (68 %) was obtained again with the extract n-hexánic macerated leaf (3200 ug/mL), also the leaf extracts, the solvent n-hexane and method maceration had greater values (51, 48 and 43 % respectively) of the variables evaluated. Moreover, some of the physicochemical parameters were: soluble solids (17.63 ° Bx), ash (0.62 g) and protein (0.98 g), values higher than those reported in blueberry, whence *Styrax ramirezii* has economic potential and proposed in genetic improvement studies.

**Keywords:** bioactivity, antibacterial, antifungal, physicochemical analysis, mamuyo.

## I. INTRODUCCIÓN

Los extractos de plantas han sido usados desde la antigüedad para el tratamiento de distintas enfermedades y desordenes fisiológicos en humanos, pero ha sido hasta en el último siglo, que con la ayuda del desarrollo e innovación de algunas técnicas y el incremento en la demanda de productos de origen natural propiciara el surgimiento de una amplia gama de aplicaciones de los extractos naturales y con esto, a nivel científico la creación nuevas líneas de investigación (Shiva, 2007).

Una de las características de algunos extractos es la antimicrobiana, es decir, impedir o frenar el crecimiento de bacterias en tejidos vegetales y animas (incluido los humanos), de tal manera se tiene que los principales extractos vegetales con actividad antimicrobiana son los aceites esenciales y se conocen aproximadamente 3000 plantas con potencial antimicrobiano, de las cuales 300 tienen importancia comercial (Burt, 2004).

Los aceites esenciales o también llamados terpenos son las fracciones que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 150 componentes, entre ellos: fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos, cetonas y principalmente terpenoides que le proporcionan características únicas (Gutierrez y col., 2008), ejemplos de plantas que tiene aceites esenciales en su composición son: eucalipto (*Melaleuca alternifolia*), romero (*Rosmarinus affinalis*), menta (*Mentha piperita*), trébol (*Syzygium aromaticum*), limón (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), etc. (Ponce y col., 2008; Burt, 2004).

Entre las familias que han registrado mayor contenido de terpenoides esta la Styracaceae y su género *Styrax*, un ejemplo de ello son las meliacinas (triterpenos) y ajugarinas (diterpenos) que otorgan propiedades biológicas, que en muchos casos se relacionan con actividades bioinsecticidas. Este es el caso de ajugarina I y desacetilajugarina II que poseen actividad disuasoria frente a larvas de *Spodoptera littoralis* y *Helicoverpa armígera* (Fraga, 2003).

En relación a los frutos del género *Styrax*, se reportan compuestos de naturaleza terpenoica con acción fungicida, tal como lo demuestra el análisis de extractos de frutos de *Styrax officinalis*, que reducen el crecimiento de micelio de *Alternaria solani*, dando origen a una nueva alternativa de control más bioagradable en comparación con las típicas técnicas químicas de control (Yanar y col., 2011). Por otro lado, sesquiterpenoides presentes en frutos frescos de *Styrax argenteus*, han sido empleados como materia prima en síntesis de otros terpenoides, entre otras razones porque es un producto comercializado por su agradable aroma (Gebbinck, 2002). No obstante a los anteriores reportes, es de llamar la atención que no se tienen trabajos de frutos comestibles del género.

El mamuyo (*Styrax ramirezii* Greenm), es una especie con frutos comestibles distribuida en los bosques del estado de Michoacán, sin embargo su estudio e identificación como planta con potencial comercial, medicinal y agrícola es escaso. Por ello, en el presente trabajo el objetivo principal fue determinar la bioactividad de *Styrax ramirezii*, esto como una primera fase para proponer y considerar al mamuyo en programas de fitomejoramiento.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 *Styrax*

El género *Styrax* pertenece a la familia Styracaceae e incluye aproximadamente 130 especies de árboles y arbustos ampliamente distribuidos en Asia, América y la parte sur de Europa (Fritsch, 1999), lugares donde se han utilizado como ornamentales o se les ha dado un uso medicinal, destacando como sus componentes sustancias de naturaleza terpenoide, ácidos grasos y saponinas (Park y col., 2009; Yoshikama y col., 2000; Mendoça y col., 2000; Breuer, 1987).

#### 2.1.1 Generalidades

Reportes de varias especies de *Styrax* han puesto de manifiesto un gran número de cualidades que van desde poseer propiedades antiinflamatorias e inhibitorias en la proliferación de células cancerígenas y tener actividad biológica frente algunas de las enfermedades crónico degenerativas como el diabetes (Mendoça y col., 2006) y cáncer (Harikrishnan y col., 2011).

#### 2.1.2 Descripción botánica

El género comprende árboles y arbustos glabros con hojas alternas, simples, membranáceas a semicoriáceas, con margen entero, aserrado o dentado; Sus nervaduras son de forma pinnar y contienen inflorescencias de apariencia racemosas; sus flores contienen un ovario semi-infero, densamente pubescente o lepidoto, los 3 septos parietales unidos en la base pero no completamente unidos en el ápice; Fruto una drupa seca, globosa a oblonga, indehiscente o con dehiscencia loculicida, formando 3 valvas con una semilla o excepcionalmente dos de forma subglobosa o elipsoide, con un hilo basi lateral y la testa endurecida, ligeramente rugosa; embrión linear-lanceolado o linear-clavado (Dos Santos, 2005; Fritsch, 1997; Carranza, 1993; Pacheco 1983).

Los caracteres que distinguen a *Styrax* de los otros géneros de la familia Styracaceae son el tener 10 estambres o más, flores perfectas en racimos, cimas

o panículas, ovario semiínfero o casi completamente súpero, semillas no aladas, filamentos libres o conados sólo en la base y fruto drupáceo (Carranza, 1993).

### 2.1.3 Importancia del género

La importancia del género *Styrax* se basa en las diferentes funciones para el desarrollo de la vida y las aplicaciones que el humano ha encontrado en estas plantas, aplicaciones que recorren el horizonte de los valores estéticos, ecológicos, recreativos, religiosos, culturales, científicos, artísticos y éticos, donde la escala de valores del individuo que lo percibe, marca la pauta a seguir hacia su preservación, uso adecuado a perpetuidad o destrucción en donde están presente las diversas especies pertenecientes de *Styrax* (Guerrero, 2013).

Desde el punto de vista económico, es ampliamente aceptado que el valor de los recursos silvestres puede ser directo o indirecto. El primero está relacionado con el disfrute o satisfacción recibida directamente por el consumidor del recurso, lo cual permite una asignación de precios, en tanto que el segundo se estima principalmente tomando en consideración las funciones de los ecosistemas como parte del mismo (Rzedowski y Calderón, 2005).

### 2.1.4 Actividad biológica

Existen diversos estudios acerca de los componentes y/o ingredientes activos de plantas que pertenecen al género *Styrax*, debido a que se ha demostrado que los mencionados constituyentes tienen una gran número de aplicaciones que van desde ser sustancias auxiliares en padecimientos humanos y ser agentes biocidas, debido a esto último, se han aplicado extractos, infusiones y un gran número de productos derivados , en el control de algunas enfermedades ocasionadas por bacterias y algunos hongos patógenos de plantas y/o humanos (Harikrishnan y col., 2011; Pauletti y col., 2006; Wang y col., 2006), con base a los reportes podemos dividir en tres principales tipos de actividad biológica del género, los cuales son:

### *Actividad insecticida*

Un ejemplo del contenido de terpenoides en plantas de *Styrax* son las ajugarinas (diterpenos) que otorgan propiedades biológicas, que en muchos casos se relacionan con actividades bioinsecticidas. Este es el caso de ajugarina I, y desacetilajugarina II que mostraron poseer una elevada actividad disuasoria frente a larvas de *S. littoralis* y *H. armígera* (Fraga, 2003).

Estudios en *S. argenteus* revelan la presencia de eritroviol (triterpenopentacíclico), penlanfuranos (sesquiterpenoide con doble anillo), macrocarpanos (sesquiterpeno) y opositanos (sesquiterpenos) de forma habitual, compuestos que por su naturaleza química otorgan propiedades inhibitorias contra diversos microorganismos (Lee y Lim, 2010).

### *Actividad antibacteriana*

Investigaciones en especies de *Styrax* han demostrado ser fuentes ricas de arylpropanoides y triterpenoides, los cuales han sido evaluados por tener actividad antimicrobiana significativa (Öztürk y col., 2008; Teles y col., 2005; Mendonça y col., 2000; Hirano y col., 1994), como es el caso de extractos de las hojas de *Styrax ferrugineus*, a quien se le atribuye efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*.

Bertanha y col. (2013) obtuvieron extractos de hojas de *Styrax pohlii* y a bajas concentraciones inhibieron en diferente grado cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Por otro lado, se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en *Styrax benzoin* en cuatro extractos utilizando distintos solventes, los cuales fueron: agua:etanol (3:2 v/v); éter:agua (3:2 v/v); n-hexano:éter (4:1 v/v) y agua:etanol (3:3 v/v), todos ellos se analizaron contra cuatro especies de bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas varicosas*, *Pseudomonas auraginosa*, y *Escherichia coli*, los cultivos fueron de una noche y se mantuvieron durante 24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la pureza de los cultivos se comprobó después de 8 horas de la incubación y sus resultados evidenciaron que el mejor extracto fue la mezcla n-hexano:éter ya que mostró el

mejor índice antimicrobiano contra bacterias gram positivas y gram negativas, mientras que los tres extractos restantes presentaron alta inhibición sólo en bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) (Kissmann y Habermann, 2013; Bertanha y col., 2012; Oussalah y col., 2006).

### *Actividad antifúngica*

Compuestos de *Styrax paralleloneurus* (ácidos triterpenoides derivados del oleanólico) mostraron inhibición sobre los hongos *Candida albicans* (ATCC 906) y *Sporothrix schenckii* (APLL 868) después de la incubación a 37 °C durante 24 horas y en comparación con la longitud de cada halo de inhibición que presentaron ambos hongos en el control de discos de alginato Max-Print sin nanopartículas de AgNPs (Mendoza y col., 2000).

En relación a los frutos del género *Styrax*, se reportan compuestos de naturaleza terpenoica con acción fungicida, tal como lo demuestra el análisis de extractos de frutos de *Styrax officinalis*, que reducen el crecimiento de micelio de *Alternaria solani* en un intervalo de 40 a 60 %, dando origen a una nueva alternativa de control más bioagradable que las típicas técnicas químicas de control (Yanar y col., 2011; Gebbinck y col., 2002).

## 2.2 *Styrax ramirezii*

El mamuyo ó *Styrax ramirezii* es una especie silvestre poco estudiada pero con gran presencia en cuanto a su distribución dentro del estado de Michoacán se refiere y teniendo como gran atractivo el tener frutos comestibles, característica sobresaliente en comparación con otras especies con frutos no comestibles del género *Styrax* (Pauletti y col., 2006; Carranza, 1993; Pacheco, 1983).

### 2.2.1 Generalidades

*Styrax ramirezii* anteriormente se incluía dentro de la especie *Styrax argentus* como una variedad (Carranza, 1993; Pacheco 1983) debido a su semejanza morfológica y el uso de técnicas para la identificación muy rudimentarias, actualmente es considerada como especie y de manera práctica se distingue

fácilmente de las otras especies de *Styrax* presentes en México por la presencia de escamas en el indumento y forma del fruto, el cual tiene forma oblongo-elipsoide (Pacheco, 1983).

### 2.2.2 Clasificación y descripción botánica

El mamuyo se describe como un árbol pequeño de 5 a 15 m de alto y en ocasiones de un porte arbustivo; tiene pecíolos de 1.3 a 2 cm de largo, con apariencia de ser tomentosos-estrellados y en ocasiones con presencia de pelos escumiformes dispersos, láminas oblongo-lanceoladas a oblongo-elípticas, de 3.4 a 19 cm de largo y de 1.2 a 7 cm de ancho, los ápices del mamuyo son acuminados a obtuso, con base atenuada, oblicua o cuneada, el envés de la hoja es más pálido que el haz con tomento estrellado muy pequeño ( $\pm 0.1$  mm); con 6 a 12 flores dispuestas por racimo de 5 a 7 cm de largo, pedicelos de 6 a 10 mm de longitud, cortamente estrellado-pubescentes, con pubescencia lepidota; la corola de 8 a 10 mm de longitud; el fruto es de forma irregularmente cilíndrico-elipsoide, de 8 a 13 mm de largo y de 4-9 mm de diámetro, testa rugosa y contiene una sola semilla de color café y forma ovalada como se puede observar en la Figura 1 (Pauletti y col., 2006; Dos Santos, 2005; Fritsch, 1997; Carranza, 1996; Carranza, 1993; Pacheco 1983).

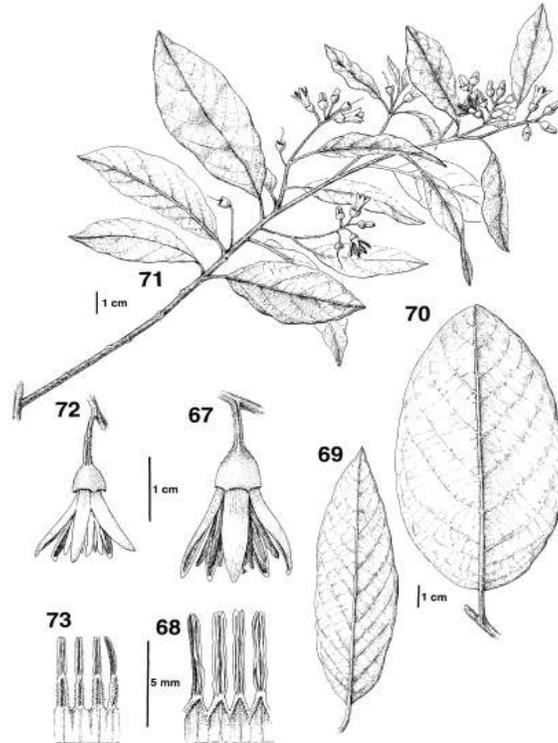


Figura 1. Diferentes órganos de *Styrax ramirezii*.

En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica actual del mamuyo.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Styrax ramirezii*.

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Reino             | Plantae                 |
| Phylum            | Magnoliophyta           |
| Clase             | Magnoliopsida           |
| Orden             | Ebenales                |
| Familia           | Styracaceae             |
| Género            | <i>Styrax</i>           |
| Especie           | <i>Ramirezii</i>        |
| Nombre Científico | <i>Styrax ramirezii</i> |

### 2.2.3 Distribución

El mamuyo es una planta endémica de México, que crece y se desarrolla en elevaciones relativamente altas de las laderas occidentales de la Sierra Madre

Occidental desde los estados de Sinaloa a Jalisco, la vertiente sur de la Franja Volcánica Transversal Mexicana, la Sierra Madre del Sur, la escarpa el este de la Sierra Madre de Oaxaca, y rara vez en las montañas de Chiapas (Fritsch, 1997; Carranza, 1993; Pacheco 1983).

Dentro del estado de Michoacán es frecuente y abundante sobre todo en la región de Pátzcuaro, entre las comunidades de Pito Real y Pontezuelas, del municipio de Charo y la zona alta del municipio de Hidalgo al noreste del estado, así que de manera general presenta buena adaptación en los bosques de pino, pino-encino o pino-encino-oyamel, a una altura dentro del intervalo de 2000-2700 msnm (Carranza, 1993).

#### 2.2.4 Fenología

La poca información acerca de *S. ramirezii* se evidencia acerca del desconocimiento de las diferentes etapas morfológicas de la planta durante el transcurso de las estaciones climáticas.

La única información y reportes publicados indican que la planta florece entre los meses de marzo a julio y fructifica de octubre a marzo (Fritsch, 1997; Pacheco, 1983).

#### 2.2.5 Importancia de *Styrax ramirezii*

En aspectos generales, la importancia del mamuyo puede ser expresado en términos del beneficio social que es percibido de su poco aprovechamiento, o de su sola existencia. Una vía no monetaria de estimar la importancia es analizar sus potenciales usos para el hombre, bien sea para la obtención de alimento, medicinas o como estabilizadores de ambientes naturales por el mismo hecho de ser una especie silvestre y de tal manera preservar su hábitat natural (Rzedowski y Calderón, 2005; Carranza, 1996).

Sobre los usos del mamuyo se tiene muy poca información, en algunos lugares donde el árbol está presente su madera es usada para hacer postes (Carranza, 1993) y los frutos son consumidos en fresco pero no llegan a ser comercializados

en mercados a grandes volúmenes, en la actualidad no se tiene conocimiento de reportes sobre propiedades físicoquímicas y/o funcionales del fruto o la planta. Las publicaciones acerca de la especie hechas por Carranza (1993) y por Fritzch (1997), no hacen referencia a que la especie se encontrase en riesgo o su hábitat reducido drásticamente, además de mencionar una alta frecuencia de la especie en las zonas de estudio, por el contrario, González-Espinoza y col. (2011) incluye a *Styrax ramirezii* en una lista de especies amenazadas del bosque nuboso mexicano donde está presente.

### 2.3 Metabolitos secundarios como agentes de biocontrol

El metabolismo secundario de las plantas produce moléculas también llamadas “metabolitos secundarios”, los cuales ayudan en el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero no son necesarios ni esenciales para que la planta viva, es decir, el metabolismo secundario es complementario del metabolismo primario. Una de las funciones comunes de los metabolitos secundarios de las plantas son los mecanismos de defensa que se utilizan para luchar contra los herbívoros, las plagas y patógenos. Aunque los investigadores saben que este rasgo es común en muchas plantas todavía es difícil determinar el papel exacto de cada metabolito secundario debido a la amplia naturaleza química a la que pertenecen. Los metabolitos secundarios más comunes son: Alcaloides, compuestos polifenoles y terpenoides (Russo, 2011; Burt, 2004; Zavaleta, 2000).

#### 2.3.1 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos de origen natural y nitrogenado que son derivados generalmente de aminoácidos y tienen carácter básico con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación, además de sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaína, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina) y en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina) (Evans, 2000).

Los alcaloides se encuentran principalmente en las plantas y se estima la existencia de más de 3,000 moléculas diferentes, las cuales están presentes en más de 4,000 especies de plantas. En general, una especie dada contiene sólo unos pocos tipos de alcaloides, aunque tanto la adormidera (*Papaver somniferum*) y el hongo del cornezuelo de centeno (*Claviceps* sp.) contienen cada uno cerca de 30 tipos diferentes (Evans, 2000; Paris y Hurabielle, 1981).

Ciertas familias de plantas son particularmente ricas en alcaloides, por ejemplo: La Ranunculaceae (ranúnculos), Solanáceas (solanáceas), y Amaryllidaceae (azucena) son otras familias prominentes que contienen un gran número y diversidad de alcaloides. Por el contrario, pocos alcaloides se han encontrado en las especies animales, tal es el caso del castor nuevo mundo (*Castor canadensis*) y ranas venenosas (*Phyllobates* spp.) (Evans, 2000).

Sirven como productos de defensa y debido a que en su mayoría están asociados con ácidos orgánicos pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado (Paris y Hurabielle, 1981).

### 2.3.2 Polifenoles

La materia viva contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, aunque muy difundidos y de considerable importancia, resultado del metabolismo secundario de las plantas que están involucrados en diversos mecanismos de defensa a patógenos y factores ambientales.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son solubles en agua o en solventes orgánicos, actualmente se conocen aproximadamente 8,000 moléculas diferentes y se caracterizan por tener en su estructura uno o más anillos bencénicos y por lo menos un sustituyente hidroxilo; tienen una gran capacidad de reaccionar y en su estructura pueden contener un ácido orgánico o un azúcar dando origen a ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Guerrero, 2013).

Los polifenoles se caracterizan por tener en su estructura uno o más anillos bencénicos y por lo menos un sustituyente hidroxilo; tienen una gran capacidad de

reaccionar y en su estructura pueden contener un ácido orgánico o un azúcar dando origen a ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Martínez-Valverde y col., 2000).

### 2.3.3 Terpenos

Durante el siglo XIX, las obras y estudios químicos realizados a la trementina condujeron al nombre de "terpeno" y concluyeron a que estos compuestos se encuentran con frecuencia en los aceites esenciales de plantas que contienen la "Quinta essentia". En la actualidad se definen como un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico y que origina el isopentenil pirofosfato (Palá-Paúl, 2002; Templeton, 1969).

#### 2.3.3.1 Generalidades

A menudo son de olor fuerte, y por lo tanto pueden proteger a las plantas que los producen, al disuadir a parásitos. Muchos terpenos son hidrocarburos aromáticos y por lo tanto pueden haber tenido una función protectora (Degenhardt y col., 2009). La diferencia entre terpenos y terpenoides es que terpenos son hidrocarburos, mientras que terpenoides contienen grupos funcionales adicionales debido por alguna modificación química, tal como sucede en los procesos oxidativos o de reorganización del esqueleto de carbono y adición de algún radical, algunos autores utilizan el término terpeno para incluir todos los terpenoides (González, 2014; Breitmaier, 2006).

#### 2.3.3.2 Localización

La localización y acumulación de compuestos de naturaleza terpenoide (Figura 2) ocurre de forma general en células epidérmicas modificadas, aunque dependiendo de la familia, género y especie también pueden acumularse en otras estructuras como tallos, raíces, flores y frutos; por ejemplo: en las hojas de albahaca, eucalipto, etc., en las raíces de azafrán, jengibre, valeriana etc., en las flores de árnica, lavanda, manzanilla, tomillo, etc., y en los frutos de cilantro, laurel, nuez

moscada, perejil, pimienta, etc. (Russo, 2011; Degenhardt y col., 2009; Shiva, 2007, Burt, 2004).

A nivel microscópico las estructuras donde se localizan los terpenoides están constituidas por una célula basal localizada en la epidermis y una célula peduncular sobre la que se sitúan las células secretoras, protegidas por una cutícula globosa en cuyo interior se acumula el aceite esencial (Burt, 2004; Lahlou, 2004).

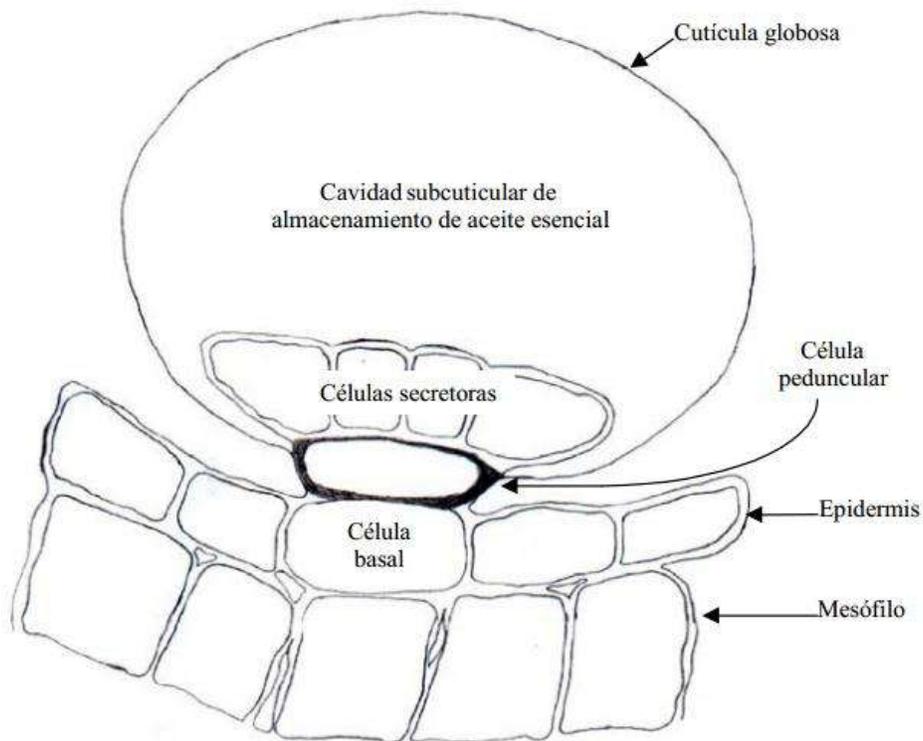


Figura 2. Células glandulares con aceite esencial.

### 2.3.3.3 Estructura

Los terpenos se derivan a partir de unidades de isopreno, que tiene la fórmula molecular  $C_5H_8$  (Figura 3). Las fórmulas moleculares básicas de terpenos son múltiplos de  $(C_5H_8)_n$ , donde  $n$  es el número de unidades de isopreno enlazadas. Esto se conoce como la regla de isopreno o la regla  $C_5$ . Las unidades de isopreno pueden ser unidos entre sí "cabeza con cola" para formar cadenas lineales o pueden estar dispuestos para formar anillos. Por lo anterior se puede considerar la

unidad de isopreno como uno de los bloques de construcción comunes de la naturaleza (Breitmaier, 2006; Voirin y col., 1990; Templeton, 1969).

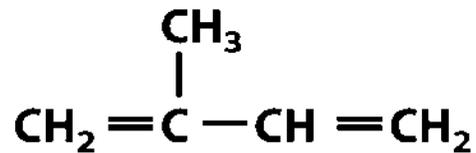


Figura 3. Isopreno.

#### 2.3.3.4 Biosíntesis

El isopreno en sí no sufre el proceso de construcción, pero las formas activas de pirofosfato isopentenil (IPP o también isopentenildifosfato) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP o también dimetilalildifosfato), son los componentes de la ruta de biosíntesis (Breitmaier, 2006). El IPP se forma a partir de acetil-CoA a través de la intermediación de ácido mevalónico en la vía de la reductasa de la HMG-CoA reductasa (Figura 4). Una alternativa, sin relación alguna con la vía de la biosíntesis de IPP es conocido en algunos grupos de bacterias y plástidos de las plantas, el llamado-MEP (2-metil-D-eritritol-4-fosfato)-vía, que se inicia a partir de C5-azúcares. En ambas vías, IPP se isomeriza a DMAPP por el pirofosfato de la enzima isomerasaisopentenilo (Russo, 2011; Breitmaier, 2006; Soheil y Rodney, 2003).

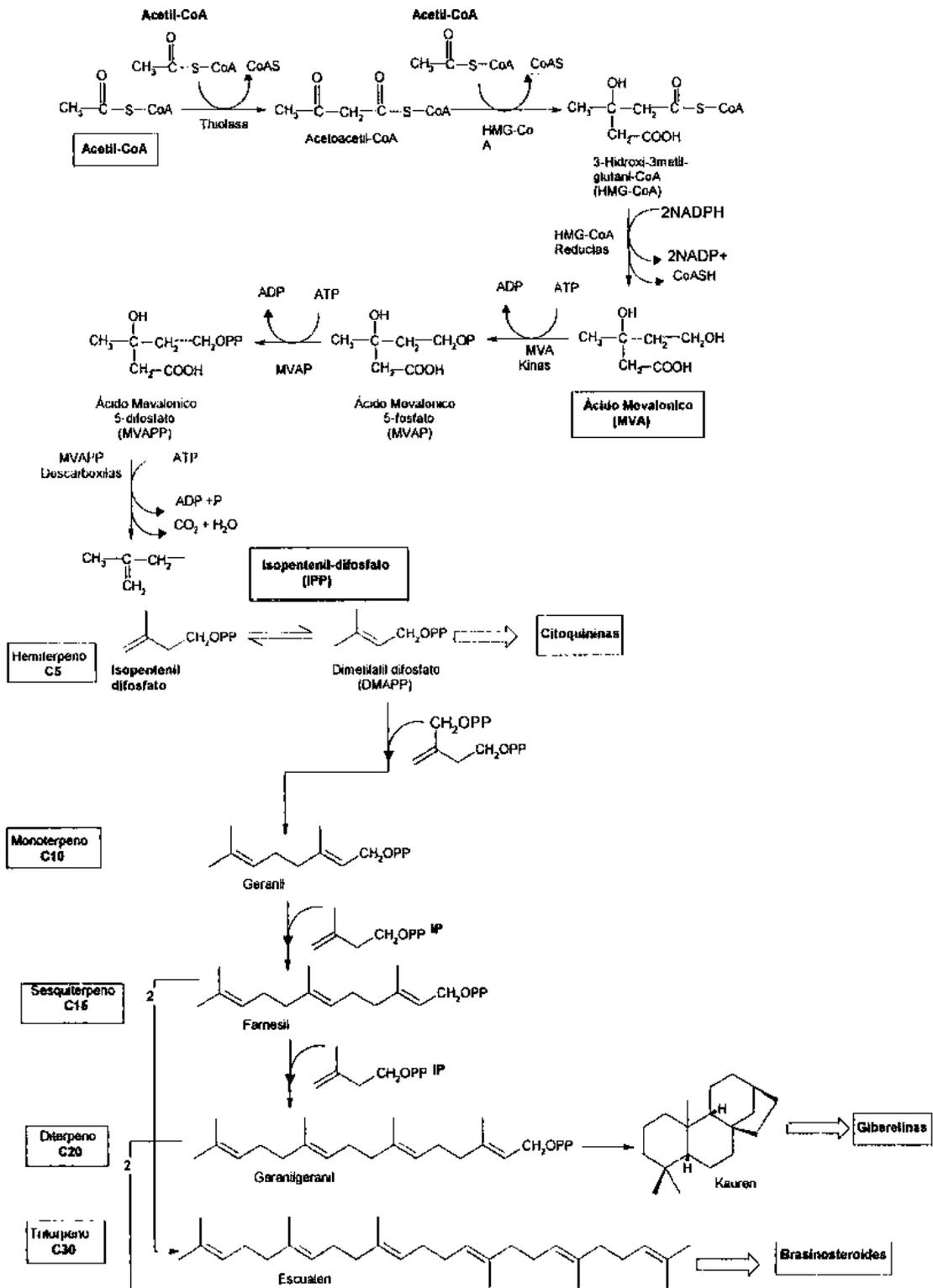


Figura 4. Biosíntesis de terpenoides.

### 2.3.3.5 Clasificación

Los terpenos se clasifican de acuerdo a la cantidad de unidades isoprénicas que contengan en su molécula, de esta forma los compuestos con un sólo isopreno son los hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos los de dos unidades isoprénicas (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos los de tres unidades (C<sub>15</sub>) y así sucesivamente (Tabla 2) (Degenhardt y col., 2009; Breitmaier, 2006).

Tabla 2. Clasificación de los terpenos.

| Nombre genérico | No. unidades de isopreno | No. átomos de carbono |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|
| Hemiterpenos    | 1                        | 5                     |
| Monoterpenos    | 2                        | 10                    |
| Sesquiterpenos  | 3                        | 15                    |
| Diterpenos      | 4                        | 20                    |
| Sesterpenos     | 5                        | 25                    |
| Triterpenos     | 6                        | 30                    |
| Tetraterpenos   | 8                        | 40                    |
| Politerpenos    | 5n                       | N                     |

Además cada uno de estos grupos se puede subdividir con base a sus características estructurales o la importancia del grupo funcional principal. Por ejemplo, pueden ser de estructura regular, irregular, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos (Figura 5) (Breitmaier, 2006; Voirin y col., 1990).

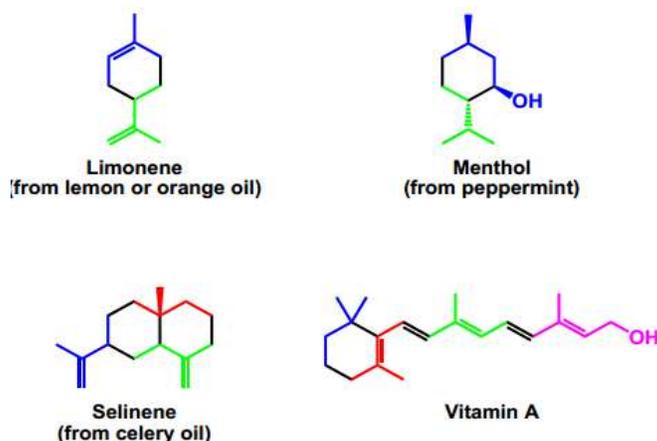


Figura 5. Estructuras de terpenoides.

### 2.3.3.6 Separación

La mayoría de los compuestos en mezcla (incluidos los terpenoides) cuando se pueden separar mediante uso de alguna técnica cromatográfica, por lo cual a la cromatografía se le define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas (Skoog y Leary, 1994).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Todos los sólidos finalmente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente' todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía (Nielssen, 2003).

### 2.3.3.7 Identificación y cuantificación

La cromatografía de gases-masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite identificar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad (Valcárcel y Gómez, 1994).

Para cuantificar el analito en la muestra se usa la masa de cada compuesto por su espectrometría y posteriormente se corrobora con bibliotecas previamente establecidas en donde se compara el grado de similitud de los compuestos ya identificados con el de la muestra que se analiza (Nielssen, 2003).

### 2.3.3.8 Usos

Los terpenos juegan un papel importante como fragancias en perfumería, como constituyentes de sabores para condimentar los alimentos, alternativa de control de algunos insectos ya que atraen por sus aromas y a pesar de la tecnología existente en la química orgánica para la síntesis de un nuevos medicamentos, los terpenos, sirven como fuente de materia prima para el descubrimiento de medicamentos innovadores, debido a que la diversidad química de los terpenos es muy adecuada para proporcionar el esqueleto para futuras moléculas(Russo, 2011).

Por lo tanto, en un intento de mejorar el perfil de eficacia y seguridad de nuevas moléculas, la relación estructura-actividad que favorece a los terpenos y terpenoides han marcado una nueva tendencia hacia el desarrollo de moléculas que se puedan aplicar en diversas áreas pero con la ventaja de provenir de productos naturales que no afecten al ambiente ni al humano (González, 2014; Breitmaier, 2006; Voirin y col., 1990; Templeton, 1969).

## 2.4 Caracterización de frutos

Desde tiempos remotos se ha intentado conocer más acerca de las sustancias que conforman los alimentos, primero por métodos rudimentarios que aportaban la

información básica acerca de sus componentes y después con el desarrollo de técnicas mucho más sofisticadas, capaces de detectar y cuantificar sustancias en cantidades muy pequeñas, además desde el punto de vista químico, los alimentos son tan complejos, que de algunos aún se desconoce su composición completa. Agua, proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas, pigmentos y aromas, pero también otras muchas sustancias, proporcionan al alimento sus características especiales de color, sabor, olor y textura (Franco y col., 2008).

El fruto del mamuyo ha sido consumido única y exclusivamente por los habitantes de las zonas donde desarrolla, sin que sea explotado comercialmente; aunado a esto y con la información que reporta a *Styrax ramirezzi* con los únicos frutos comestibles producidos por las especies que se incluyen en el género *Styrax*, es fundamental su caracterización y análisis (Guerrero, 2013).

Según las pruebas a realizar la caracterización de frutos se puede dividir en varias áreas, siendo las pruebas fisicoquímicas y bromatológicas las más comunes y confiables.

#### 2.4.1 Análisis fisicoquímicos y bromatológicos

Los análisis fisicoquímicos y bromatológicos de las frutas son fundamentales, ya que por medio de estos es posible conocer las diferentes características nutrimentales de manera cuantitativa (Franco y col., 2008). Según la FAO (2011) los análisis más comunes, importantes y básicos que se realizan en frutas son:

- **Peso:** el objetivo es determinar fuerza gravitatoria que actúa sobre el fruto.
- **Tamaño:** se realiza para determinar las dimensiones de los frutos, tradicionalmente se calcula de forma ecuatorial y vertical.
- **Volumen:** es el cálculo de las tres dimensiones ocupadas por el fruto.
- **Densidad:** es una magnitud escalar referida a la cantidad del fruto que ocupa un determinado volumen.

- Color: con los avances tecnológicos se ha desarrollado instrumental para la medición cuantitativa del color en frutos, con lo cual se ha podido relacionar el grado de madurez con el color que presenta el fruto.
- Porcentaje de semilla: se calcula a partir del peso inicial de fruto y tiene como objetivo conocer la proporción de las partes que componen al fruto.
- Acidez titulable: se determina con el fin de conocer el porcentaje de acidez de la fruta, el cual se expresa según el ácido predominante en las fruta, pues todas las frutas no contienen los mismos ácidos.
- Grados °Brix: los grados °Brix de la pulpa se toman con el refractómetro. esta medición se realiza con el fin de conocer los sólidos solubles presentes en la pulpa de fruta.
- pH: se realiza mediante la toma de pH de la fruta para conocer si es ácido, básico o neutro.
- Índice de madurez: se puede determinar de distintas formas, con el fin de saber el grado de madurez en el que se encuentra la fruta, generalmente se utiliza el penetrometro, o en otro caso por medio de cartas de colores según el tipo de fruta.
- Humedad: se determina con el fin de saber la cantidad de agua presente en la fruto.
- Proteína: existen diversas metodologías para calcular el contenido de proteína, las cuales se basan en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico.
- Extracto etéreo (lípidos): el método Soxhlet es el más utilizado para la cuantificar el contenido de grasa en frutos, ya que costa de un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el fruto.
- Carbohidratos: la determinación de carbohidratos se puede lograr por diversas técnicas que son directas o indirectas, además de relacionar mediante reacciones químicas con indicadores (ejemplo: lugol) la presencia de ciertos monosacáridos y disacáridos que contenga una fruta.

Además existe en un nivel más específico la determinación de moléculas de naturaleza lipídica, proteica etc. (Franco y col., 2008), así como sus respectivas concentraciones.

### III. JUSTIFICACIÓN

El desequilibrio del medio ambiente, el deterioro a la salud humana y el surgimiento de microorganismos fitopatógenos más agresivos y resistentes a plaguicidas de síntesis química, ha llevado a la necesidad de buscar alternativas menos agresivas con el ambiente y sin peligro para el humano. Una de estas alternativas es el uso de extractos de plantas silvestres con compuestos de naturaleza terpenica que actúen como reguladores del desarrollo y crecimiento de los microorganismos. El análisis de compuestos terpenicos es una importante área de investigación científica, debido a su demostrada capacidad para prevenir, controlar e inhibir el desarrollo de organismos perjudiciales a diversos cultivos agrícolas, por otra parte existen miles de estos compuestos terpenicos contenidos en los vegetales, cuyo valor se puede ver influido en cierto grado por la presencia de altas concentraciones, imprimiéndole un carácter medicinal, insecticida, bactericida o antifúngico, asiendo altamente atractivo el estudio de plantas silvestres.

Michoacán cuenta con una gran diversidad vegetal tanto silvestre como cultivada que ha sido poco explorada para la caracterización de productos del metabolismo secundario y su potencial biológico, por lo cual, el Mamuyo o *Styrax ramirezii* representa una oportunidad única para analizar los compuestos y actividad biológica contra patógenos de cultivos de importancia agrícola, que además es la única especie que produce frutos comestibles del género *Styrax*, lo cual es dar un importante paso hacia el valor ecológico, económico y agrícola de esta especie sin reportes previos.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de extractos de *Styrax ramirezii* Greenm contra patógenos de cultivos agrícolas.

### 4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de terpenoides en órganos vegetales (fruto, hoja y tallo) de *S. ramirezii*.
- Evaluar la probable actividad biológica de los compuestos terpenoides extraídos de fruto, hoja y tallo.
- Analizar los extractos crudos por técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la identificación y cuantificación de sus compuestos.
- Medir los parámetros fisicoquímicos de frutos maduros de *Styrax ramirezii* que describan de forma general sus características.

### 4.3 Hipótesis

Los extractos con compuestos terpenoides de frutos, tallos y hojas de *Styrax ramirezii* tienen actividad antimicrobiana contra al menos uno de los microorganismos seleccionados.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Esquema general de trabajo

En la Figura 6 se muestra de manera generalizada el procedimiento para realizar las evaluaciones de los compuestos presentes en *Styrax ramirezii*, así como las determinaciones fisicoquímicas del fruto.

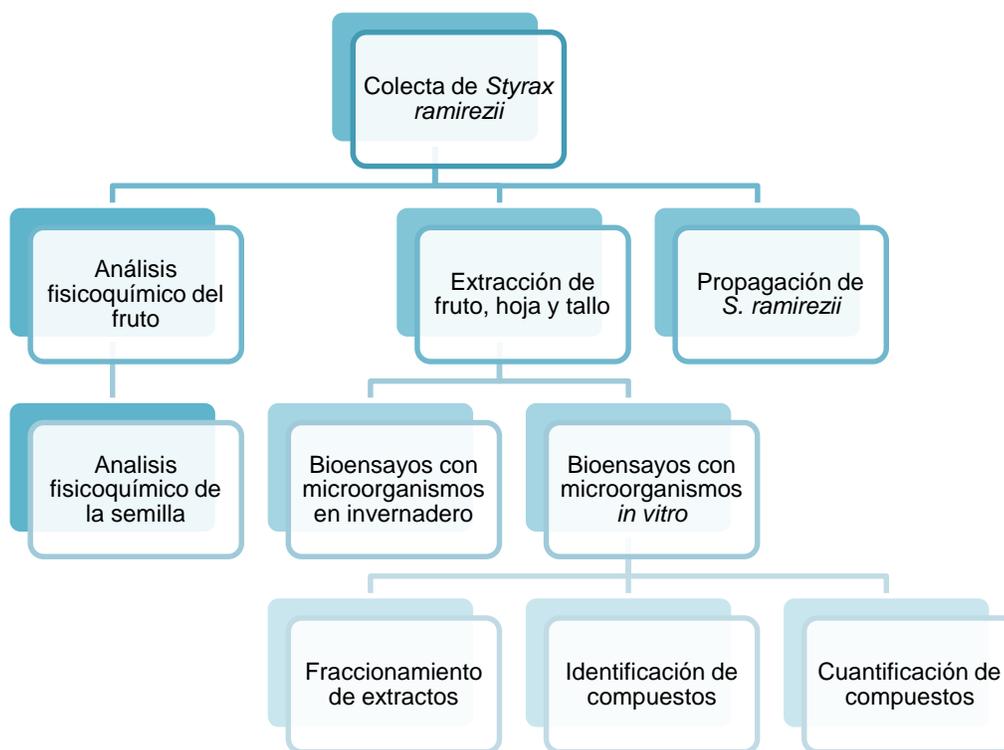


Figura 6. Esquema general de trabajo.

### 5.2 Material biológico

Los materiales biológicos utilizados en este trabajo fueron previamente identificados como es el caso de *Styrax ramirezii* que a partir de las muestras de plantas llevadas al Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro se corroboró la identidad de la muestra con las del herbario por el Dr. Sergio Zamudio Ruiz y en el caso de los microorganismos ya identificados pertenecen a muestras del cepario del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) y los aislados fueron obtenidos en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología,

los cuales pertenecen a trabajos de investigación que posteriormente serán secuenciados.

#### 5.2.1 Selección y colecta del material vegetal

Para la localización de los distintos sitios de poblaciones de materiales de mamuyo, se recurrió a la revisión de trabajos previos generados por el Laboratorio de Bromatología, así como el conocimiento de localización de árboles de los pobladores.

Una vez identificados los sitios, se realizó la colecta de frutos, tallos y hojas en época de fructificación (con el propósito de uniformizar la época de colecta de los órganos vegetales a utilizar), los cuales fueron a simple observación libres de potenciales patógenos y sólo se colectó material vegetal de árboles entre 1 – 2 m de altura de los cuatro puntos cardinales y de la zona alta, media y baja del follaje, el material colectado se transportó manteniéndolo a una temperatura de 6 – 9 °C hasta el Laboratorio de Bromatología.

#### 5.2.2 Microorganismos para la realización de bioensayos

Los materiales biológicos utilizados para la determinación de la bioactividad de los extractos de *S. ramirezii* son *Pseudomonas* sp. (Gram -), *Pantoea stewartii* (Gram -), Aislado de aguacate 26 (Gram -) y Aislado de aguacate 34 (Gram -) para la actividad antibacteriana, y *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum glosporoides*, *Colletotrichum acutatum*, el oomicete *Phytophthora cinnamomi* y tres aislados de *Armillaria* spp. (ZC4: zona Corupo 4; ZC5: zona Corupo 5 y SNJ: San Juan Nuevo) para la actividad antifúngica, todos ellos fitopatógenos de importancia en la zona agrícola del estado de Michoacán y con un amplio rango de hospederos.

##### 5.2.2.1 Mantenimiento de los microorganismos

Para el mantenimiento de los microorganismos se utilizaron medios básicos recomendados para bacterias y hongos (Caldo Nutritivo (CN) y Papa-Dextrosa-Agar (PDA) respectivamente) e incubadoras con temperatura controlada (37 °C

para bacterias y 25 °C para hongos y el oomicete), además las cepas y aislados originales se mantuvieron a 4 °C y se reactivaban cuando se utilizaban con 48 h de anticipación mediante subcultivos sobre medio nuevo (Sánchez y Corrales, 2005).

### 5.3 Preparación del material vegetal para la extracción

Una vez realizada la colecta en época de fructificación y con el material vegetal fresco, se cortaron frutos y hojas con el uso de tijeras y se disminuyó el tamaño con ayuda de un mortero de porcelana y pistilo, en el caso de los tallos se cortaron en segmentos de aproximadamente 0.5 cm de longitud, para finalmente someterlos a los distintos procesos de extracción.

### 5.4 Obtención de extractos crudos (EC)

Para la obtención de los extractos se emplearon: a) n-hexano (baja polaridad) y b) cloroformo (polaridad intermedia). De esta manera, se extrajeron moléculas o grupos de moléculas a fines a cada polaridad, por ejemplo, con n-hexano se extraen terpenos de bajo peso molecular y con cloroformo terpenos de peso molecular intermedio. Además se utilizaron dos métodos de extracción distintos, los cuales se describen a continuación.

#### *Extracción por maceración*

Para el establecimiento de esta metodología se maceraron 100 g del material vegetal a utilizar en un volumen de un litro de solvente por un periodo de 5 días a 4 °C. En el material vegetal se eliminaron los contaminantes y/o daños que tuvieran para posteriormente ser pesadas y divididas en dos partes. Una parte de la muestra se secó en la estufa a 80 °C para obtener su peso seco. La otra parte de la muestra se molió exhaustivamente en un mortero. Posteriormente transcurridos los 5 días, los extractos se filtraron utilizando papel filtro Whatman no. 4 en un sistema de embudo acoplado a bomba de vacío, posteriormente se concentraron en un rotavapor (Heildolph 2000) a 48 y 41 °C para el caso del n-hexano y cloroformo respectivamente, finalmente los extractos crudos (E.C.) se

suspendieron en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) y agua destilada 1:10 v/v. Los E.C. se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su utilización. Las extracciones se realizaron por triplicado para cada órgano vegetal.

#### *Extracción con aparato Soxhlet*

Para la obtención de extractos se utilizó el aparato Soxhlet realizando una extracción por separado para cada solvente y en forma general el proceso consistió en utilizar por separado 8 g de cada material vegetal fresco dentro de un recipiente elaborado con papel filtro Whatman no. 4 que se introdujo en un dedal de celulosa. La extracción se realizó con 80 mL de n-hexano o cloroformo según cada caso, el cual se mantuvo en ebullición por 6 horas. Los E.C. obtenidos fueron concentrados y almacenados bajo las condiciones descritas en el apartado anterior.

#### 5.5 Bioensayos con microorganismos *in vitro*

Los protocolos seguidos en esta investigación son los establecidos en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Agrobiología y constan de las siguientes etapas:

##### 5.5.1 Actividad antibacteriana

Para conocer la actividad antibacteriana de los extractos crudos se realizaron diluciones seriales y su respectiva siembra en placa para determinar las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), lo cual permitió conocer por diferencia el porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos.

#### *Cinéticas de crecimiento de bacterias empleadas en bioensayos*

Para la realización de los bioensayos fue fundamental determinar la velocidad de crecimiento para la preparación del inóculo que se utilizaría, así como para establecer el tiempo de medición del halo de inhibición de los disco en las cajas de Petri. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento bajo las siguientes condiciones: incubación a 37 °C, agitación a 150 rpm, medición de pH y densidad

óptica (D.O.) del medio a las 0, 0.5, 1 y 1.5 horas para posteriormente cada 2 horas hasta un tiempo total de 30 horas. La D.O. fue determinada en un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm y se tomó como blanco de referencia y control el medio Papa-Dextrosa (medio donde se incubó la bacteria), además se realizaron siembras en placas con medio Mueller-Hinton con 100 µL provenientes de las distintas diluciones seriales para determinar las UFC/mL.

Por otro lado se relacionó la D.O. con las UFC/mL obtenidas en el conteo por placa, con lo cual se pudo conocer la cantidad aproximada de bacterias en cada una de las diferentes etapas de su crecimiento.

#### *Preparación del inóculo*

En medio líquido papa-dextrosa se puso a crecer la bacteria a temperatura ambiente con agitación a 150 rpm el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de 0.7, la cual corresponde a una población de bacteriana de  $1.58 \times 10^7$  UFC/mL para *Pseudomonas* sp.,  $1.39 \times 10^8$  UFC/mL para *Pantoea stewartii*,  $1.48 \times 10^8$  UFC/mL para el aislado de aguacate 26 (AA26) y  $1.54 \times 10^8$  UFC/mL para el aislado de aguacate 34 (AA34). El tiempo en el que se alcanza la densidad óptica antes señalada fue de 18 horas para todas las bacterias evaluadas, de tal motivo se estableció el tiempo de incubación (18 horas) para los bioensayos de actividad antimicrobiana.

#### *Preparación de los tratamientos*

Para la preparación de los tratamientos se utilizaron los extractos crudos de hoja tallo y fruto resuspendidos en dimetilsulfoxido por separado y para el control positivo se emplearon antibióticos específicos para cada microorganismo (*Pseudomonas* sp. con Amikacina 30 µg/mL, *Pantoea stewartii* y el aislado de aguacate 26 con Gentamicina 10 µg/mL y el aislado de aguacate 34 con Trimetoprima y Sulfametoxazol 8 mg - 40 mg/mL respectivamente) antibióticos que fueron determinados con la previa elaboración de pruebas *in vitro* con multidiscos. La descripción de los controles y tratamientos establecidos en los bioensayos antimicrobianos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos y controles evaluados en actividad antibacteriana

| Tratamiento/control | Descripción   |
|---------------------|---|
| Control negativo    | 5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v                                   |
| Control positivo    | Antibiótico (5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)                     |
| Extracto 1          | 100 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 2          | 200 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 3          | 400 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 4          | 600 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 5          | 800 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |

\*Extracto crudo proveniente de hoja, tallo y fruto por separado.

### 5.5.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica se determinó con el uso de discos de papel filtro Whatman # 4 de 7 mm de diámetro, los cuales fueron esterilizados para ser impregnados con los tratamientos y/o controles correspondientes y se incubaron las cajas de petri en un intervalo de 22 a 27 °C hasta que la caja se llenara completamente en el control negativo (medio e inóculo) en PDA y se registro el crecimiento de micelio para calcular el diámetro del halo de inhibición de *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum glosporoides*, *Colletotrichum acutatum*, y los tres aislados de *Armillaria* spp. (ZC4, ZC5 y SNJ). Los bioensayos con hongos se realizaron con cuatriplicado para cada una de las concentraciones.

### *Cálculo de halos de inhibición*

Los halos de inhibición de los tratamientos se midieron con un Vernier, la lectura de los halos de inhibición de la actividad antifúngica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$C = A - B$$

Dónde:

C = tamaño del halo de inhibición

A = tamaño del disco + halo

B = tamaño del disco

Una vez realizado el bioensayo se determinó el porcentaje de inhibición para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(100)(dm)}{dc}$$

Dónde:

dm = promedio del halo de inhibición

dc = promedio diámetro del halo del control negativo

### *Preparación de los tratamientos*

Al igual que en los bioensayos antibacterianos se utilizaron los extractos crudos de hoja tallo y fruto resuspendidos en dimetilsulfoxido por separado y para el control positivo se emplearon fungicidas específicos para cada microorganismo (*Rhizoctonia* sp. con benomil (2 mg/mL), *Phytophthora cinnamomi* con metalaxil (5 mg/mL), *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum acutatum* con azoxystrobin (2 mg/mL) y los tres aislados de *Armillaria* spp. con ciproconazol (2 mg/mL), fungicidas que fueron determinados con la previa elaboración de pruebas *in vitro* con discos de papel filtro impregnados con diferentes fungicidas a distintas concentraciones. La descripción de los controles y tratamientos establecidos en los bioensayos antifúngicos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos y controles evaluados en la actividad antifúngica

| Tratamiento/control | Descripción  |
|---------------------|--|
| Control negativo    | 5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v                                    |
| Control positivo    | Fungicida (5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)                        |
| Extracto 1          | 100 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)  |
| Extracto 2          | 400 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)  |
| Extracto 3          | 800 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)  |
| Extracto 4          | 1600 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 5          | 2400 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 6          | 3200 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 7          | 4000 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |

\*Extracto crudo proveniente de hoja, tallo y fruto por separado.

## 5.6 Bioensayos con microorganismos en invernadero

Posteriormente y con base en los resultados del experimento *in vitro* se realizaron bioensayos para confirmar y complementar la inhibición de fitopatógenos en plantas modelo a nivel de invernadero, el cual se ubica en las instalaciones de la Facultad de Agrobiología y se realizó en una superficie de 5 x 6 m y cuenta con maya antiafidos y cubierta de plástico en el suelo.

### 5.6.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana en invernadero se realizó mediante el empleo de dos plantas modelo como son: Calabacita (*Cucurbita pepo* L. var. grey zucchini) y Pepino (*Cucumis sativa* L. var. Americana) seleccionadas por su rápido crecimiento y acelerado metabolismo en comparación con los árboles frutales y sólo se utilizaron extractos hexánicos de hoja macerada contra la bacteria aislada de aguacate 26.

#### *Preparación de plantas modelo*

Las semillas utilizadas de las plantas fueron provenientes de paquetes de marca registrada y obtenidas en viveros. Tanto la calabacita como el pepino se

germinaron en charolas de 88 orificios de 45 mL en Peat Moss como sustrato previamente esterilizado en autoclave, posteriormente y cuando tenían 3 hojas verdaderas fueron transplantadas a bolsas negras de 35 x 45 cm con tierra de pino y encino (1:1 v/v) la cual fue previamente tratada con cobre y azufre para eliminar patógenos que pudiera haber contenido. Se aplicaron riegos cada 48 h a capacidad de campo y se fertilizó cada planta con 4 g de Urea a los 15 y 30 días de trasplante de calabacita y pepino respectivamente (Figura 7).

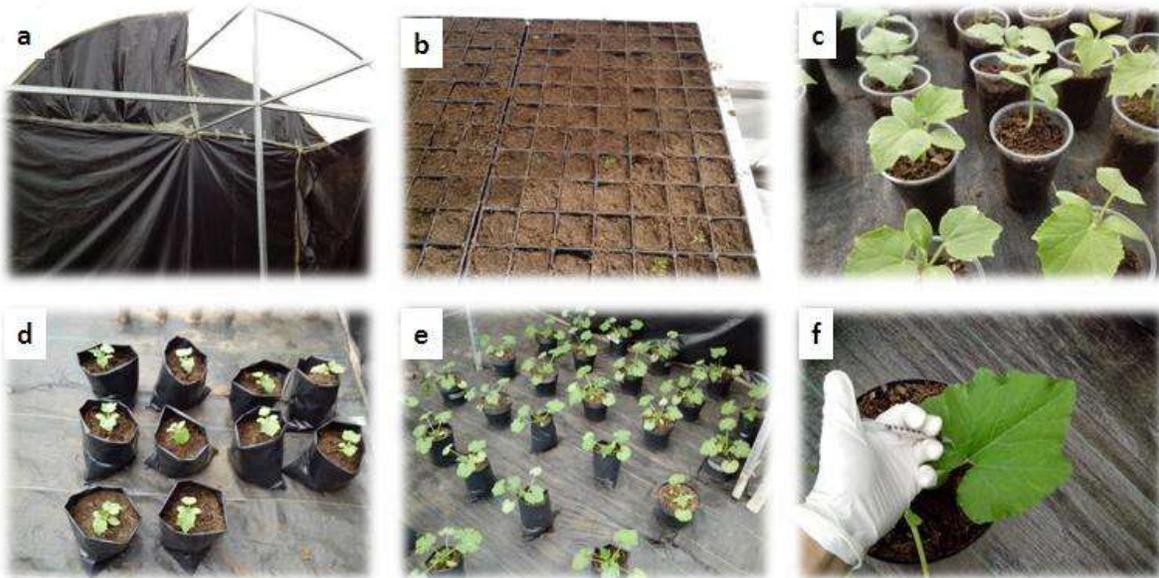


Figura 7. Preparación de la calabacita para el bioensayo. a: invernadero; b: charola de germinación; c: trasplante de plántula en vasos; d: trasplante de plántula en bolsa; e: vista general de las plantas; f: inoculación con jeringa de plantas.

### *Preparación del inóculo*

El inóculo para la infección con el aislado de aguacate 26 (AA26) de las plantas se puso a crecer la bacteria a temperatura ambiente en medio líquido papa-dextrosa y en agitación a 150 rpm el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de 0.6, la cual corresponde a una población de bacteriana de  $1.48 \times 10^8$  UFC/mL, el tiempo en el que se alcanza la densidad óptica antes señalada fue de 20 horas. La inoculación se realizó 30 (calabacita) y 45 (pepino) días después del trasplante con la inyección de 30  $\mu$ L de inóculo de 4 hojas en su zona basal con aguja de insulina.

### Preparación de los tratamientos

La preparación de los tratamientos fue en función de las dosis que tuvieron inhibición del extracto n-hexánico de hoja macerada en las pruebas *in vitro* contra el aislado AA26 con su respectivo control negativo y positivo como se muestra en la Tabla 5. Los tratamientos y controles se aplicaron un día después de la aparición del primer síntoma en la hoja (3 días para calabacita y 5 días para pepino después de la respectiva inoculación), además cabe señalar que se midió el efecto cada 48 horas durante 10 días y se utilizaron 6 plantas con 4 hojas inoculadas cada una a las cuales se les inyectaron con aguja de insulina 1 mL de cada tratamiento o control según fuese el caso.

Tabla 5. Tratamientos y controles evaluados en el invernadero

| Tratamiento/control | Descripción   |
|---------------------|---|
| Control negativo    | 5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v                                   |
| Control positivo    | Gentamicina 10 µg/mL (5 % DMSO-H <sub>2</sub> O v/v)            |
| Extracto 1          | 200 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 2          | 400 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 3          | 600 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |
| Extracto 4          | 800 µg de extracto crudo*/mL (5 % de DMSO-H <sub>2</sub> O v/v) |

\*Extracto crudo n-hexánico proveniente sólo de hoja macerada.

### 5.7 Preparación de muestra para cromatografía (CG-EM)

Las únicas muestras analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fueron las que presentaron mayor bioactividad al inhibir a fitopatógenos en la etapa *in vitro* y en invernadero, a las muestras vegetales primeramente se les eliminaron contaminantes y/o daños que tenían las hojas frescas para posteriormente ser pesadas y divididas en dos partes. Una parte de la muestra se secó en la estufa a 80 °C dentro de un sobre de papel para obtener su peso seco. La otra parte de la muestra se molió exhaustivamente en un mortero con arena neutra agregándole poco a poco 100 mL de hexano grado reactivo. A cada muestra se le adicionó 1 mL de una solución de tetradecano a 1 mg/mL (1:1

p/v), antes de empezar a moler la muestra. Este extracto se filtró con papel Whatman no. 1, el cual que contenía 2.5 g de sulfato de magnesio anhidro grado reactivo. Finalmente este extracto n-hexánico se concentró a 0.2 mL, bajo una corriente de nitrógeno gaseoso.

#### 5.8 Metodología para la identificación y cuantificación de compuestos

La identificación y cuantificación de compuestos en los extractos que presentaron bioactividad se llevo a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), en donde se inyectó 1  $\mu$ L en un cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973). El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador (7.48 psi) con un flujo de 1mL/min, inyección con división de flujo (split 60.3:1) a una temperatura de 250°C, en una columna capilar de polaridad intermedia (HP-5MS, 30 m x 20 mm x 20 m), con el siguiente programa de temperatura en el horno: una rampa inicial de 50-200 °C a 20 °C/min, seguida de otra rampa de 200-280 °C a 15 °C/min y por último una de 280-300 °C a 20 °C/min. El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización eléctrica (EI), con flujo de 1 mL/min, voltaje de ionización a 70 eV, temperatura de la interfase a 280 °C y en modo SCAN con un rango de masas de 50-550 m/z.

##### *Análisis cualitativo*

Los componentes volátiles de *S. ramirezii* se identificaron por comparación de espectros con los espectros de masas de la *Biblioteca National Institute of Standars and Technology* (NIST 05), aceptando la identificación de compuestos puros con más del 90 % de concordancia.

##### *Análisis cuantitativo.*

Para calcular las concentraciones relativas de cada compuesto se eliminaron concentraciones de impurezas identificadas y de compuestos no resueltos. Posteriormente se sumaron todas las concentraciones de los compuestos de interés para calcular su porcentaje con respecto al total con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Concentración relativa} = \frac{\text{Concentración compuesto} \times 100}{\text{Concentración de todos los compuestos}}$$

### 5.9 Metodología para el fraccionamiento de los extractos crudos

Para el fraccionamiento de los compuestos se empleó la cromatografía en columna (CC) con grl de sílice 60, Sigma en una columna de 55 cm x 2 cm sin robinete y con un reservorio de 200 mL, además se adaptó un trozo de algodón en su base y se transfirió un volumen de fase móvil (mezcla de n-hexano y cloroformo 4:1 (v/v) y 90 g de sílica como soporte sólido. La sílica fue previamente disuelta en 350 mL de la mezcla de n-hexano y cloroformo 4:1 (v/v) hasta obtener una mezcla homogénea y densa, esto con el fin de facilitar y tener el “empaco” uniforme de la columna.

El fraccionamiento de los extractos en la columna se realizó bajo el procedimiento de diferentes mezclas de n-hexanos y cloroformo como eluyentes (5:0, 4:1, 3:2, 2:3 y 1:4 todos v/v) con dos volúmenes muertos (uno al inicio y otro al final) y un volumen por cada mezcla de eluyentes. Finalmente se almacenaron en frascos de vidrio a 4 °C hasta su aplicación en los bioensayos contra el aislado de aguacate 26 (AA26).

### 5.10 Análisis fisicoquímicos del fruto

El análisis fisicoquímico del fruto (drupa) del mamuyo se realizó mediante protocolos previamente establecidos por la Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC) y las Normas Mexicanas (NMX) para alimentos, que según sea el caso se hicieron ligeras modificaciones que se mencionan en los siguientes apartados.

En las determinaciones fisicoquímicas se utilizó un estado de madurez del fruto, el cual fue determinado por las características de consumo de los pobladores que habitan la región donde se colectó (madurez de consumo) y adicionalmente se

realizó una escala de madurez con base a sus características visuales. Los parámetros determinados, así como sus respectivas metodologías son:

#### *Peso*

Para determinar el peso del fruto se utilizó una balanza analítica (marca Sartorius modelo 210S), pesándose cada fruto de manera individual y expresando los resultados en gramos como lo indica la NMX-FF-006. El parámetro de peso se determinó en todos los estadios de maduración propuestos.

#### *Tamaño*

El tamaño del fruto se evaluó con un calibrador vernier digital (marca Truper), se midió la fruta por su diámetro ecuatorial y diámetro longitudinal. Se obtuvo la lectura en milímetros (mm) directamente en la escala del vernier según lo establecido en la Norma Mexicana NMX-FF-009-1982. El parámetro de tamaño se determinó en todos los estadios de maduración propuestos.

#### *Volumen*

El volumen se evaluó con una probeta de 10 mL, en donde se insertaron los frutos por separado, midiendo el desplazamiento del agua y tomando la lectura de la probeta. En referencia que 1 mL mililitro es igual a 1 cm<sup>3</sup>, esto para expresar el volumen del fruto en cm<sup>3</sup>.

#### *Densidad*

Para la determinación de la densidad del fruto de *S. ramirezii* se tomó como referencia el peso y volumen registrado anteriormente. Los valores fueron expresados en g/cm<sup>3</sup> y para calcular la densidad absoluta del fruto se aplicó la fórmula:

$$d = \frac{m}{v}$$

Dónde:

d= densidad

m= masa

v= volumen

Para calcular la densidad relativa se tomó de referencia la densidad del agua (1 g/cm<sup>3</sup>), en la siguiente fórmula:

$$dr = \frac{df}{d_{\text{agua}}}$$

Dónde:

dr = densidad relativa

df = densidad del fruto

d<sub>agua</sub> = densidad del agua

### *Porcentaje de semilla*

En el porcentaje de semilla se utilizó una balanza analítica, se pesaron diferentes frutos de mamuyo por separado y posteriormente se retiró la semilla a cada una para pesarla, la diferencia entre las lecturas (peso con semilla y peso sin semilla) nos permitió determinar el porcentaje de semilla.

### *Color*

Para la medición del color del epicarpio y pulpa del mamuyo se utilizó un colorímetro de Reflectancia (Marca Lovibond con patrón de calibración blanco de L\* = 94.43, a\* = -1.01, b\* = 0.24) para obtener las coordenadas del sistema de color CIE L\*a\*b\* en donde L\* representa la luminosidad con intervalo desde cero para el negro y cien para el blanco, a\* corresponde al tono de colores que varía del verde para valores negativos al rojo para valores positivos y b\* corresponde al color azul para valores negativos y amarillo para valores positivos.

La medición se realizó en un punto al azar sobre 700 frutos, una vez determinados los componentes L\*a\* y b\* se calcularon los ángulos Hue (°hue).

#### *Firmeza*

Para determinar la firmeza del fruto fue utilizado un Texturómetro (marca TA.TX plus Stable Micro Systems) con una sonda tipo plataforma (para resistencia a la compresión), que se ajustaron los parámetros: velocidad previa de 2.0, Trig. Frc 0.5 g, velocidad de prueba de 2.0, retención de velocidad 1.0 mm, 1 ciclo y con una distancia de compresión de 1.0 mm, seguido a esto se tomó lectura de la cantidad de gramos fuerza (gf) necesarios para comprimir el fruto, los resultados fueron convertidos a Newtons (N) para su interpretación y análisis (1 gf = 0.0098 N).

#### *Porcentaje de jugo*

En el porcentaje de jugo se utilizaron 100 g de fruta que se introdujeron a un mortero para retirar la semilla y obtener la pulpa de forma homogénea para estrujar la pulpa y conseguir la mayor cantidad de jugo, finalmente el jugo adquirido se vertió a un matraz de donde se tomó la lectura de la cantidad de jugo obtenido.

#### *Sólidos solubles*

Los sólidos solubles totales determinan la concentración de sacarosa por cada 100 mililitros y para determinar este parámetro se utilizó un refractómetro manual (marca Atago con intervalo de 0 a 30 °Brix) y según lo indicado por la Norma Mexicana NMX-FF-015-1982 consistió en agregar de dos a tres gotas de pulpa para colocar en el prisma del refractómetro y tomar la lectura directamente.

#### *pH*

Se tomó lectura directamente del potenciómetro (marca Oaklon previamente calibrado con soluciones reguladoras de pH 4 y pH) en donde se midió la muestra

(jugo proveniente de 10 g de frutos frescos), como lo indica la Norma Mexicana NMX-F-317-S-1978.

#### *Acidez titulable*

Para la determinación de acidez titulable se pesó 1 g de la pulpa y se diluyó con 10 mL de agua destilada, y se adicionaron 3 gotas de solución de fenofaleína al 1 %, posteriormente se tituló con NaOH al 0.1 N hasta obtener un color ligeramente rosado persistente por 30 segundos, lo anterior basado en la Norma Mexicana NMX-FF-011-1982, los mL gastados de la solución tituladora se sometieron a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = \frac{(100)(N)(v)}{m}$$

Dónde:

v = volumen en centímetros cúbicos de la solución de NaOH gastada en la determinación.

N = normalidad de la solución de NaOH.

m = masa en gramos de la muestra.

Finalmente se multiplico la acidez por la constante del ácido cítrico (0.064) para obtener la acidez titulable.

#### *Humedad*

Según lo indicado por la Norma Mexicana NMX-F-O83-S, la humedad se determinó pesando una cantidad (10 g) de muestra molida y homogenizada de la parte comestible del fruto del mamuyo y posteriormente las capsulas se colocaron en el horno de aire forzado a una temperatura de 90 °C durante 75 minutos.

Después se transfirió la capsula a un desecador donde se dejó enfriar durante 30 minutos y finalmente se pesó para aplicar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(100)(m)}{n}$$

Dónde:

m = peso de la muestra seca

n = peso de la muestra húmeda

Con esto y por diferencia de peso pudimos calcular la cantidad de materia seca que se encuentra en la parte comestible del fruto.

### *Ceniza*

Para la determinación de ceniza se siguió el protocolo que señala la Norma Mexicana NMX-F-066-S, la cual indica utilizar un crisol a peso constante y agregar 2 g de muestra sin humedad para analizarla, posteriormente colocamos el crisol con la muestra en una parrilla y hasta quemarla lentamente hasta que ya no desprenda humo.

Después se llevó el crisol a una mufla en donde se sometió a una temperatura de 600 °C durante 3 horas para efectuar la calcinación completamente, posteriormente se dejó enfriar en la mufla para transferir la muestra al desecador para su completo enfriamiento y registrar el peso del crisol con cenizas, la cantidad de ceniza se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ceniza} = \frac{(100)(\tilde{n} - n)}{m}$$

Dónde:

$\tilde{n}$  = peso del crisol con las cenizas

n = peso de crisol vacío

m = peso de la muestra

### *Extracto etéreo*

Para la determinación de extracto etéreo o grasa bruta se utilizó 1 g de muestra cubierta con un papel filtro, para colocarlo en un dedal de celulosa y posteriormente se insertó en el aparato de Soxhlet. En la parte inferior se ajustó un matraz con 200 mL de n-hexano (para calentarse a 100 – 110 °C) y se agregó refrigerante para condensar los vapores del n-hexano, después de que se calentó se regulo la temperatura de la parrilla para obtener 1 gota por segundo.

La extracción se efectuó durante 4 horas para posteriormente quitar el matraz y retirar la muestra del dedal, para finalizar se evaporo el n-hexano del matraz hasta obtener un peso constante y se pesó la muestra. Se realizaron los cálculos correspondientes para la determinación de grasa como lo indica el protocolo de la Norma Mexicana NMX-F-089-S-1978 y la formula fue la siguiente:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{(100)(\tilde{n} - n)}{m}$$

Dónde:

$\tilde{n}$  = peso del matraz con grasa

n = peso del matraz sin grasa

m = peso de la muestra

### *Proteína*

Para la determinación de proteína se utilizó un Kjendhal automatizado, en donde se utilizaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado como digestor y una vez terminado el proceso de reacciones se agregaron 5 gotas de solución de tinción y titular se tituló con ácido sulfúrico al 0.5 N (viraje de color de verde al rojo), registrando la cantidad de mililitros gastados. Finalmente se empleó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de nitrógeno total en la muestra.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(V_2 - V_1) (N)(0.014) (100)}{M}$$

Dónde:

$V_2$  = volumen del ácido sulfúrico gastados en la muestra

$V_1$  = volumen del ácido sulfúrico gastados en el blanco

N = normalidad de la solución de ácido sulfúrico

M = masa de la muestra en gramos

Una vez con el porcentaje de nitrógeno se determinó la cantidad de proteína multiplicando el nitrógeno total por el factor indicado en la correlación producto-factor.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ de Nitrgeno} \times \text{Factor (6.25)}$$

### *Calorías*

En la determinación de calorías se empleo un calorímetro marca Dartz z400 con base en los principios de transferencia de calor de los cuerpos cuando están en contacto, para lo cual la muestra deshidratada se dejó 5 minutos en agitación, después de este tiempo se capturaron datos de 30 en 30 segundos durante 5 minutos, posteriormente se inicio la ignición y se siguió capturando los datos, esto en conteos de 10 en 10 segundo por 5 minutos pasado este tiempo se retomó la lectura de 30 en 30 segundos durante otros 5 minutos. Posteriormente se emplearon los datos para el cálculo de la curva de combustión mediante la siguiente ecuación:

$$t = t_c - t_a - r_1 (b - a) - r_2 (c - b)$$

Dónde:

a = tiempo de inicio de ignición (cocción)

b = tiempo (al 0,1 min.) cuando la temperatura alcanza 60 % del aumento total

c = tiempo al inicio del periodo constante

ta = temperatura en el momento de ignición (temperatura en "a")

tc = temperatura en el tiempo de "c"

r1 = tasa en aumento durante los 5 minutos, período antes de ignición

r2 = tasa en aumento durante los 5 minutos, después del periodo de cocción

En donde el valor de b es:

$$b = y + [(y_1 - y) / (x_1 - x)] (tb - x)$$

Dónde:

tb = temperatura alcanzada en el 60 % total del incremento

$$tb = (0.6(tc - ta)) + ta$$

y = tiempo anterior al tiempo de tb

y1 = tiempo posterior al tiempo de tb

x = temperatura anterior a tb

x1 = temperatura posterior a tb

Y finalmente se emplea la siguiente igualdad para el para el cálculo del calor total de combustión (Hg):

$$Hg = (t W - e_1 - e_2 - e_3) / M = \text{Calorías/g}$$

Dónde:

t = incremento de la temperatura en °C

W = energía equivalente del calorímetro (Calorías/°C)

M = masa de la muestra en gramos

$e_3$  = corrección en calorías de calor de combustión (níquel cromo 45C10)

$c_3$  = centímetros de alambre fusible que se consume durante ignición

### *Vitamina C*

La determinación de vitamina C se efectuó con ayuda de una solución indicadora (0.105 g de  $\text{NaHCO}_3$  en 50 mL de agua destilada, a la cual se adiciono 2-6 diclorofenol-indofenol) y la una solución extractora (ácido metafosfórico disuelto en ácido acético glacial), las cuales en ausencia de luz a la muestra centrifugada se titulo hasta tener un viraje de color rosa. Los cálculos se llevaron a cabo con la siguiente fórmula:

$$\text{mg de vitamina C} = (X - B) \left( \frac{E}{F} \right) \left( \frac{V}{\bar{Y}} \right)$$

Dónde:

X = mL de solución de 2-6 diclorofenol-indofenol gastados por muestra

B = mL de solución de 2-6 diclorofenol-indofenol extractora

F = mg de ácido ascórbico equivalente a 1 mL

E = peso de muestra indicada

V = volumen indicado de muestra ensayada

### 5.11 Análisis estadísticos

Para la actividad antimicrobiana tanto en la fase *in vitro* como en invernadero se buscó encontrar la mayor inhibición representada con el control positivo de los antibióticos y antifúngicos utilizados y con los datos obtenidos se aplicó un análisis estadístico paramétrico que tiene como formula el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = valor del halo de inhibición en cada observación

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto del factor A (microorganismo)

$\beta_j$  = efecto del factor B (extracto utilizado)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = efecto de la interacción de los dos factores

$\epsilon_{ij}$  = efecto de error aleatorio

El análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos evaluados se realizó mediante la elaboración de histogramas de frecuencias distribuidos en sus respectivas categorías, de tal forma se pudo conocer de manera general el comportamiento de la población dentro de los distintos parámetros con la ayuda de la muestra representativa analizada. La determinación del número de categorías se llevó a cabo con la ecuación de Sturges que es:

$$K = 1 + 3.322(\log_{10}(n))$$

Dónde:

$K$  = número de categorías

$n$  = tamaño de la población o muestra

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Colecta del material vegetal

Carranza (1993) y Fritsch (1997) identificaron a *Styrax ramirezii* en Michoacán en las zonas elevadas del noreste del estado, en este trabajo se localizó en la comunidad de Señaladero municipio de Hidalgo (Tabla 6), lugar en donde según Guerrero (2013) se identificó y corroboró la identidad de las muestra de *Styrax ramirezii* con las muestras del herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, por el botánico Dr. Sergio Zamudio Ruiz.

Tabla 6. Ubicación del sitio de colecta

|           |                  |
|-----------|------------------|
| Municipio | Hidalgo          |
| Localidad | Señaladero       |
| Altitud   | 2519 m.s.n.m.    |
| Latitud   | N 19° 36´ 21´´   |
| Longitud  | W 100° 38´ 33.7´ |

Las plantas de *Styrax ramirezii* localizadas en la comunidad de señaladero, son comunes y se encuentran en un área del bosque muy segmentada por el cambio de uso de suelo, la extensión del área en que se encuentran es amplia (aproximadamente 40 ha). Entre sus principales características se cuenta con que el fruto no es completamente esférico al madurar y tiene pubescencia como lo menciona Carranza (1993).

Por otro lado y contrario a los reportes (Carranza, 1993) la etapa de floración y fructificación del ciclo 2014-2015 no coincidió, es decir, la floración se registró en los meses de agosto a diciembre y la fructificación de diciembre a abril. Además en el ciclo 2015-2016 se observó una disminución en cuanto a la floración y su respectiva cantidad de frutos, lo cual puede indicar la presencia del fenómeno de alternancia, lo cual crea una nueva línea de investigación del mamuyo y sus interacciones con los factores bióticos y abióticos del ecosistema donde se encuentra.

## 6.2 Extractos crudos (EC)

La inhibición de los extractos crudos contra los microorganismos utilizados registró en forma general diferencia mínima significativa ( $p < 0.05$ ), tal es el caso al comparar el efecto inhibitorio de los tres tejido vegetales utilizados (Figura 8), siendo los extractos de hoja quienes tuvieron mayor (52.3 %) inhibición en el promedio general en comparación con los extractos de tallo (42.0 %) y hoja (22.1 %), resultados que pueden indicar la diferencia de compuestos en los tejidos, esto último coincide con los registros de Tayoub y col.(2006) quienes indican que las hojas de *Styrax officinalis* tiene mayor compuestos volátiles que tallo y raíz independientemente de la etapa fenológica. Por otro lado, una posible explicación acerca de la poca inhibición del fruto en comparación a los otros tejidos es la presencia de antioxidantes de naturaleza polifenólica (Timmers y col., 2015), es decir, probablemente el fruto es comestible por la poca presencia de compuestos terpenoides (efecto inhibitorio) y la mayor presencia de polifenoles (efecto antioxidante).

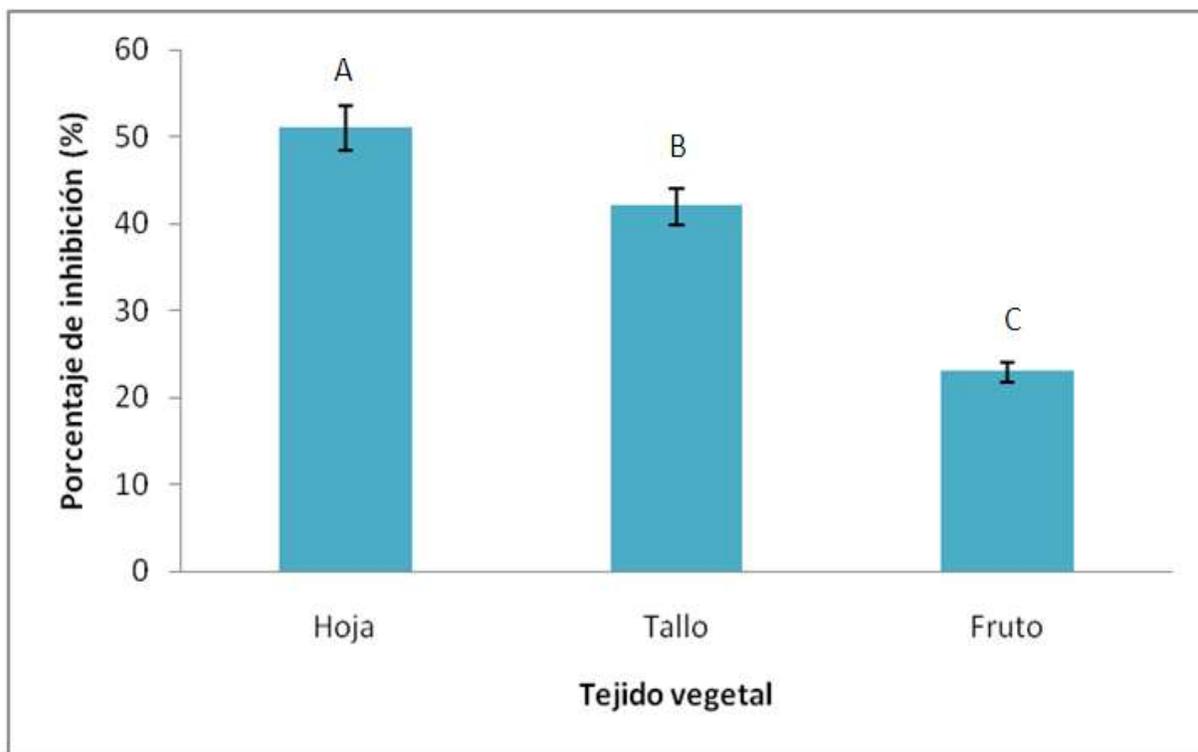


Figura 8. Porcentajes de inhibición registrados por hoja, tallo y fruto de *S. ramirezii*.

En el caso del efecto inhibitorio de los extractos en función del solvente utilizado (Figura 9) también se obtuvo diferencia mínima significativa ( $p < 0.05$ ) siendo los extractos n-hexánicos los que registraron mayores valores de inhibición con un promedio general de 47.8 % en comparación con el 23.5 % registrados con los extractos de cloroformo, resultados que se pueden atribuir según Breitmaier (2006) a que con solventes no polares se extraen compuestos volátiles (ej. pineno, limoneno etc.), los cuales se ha demostrado tienen mayor efecto inhibitorio en comparación a los compuestos extraídos con un solvente medianamente polar como lo es el cloroformo, con el cual se extraen compuestos de mayor peso molecular (ej. diterpenos, triterpenos etc) con menor inhibición que los volátiles, con lo anterior se puede deducir que la mayor inhibición en todos los bioensayos (*in vitro* e *in situ*) se obtuvieron con los extractos n-hexánicos.

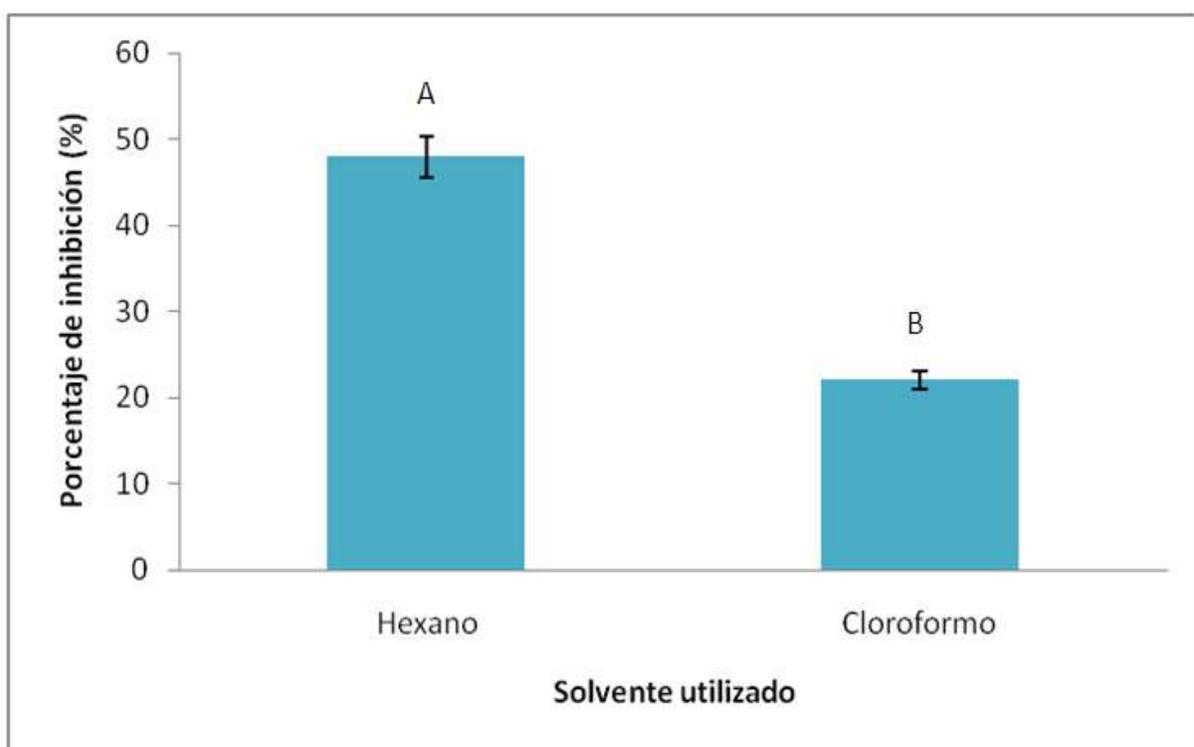


Figura 9. Porcentajes de inhibición registrados por los extractos crudos extraídos por n-hexano y cloroformo.

Por otro lado, el método de extracción en el que se obtuvieron los valores promedios en general más altos de inhibición fue la maceración (43.2 %), mientras que el sistema soxhlet fue en términos generales donde se registraron los valores de inhibición más bajos (27.9 %) (Figura 10), resultados que se pueden atribuir según nuevamente Breitmaier (2006) a que la temperatura afecta a los compuestos volátiles, es decir, en el sistema soxhlet en donde se emplea la temperatura para la extracción se pudieron degradar o volatilizar los compuestos susceptibles a temperaturas mayores de 50 °C, quedando sólo compuestos de naturaleza lipídica de mayor peso molecular, con lo cual el extracto crudo no tenía compuestos inhibitorios, en contra parte la maceración en donde se mantuvieron los extractos a 4 °C conservó los compuestos volátiles a los cuales se les atribuye efecto inhibitorio que se registró en los bioensayos. La diferencia cualitativa en la composición de los extractos en función de los métodos de extracción se muestra en el apartado de resultados de la cromatografía de gases.

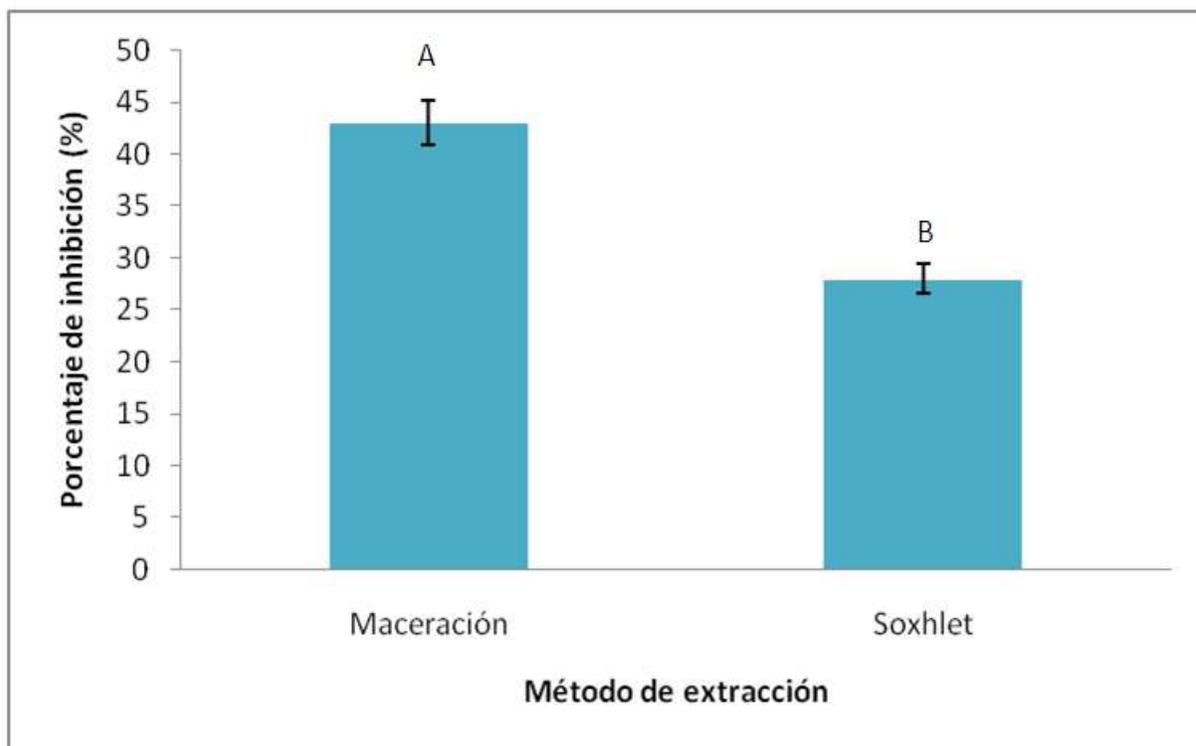


Figura 10. Porcentajes de inhibición registrados por los extractos crudos extraídos por el método de maceración y el sistema soxhlet.

### 6.3 Bioensayos con microorganismos *in vitro*

En este apartado se muestran las figuras que muestran el porcentaje de inhibición contra los distintos fitopatógenos más destacadas de los bioensayos (aislado de aguacate 26 y 34 con extractos n-hexánicos de hoja macerada), en la sección de Anexos se muestran las figuras y cuadros restantes.

#### 6.3.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos crudos de los distintos tejidos vegetales contra el aislado de aguacate 26 (AA26) (Figura 11) fue en términos generales la de mayores resultados, ya que el extracto de hoja macerada con n-hexano registró el 94.1 % de inhibición respecto al control positivo, lo cual indica que estadísticamente es lo mismo utilizar Gentamicina 10 µg/mL (control positivo) que 400 µg/mL de extracto de hoja de mamuyo.

Además los registros indican que el tejido vegetal con mayores valores de inhibición es la hoja (94.1, 68.1 y 55.3 % a concentraciones de 400, 600 y 800 µg/mL respectivamente) en comparación de tallo y fruto, pero los tres tejidos vegetales muestran tendencia de que su mayor inhibición se registra en concentraciones de 400 µg/mL y disminuye al aumentarse. En contraparte los valores de la inhibición de los extractos crudos de fruto se mantuvieron cercanos al 40 % lo cual puede ser probable de que los compuestos en el fruto son estables y/o existe saturación en el medio a concentraciones mayores de 400 µg/mL.

Por todo lo anterior y debido a que estos resultados demuestran la susceptibilidad del AA26 contra los extractos n-hexánicos de hoja macerada se eligió para ser evaluado con las distintas fracciones y el bioensayo *in situ* en el invernadero inoculado en calabacita y pepino

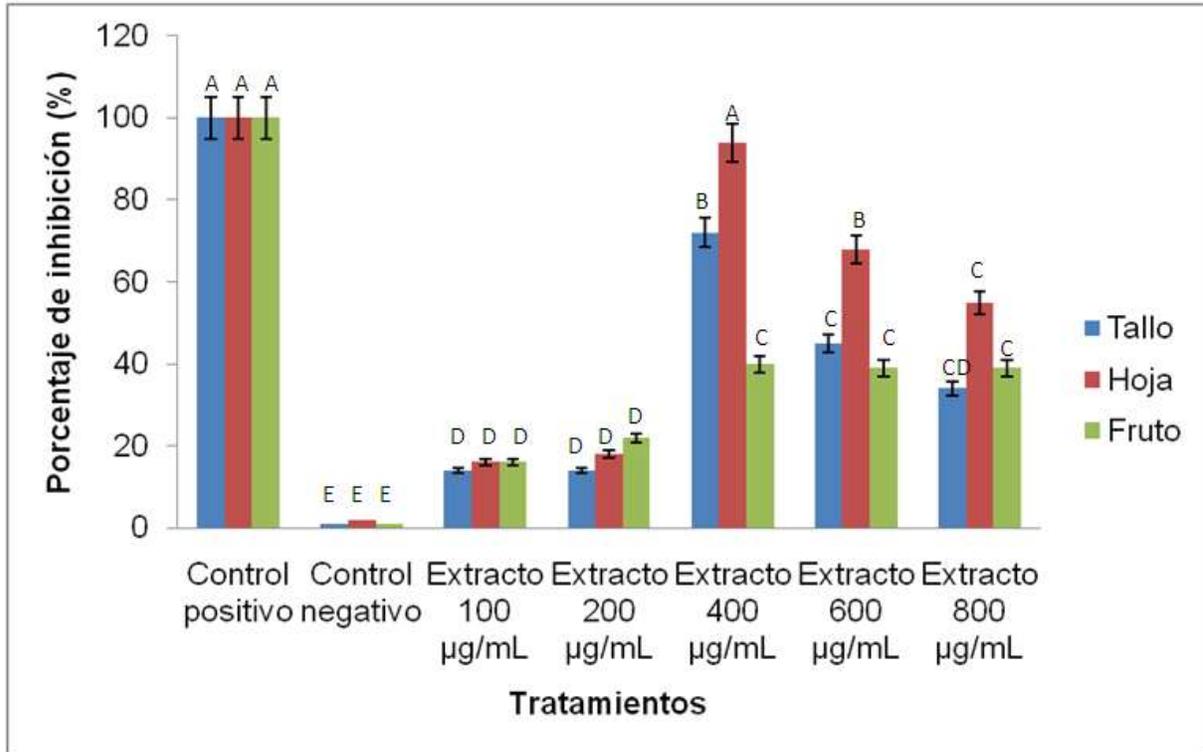


Figura 11. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de aguacate 26 (AA26) (Control positivo = gentamicina 10 µg/mL; Control negativo = sin antibiótico; Extracto 100, 200, 400, 600 y 800 = 100, 200, 400, 600 y 800 µg/mL de extracto crudo de hoja, tallo y fruto respectivamente).

En la Figura 12 se muestra de manera de ejemplo las placas de los diferentes tratamientos con los extractos contra el AA26.

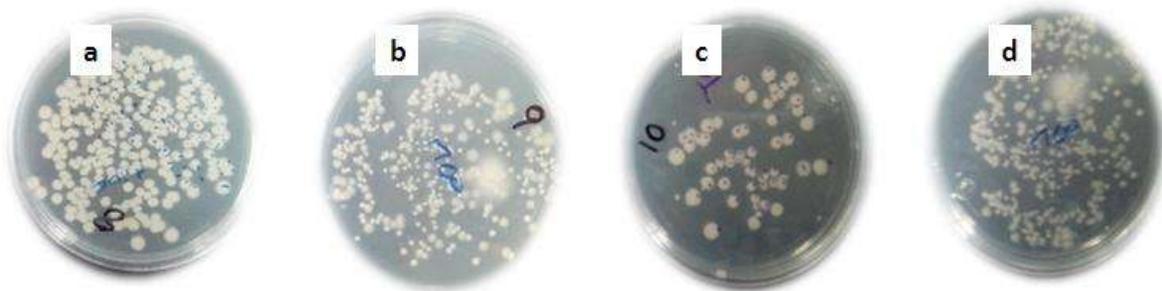


Figura 12. Inhibición del aislado de aguacate 26 a causa de los extractos n-hexánicos de hoja macerada de *S. ramirezii*. a: extracto a 100 µg/mL; b: extracto a 200 µg/mL; c: extracto a 400 µg/mL y d: extracto a 600 µg/mL.

En el caso del aislado de aguacate 34 (AA34) (Figura 13) la tendencia en cuanto a la inhibición de los extractos fue similar al AA26, pero con la diferencia que en AA34 se registraron valores de porcentaje menores, siendo nuevamente el extracto n-hexánico de hoja macerada a una concentración de 400 µg/mL quien presento 84.2 % de inhibición, valor que nos indica que en este extracto se tienen compuestos con actividad antibacteriana, propiedad similar a la reportada por Bertanha y col. (2013) quienes estudiaron extractos n-hexánicos de hoja de *Styrax pohlii* contra algunos patógenos de humanos (ej. *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* etc.) y observaron respuesta inhibitoria a concentraciones de 200 µg/mL de extracto, (atribuido a compuestos identificados como egonol y homoe gonol), por otro lado, Mendonça y col. (2000) también reportan propiedades antibacteriales en extractos de hojas de *Styrax ferrugineus* atribuidos a nor-lignanós en concentraciones de 100 µg/mL.

Con todo lo anterior y con base en los resultados registrados en esta investigación se puede atribuir a *Styrax ramirezii* la actividad antibacteriana de sus compuestos presentes en hoja, lo cual genera una nueva alternativa de control de microorganismo diferente a las típicas medidas de control químico existentes.

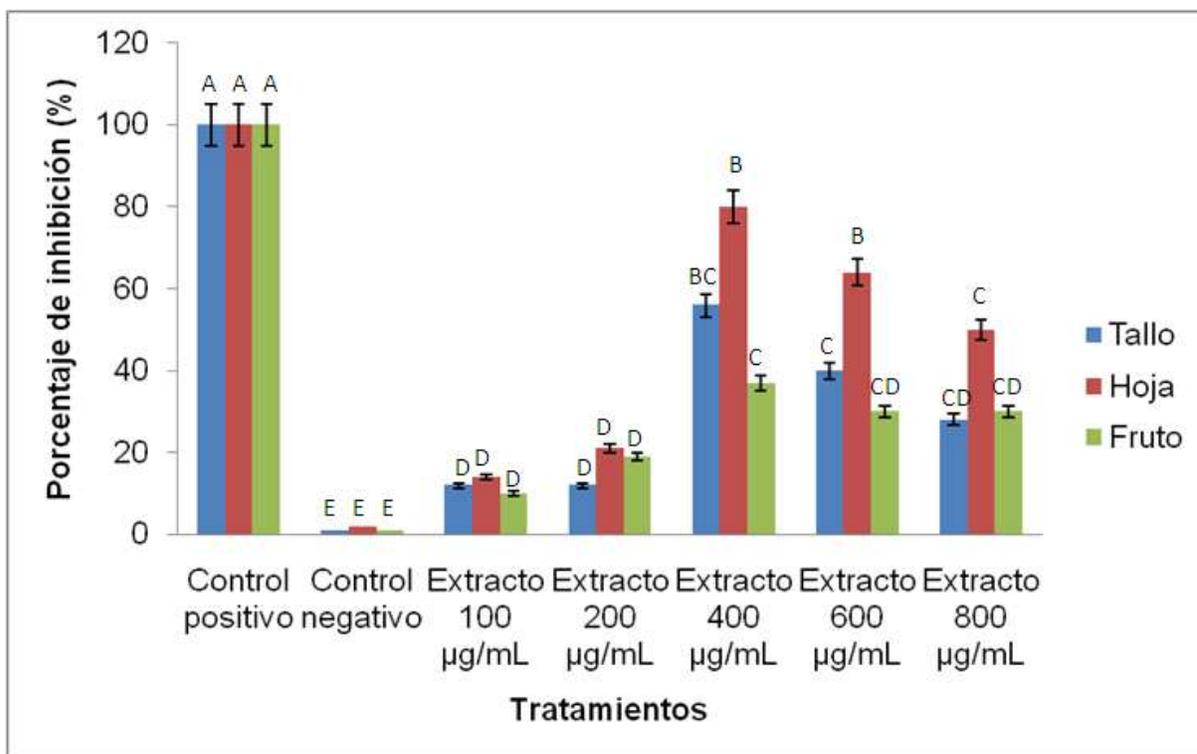


Figura 13. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de aguacate 34 (AA34) (Control positivo = Trimetoprima y Sulfametoxazol 8 mg - 40 mg/mL; Control negativo = sin antibiótico; Extracto 100, 200, 400, 600 y 800 = 100, 200, 400, 600 y 800 µg/mL de extracto crudo de hoja, tallo y fruto respectivamente).

### 6.3.2 Actividad antifúngica

Al igual que en la actividad antibacteriana en esta sección se muestran los bioensayos más destacados por su mayor porcentaje de inhibición, es decir, las pruebas con extractos n-hexánicos de hoja macerada sobre los tres aislados de *Armillaria* spp. (ZC4, ZC5 y SJN), nuevamente en la sección de anexos se encuentran las figuras y cuadros restantes.

Para el caso del efecto inhibitorio de los extractos crudos sobre el aislado de *Armillaria* sp. ZC4 se tuvo que existió diferencia mínima significativa ( $p < 0.05$ ), siendo con el 59.1 % de inhibición el extracto de hoja a concentración de 3200 µg/mL el que obtuvo el valor más alto (exceptuando al control positivo), además en la Figura 14 se observa la tendencia que a mayor concentración del extracto no se relaciona con una mayor inhibición, efecto que se ejemplifica con los extractos de

fruto, los cuales a 400  $\mu\text{g/mL}$  se registró el 24 % de inhibición mientras que a 4000  $\mu\text{g/mL}$  (10 veces mayor en relación con la anterior) se obtuvo el mismo 24 %, por otro lado, la mayoría de los extractos en concentraciones entre 400  $\mu\text{g/mL}$  y 4000  $\mu\text{g/mL}$  (con excepción del extracto de hoja a 3200 y 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) pertenecen a un grupo estadístico en particular (grupo "D"), lo cual indica que su efecto no hay diferencia estadística, es decir, tenemos el mismo efecto inhibitorio.

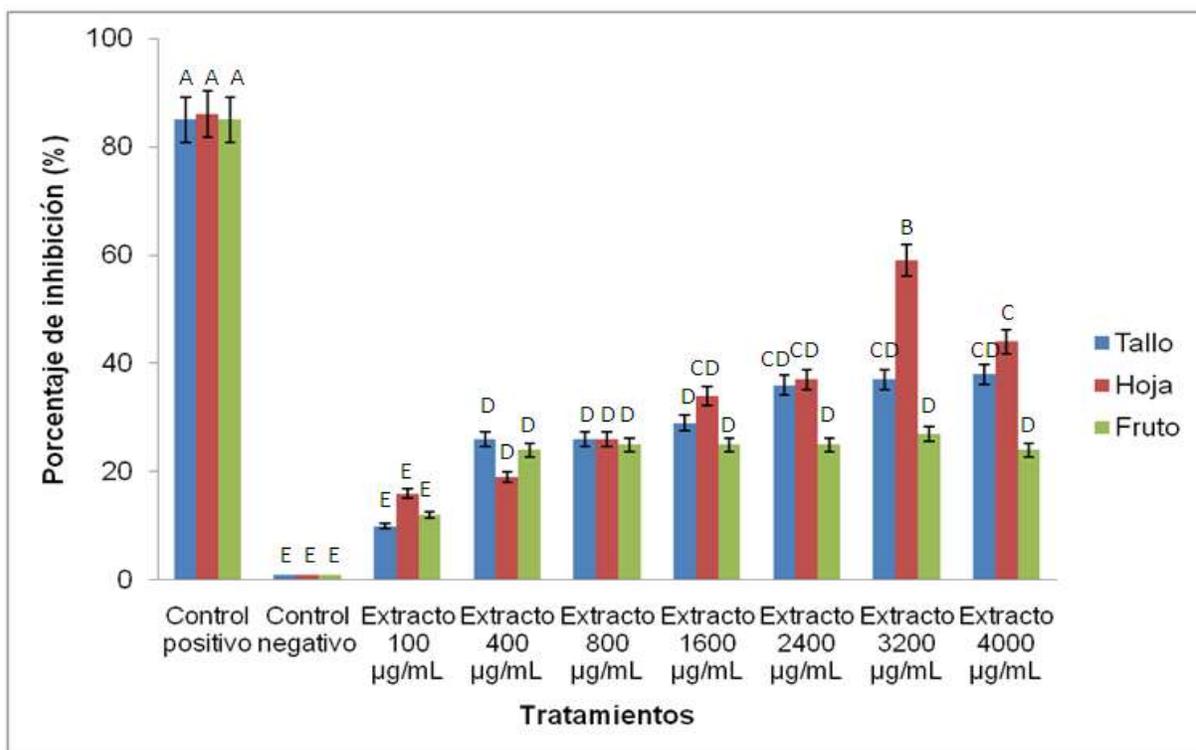


Figura 14. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de *Armillaria* sp. ZC4 (Control positivo = ciproconazol 2 mg/mL; Control negativo = sin fungicida; Extracto 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000 = 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto crudo de hoja, tallo y fruto respectivamente).

En el caso del aislado de *Armillaria* sp. ZC5 se registraron valores y tendencia de inhibición muy similares al descrito anteriormente (ZC4), lo cual se puede interpretar como un efecto-respuesta reproducible; en la Figura 15 se muestran los porcentajes de inhibición por el efecto de los tratamientos (combinaciones entre tallo, hoja y fruto con las diferentes concentraciones utilizadas) sobre *Armillaria* sp. ZC5, en donde el extracto de hoja (3200  $\mu\text{g/mL}$ ) registró el 57 % de inhibición con

respecto al control negativo (1 %), lo cual en comparación con el control positivo (85 %) que es con el fungicida comercial (Alto 100 SL de Syngenta) representa una opción para el combate de *Armillaria* sp. ZC5, ya que a diferencia del control típico, el extracto es de naturaleza biodegradable lo cual es un aporte importante en la lucha de la conservación del ecosistema y la salud de los trabajadores que aplican los productos.

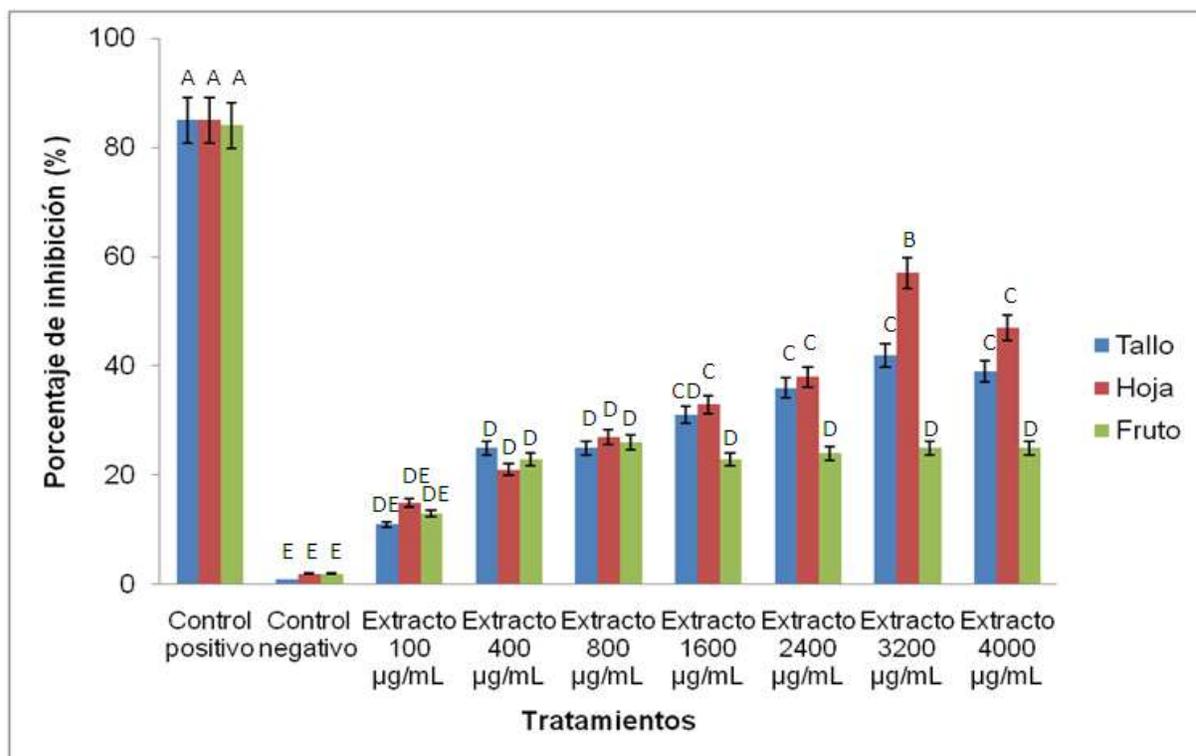


Figura 15. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de *Armillaria* sp. ZC5 (Control positivo = ciproconazol 2 mg/mL; Control negativo = sin fungicida; Extracto 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000 = 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000 µg/mL de extracto crudo de hoja, tallo y fruto respectivamente).

Por último, la inhibición del aislado de *Armillaria* sp. SJN fue la que presentó mayores porcentajes de inhibición (hasta 68 %) en comparación de los aislados ZC4 y ZC5, siendo nuevamente el extracto de hoja (3200 µg/mL) quien supero a los otros, además, en la Figura 16 se muestra como a partir de concentraciones de 1600 µg/mL se tienen valores cercanos al 40 % y aunque los valores en términos generales encuentran su valor máximo en los 3200 µg/mL decrecen al ser

aumentados a 4200  $\mu\text{g/mL}$ , lo que indica la posibilidad de saturación del medio por el aumento de concentración del extracto.

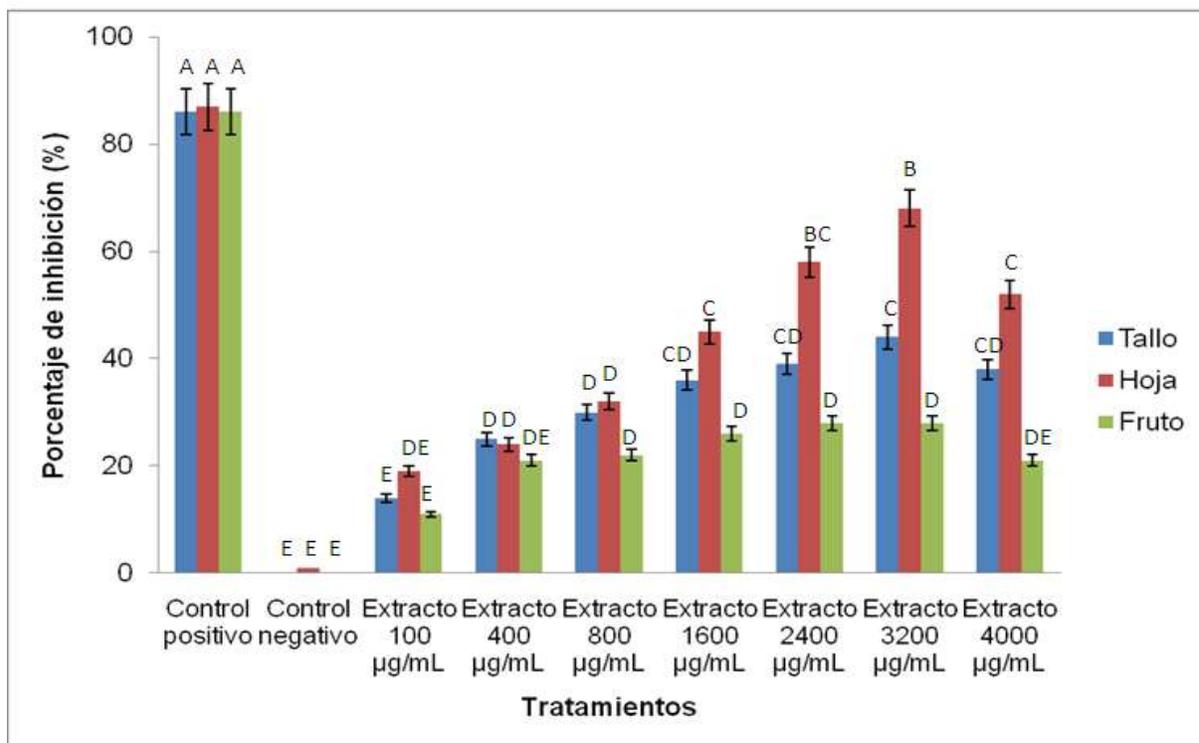


Figura 16. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos obtenidos con n-hexano por maceración contra el aislado de *Armillaria* sp. SJN (Control positivo = ciproconazol 2 mg/mL; Control negativo = sin fungicida; Extracto 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000 = 100, 400, 800, 1600, 2400, 3200 y 4000  $\mu\text{g/mL}$  de extracto crudo de hoja, tallo y fruto respectivamente).

Con los resultados de los tres aislados de *Armillaria* spp. (ZC4, ZC5 y SJN) (Figura 17) se puede atribuir a que los extractos de *Styrax ramirezii* (en específico los n-hexánicos de hoja macerada) tienen compuestos que le confieren actividad antifúngica, propiedad similar a la reportada por Mendonça y col. (2000) quienes se la atribuyen a extractos de *Styrax ferrugineus*, ya que tuvieron inhibición contra hongo como *Candida albicans* y *Candida sphaerospermum* a concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  de nor-lignanós presentes en las hojas, por otro lado Harikrishnan y col. (2011) reportan efecto inhibitorio en extractos de *Styrax japonica* en especies del género *Candida* spp. Por lo tanto y con base en los antecedentes se puede

atribuir que los extractos del mamuyo tienen en diferente grado y proporción inhibición contra hongos según sea el género y especie a la que pertenezcan.

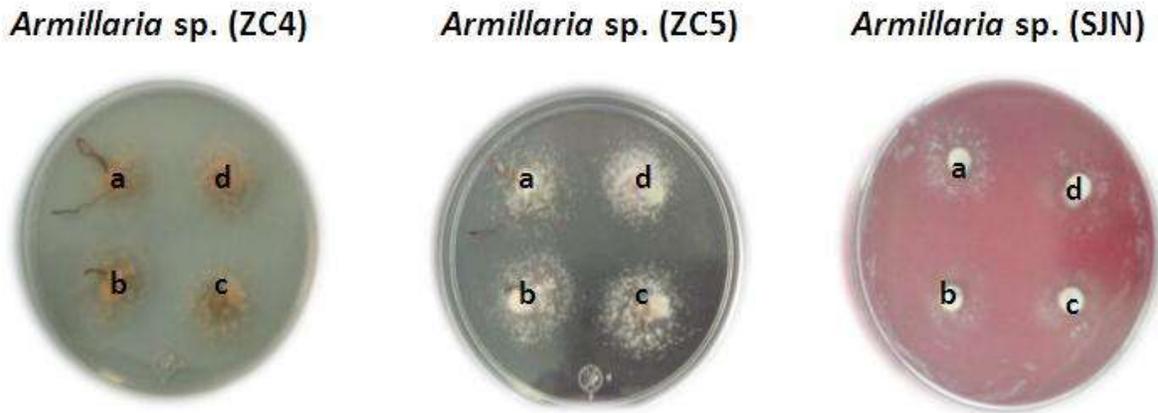


Figura 17. Inhibición de los tres aislados de *Armillaria* spp. (ZC4, ZC5 Y SJN) a causa de los extractos n-hexánicos de hoja macerada de *S. ramirezii*. a: extractos a 1600 µg/mL; b: extracto a 2400 µg/mL; c: extracto a 3200 µg/mL y d: extracto a 4000 µg/mL.

#### 6.4 Bioensayos con microorganismos en invernadero

Como se describió en materiales y métodos, los bioensayos *in situ* (en invernadero) demostraron de forma general que el aislado de aguacate 26 (AA26) presenta patogenicidad cruzada, es decir, aunque en principio fue aislado de semillas de aguacate no es patógeno exclusivo, ya que tanto en la calabacita como en el pepino se expresaron síntomas a causa de este microorganismo, con lo cual y aunque no fue el objetivo saber qué tipo de patógeno era AA26 se demuestra que no es un fitopatógeno exclusivo de un solo género o especie de planta.

##### 6.4.1 Actividad antibacteriana

En el bioensayo en calabacita se registraron valores de inhibición de AA26 a 400 µg/mL de extracto n-hexánico de hoja macerada de 52 % (Figura 18), valor inferior al registrado en el experimento *in vitro* (94 %), esto pudo deberse a que en un invernadero interactúan varios factores (ej. temperatura del ambiente, humedad relativa, evapotranspiración de la planta etc.) que posiblemente altere la eficiencia del extracto crudo o potencialicen y ayuden al crecimiento y desarrollo de la

enfermedad (en este caso AA26), además la tendencia en cuanto a la relación entre concentración del extracto y porcentaje de inhibición se comporto como en los bioensayos anteriores, es decir, a mayor concentración disminuye la inhibición.

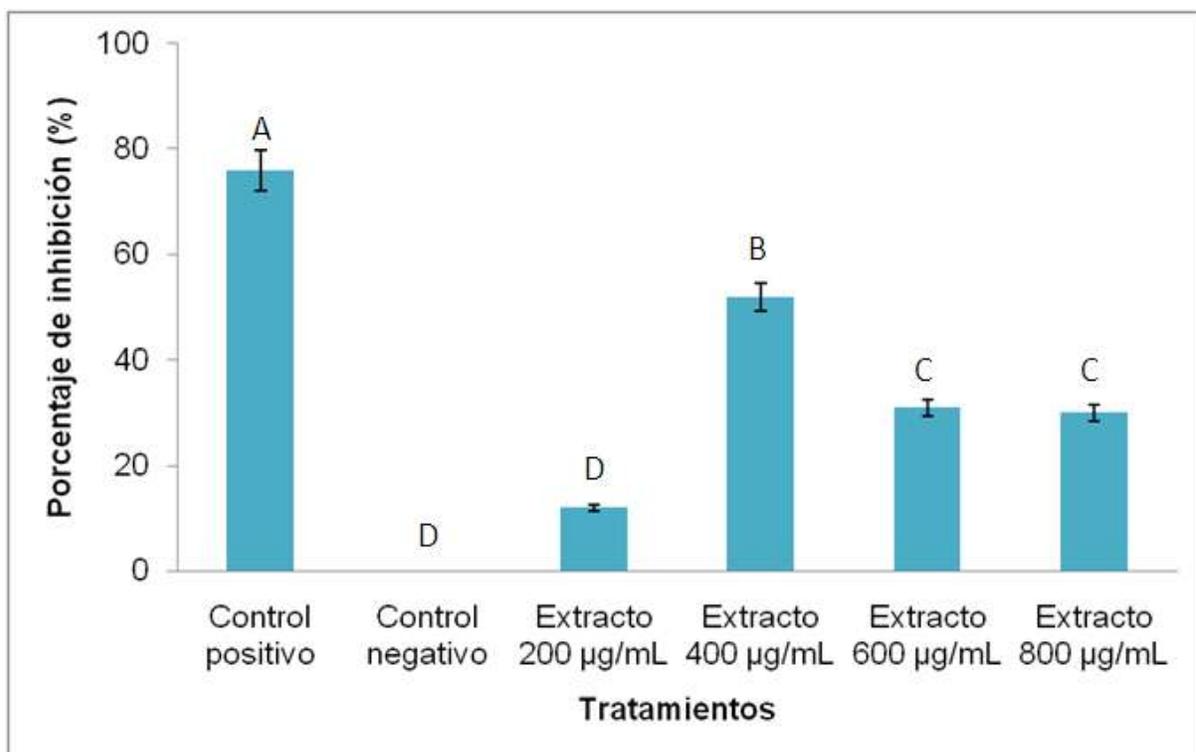


Figura 18. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos n-hexánicos de hoja macerada contra el aislado de aguacate 26 (AA26) en calabacita (Control positivo = gentamicina 10 µg/mL; Control negativo = sin antibiótico; Extracto 200, 400, 600 y 800 = 200, 400, 600 y 800 µg/mL de extracto crudo de hoja.

Sin embargo, el tener el 52 % de inhibición no es despreciable, ya que durante el desarrollo del cultivo únicamente se aplico el extracto crudo para el tratamiento de la enfermedad (AA26) y prevención de posibles microorganismo y/o insectos, debido a lo anterior se genera una alternativa de control menos agresiva con el ambiente y estos resultados propician a generar más información en experimentos *in situ* con los extractos crudos de mamuyo. En la Figura 19 se muestra de manera visual los diferentes grados de daño ocasionados por AA26 en calabaza.

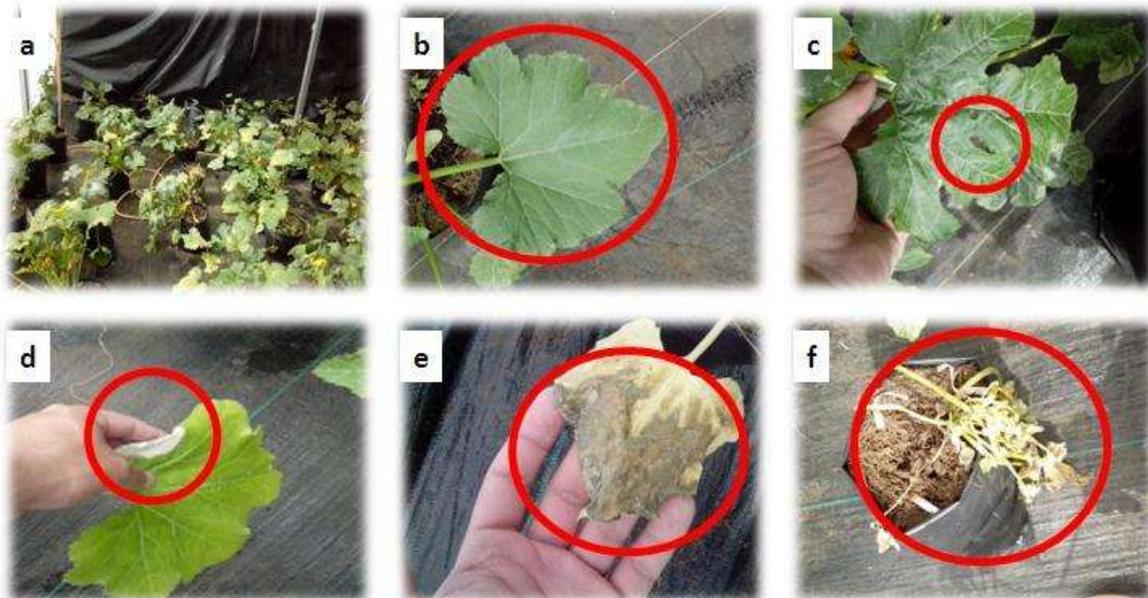


Figura 19. Grados de daño ocasionados por el aislado de aguacate 26 en calabacita. a: vista general de las plantas; b: hoja sin daño (control positivo); c: hoja con daño leve (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto); d: hoja con daño moderado (800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto); e: hoja con daño grave (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto) y f: planta muerta (control negativo).

En el caso del bioensayo en pepino se registró nuevamente el valor más alto (48 %) en la concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto crudo, además no existió diferencia estadística mínima en los extractos a 200, 600 y 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 20). Por otro lado y aunque no fue cuantificado rigurosamente se observó un acortamiento en el ciclo fenológico en las plantas inoculadas con AA26 y que no fueron tratadas (control negativo) ya que de 40 se redujo 31 días la floración y 54 a 45 días el inicio de la cosecha. La explicación a este fenómeno es posiblemente que al ser el AA26 patógeno de la semilla de aguacate, en otros cultivos como en este caso el pepino, propicia y acelera la formación de frutos para poder sobrevivir en sus semillas.

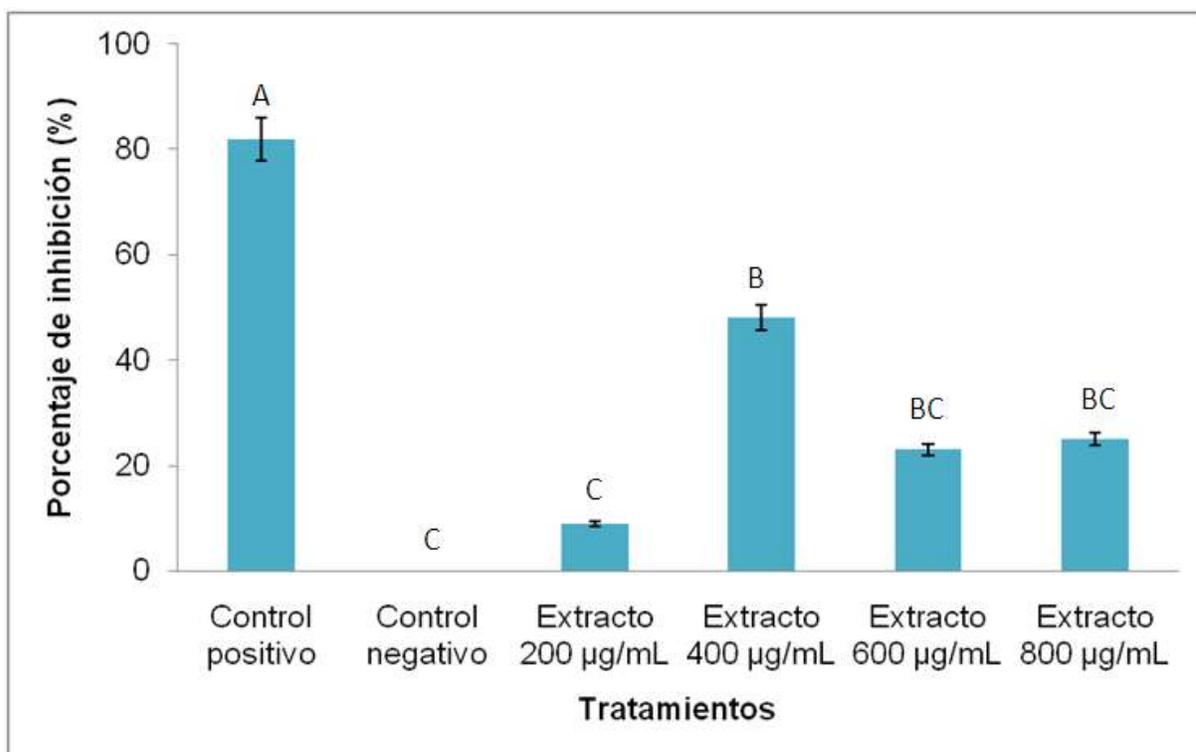


Figura 20. Porcentaje de inhibición de los extractos crudos n-hexánicos de hoja macerada contra el aislado de aguacate 26 (AA26) en pepino (Control positivo = gentamicina 10 µg/mL; Control negativo = sin antibiótico; Extracto 200, 400, 600 y 800 = 200, 400, 600 y 800 µg/mL de extracto crudo de hoja).

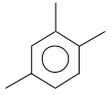
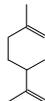
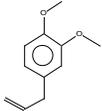
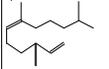
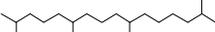
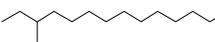
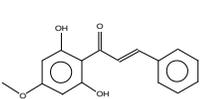
Los resultados de ambos bioensayos en invernadero demuestran la potencial aplicación de los extractos del mamuyo a nivel de campo, alentando de tal forma a continuar con esta línea de investigación orientada a resolver problemas agrícolas, lo cual es, al final de los experimentos lo que se busca en la mayoría de las investigaciones.

### 6.5 Identificación de compuestos

Al realizar el análisis por CG-EM (90 % de confiabilidad) de los extractos crudos de hojas de mamuyo se identificaron compuestos de naturaleza terpenoide (Tabla 7) que de acuerdo a lo reportado por varios autores tienen diversa actividad biológica, desde ser compuestos bactericidas y fungicidas hasta tener propiedades antiproliferativas contra diferentes tipos de células cancerígenas y tumorales en animales, con lo anterior se puede relacionar los resultados obtenidos en los

bioensayos *in vitro* e *in situ* con los compuestos terpenoides presentes en los extractos de hoja de *Styrax ramirezii*, esto al igual que los reportes de Bertanha y col. (2012) y Mendonça y col. (2000) quienes atribuyen propiedades antibacteriales y antifúngicas por los compuestos terpenoides en los extractos de hoja de *Styrax pohlii* y *Styrax ferrugineus* respectivamente.

Tabla 7. Compuestos presentes en los extractos n-hexánicos de hoja macerada de *Styrax ramirezii* y su bioactividad reportada

| Compuesto  | Estructura  | Actividad reportada      | Referencia                                       |
|--|---|--------------------------|--|
| $\beta$ -Pino                                    |    | Bactericida<br>Fungicida | Breitmaier (2006)<br>Bertanha y col. (2012)      |
| Pseudocumeno                                     |    | Fungicida                | Essam y Maytham (2012)<br>Tracanna y col. (2007) |
| D-Limoneno                                       |    | Bactericida<br>Fungicida | Bertanha y col. (2012)                           |
| cis-Ocimeno                                      |    | Insecticida              | Gebbinck (2002)                                  |
| Nonanal  |    | Antiestaminico           | Burt (2004)<br>Tracanna y col. (2007)            |
| Estragol   |   | Anticancerigeno          | Britmaier (2006)<br>Gonzalez (2014)              |
| Pulegon  |  | Bactericida              | Bertanha y col. (2012)                           |
| Methyleugenol                                    |  | Insecticida              | Gonzalez (2014)                                  |
| Germacreno D                                     |  | Bactericida<br>Fungicida | Tracanna y col. (2007)                           |
| Cardieno   |  | Bactericida              | Britmaier (2006)                                 |
| Heptadecano, 2,6,10,15-tetrametil-               |  | Antiproliferativo        | Siddiqui y col. (2012)                           |
| Pentadecanoicoácido, 13-metil-, metilester       |  | Antiproliferativo        | Siddiqui y col. (2012)                           |
| Octadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)               |  | Antiproliferativo        | Siddiqui y col. (2012)                           |
| 2-Propen-1-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-3-fenil |  | Antiproliferativo        | Siddiqui y col. (2012)                           |

## 6.6 Cuantificación de compuestos

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ayudo cuantificar los compuestos presentes en los extractos de hoja obtenidos por maceración y sistema soxhlet (ambos con n-hexano como solvente) mediante la integración del área bajo cada pico de los compuestos separados e identificados para expresados en porcentaje de muestra (% de área total de muestra), de tal manera la utilización conjunta de de CG-EM permitió aunar las cualidades de separación de la primera, con las propiedades analíticas de la segunda, para dar como resultado los cromatogramas (Figuras 21 y 22) de las muestras analizadas, en donde se observa la diferencia en la composición, en la muestra de hoja macerada se registraron mayor cantidad de picos en menos tiempo de retención, es decir, de compuestos volátiles en comparación con la muestra de hoja por soxhlet que tuvo mayor cantidad de compuestos no volátiles, de tal manera puede haber relación entre el grado de inhibición con el método de obtención de los extractos, ya que como se menciona con anterioridad, el sistema soxhlet emplea calor que puede degradar o volatilizar compuestos, mientras que la maceración (con mayor porcentajes generales de inhibición) se mantuvieron a 4 °C.

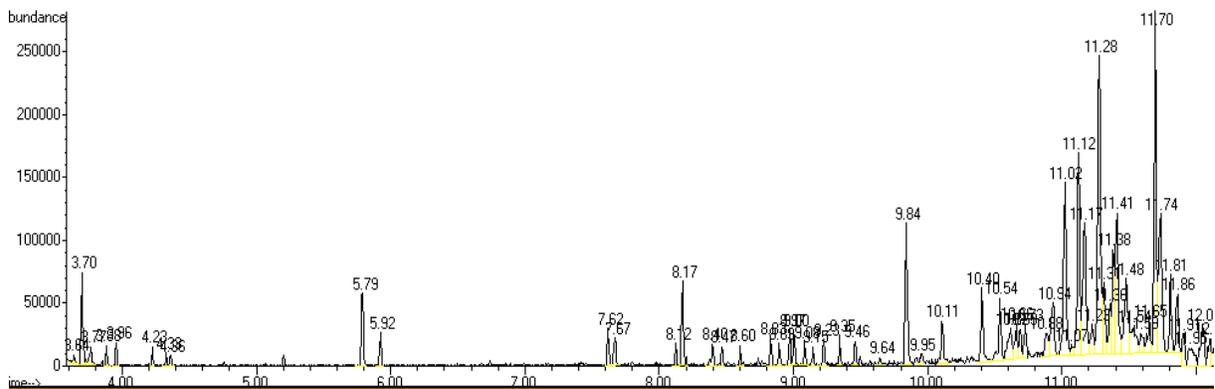


Figura 21. Cromatograma del extracto n-hexánico de hoja macerada de *Styrox ramirezii*.

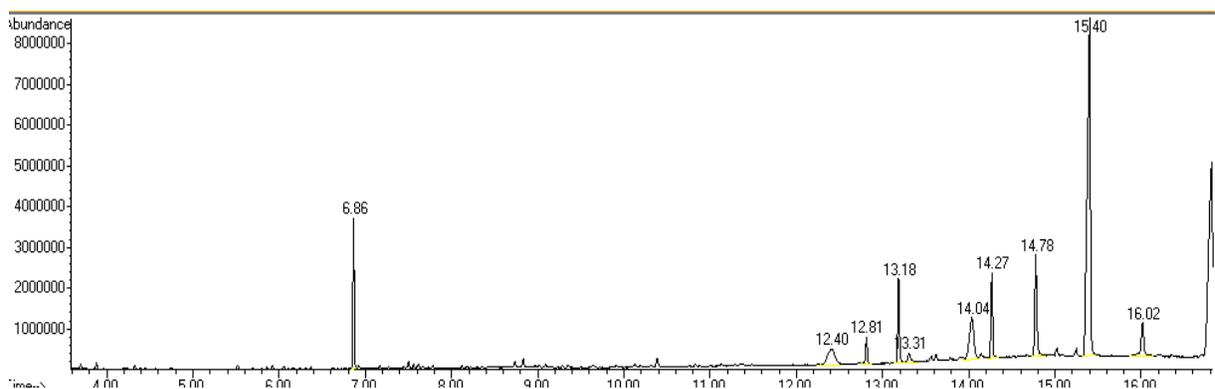
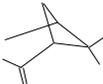
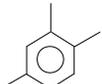
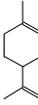
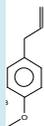
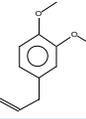
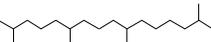
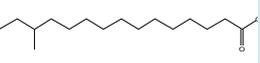
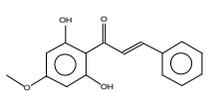


Figura 22. Cromatograma del extracto n-hexánico de hoja por soxhlet de *Styrox ramirezii*.

Entre los compuestos identificados y cuantificados se encuentran volátiles y/o terpenoides (Tabla 8), tal es el caso para la muestra de hoja macerada que registro  $\beta$ -pineno (11.31 % con un tiempo de retención de  $Tr = 3.88$ ), cis-ocimeno (8.13 %,  $Tr = 4.33$ ), estragol (9.37 %,  $Tr = 5.52$ ) entre otros, mientras que la muestra de hoja con el sistema soxhlet tuvo  $\beta$ -pineno (3.01 %,  $Tr = 3.88$ ) Pseudocumeno (2.49 %,  $Tr = 3.96$ ), D-limoneno (2.68 %,  $Tr = 4.23$ ) entre los compuestos volátiles, lo cual reafirma que el método de extracción afecta la composición y concentración de los extractos crudos independientemente que se utilice el mismo solvente y tejido vegetal como es en este caso.

Tabla 8. Composición porcentual de extractos hexánicos de hoja obtenidos por maceración y soxhlet de *Styrax ramirezii* ordenados por su tiempo de retención

| Tiempo de retención | Compuesto  | Estructura   | Porcentaje por maceración | Porcentaje por soxhlet |
|---------------------|--|--|---------------------------|------------------------|
| 3.88                | $\beta$ -Pineno                                  |     | 11.31                     | 3.01                   |
| 3.96                | Pseudocumeno                                     |     | 0.00                      | 2.49                   |
| 4.23                | D-Limoneno                                       |     | 0.00                      | 2.68                   |
| 4.33                | cis-Ocimeno                                      |     | 8.13                      | 2.14                   |
| 4.76                | Nonanal  |    | 0.00                      | 2.29                   |
| 5.52                | Estragol   |    | 9.37                      | 0.00                   |
| 5.85                | Pulegon  |   | 8.05                      | 0.00                   |
| 6.92                | Methyleugenol                                    |   | 10.87                     | 0.00                   |
| 7.56                | Germacrenp D                                     |   | 8.67                      | 0.00                   |
| 7.78                | Cardieno   |   | 10.07                     | 0.00                   |
| 8.83                | Heptadecano, 2,6,10,15-tetramethyl-              |  | 22.52                     | 0.00                   |
| 10.11               | Pentadecanoicoácido, 13-metil-, metilester       |  | 11.01                     | 18.73                  |
| 11.70               | Octadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)-              |   | 0.00                      | 24.32                  |
| 13.02               | 2-Propen-1-(2,6-dihidroxi-4-metoxifenil)-3-fenil |  | 0.00                      | 44.34                  |

## 6.7 Fraccionamiento de los extractos crudos

Tal como se describió en el capítulo de materiales y métodos, se separaron 5 fracciones atendiendo a diferentes proporciones de la mezcla entre n-hexano y cloroformo por medio de cromatografía en columna, estas fracciones fueron únicamente evaluadas para determinar el efecto inhibitorio contra el aislado de aguacate 26 (AA26) y según los resultados registrados el efecto fue estadísticamente igual para las 5 fracciones probadas (Figura 23), siendo la mezcla de hexano y cloroformo 5:0 v/v quien obtuvo mayor inhibición (15 %) por el contrario de la mezcla 4:1 v/v (7 %), con estos resultados y los presentados en secciones anteriores se puede intuir la existencia de sinergismo entre los componentes de los extractos, es decir, una vez fraccionado el extracto de hoja pierde efecto inhibitorio en comparación a la interacción de las fracciones cuando interactuaban juntas en el extracto crudo. Lo anterior que desde un punto de vista de aplicación comercial a futuro, no es limitante, debido a que (en campo) es más fácil la adquisición de los insumos y elaboración del extracto crudo de mamuyo en comparación de un potencial fraccionamiento del extracto.

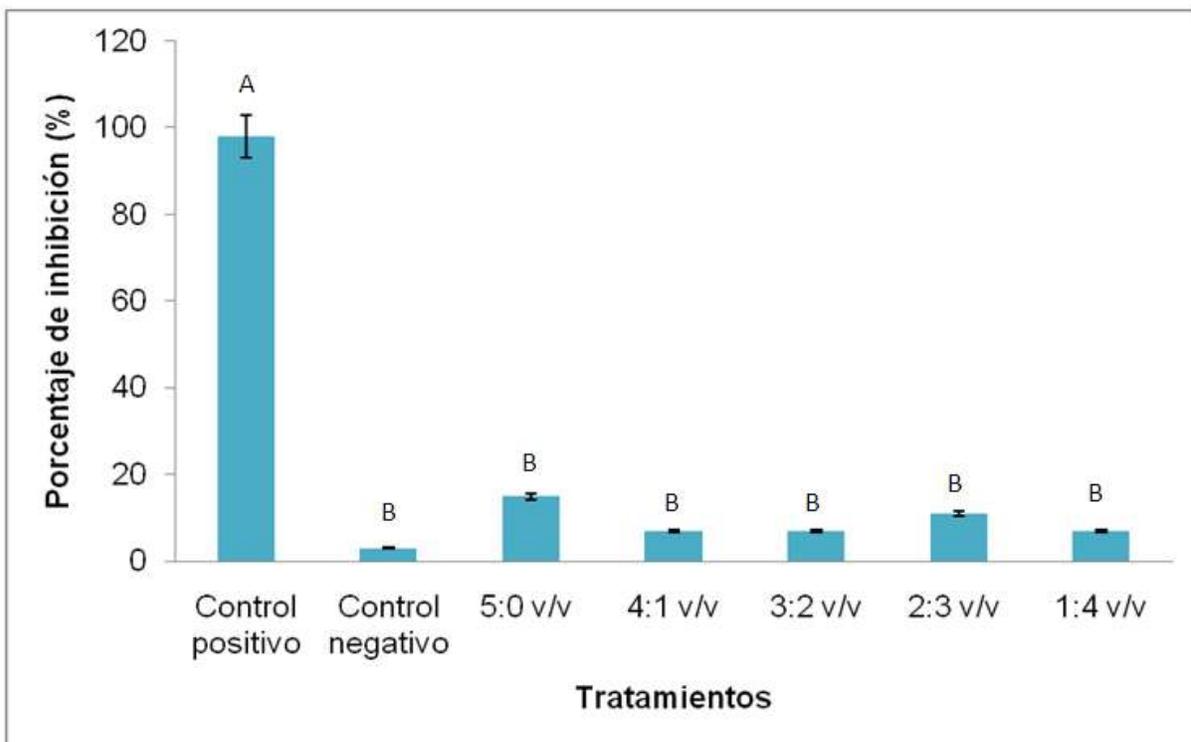


Figura 23. Porcentajes de inhibición registrados por las distintas fracciones del extracto de hoja con la mezcla entre n-hexano y cloroformo expresadas en proporción de volumen/volumen (v/v).

### 6.8 Análisis fisicoquímicos del fruto

Como parte de los resultados del análisis fisicoquímico de *Styrax ramirezii* se determinó la escala de madurez del fruto para determinar el estadio de las mediciones, a continuación se presentan histogramas de frecuencias y momentos estadísticos (según sea el caso) correspondientes a cada uno de los parámetros fisicoquímicos analizados con frutos en madurez de consumo.

#### *Escala de madurez del fruto*

Con base en sus características visuales (tamaño y color) en la Figura 24 se muestran los diferentes estadios (En) de desarrollo y crecimiento del fruto de *Styrax ramirezii*, además en la Tabla 1 se muestran las medias obtenidas de los parámetros peso, tamaño y color de los estadios 0 a 8 (E0 a E8).



Figura 24. Escala de madurez de frutos de *S. ramirezii*. E0: estadio cero; E1: estadio uno; E2: estadio dos; E3: estadio tres; E4: estadio cuatro; E5: estadio cinco; E6: estadio seis; E7: estadio siete; E8: estadio ocho (madurez de consumo).

Los estadios del E0 a E7 son considerados inmaduros debido a que no han desarrollado su tamaño, peso y color potencial. En la Tabla 9 se muestran los valores de los diferentes estadios inmaduros del mamuyo.

Tabla 9. Promedios de peso, tamaño y color de los distintos estadios inmaduros

| Estadio (E)             | Peso (g) | Tamaño (mm) |              | Color |        |        |
|-------------------------|----------|-------------|--------------|-------|--------|--------|
|                         |          | Ecuatorial  | Longitudinal | L*    | a*     | b*     |
| E0                      | --       | --          | --           | --    | --     | --     |
| E1                      | 0.15     | 5.27        | 5.78         | 64.10 | - 8.23 | 4.00   |
| E2                      | 0.21     | 6.10        | 6.61         | 63.25 | - 6.78 | 3.71   |
| E3                      | 0.27     | 7.75        | 8.90         | 62.45 | - 6.88 | 3.29   |
| E4                      | 0.36     | 8.81        | 9.92         | 62.58 | - 5.95 | 1.55   |
| E5                      | 0.53     | 9.03        | 10.67        | 61.84 | - 2.06 | - 1.15 |
| E6                      | 0.64     | 9.58        | 11.69        | 59.19 | - 0.64 | - 4.14 |
| E7                      | 0.66     | 9.77        | 12.03        | 58.55 | 0.49   | - 7.11 |
| E8 (madurez de consumo) | 0.66     | 9.85        | 13.42        | 58.11 | 0.68   | - 9.98 |

El estadio 8 es el considerado en madurez de consumo debido a que reúne las características organolépticas deseables por los pobladores que lo consumen, a nivel visual se observa un fruto con un color “morado-azulado” con presencia de pubescencias sobre el epicarpio y al momento del corte del árbol presenta gran facilidad para el desprendimiento de su pedúnculo en comparación con los otros estadios de desarrollo propuestos. Señalando que E8 fue el estadio al que se le realizaron todos los análisis fisicoquímicos descritos en el capítulo de materiales y métodos.

### *Peso*

La determinación del peso de los frutos arrojo que el 78.4 % de los frutos muestreados tienen un peso entre 0.45 y 0.82 (Figura 25); además los momentos estadísticos (media = 0.66; desviación estándar = 0.17; curtosis = 0.28 y moda = 0.69) revelan que se encuentran distribuidos normalmente y que el comportamiento de la población respecto a su peso es cercano a la media, con lo cual, un fruto de mamuyo con madurez de consumo tiene un peso aproximado de 0.66 g, es decir, en 1 kg hay 1515 frutos.

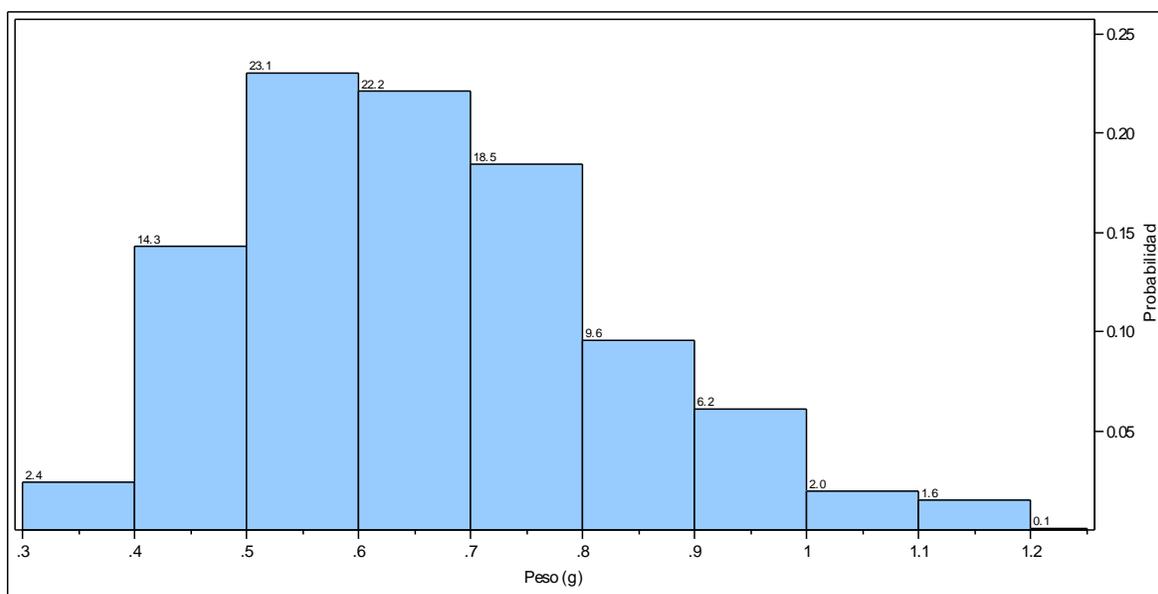


Figura 25. Peso de frutos de *Styrax ramirezii*.

## Tamaño

Los resultados preliminares obtenidos para el tamaño (ecuatorial y longitudinal) del fruto demuestran que *S. ramirezii* produce frutos ovoides. Las Figuras 26 y 27 muestran la distribución de los tamaños ecuatorial y longitudinal, en donde se aprecian distribuciones normales con tendencias leptocúrticas (curtosis de 0.38 y -0.01 para tamaño ecuatorial y longitudinal) cercanas a 9.85 mm de tamaño ecuatorial y 13.42 mm de tamaño longitudinal (medias aritméticas), medidas que tendría un fruto habitualmente consumido por los pobladores (modas = 10.12 y 13.28 respectivamente).

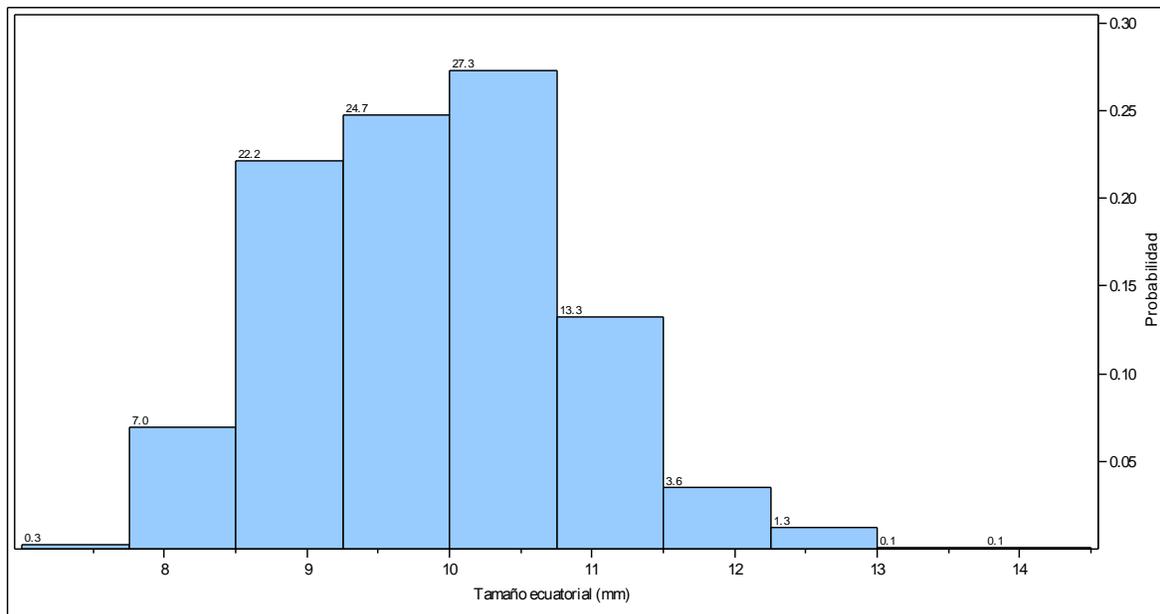


Figura 26. Tamaño ecuatorial de frutos de *Styrox ramirezii*.

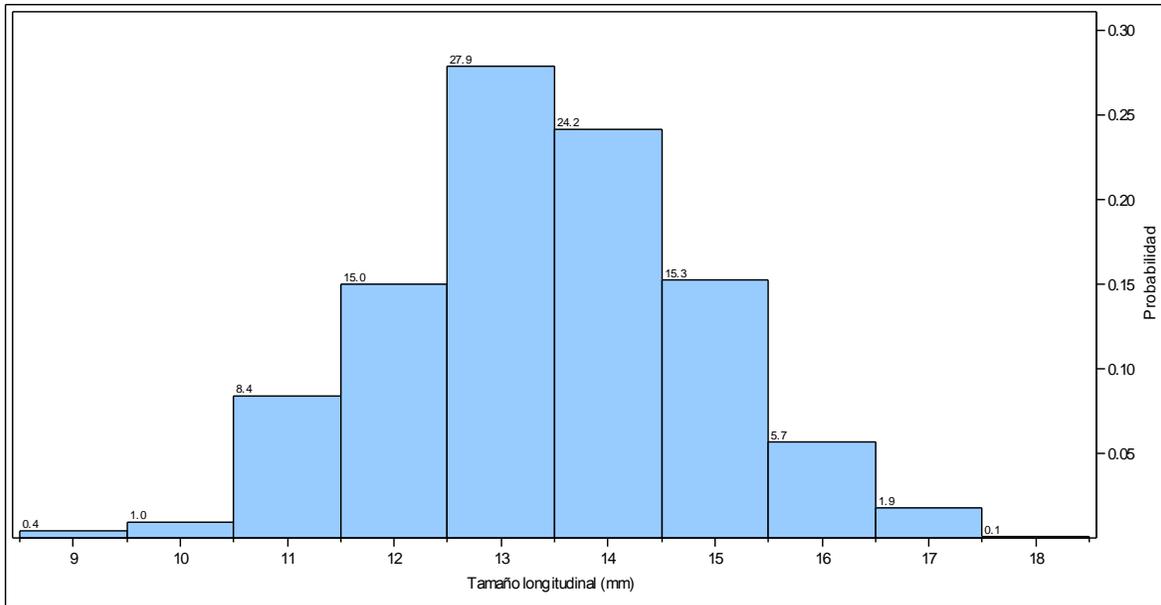


Figura 27. Tamaño longitudinal de frutos de *Styrax ramirezii*.

### Volumen

El volumen medio de los frutos de mamuyo es de  $0.65 \text{ cm}^3$  (desviación estándar =  $0.09$ ; curtosis =  $0.34$  y moda =  $0.63$ ) y el  $73.1 \%$  de la muestra registraron valores entre  $0.55$  y  $0.80 \text{ cm}^3$  (Figura 28), lo cual describe un comportamiento homogéneo en cuanto al espacio ocupado por cada fruto.

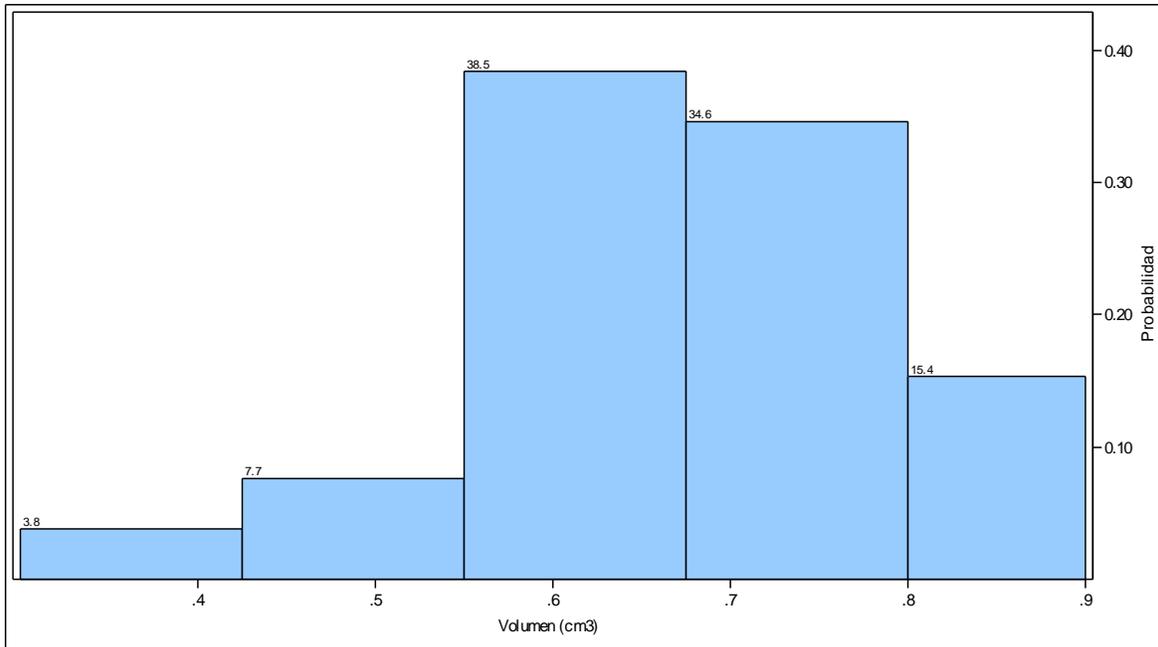


Figura 28. Volumen de frutos de *Styrox ramirezii*.

### Densidad

Los datos obtenidos en el cálculo de la densidad absoluta (Figura 29) tuvieron una media de  $0.107 \text{ g/cm}^3$  (desviación estándar = 0.04; curtosis = 0.56 y moda = 0.111) y el 38.5 % de los frutos muestreados registraron valores dentro del intervalo de  $0.100$  y  $0.125 \text{ g/cm}^3$  mismos valores para la densidad relativa con la referencia del agua.

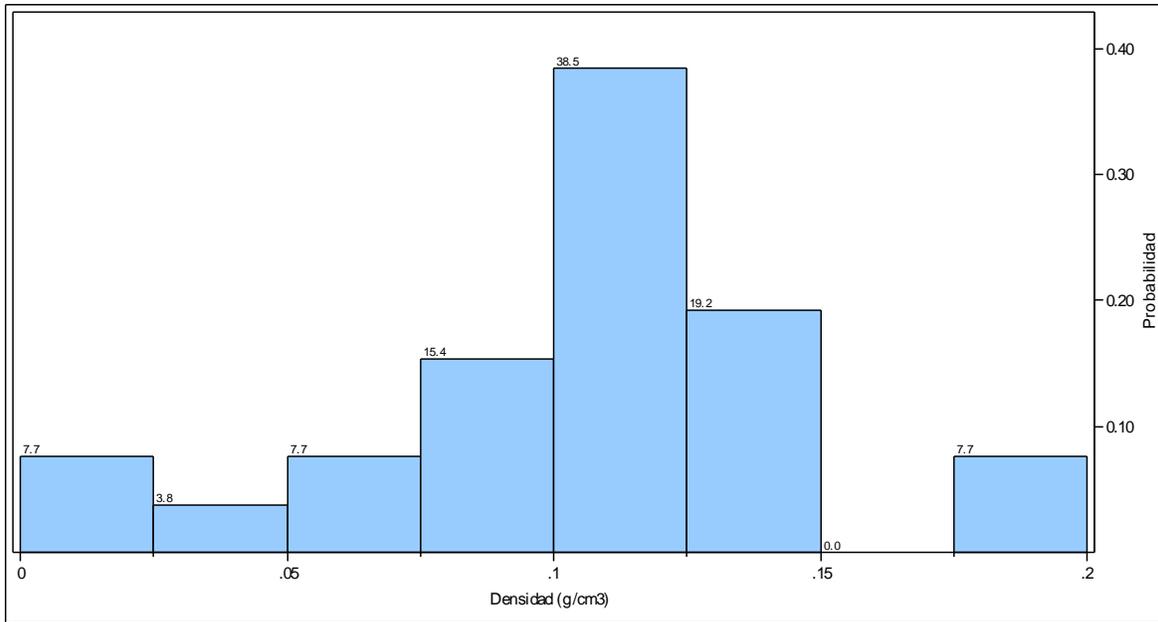


Figura 29. Densidad de frutos de *Styrax ramirezii*.

### *Porcentaje de semilla*

El porcentaje de semilla (Figura 30) reveló que cada fruto tiene en promedio el 27.03 % de su peso total de semilla, es decir que de cada 100 g de fruto obtendríamos aproximadamente 80 g de pulpa, teniendo en cuenta que habitualmente los pobladores consideran únicamente la semilla como no comestible. Los momentos estadísticos fueron: desviación estándar = 4.37; curtosis = -0.86 y moda = 28.2.

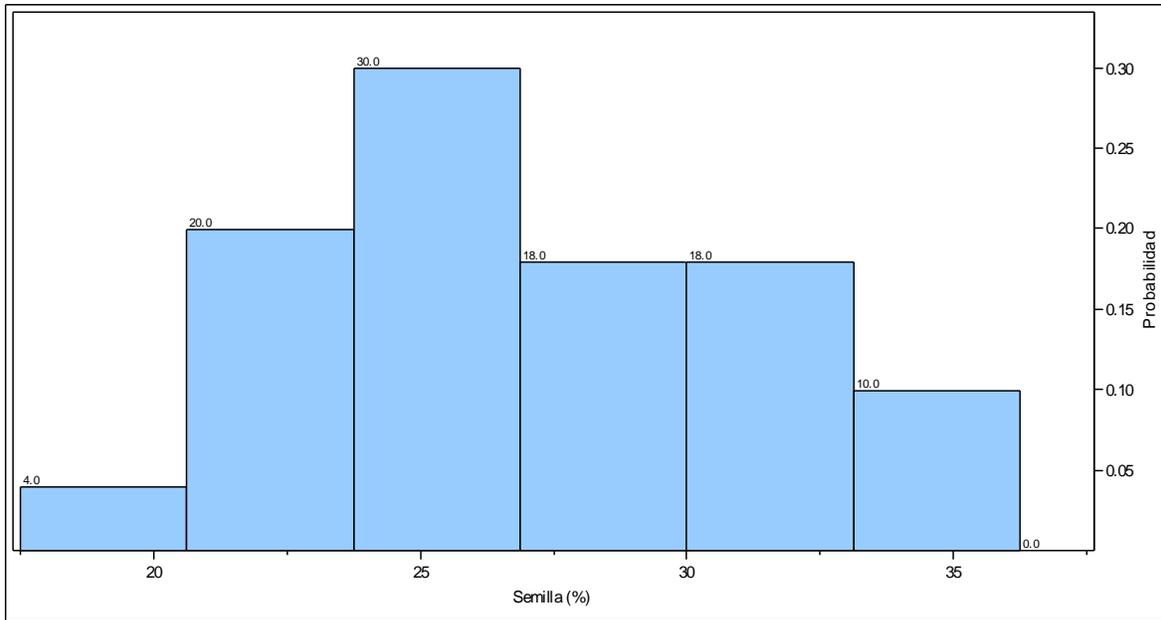


Figura 30. Porcentaje de semilla de frutos de *Styrox ramirezii*.

### Color

El color calculado a partir del sistema de color CIE  $L^*a^*b^*$  y representado en grados Hue ( $^{\circ}$ hue) se muestran en la Figura 31, adicionalmente las medias de los componentes son  $L^* = 58.11 (\pm 2.23)$ ,  $a^* = 0.66 (\pm 0.12)$  y  $b^* = 9.93 (\pm 1.42)$ . Los momentos estadísticos para el parámetro del color son: 277.89 de media; 8.26 de desviación estándar y 277.83 de moda, con lo cual se afirma que el 68 % de los frutos se encuentran entre el intervalos de grados Hue de 269.63 y 286.15, valores correspondientes a colores azules.

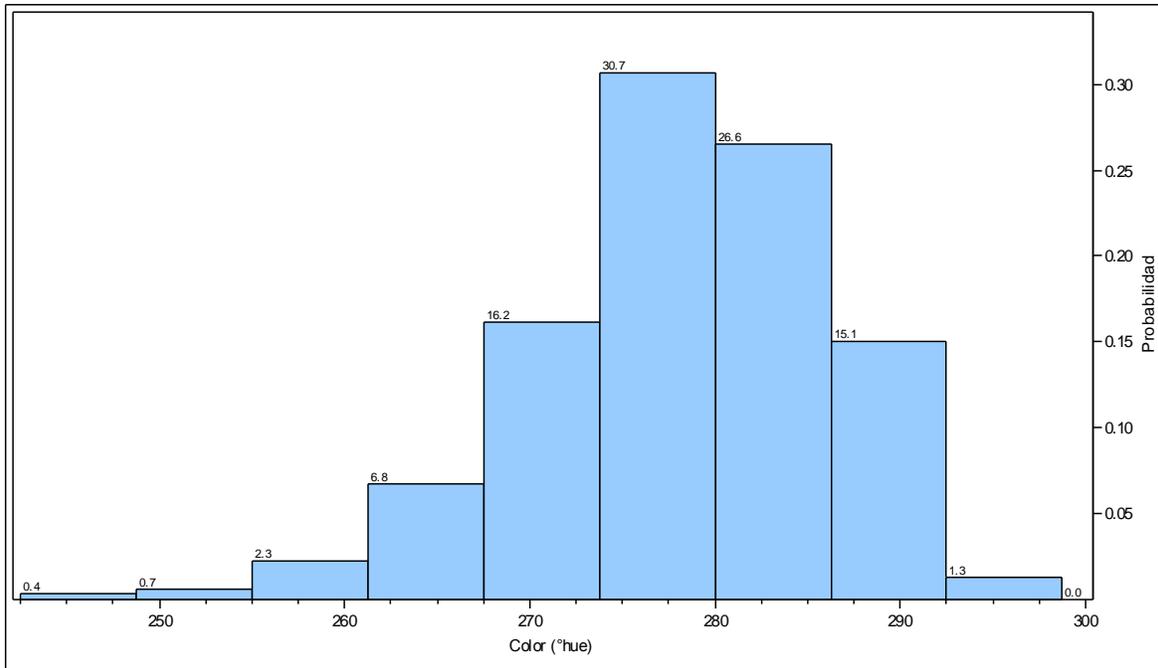


Figura 31. Color de frutos de *Styrax ramirezii*.

### *Firmeza*

La firmeza (Figura 32) calculada como resistencia a la compresión tuvo una media de 5.24 N como fuerza máxima para comprimir 1 mm el fruto, visualmente el fruto se deforma una vez que la sonda regreso a su posición inicial. Los momentos estadísticos son: desviación estándar = 0.52, curtosis = 0.21 y moda = 5.48.

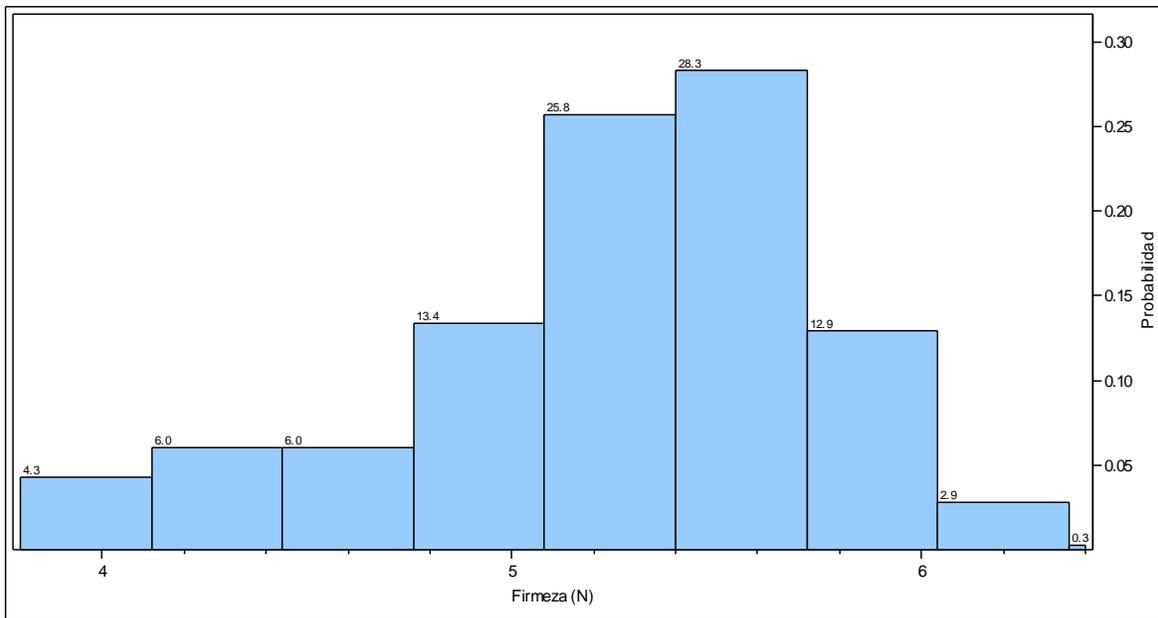


Figura 32. Firmeza de frutos de *Styrox ramirezii*.

### Porcentaje de jugo

El mamuyo tiene un  $76.3 \pm 1.2$  % de jugo, es decir que por cada 100 g de fruto sin semilla (pulpa) se pueden obtener aproximadamente 78.1 mL. Tomando el peso total del fruto (con semilla) el porcentaje es de 55.6 %.

### Sólidos solubles

Los sólidos solubles presentes en el jugo del mamuyo oscilan entre 14.9 y 20.1 °Bx y lo que indica es cociente es que existen en promedio 17.63 g de azúcar (sacarosa principalmente) por cada 100 mL de jugo.

### pH

Las lecturas del jugo muestran que el mamuyo tiene un promedio de pH de  $5.52 \pm 0.09$ , valor más neutro en comparación con el pH del jugo de arándano azul (*Vacinium corymbosum*) que oscila entre 2.5 y 3.0.

### *Acidez titulable*

La acidez titulable promedio del mamuyo es de 1.55 % ( $\pm 0.14$ ) de ácido cítrico, valores inferiores a los registrados para el arándano, que en promedio tiene 2.42 % de ácido cítrico.

### *Humedad*

La cantidad de humedad presente en la parte comestible del fruto es de  $82.56 \pm 1.24$  g por cada 100 g, por lo cual la cantidad de materia seca es de  $17.44 \pm 1.24$  g por cada 100 g, valores que indican alto contenido de agua disponible para una eventual deshidratación y conservación de sus nutrientes.

### *Ceniza*

En la determinación de ceniza se obtuvo una media de  $0.67 \pm 0.08$  g por cada 100 g de la parte comestible del fruto, es decir, un 0.62 %.

### *Extracto etéreo*

La cantidad de extracto etéreo fue de  $0.54 \pm 0.04$  g por cada 100 g de la parte comestible del mamuyo (0.52 %), valores superiores a los 0.33 g que contiene 100 g de arándano azul.

### *Proteína*

La cantidad de proteína fue de  $4.98 \pm 0.24$  g por cada 100 g de peso fresco de pulpa de *Styrax ramirezii*.

### *Calorías*

En cuanto a la cantidad de calorías que tiene la pulpa de mamuyo es de  $0.712 \pm 0.010$  Kcal por gramo de muestra, es decir en 142 g de peso fresco existen 100 kcal.

### *Vitamina C*

La cantidad de vitamina C presente en 100 g de peso fresco fue de  $6.68 \pm 0.07$  mg valores superiores a los 9.37 mg que contiene 100 g de arándano azul.

## VII. CONCLUSIONES

- Se logró coleccionar muestras silvestres con potencial económico de mamuyo (*S. ramirezii*) con la referencia en lo reportado.
- Se estandarizó un protocolo de extracción de compuestos terpenicos aplicando el método de maceración con solventes orgánicos partiendo de hojas, tallos y frutos frescos.
- La concentración y tipo de terpenoides están ligados a la técnica y al solvente extrante utilizados.
- El extracto n-hexánico de hoja macerada de *S. ramirezii* resulto ser el más efectivo *in vitro* y en el invernadero para la inhibición en contra de los fitopatógenos utilizados.
- La capacidad inhibitoria del extracto n-hexánico de hoja macerada permite sugerir que es debida a la sinérgia de sus compuestos, ya que ninguna de las fracciones de él alcanzaron el mismo porcentaje de inhibición.
- Las diferencias en el grado de inhibición observadas hacen suponer que existen distintos tipos de terpenoides los cuales se pudieron identificar y cuantificar por cromatografía de gases acoplada a espectometría de masas.
- Los resultados observados en este trabajo permiten proponer al mamuyo como fuente de compuestos antimicrobianos, pudiendo ser considerado para el control biológico de microorganismos fitopatógenos.
- Esté trabajo muestra la importancia alimenticia del fruto del mamuyo como alimento debido a sus características comparables con las del arándano azul.
- Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte de análisis fisicoquímicos de frutos y actividad antimicrobiana de extractos de *S. ramirezii*.

## VIII. FUENTES DE CONSULTA

Bertanha, C. S., Braguine, C. G., Moraes, A. C., Gimenez, V., Groppo, M., Silva, M. L., Cunha, W. R., Januário, A. H. y Pauletti, P. M. (2012). Cyclooxygenase inhibitory properties of nor-neolignans from *Styrax pohlilii*. *Natural Product Research*. 26 (24), 2323-2329.

Bertanha, C. S., Utrera, S. H., Gimenez, V., Groppo, M., Silva, M. L., Cunha, W. R., Gomes M. C. H., Januário, A. H. y Pauletti, P. M. (2013). Antibacterial evaluation of *Styrax pohlilii* and isolated compounds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49 (4), 653-658.

Breitmaier, E. (2006). Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca and Pheromones. Berlin. John Wiley & Sons. pp.17-203.

Breuer, B., Stuhlfauth, Fock, H. y Huber, H. (1987). Fatty acids of some Cornacea, Hydrangeaceae, Aquifoliaceae, Hamammelidaceae and Styracaceae. *Phytochemistry*. 26 (5), 1441-1445.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253.

Carranza, E. (1993). Styracaceae. Flora del bajío y regiones adyacentes. 21, 1-14.

Carranza, E. (1996). Una nueva variedad de *Styrax argenteus* (Styracaceae) del estado de Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana*. 36, 15-19.

Degenhardt, J., Köllner G. T. y Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. 70, 1621-1637.

Dos Santos, J. P. G. (2005). Morfología e anatomia de frutos e sementes de *Styrax camporum* Pohl. (Styracaceae), espécie de cerrado do Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*. 5, 87-93.

Essam, F. A. y Maytham H. A. A. (2012). Extraction and Purification of Terpenes from Nutmeg (*Myristica fragrans*). *Journal of Al-Nahrain University*. 15 (3), 151-160.

Evans, W.C. (2000). Pharmacognosy. Ed. Saunders. Edinburgh. pp. 13-14.

Fraga, B. M. (2003). Natural sesquiterpenoids. *Natural Products Report*. 20, 392-413.

Fritsch, P. W. (1997). A revision of *Styrax* (Styracacea) for western Texas, Mexico and Mesoamerica. *The Annals of the Missouri Botanical Garden*. 84 (4), 705-761.

Fritsch, P., W. (1999). Phylogeny of *Styrax* based on morphological characters, with implication for biogeography and infrageneric classification. *Systematic Botany*. 24 (3), 356-378.

Gebbinck, E. A., Jansen, B. J. M. y Groot, A. (2002). Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry*. 61, 737-770.

González-Espinosa, M., Meave, J. A., Lorena-Hernández, F. G., Ibarra-Manríquez, G. y Newton, A. C. (2011). The red list of Mexican cloud forest trees. Cambridge, UK: *Fauna & Flora International*. 3, 91-98.

González, M. A. (2014). Síntesis y evaluación de terpenos biológicamente activos. *Vitae*. 21 (1), 16-17.

Guerrero, M. J. (2013). Obtención y caracterización de polifenoles de frutos de *Rubus* spp., *Styrax ramirezii* Greenm y *Vaccinium* spp. con potencial nutracéutico, colectados en Michoacán. Tesis de maestría. Uruapan, Michoacán. pp. 7-14.

Gutierrez, J., Barry, R. C. y Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 91-97.

Harikrishnan, R., Ju-Sang, K., Man-Chul, K., Chellam, B. y Moon-Soo, H. (2011). *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. *Experimental Parasitology*. 129, 260-265.

Hirano, T., Gotoh, M. y Oka, K. (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Science*. 55 (13), 1061-1069.

Kissmann, C. y Habermann, G. (2013). Seed germination performances of *Styrax* species help understand their distribution in Cerrado areas in Brazil. *Bragantia*. 72 (3), 199-207.

Lahlou, M. (2004). Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy Research*. 18, 435–448.

Lee, J. y Lim, K. T. (2010). Apoptotic activity of ethanol extract from *Styrax Japonica* Siebold al Zuccarini in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 210-215.

Martínez, V. I., Periago, M. J. y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*. 50: 5-18.

Mendoça, P. P., Regina, A. A., Marx, Y. M., Giesbrecht, A. M. y Da Silva B. V. (2000). nor-Lignans from the leaves of *Styrax ferrugineus* (Styracaceae) with antibacterial and antifungal activity. *Phytochemistry*. 55, 597-601.

Nielsen, S. S. (2003). Food analysis. Ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York. pp. 437-460.

Oussalah, M., Caillet, S. y Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Production*. 69, 1046-1055.

Oztürk, S. E., Akgül, F. y Anil, H. (2008). Synthesis and antibacterial activity of egonol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16 (8), 4431-4437.

Pacheco, L. (1983). Flora de Veracruz, Styracaceae. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Fascículo 32. Xalapa, Veracruz. pp. 6-14.

Palá-Paúl, J. (2002). Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "*Eryngium*" L., en la península ibérica. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. pp. 269-271.

Palá-Paúl, J., Brophy, J., Pérez-Alonso, M., Usano, J. y Soria, S. (2007). Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain. *Journal Chromatography A*. 1175, 289-293.

Park, C., Woo, E. y Gun, D. (2009). Antifungal effect with apoptotic mechanism(s) of Styrajaponoside C. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 390, 1255-1259

Paris, M. y Hurabielle, M. (1981). *Abrégé de Matière Médicale*, Ed. Masson, Tomo 1 y 2. París. pp. 35-37.

Pauletti, P. M., Teles, H. L., Silva, D. H. S., Araújo, A. R. y Bolzani, V. S. (2006). The Styracaceae. *Revista Brasileira do Farmacogéinica*. 16 (4), 576-590.

Ponce, A., Roura, S., Del Valle, C. y Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Postharvest Biology and Technology*. 49, 294-300.

Rzedowski, J. y Calderon, G. (2005). Rosaceae. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. Fascículo 135, Co-edición entre el instituto de Ecología, A. C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Morelia, Michoacán. pp. 123-147.

Ríos, J. L. y Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacol*. 100 (2), 80-84.

Russo, E. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 163, 1344–1364.

Shiva, R. C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 47-181.

Skoog, D. A. y Leary, J. J. (1994). *Análisis instrumental*. Ed. McGraw Hill/Interamericana de España. Madrid. pp. 674-703.

Soheil, S. y Rodney, B. (2003). Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 14481-14486.

Teles, H. L., hemerly, J. P., Pauletti, P. M., Pandolfi, J. R., Araujo, A. R., Valentini, S. R., Young, M. C., Bolzani, V. S. y Silva, D. H. (2005). Cytotoxic lignans from the stems of *Styrax camporum* (styracaceae). *Natural Product Research*. 19 (4), 319-323.

Tayoub, G., Schwob, I., Bessie`re, J. M., Masotti, V., Rabier, J., Ruzzier, M. y Viano, J. (2006). Composition of volatile oils of *Styrax* (*Styrax officinalis*L.) leaves at different phenological stages. *Biochemical Systematics and Ecology* . 34, 705-709.

Timmers, M. A., Guerrero-Medina, J. L., Esposito, D., Grace, M. H., Paredes-López, O., García-Saucedo, P. A. y Lila, M. A. (2015). Characterization of Phenolic Compounds and Antioxidant and Anti-inflammatory Activities from Mamuyo (*Styrax ramirezii* Greenm.) Fruit. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 63 (48),10459-10465.

Templeton, W. (1969). *An Introduction to the Chemistry of Terpenoids and Steroids*. London. Butterworth Publishers & Co., Ltd. 15-17.

Tracanna, M. I., Poch, M. J., González, A. M., Schuff, C., Sulaiman, C., Rodríguez, A. M. y Amani, S. M. (2007). Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Salvia* sp. (Lamiaceae) de Tucuman, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Sin mes, 282-283.

Siddiqui, N. U., Li, X., Luo, H., Karaiskakis, A., Hou, H., Kislinger, T., Westwood, J. T., Morris, Q. y Lipshitz, H. D. (2012). Genome-wide analysis of the maternal-to-

zygotic transition in *Drosophila* primordial germ cells. *Genome Biology*. 13 (2), 18847.

Valcárcel, M. y Gómez, A. (1994), Técnicas analíticas de separación. Ed. Reverté. Barcelona. pp. 655-676.

Voirin, B., Brun, N. y Bayet, C. (1990). Effects of day length on the monoterpene composition of leaves of *Macropous X piperita*. *Phytochemistry*. 29, 749-755.

Wang, F., Hua, H., Pei, Y., Chen, D. y Jing, Y. (2006). Triterpenoids from the Resin of *Styrax tonkinensis* and Their Antiproliferative and Differentiation Effects in Human Leukemia HL-60 Cells. *Journal Nature Products*. 69, 807-810.

Yanar, Y., Ayhan, G., Izzet K., Halit, Ç. y Whalon, M. (2011). *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology*. 10 (42), 8291-8295.

Yoshikama, K., Hirai, H., Tanaka, M. y Arihara, S. (2000). Antisweet natural products. XV.1) Structures of Jegosaponins A-D from *Styrax japonica* SIEB. ZUCC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 48 (7), 1093-1096.

Zavaleta, M. E. (2000). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*. 17, 201-207.

## IX.ANEXOS

### Inhibición sobre *Pseudomonas* sp.

Tabla A1. Porcentaje de inhibición sobre *Pseudomonas* sp. por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|       |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|-------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|       |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| Tallo | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|       | Control negativo | 1          | 1       | 2          | 2       |
|       | 100 µg/mL        | 10         | 9       | 4          | 5       |
|       | 200 µg/mL        | 10         | 22      | 4          | 7       |
|       | 400 µg/mL        | 71         | 66      | 28         | 31      |
|       | 600 µg/mL        | 37         | 21      | 25         | 29      |
|       | 800 µg/mL        | 34         | 20      | 23         | 27      |
| Hoja  | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|       | Control negativo | 1          | 1       | 1          | 1       |
|       | 100 µg/mL        | 12         | 9       | 7          | 5       |
|       | 200 µg/mL        | 15         | 21      | 6          | 8       |
|       | 400 µg/mL        | 79         | 67      | 25         | 30      |
|       | 600 µg/mL        | 57         | 28      | 26         | 27      |
|       | 800 µg/mL        | 55         | 27      | 23         | 25      |
| Fruto | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|       | Control negativo | 1          | 1       | 1          | 2       |
|       | 100 µg/mL        | 6          | 10      | 4          | 6       |
|       | 200 µg/mL        | 12         | 14      | 5          | 9       |
|       | 400 µg/mL        | 42         | 32      | 22         | 32      |
|       | 600 µg/mL        | 39         | 19      | 20         | 22      |
|       | 800 µg/mL        | 39         | 18      | 20         | 20      |

## Inhibición sobre *Pantoea stewartii*

Tabla A2. Porcentaje de inhibición sobre *Pantoea stewartii* por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|                  |                  | Hexano           |         | Cloroformo |         |
|------------------|------------------|------------------|---------|------------|---------|
|                  |                  | Maceración       | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b>     | Control positivo | 100              | 100     | 100        | 100     |
|                  | Control negativo | 1                | 2       | 1          | 1       |
|                  | 100 µg/mL        | 5                | 4       | 4          | 5       |
|                  | 200 µg/mL        | 8                | 7       | 4          | 8       |
|                  | 400 µg/mL        | 42               | 39      | 24         | 22      |
|                  | 600 µg/mL        | 22               | 19      | 9          | 11      |
|                  | 800 µg/mL        | 20               | 17      | 8          | 11      |
|                  | <b>Hoja</b>      | Control positivo | 100     | 100        | 100     |
| Control negativo |                  | 2                | 2       | 1          | 1       |
| 100 µg/mL        |                  | 10               | 4       | 4          | 6       |
| 200 µg/mL        |                  | 11               | 5       | 3          | 10      |
| 400 µg/mL        |                  | 65               | 62      | 29         | 20      |
| 600 µg/mL        |                  | 37               | 33      | 14         | 10      |
| 800 µg/mL        |                  | 34               | 30      | 12         | 7       |
| <b>Fruto</b>     |                  | Control positivo | 100     | 100        | 100     |
|                  | Control negativo | 1                | 1       | 2          | 1       |
|                  | 100 µg/mL        | 6                | 5       | 5          | 5       |
|                  | 200 µg/mL        | 5                | 8       | 3          | 8       |
|                  | 400 µg/mL        | 44               | 44      | 12         | 7       |
|                  | 600 µg/mL        | 16               | 17      | 11         | 8       |
|                  | 800 µg/mL        | 12               | 15      | 10         | 4       |

## Inhibición sobre el aislado de aguacate 26 (AA26)

Tabla A3. Porcentaje de inhibición sobre el aislado de aguacate 26 por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 14         | 12      | 7          | 13      |
|              | 200 µg/mL        | 14         | 30      | 6          | 15      |
|              | 400 µg/mL        | 72         | 65      | 28         | 31      |
|              | 600 µg/mL        | 45         | 21      | 30         | 32      |
|              | 800 µg/mL        | 34         | 25      | 27         | 32      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 2          | 1       | 1          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 16         | 12      | 10         | 11      |
|              | 200 µg/mL        | 18         | 28      | 7          | 19      |
|              | 400 µg/mL        | 94         | 84      | 25         | 31      |
|              | 600 µg/mL        | 68         | 28      | 26         | 32      |
|              | 800 µg/mL        | 55         | 28      | 25         | 31      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 3          | 3       |
|              | 100 µg/mL        | 16         | 10      | 14         | 6       |
|              | 200 µg/mL        | 22         | 19      | 4          | 12      |
|              | 400 µg/mL        | 40         | 32      | 21         | 15      |
|              | 600 µg/mL        | 39         | 19      | 20         | 14      |
|              | 800 µg/mL        | 39         | 18      | 20         | 18      |

## Inhibición sobre el aislado de aguacate 34 (AA34)

Tabla A4. Porcentaje de inhibición sobre el aislado de aguacate 34 por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 2          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 12         | 10      | 6          | 11      |
|              | 200 µg/mL        | 12         | 26      | 6          | 15      |
|              | 400 µg/mL        | 56         | 66      | 28         | 26      |
|              | 600 µg/mL        | 40         | 20      | 24         | 22      |
|              | 800 µg/mL        | 28         | 20      | 23         | 17      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 2          | 1       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 14         | 11      | 6          | 9       |
|              | 200 µg/mL        | 21         | 26      | 7          | 19      |
|              | 400 µg/mL        | 80         | 74      | 28         | 33      |
|              | 600 µg/mL        | 64         | 22      | 26         | 22      |
|              | 800 µg/mL        | 50         | 20      | 22         | 22      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 100        | 100     | 100        | 100     |
|              | Control negativo | 1          | 2       | 1          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 10         | 10      | 4          | 3       |
|              | 200 µg/mL        | 19         | 17      | 5          | 9       |
|              | 400 µg/mL        | 37         | 30      | 20         | 12      |
|              | 600 µg/mL        | 30         | 17      | 19         | 12      |
|              | 800 µg/mL        | 30         | 16      | 16         | 9       |

## Inhibición sobre *Rhizoctonia* sp.

Tabla A5. Porcentaje de inhibición sobre *Rhizoctonia* sp. por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 82         | 78      | 80         | 80      |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 0          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 6          | 5       | 4          | 3       |
|              | 400 µg/mL        | 25         | 22      | 17         | 15      |
|              | 800 µg/mL        | 25         | 23      | 20         | 20      |
|              | 1600 µg/mL       | 31         | 25      | 23         | 24      |
|              | 2400 µg/mL       | 33         | 29      | 25         | 24      |
|              | 3200 µg/mL       | 44         | 41      | 27         | 28      |
|              | 4000 µg/mL       | 33         | 32      | 26         | 26      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 80         | 78      | 81         | 80      |
|              | Control negativo | 1          | 2       | 3          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 6          | 4       | 4          | 4       |
|              | 400 µg/mL        | 27         | 23      | 16         | 18      |
|              | 800 µg/mL        | 27         | 25      | 25         | 19      |
|              | 1600 µg/mL       | 33         | 26      | 26         | 22      |
|              | 2400 µg/mL       | 36         | 32      | 27         | 29      |
|              | 3200 µg/mL       | 49         | 44      | 27         | 31      |
|              | 4000 µg/mL       | 33         | 30      | 26         | 28      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 79         | 80      | 82         | 79      |
|              | Control negativo | 1          | 2       | 1          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 6          | 5       | 4          | 6       |
|              | 400 µg/mL        | 22         | 23      | 12         | 11      |
|              | 800 µg/mL        | 22         | 23      | 20         | 13      |
|              | 1600 µg/mL       | 24         | 26      | 22         | 14      |
|              | 2400 µg/mL       | 23         | 28      | 24         | 15      |
|              | 3200 µg/mL       | 29         | 28      | 24         | 15      |
|              | 4000 µg/mL       | 22         | 24      | 25         | 15      |

## Inhibición sobre *Phytophthora cinnamomi*

Tabla A6. Porcentaje de inhibición sobre *Phytophthora cinnamomi* por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 78         | 75      | 76         | 75      |
|              | Control negativo | 2          | 3       | 1          | 3       |
|              | 100 µg/mL        | 4          | 3       | 3          | 3       |
|              | 400 µg/mL        | 7          | 6       | 5          | 7       |
|              | 800 µg/mL        | 8          | 6       | 5          | 6       |
|              | 1600 µg/mL       | 7          | 6       | 6          | 6       |
|              | 2400 µg/mL       | 8          | 6       | 6          | 6       |
|              | 3200 µg/mL       | 9          | 6       | 4          | 6       |
|              | 4000 µg/mL       | 7          | 8       | 6          | 5       |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 75         | 75      | 75         | 74      |
|              | Control negativo | 0          | 2       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 4          | 4       | 5          | 3       |
|              | 400 µg/mL        | 7          | 7       | 6          | 7       |
|              | 800 µg/mL        | 7          | 6       | 6          | 5       |
|              | 1600 µg/mL       | 7          | 8       | 6          | 4       |
|              | 2400 µg/mL       | 6          | 7       | 6          | 6       |
|              | 3200 µg/mL       | 10         | 9       | 7          | 6       |
|              | 4000 µg/mL       | 7          | 4       | 5          | 7       |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 76         | 77      | 76         | 76      |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 2          | 0       |
|              | 100 µg/mL        | 3          | 5       | 4          | 3       |
|              | 400 µg/mL        | 6          | 7       | 7          | 7       |
|              | 800 µg/mL        | 7          | 8       | 6          | 7       |
|              | 1600 µg/mL       | 6          | 7       | 6          | 7       |
|              | 2400 µg/mL       | 6          | 7       | 6          | 7       |
|              | 3200 µg/mL       | 7          | 4       | 8          | 7       |
|              | 4000 µg/mL       | 7          | 8       | 5          | 6       |

## Inhibición sobre *Colletotrichum gloesporoides*

Tabla A7. Porcentaje de inhibición sobre *Colletotrichum gloesporoides* por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 95         | 95      | 95         | 96      |
|              | Control negativo | 2          | 3       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 7          | 7       | 7          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 25         | 22      | 18         | 16      |
|              | 800 µg/mL        | 27         | 25      | 21         | 22      |
|              | 1600 µg/mL       | 33         | 33      | 24         | 23      |
|              | 2400 µg/mL       | 36         | 34      | 28         | 23      |
|              | 3200 µg/mL       | 45         | 39      | 23         | 23      |
|              | 4000 µg/mL       | 36         | 36      | 23         | 24      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 94         | 96      | 94         | 96      |
|              | Control negativo | 2          | 2       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 8          | 7       | 6          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 29         | 25      | 18         | 17      |
|              | 800 µg/mL        | 34         | 26      | 21         | 24      |
|              | 1600 µg/mL       | 36         | 27      | 27         | 23      |
|              | 2400 µg/mL       | 38         | 28      | 26         | 27      |
|              | 3200 µg/mL       | 52         | 37      | 28         | 30      |
|              | 4000 µg/mL       | 34         | 33      | 22         | 29      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 95         | 95      | 96         | 94      |
|              | Control negativo | 2          | 2       | 1          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 7          | 9       | 7          | 8       |
|              | 400 µg/mL        | 23         | 25      | 14         | 13      |
|              | 800 µg/mL        | 26         | 26      | 22         | 13      |
|              | 1600 µg/mL       | 26         | 26      | 22         | 15      |
|              | 2400 µg/mL       | 28         | 28      | 23         | 16      |
|              | 3200 µg/mL       | 29         | 26      | 22         | 20      |
|              | 4000 µg/mL       | 27         | 26      | 22         | 21      |

## Inhibición sobre *Colletotrichum acutatum*

Tabla A8. Porcentaje de inhibición sobre *Colletotrichum acutatum* por la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 94         | 95      | 95         | 94      |
|              | Control negativo | 3          | 0       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 8          | 8       | 6          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 25         | 23      | 15         | 14      |
|              | 800 µg/mL        | 26         | 24      | 19         | 17      |
|              | 1600 µg/mL       | 36         | 24      | 22         | 17      |
|              | 2400 µg/mL       | 39         | 25      | 26         | 21      |
|              | 3200 µg/mL       | 41         | 37      | 25         | 25      |
|              | 4000 µg/mL       | 30         | 31      | 22         | 22      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 94         | 96      | 95         | 95      |
|              | Control negativo | 2          | 3       | 2          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 7          | 7       | 6          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 28         | 23      | 18         | 19      |
|              | 800 µg/mL        | 29         | 28      | 26         | 16      |
|              | 1600 µg/mL       | 34         | 30      | 27         | 17      |
|              | 2400 µg/mL       | 38         | 33      | 28         | 27      |
|              | 3200 µg/mL       | 47         | 46      | 28         | 26      |
|              | 4000 µg/mL       | 36         | 37      | 25         | 24      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 96         | 95      | 95         | 95      |
|              | Control negativo | 1          | 2       | 2          | 3       |
|              | 100 µg/mL        | 8          | 8       | 7          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 24         | 22      | 11         | 12      |
|              | 800 µg/mL        | 25         | 22      | 19         | 13      |
|              | 1600 µg/mL       | 25         | 26      | 23         | 12      |
|              | 2400 µg/mL       | 25         | 26      | 23         | 13      |
|              | 3200 µg/mL       | 27         | 28      | 24         | 18      |
|              | 4000 µg/mL       | 24         | 27      | 22         | 15      |

## Inhibición sobre el aislado de *Armillaria* sp. ZC4

Tabla A9. Porcentaje de inhibición sobre *Armillaria* sp. ZC4 la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 85         | 86      | 87         | 86      |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 1          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 10         | 10      | 8          | 9       |
|              | 400 µg/mL        | 26         | 25      | 13         | 12      |
|              | 800 µg/mL        | 26         | 26      | 15         | 15      |
|              | 1600 µg/mL       | 29         | 31      | 21         | 16      |
|              | 2400 µg/mL       | 36         | 32      | 26         | 24      |
|              | 3200 µg/mL       | 37         | 32      | 25         | 22      |
|              | 4000 µg/mL       | 38         | 32      | 20         | 21      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 86         | 86      | 86         | 86      |
|              | Control negativo | 1          | 2       | 2          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 16         | 14      | 9          | 10      |
|              | 400 µg/mL        | 19         | 17      | 16         | 15      |
|              | 800 µg/mL        | 26         | 24      | 22         | 16      |
|              | 1600 µg/mL       | 34         | 30      | 23         | 23      |
|              | 2400 µg/mL       | 37         | 32      | 23         | 27      |
|              | 3200 µg/mL       | 59         | 46      | 31         | 29      |
|              | 4000 µg/mL       | 44         | 40      | 24         | 23      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 85         | 87      | 86         | 86      |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 1          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 12         | 9       | 8          | 7       |
|              | 400 µg/mL        | 24         | 23      | 9          | 11      |
|              | 800 µg/mL        | 25         | 22      | 12         | 12      |
|              | 1600 µg/mL       | 25         | 27      | 22         | 15      |
|              | 2400 µg/mL       | 25         | 29      | 21         | 17      |
|              | 3200 µg/mL       | 27         | 29      | 21         | 13      |
|              | 4000 µg/mL       | 24         | 21      | 19         | 11      |

## Inhibición sobre el aislado de *Armillaria* sp. ZC5

Tabla A10. Porcentaje de inhibición sobre *Armillaria* sp. ZC5 la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 85         | 85      | 86         | 85      |
|              | Control negativo | 1          | 3       | 2          | 2       |
|              | 100 µg/mL        | 11         | 9       | 9          | 10      |
|              | 400 µg/mL        | 25         | 24      | 11         | 11      |
|              | 800 µg/mL        | 25         | 25      | 16         | 14      |
|              | 1600 µg/mL       | 31         | 33      | 24         | 16      |
|              | 2400 µg/mL       | 36         | 35      | 26         | 18      |
|              | 3200 µg/mL       | 42         | 35      | 33         | 24      |
|              | 4000 µg/mL       | 39         | 32      | 25         | 23      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 85         | 86      | 86         | 86      |
|              | Control negativo | 2          | 1       | 2          | 3       |
|              | 100 µg/mL        | 15         | 13      | 8          | 10      |
|              | 400 µg/mL        | 21         | 18      | 15         | 14      |
|              | 800 µg/mL        | 27         | 26      | 19         | 13      |
|              | 1600 µg/mL       | 33         | 33      | 25         | 22      |
|              | 2400 µg/mL       | 38         | 36      | 26         | 24      |
|              | 3200 µg/mL       | 57         | 48      | 33         | 28      |
|              | 4000 µg/mL       | 47         | 43      | 26         | 27      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 84         | 86      | 86         | 86      |
|              | Control negativo | 2          | 3       | 2          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 13         | 10      | 8          | 10      |
|              | 400 µg/mL        | 23         | 24      | 10         | 10      |
|              | 800 µg/mL        | 26         | 25      | 14         | 10      |
|              | 1600 µg/mL       | 23         | 25      | 19         | 11      |
|              | 2400 µg/mL       | 24         | 28      | 20         | 14      |
|              | 3200 µg/mL       | 25         | 26      | 16         | 14      |
|              | 4000 µg/mL       | 25         | 25      | 15         | 12      |

## Inhibición sobre el aislado de *Armillaria* sp. SJN

Tabla A11. Porcentaje de inhibición sobre *Armillaria* sp. SJN la combinación de los diferentes solventes, métodos, tejidos y dosis de los extractos empleados

|              |                  | Hexano     |         | Cloroformo |         |
|--------------|------------------|------------|---------|------------|---------|
|              |                  | Maceración | Soxhlet | Maceración | Soxhlet |
| <b>Tallo</b> | Control positivo | 86         | 86      | 86         | 87      |
|              | Control negativo | 0          | 1       | 0          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 14         | 12      | 10         | 12      |
|              | 400 µg/mL        | 25         | 23      | 16         | 15      |
|              | 800 µg/mL        | 30         | 24      | 16         | 17      |
|              | 1600 µg/mL       | 36         | 29      | 22         | 21      |
|              | 2400 µg/mL       | 39         | 33      | 31         | 22      |
|              | 3200 µg/mL       | 44         | 37      | 29         | 28      |
|              | 4000 µg/mL       | 38         | 31      | 24         | 27      |
| <b>Hoja</b>  | Control positivo | 87         | 86      | 87         | 86      |
|              | Control negativo | 1          | 1       | 0          | 0       |
|              | 100 µg/mL        | 19         | 15      | 14         | 14      |
|              | 400 µg/mL        | 24         | 27      | 17         | 16      |
|              | 800 µg/mL        | 32         | 28      | 19         | 16      |
|              | 1600 µg/mL       | 45         | 35      | 22         | 20      |
|              | 2400 µg/mL       | 58         | 37      | 31         | 22      |
|              | 3200 µg/mL       | 68         | 45      | 30         | 26      |
|              | 4000 µg/mL       | 52         | 43      | 24         | 26      |
| <b>Fruto</b> | Control positivo | 86         | 86      | 86         | 86      |
|              | Control negativo | 0          | 1       | 1          | 1       |
|              | 100 µg/mL        | 11         | 11      | 11         | 10      |
|              | 400 µg/mL        | 21         | 21      | 12         | 12      |
|              | 800 µg/mL        | 22         | 22      | 17         | 9       |
|              | 1600 µg/mL       | 26         | 19      | 18         | 10      |
|              | 2400 µg/mL       | 28         | 18      | 21         | 12      |
|              | 3200 µg/mL       | 28         | 18      | 19         | 9       |
|              | 4000 µg/mL       | 21         | 19      | 21         | 11      |

## Concentración de compuestos de *Styrax ramirezii*

Tabla A12. Composición de muestra de extractos n-hexánicos de *Styrax ramirezii* ordenados por su índice de retención (IR) experimentales

| IR exp. | IR teoricos | Libreria/ID  | Hoja fresca (*) | Hoja seca (*) | Tallo fresco (*) |
|---------|-------------|--|-----------------|---------------|------------------|
| 996     | 988         | Myrceno  | 0.0527          | 0.0095        | 0.0128           |
| 1002    | 1005        | Pseudocumen  | 0.0112          | 0.0033        | 0.0058           |
| 1038    | 1024        | D-Limoneno   | 0               | 0             | 0.0026           |
| 1050    | 1044        | Ocimeno  | 0.0205          | 0.0058        | 0.0105           |
| 1208    | 1196        | Estragol   | 0.0262          | 0.0048        | 0.0243           |
| 1275    | 1258        | Geraniol   | 0.0478          | 0             | 0                |
| 1500    | 1500        | Pentadecano  | 0.0388          | 0.0085        | 0.0052           |
| 1728    | 1734        | 2,4-dihidroxi-3,6-dimetil-, metilesterácido benzoico | 0               | 0             | 0.0110           |
| 1961    | 1959        | ácido hexadecanoico                                  | 0               | 0             | 0.0044           |
| 1993    | 1994        | etilester ácido hexadecanoico                        | 0               | 0             | 0.0030           |
| 2100    | 2096        | 9,12-(Z,Z)-metilester ácido octadecanoico            | 0               | 0             | 0.0076           |
| 2105    | 2115        | 11-ácido, metilester ácido octadecanoico             | 0               | 0             | 0.0062           |
| 2168    | 2159        | etilesterácido linoleico                             | 0               | 0             | 0.0082           |
| 2174    | 2179        | Etil oleato  | 0               | 0             | 0.0081           |
| 2399    | 2400        | Tetracoacosano                                       | 0.1287          | 0             | 0.0033           |
| 2501    | 2500        | Pentacosano  | 0.5583          | 0             | 0                |
| 2703    | 2700        | Heptacosano  | 0               | 0.4545        | 0.0135           |
| 2842    | 2833        | Squaleno   | 0               | 0             | 0.0346           |
| 2903    | 2900        | Nonacosano   | 0.9314          | 0             | 0.0425           |
| 3001    | 3000        | Triacontano  | 1.3172          | 1.9529        | 0                |

\* Concentración de miligramos por gramo de tejido seco

## Análisis fisicoquímicos de mamuyo (*Styrax ramirezii*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*)

Tabla A13. Medias y desviaciones estándar por cada 100 g de peso fresco de *Styrax ramirezii* y *Vaccinium corymbosum*.

| Parámetro             | <i>Styrax ramirezii</i>        | <i>Vaccinium corymbosum</i>    |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Peso                  | 0.66 ± 0.17 g                  | 0.96 ± 0.07 g                  |
| Tamaño ecuatorial     | 9.85 ± 0.99 mm                 | 12.12 ± 0.27 mm                |
| Tamaño longitudinal   | 13.42 ± 1.46 mm                | 9.68 ± 0.18 mm                 |
| Volumen               | 0.65 ± 0.09 cm <sup>3</sup>    | 0.79 ± 0.02 cm <sup>3</sup>    |
| Densidad              | 0.107 ± 0.04 g/cm <sup>3</sup> | 0.228 ± 0.07 g/cm <sup>3</sup> |
| Porcentaje de semilla | 27.03 ± 4.37 %                 | n/a                            |
| Color                 | 277.89 ± 8.26 °Hue             | 272.83 ± 4.44 °Hue             |
| Porcentaje de jugo    | 76.3 ± 1.20 %                  | 81.1 ± 1.01 %                  |
| Sólidos solubles      | 17.63 ± 1.05 °Bx               | 15.61 ± 0.87 °Bx               |
| pH                    | 5.52 ± 0.09                    | 4.62 ± 0.04                    |
| Acidez titulable      | 1.55 ± 0.14 % Ac. cítrico      | 2.09 ± 0.16 % Ac. Cítrico      |
| Humedad               | 82.56 ± 1.24 g                 | 85.22 ± 0.88 g                 |
| Materia seca          | 17.44 ± 1.24 g                 | 12.78 ± 0.88 g                 |
| Ceniza                | 0.62 ± 0.08 g                  | 0.31 ± 0.10 g                  |
| Grasa                 | 0.59 ± 0.04 g                  | 0.72 ± 0.14 g                  |
| Proteína              | 0.98 ± 0.24 g                  | 0.74 ± 0.20 g                  |
| Calorías              | 0.712 ± 0.02 Kcal              | 0.704 ± 0.01 Kcal              |
| Vitamina C            | 6.68 ± 0.07 mg                 | 9.70 ± 0.06 mg                 |