



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

DOCTORADO EN CIENCIAS: Biología Experimental

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**EFEECTO ANTIFÚNGICO Y ANTIOOMICETO DE LOS EXTRACTOS DE
PLANTAS MEDICINALES DE LA REGIÓN CENTRO OCCIDENTE DE
MÉXICO**

M. C. LUZ MARÍA DAMIÁN BADILLO

**TUTOR: D.C. MAURO M. MARTÍNEZ PACHECO
CO-TUTOR: D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

Abril, 2007

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
III.1. Características generales e importancia de las plantas medicinales	5
III. 2. Antifúngicos	9
III.2.1 Antioomicético	10
III. 3. Plantas como fuente de metabolitos con propiedades biocidas	10
III.3.1. Metabolitos secundarios vegetales contra hongos que afectan la salud humana	16
III.3.2. Metabolitos secundarios vegetales contra hongos y oomicetos que afectan la agricultura	18
IV. ANTECEDENTES	
IV.1. Importancia de la búsqueda de antifúngicos vegetales	21
IV.2. Uso de plantas medicinales en México	23
IV.2.1. <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. (estafiate)	26
IV.2.2. <i>Heliopsis longipes</i> 'A' Gray Blake (chilcuague)	30
IV.2.3. <i>Satureja macrostema</i> 'Benth' Briq. (nurite)	32
IV.2.4. <i>Tagetes lucida</i> Cav. (santamaría)	34
V. HIPÓTESIS	38
VI. OBJETIVOS	39
VII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	40
VII.1 Material biológico	41
VII.2 Métodos de extracción	42
VII.3 Fraccionamiento e identificación de metabolitos activos	42

VI.4 Ensayos biológicos	44
VIII. RESULTADOS	45
VIII.1 RESULTADOS ADICIONALES	
VIII.1.1. ACEITES ESENCIALES DE LA HOJA DE ESTAFIATE (<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.) CON ACTIVIDAD CONTRA <i>Phytophthora</i> spp.	63
VIII.1.2. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL Y UNA FRACCIÓN ACTIVA ANTIFÚNGICA Y ANTIOOMICETO DE ESTAFIATE (<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.).	78
IX. DISCUSIÓN GENERAL	92
X. CONCLUSIONES	102
XII. PERSPECTIVAS	103
XI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	105
XII. ANEXOS	122

AGRADECIMIENTOS

A Agüe por sus enseñanzas.

A mis hermanos y amigos verdaderos.

A Paco, Atziri e Ireri por su comprensión, apoyo y cariño.

A la memoria de mis padres, especialmente a Vito por todo lo que implicó para mí.

Un agradecimiento especial al D.C. Jorge Molina Torres, D.C. Francisco J. Aguilar Alarcón, D.C. Carlos Cervantes Vega, D.C. Silvia Fernández Pavía, D.C. Luis Chacón Garibay, por sus valiosas aportaciones. A mis tutores el D. C. Mauro M. Martínez Pacheco y D.C. Rafael Salgado Garciglia por su paciencia para formarme. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, La Universidad Tecnológica de Morelia y el Centro de Estudios Tecnológicos y de Servicios 120 por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo. A todo el personal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, incluyendo a mis compañeros de laboratorio que siempre me compartieron sus conocimientos y me brindaron su apoyo cuando lo requerí. A todos aquellos que de alguna manera me ayudaron a alcanzar este objetivo, mil gracias.

I.RESUMEN

El incremento de enfermedades causadas por hongos en animales y plantas, así como de oomicetos fitopatógenos, ocasionado por la resistencia a los fungicidas, han generado a través del tiempo, la búsqueda incesante por encontrar una sustancia que los controle, de tal forma que ésta no presente efectos secundarios adversos y que además sea económica entre otras características, problemas sin resolver hasta hoy en día. Una alternativa viable es considerar a los compuestos biocidas de origen vegetal, para esta aplicación se tiene en cuenta el conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales. La lucha biológica además de ser eficaz, económica y categóricamente saludable, constituye un excelente método de control. En el presente trabajo se valora la eficacia de antifúngicos y antioomicetos derivados de plantas, particularmente las características de los extractos de plantas medicinales, sus principios activos y el potencial que ofrecen para combatir los diferentes tipos de enfermedades causadas por patógenos de tipo fúngico u oomiceto. Por lo antes expuesto, se seleccionaron cuatro plantas medicinales de la región centro occidente de México (*Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake, *Satureja macrostema* Benth. Brinq. y *Tagetes lucida* Cav.) para realizar un escrutinio e identificar alguna con propiedades antifúngicas y antioomiceto. Los resultados mostraron que el extracto cloroformo-metanol (2:1, v/v) de la parte aérea (hojas y tallo) de *A. ludoviciana* inhibe el crecimiento de todos los hongos y oomicetos contra los que fue probado. De dicho extracto se obtuvo una fracción cromatográfica activa con un $R_f = 0.72$ (F3). Los compuestos mayoritarios de esta fracción microbicida fueron el borneol (16.28%), el canfor (7.41 %) y el *cis*-verbenol (1.69 %), los cuales sólo en mezcla presentaron inhibición similar al extracto crudo y a la fracción cromatográfica activa, al ensayarse en forma individual no inhibieron el crecimiento. Por ende, la mezcla de los compuestos borneol, canfor y *cis*-verbenol, es la responsable de la actividad antifúngica y antioomiceto. Con el análisis estadístico correspondiente se comprobó que el extracto cloroformo-metanol del área verde de *A. ludoviciana* y la fracción 3 son los más activos.

II. ABSTRACT

The increase of diseases caused by fungi in animals and plants as well as of oomycetes phytopathogens, caused by the resistance to the fungicides, have generated across time, the incessant search to find a substance that controls them, of such form that this one does not present adverse secondary effects and that in addition it will be economic among other characteristics, problems without solving until nowadays. A viable alternative is to consider to biocides compounds of vegetal origin, for this application it is necessary to have a complete knowledge about medicinal plants. The effective, economic and categorically healthful biological fight, constitutes an excellent method of control. In the present work the effectiveness of antifungal or antioomycete derived from plants is valued, particularly the characteristics of medicinal plant extracts, the active principles and the potential that they offer to fight the different types of diseases caused by fungi or oomycetes. By before exposed, four medicinal plants were selected of the central West region of Mexico (*Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliopsis longipes* 'A' Gray Blake, *Satureja macrostema* Benth. Brinq. y *Tagetes lucida* Cav.) in order to realize a scrutiny and to identify some with antifungal and antioomycete properties. The results showed that the chloroform-methanol (2: 1, v/v) of the aerial part (leaves and stem) of *A. ludoviciana* inhibits the growth of all the fungi and oomycetes against which it was proven. From this extract an active chromatographic fraction was obtained with $R_f = 0.72$ (F3). The majority compounds of this microbicidal fraction were borneol (16.28%), the camphor (7,41%) and *cis*-verbenol (1,69%), which only in mixture presented inhibition similar to the crude extract and the active chromatographic fraction. When trying itself in individual form they did not inhibit the growth. Therefore, the mixture of compounds borneol, camphor and *cis*-verbenol, is it in charge of antifungal and antioomycete activity. With the corresponding statistical analysis it was verified that as much the chloroform-metanol extract of the aerial part of *A. ludoviciana* and fraction 3 are the most active.

III. INTRODUCCIÓN

El Reino Fungi comprende a un gran número de especies de hongos con estilos de vida extraordinarios y únicos, capaces de habitar cualquier ambiente terrestre por ejemplo, algunos de ellos para su supervivencia requieren de otros organismos. En este trabajo nos enfocaremos en el aspecto particular de la búsqueda de metabolitos secundarios vegetales capaces de controlar el crecimiento y la diseminación de los hongos patógenos de cultivos vegetales y de animales.

El número de infecciones fúngicas se ha incrementado alarmantemente en los últimos 20 años, debido a la resistencia que presentan los hongos ante los antifúngicos convencionales, la recalcitrancia del organismo y al aumento de pacientes con el sistema inmunológico alterado ya que son altamente contaminantes. Estos factores hacen que los sistemas de control de las infecciones fúngicas no sean eficientes, tanto para los hongos que afectan a los humanos, como a las plantas (Ghannoum 1997).

Hasta hace poco tiempo se consideraba a los fungicidas sintéticos convencionales dentro de los plaguicidas con bajo grado de toxicidad. Sin embargo, en 1986 la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos de América (EUA) determinó con respecto a los residuos de plaguicidas en alimentos, que los fungicidas son los químicos de mayor riesgo por ser cancerígenos en relación con los insecticidas y los herbicidas juntos (Wilson *et al.*, 1997). Además, se agudizó el problema de la resistencia de los patógenos a estos productos químicos, de tal forma que en 1993 existían datos de resistencia de 150 especies de patógenos, principalmente hongos (Werenga *et al.* 1994).

Lo anterior demuestra la necesidad existente de obtener y usar nuevos biocidas y antibióticos, alternativos a los existentes, debido a la resistencia biológica a ellos, así como a los efectos secundarios provocados por su uso irracional (Battista y Bettolo, 1988; Levy y Milo, 1998; Russell y McDonnell, 2000). La búsqueda incesante de

nuevas moléculas con características específicas no tóxicas y altamente efectivas para controlar algunas infecciones por microorganismos que afectan al ser humano, a otros animales (vertebrados) y a los vegetales, son temas de investigación recurrente, con impacto científico, económico y social sin discusión (Grainge *et al.*, 1988; Molina-Torres *et al.*, 1995, 1999; Giordani *et al.*, 2001).

De ahí el interés por la identificación con nuevos compuestos con propiedades antifúngicas y antioomicetos modos de acción diferente a los convencionales y coadyuvar al desarrollo de nuevas estrategias para evitar las infecciones causadas por estos patógenos con la utilización de preparaciones amigables con el medio ambiente y formuladas con los principios activos antifúngicos vegetales puros o bien con el uso de extractos obtenidos con diferentes solventes (agua, etanol, cloroformo, acetato de etilo, hexano), aceites esenciales y polvos.

Dentro de las alternativas para esta búsqueda, una fuente de información es la herbolaria, la cual se ha desarrollado en México desde antes de la conquista, como lo demuestra el Códice Badiano, cuyo contenido está dividido en ciertas enfermedades y la manera de curarlas, utilizando como materia prima, hierbas, árboles y las secreciones o plumas de algunos animales (Lozoya, 1999).

En los últimos 50 años del avance científico en la medicina, se han encontrado compuestos de origen natural con éxito en la cura o alivio de enfermedades tales como el cáncer, cardíacas y del sistema nervioso central, pero también en tratamientos de micosis, contra bacterias y algunos virus (Harborne y Baxter, 1993). Las plantas son fuente de hasta un 25% de dichos metabolitos y se buscan otros tantos más dentro de la gran diversidad vegetal, basándose en la etnomedicina (Farnsworth 1990). Por ello, diversos grupos científicos en el mundo se dedican a la búsqueda de plantas con potencial medicinal.

III.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Las plantas son productoras de oxígeno, nutrimentos y una gran cantidad de productos útiles en industrias como la alimenticia, agrícola, textil, cosmética y farmacéutica, debido a que sintetizan y acumulan metabolitos secundarios utilizados como edulcorantes, saborizantes, biocidas, pigmentos y medicamentos, propiedades utilizadas desde hace más de 20,000 años. El aprovechamiento y manejo del conocimiento de las estrategias químicas de supervivencia de las plantas desarrolladas al interactuar con los microorganismos y predadores ha demostrado la potencialidad de esta fuente natural para encontrar nuevas moléculas con actividades bactericidas, fungicidas e insecticidas. Asimismo, el análisis farmacológico ha permitido validar aquellas plantas que la tradición ha utilizado en base al método de ensayo y error, demostrándose su eficacia, aunque otras han resultado ser inocuas y otras más, potencialmente peligrosas (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

Un número reducido de especies vegetales ha sido estudiado como fuente de fungicidas, aproximadamente medio millón de plantas con flores no han sido investigadas y sus principios activos podrían ser decisivos en el control de las enfermedades actuales o futuras causadas por hongos. Sin embargo, un número pequeño de sustancias vegetales se han utilizado en la medicina moderna debido al descubrimiento de los antibióticos fúngicos en los años 50's del siglo pasado y la obtención de fungicidas por síntesis química (Grainge y Ahmed 1988).

De las 30,000 especies de plantas con flor conocidas, cerca de 5,000 son utilizadas en la medicina tradicional mexicana (Lozoya, 1999); el estudio de ellas es hasta la fecha un factor importante para la investigación y el desarrollo de fármacos. Las plantas representan una fuente importante de productos químicos que se generan durante su ciclo de vida, algunos de los cuales son producidos por la actividad metabólica de un estadio específico. Las plantas contienen elementos activos (fitoalexinas, quitinasas, β -glucanasas, proteinasas, péptidos antimicrobianos, etc.)

que las protegen de los insectos, hongos, bacterias y otros parásitos, así como de los rayos ultravioleta del sol y cumplen con diversas funciones dentro del ciclo de vida de la planta. Muchos de estos componentes, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre. A nivel químico, a los productos vegetales empleados en diversas industrias como materia prima se les conoce como “metabolitos secundarios” y se refiere a todos aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento, desarrollo o reproducción del mismo, generalmente se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros o especies particulares. Fue Kossel en el año de 1891 quien por primera vez los llamó de esta manera y comprenden un grupo molecular químicamente diverso (Cuadro 1).

La distribución de los metabolitos secundarios en las plantas puede variar ampliamente entre especies y puede ocurrir que sólo se les encuentre en una de ellas en particular o en algunas pocas que estén relacionadas (Phillipson, 1990; Rhodes, 1994; Wink, 1999).

Los metabolitos de plantas y microorganismos conforman un inmenso reservorio de diversidad química natural. Las estructuras de más de 200,000 metabolitos secundarios han sido dilucidadas, han proveído una enorme diversidad de esqueletos de carbono únicos y modificaciones de grupos funcionales que han generado interés en la industria farmacéutica, agroquímica, etc. (Swaminathan, 1998; Hartmann, 2005), que han liberado para su comercio fármacos, agroquímicos, saborizantes, conservadores y pesticidas (Balandrin, 1988). La búsqueda de nuevos compuestos eco-amigables derivados de plantas, es una prioridad actual y futura, debido a la tendencia de buscar la conservación sustentable y la utilización racional de la biodiversidad (Cordero, 2002).

Al mismo tiempo, existe un incesante esfuerzo por contar con alternativas aficientes de producción industrial de compuestos bioactivos obtenidos de plantas así como suplementos para la agricultura tradicional y alimenticios (Ramachandra, 2002).

Cuadro 1. Clasificación de metabolitos secundarios.

TIPO DE COMPUESTO	EJEMPLO GENERAL DE UN GRUPO	REFERENCIA
Derivados del ácido cinámico	Acido salicílico, ácido cafeico	Gutiérrez, 2002
Cumarinas	Esculetina	Cuca <i>et al.</i> , 2006
Fenoles simples, derivados del ácido benzoico, ácido gálico, ácido protocatequínico y fluoroglucinoles	Hidroquinona, ácido vanillico	Ruiz, 2005
Flavonoides	Quercetina	Hollman <i>et al.</i> , 1997
Taninos hidrolizados y condensados	Acido tánico, ácido gálico	Kalola y Shah, 2006
Terpenoides y esteroides	Cariofileno, β -sitosterol	Kalola y Shah, 2006
Ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena larga, aldehídos alifáticos y cetonas	Ácido benzoico	Bourgaud <i>et al.</i> , 2001
Lactonas	Lactucocina	
Ácidos grasos	Schizonellina, palmitato de retinilo	Brizuela <i>et al.</i> , 1998
Naftoquinonas, antraquinonas y quinonas simples	Juglona	
Aminoácidos y proteínas	Gramicidina S, creatina	Bourgaud <i>et al.</i> , 2001
Alcaloides y cianhidrinas	Colchicina, amigdalina	Waterman, 2002
Sulfuros y glicósidos	Tiofenos, rutina	Waterman, 2002
Purinas y nucleósidos	Dirimida	Bourgaud <i>et al.</i> , 2001

Dentro de las opciones de producción, se tiene el cultivo de células en suspensión, el cual permite el cultivo a gran escala de células vegetales, donde los metabolitos pueden ser extraídos del medio. Las mayores ventajas de contar con un sistema de cultivo celular sobre los cultivos convencionales de las plantas son: los compuestos pueden ser producidos en condiciones controladas, independientemente de los cambios climáticos o las condiciones del suelo, los cultivos celulares pueden estar exentos de microbios e insectos, se puede facilitar la producción de metabolitos

específicos de cualquier planta (tropical, alpina, del desierto, etc.), así como la reducción de costos al lograr el control automatizado del crecimiento celular y la regulación racional de los procesos metabólicos (Giri, 2000).

La producción de metabolitos secundarios puede aumentar o disminuir según el estadio del ciclo de vida o por factores abióticos que incluyen el cambio de estaciones, niveles de macro y micronutrientes, estrés osmótico (sequía y salinidad) y la intensidad de la luz. Al parecer, los compuestos fenólicos están relacionados con la luz, los compuestos aromáticos contra la sequía así como contra la excesiva incidencia de la luz *uv*, otros actúan como antioxidantes que contrarrestan a los radicales libres, etc. (Waterman, 1992). Entre los factores bióticos se encuentran los patógenos, las plagas y los estados fisiológicos de competencia, como la colonización del hábitat.

El análisis bioquímico de los metabolitos secundarios es complicado ya que es el resultado de la integración de diferentes disciplinas como la química, botánica, microbiología, bioquímica y farmacología e involucra técnicas de análisis tanto tradicionales como modernas. Cuando los compuestos son aislados, purificados e identificados y su actividad biológica es comprobada, pueden utilizarse en la medicina herbolaria tradicional o bien, en la medicina alópata para su uso en animales y humanos (Anaya *et al.*, 2000).

El conocimiento etnobotánico está fuertemente enlazado a un factor cultural y constituye un indicador particular de la respuesta del hombre a la enfermedad. Durante los trabajos realizados en estas áreas, se han identificado metabolitos con actividades farmacológicas, principalmente para tratar enfermedades cardíacas, del sistema nervioso central y contra el cáncer. También se han enfocado a enfermedades gastrointestinales y dérmicas, entre otras, provocadas por microorganismos como bacterias, protozoarios, virus y hongos, agentes causantes del cólera, amibiasis, herpes y pie de atleta, respectivamente, principalmente en el

humano, así como de enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Hersch, 1999).

Aún en los países industrializados, el uso de remedios botánicos está aumentando de manera sorprendente. En 1990, el 2.5% de los estadounidenses adquirió remedios del tipo herbolario, incrementándose en 1997 al 12.1%. Las plantas han contribuido al desarrollo del 25 al 50% de todos los fármacos que se recetan en EUA, ya sea que se extraigan directamente de ellas o que sirvan para crear modelos bioquímicos o plantillas para elaborar compuestos sintéticos (Swedlow, 2000).

III.2. ANTIFÚNGICOS

Se definen estos como aquellas sustancias que presentan actividad contra los hongos. Denominándose fungicidas cuando los mata o destruye y fungistáticos cuando detienen el crecimiento de los mismos (Lumbreras *et al.*, 2003)

El antifúngico ideal debe ser de amplio espectro, atóxico para el huésped, con actividad al suministrarlo por diferentes vías, sin resistencia, con una farmacocinética adecuada y de bajo costo. En los antifúngicos comerciales se incluyen a una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación de los antifúngicos se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura química (polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, derivados de la morfolina, piridona, benzofurano, tiocarbamato, etc.), su origen (sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química), su espectro de acción (amplio o restringido), sus mecanismos de acción (fungistáticos o fungicidas), la vía de administración o de empleo sobre el huésped, su toxicidad y su selectividad de acción (Gupta *et al.*, 1993).

El tratamiento de las micosis ha evolucionado de la utilización de los antifúngicos considerados de "primera generación", como los metales pesados, hasta los de "tercera generación", pasando por los antifúngicos de "segunda generación", entre

los que predominan los antifúngicos obtenidos a través de la síntesis química. El uso de antifúngicos para el tratamiento de las infecciones graves e invasoras, queda limitado a las distintas formulaciones de anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina (Cuadro 2) (Perfect, 1990).

III.2.1 ANTIOOMICÉTICO

Se define como aquella sustancia que presenta actividad contra los oomicetos. Para abatir a los oomicetos se utilizan compuestos antifúngicos, lo que ha dificultado su control y erradicación.

III.3. Plantas como fuente de metabolitos con propiedades biocidas

La incidencia de infecciones fúngicas serias en los vertebrados se han incrementado en los últimos 20 años, debido principalmente al aumento de pacientes inmunosuprimidos, al surgimiento de resistencia a las drogas antifúngicas actuales y a la recalcitrancia de las micosis (Jawetz *et al.*, 1992; Carrillo, 2000), considerándose un problema de salud a nivel mundial de todas las edades, pues genera del 5 al 10 % de las consultas dermatológicas (Lumbreras *et al.*, 2003). Los problemas dermatológicos aparecen de manera constante en la mayoría de las unidades de atención médica (García *et al.*, 1993), lo que representa entre el 10 y 15 % de infecciones en hospitales, causando la muerte en los pacientes hospitalizados por invasión fúngica masiva (Maestre *et al.*, 2001)

A nivel nacional, las infecciones respiratorias ocupan el primer lugar, seguida de las infecciones gastrointestinales, parasitosis intestinales y las dermatomicosis; incluso se puede comparar su incidencia y prevalencia de manera similar a la caries dental (Aiello *et al.*, 2006).

Las dermatomicosis más comunes son en piel y mucosas, presentándose en una alta proporción en los trabajadores que laboran en industrias, lo que provoca alteración

Cuadro 2. Antifúngicos y sus características.

GENERACIÓN	ANTIFÚNGICO	ESPECTRO DE ACCIÓN	EFEECTO	ORIGEN	
PRIMERA	Metales pesados (Ag, Hg, Cu)	Intoxicación en los procesos de respiración y metabolismo. Barrera contra la germinación de esporangios y zoosporas.	Fungicida	Sintético	
	Derivados azufrados	Toxicidad por isotiocianatos.	Fungicida	Vegetal	
	Metaloideos	Queratolítico.	Fungicida débil	Sintético	
	Sulfonamidas	Análogos del ácido p amino-benzóico.	Fungistático	Vegetal	
	Flucitocina	Análogo de precursor de ác. nucleico. Inhibidor de la síntesis de pirimidinas.	Fungicida	Sintético	
	Tonalfrato	Bloquea la síntesis del ergosterol al inhibir la epoxidación del escualeno	Fungistático	Sintético	
SEGUNDA	Alil aminas	Bloquean la ruta biosintética del ergosterol a partir de la Ac-CoA, acumulando escualeno.	Fungicida de amplio espectro, a concentraciones bajas	Sintético	
	Azoles	Impiden la síntesis del ergosterol, inhibiendo la enzima lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P ₄₅₀ .	Fungistáticos a dosis bajas y fungicidas a dosis altas	Sintético	
	Benzofuranos	Inhibidor mitótico, pueden también influir sobre la replicación del ADN y afecta a la producción de quitina de la pared, como la griseofulvina.	Fungistático	Fúngico (<i>Penicillium</i>)	
	Lipopéptidos	Altera la membrana celular hasta la lisis.	Fungicida	Fúngico (<i>Streptomyces</i>)	
	Derivados de Morfolina	Inhibición de la síntesis de esteroides, modificando la permeabilidad de la membrana. Inhibe la formación de la membrana celular en oomicetos.	Fungicida	Sintético	
	Piridona	Depleción de electrólitos en la célula fúngica y una reducción en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas	Amplio espectro Fungistático	Sintético	
	Polienos	Unión al ergosterol de la membrana fúngica, alterando la permeabilidad, se pierde K ⁺ , azúcares y otros metabolitos al formar canales iónicos.	Fungistáticos a bajas conc. y fungicidas a altas concentraciones	Fúngico (<i>Streptomyces</i> spp)	
	TERCERA	Tetraconazol	Inhiben la síntesis de los esteroides, inhibidores de la 14 - α - lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P ₄₅₀ . Inhibidor de la desmetilación.	Fungicida	Sintético y semisintético
		Estrobilurina	Interfieren en la respiración mitocondrial.	Fungicida	Sintético

Modificado de Kauffman y Carver, 1997; Lumbreras et al., 2003

en el autoestima y confianza en sí mismos, estado de violencia, malestar y frustración, generando incluso aislamiento social (Palacios *et al.*, 2005).

Se han identificado a los géneros *Candida*, *Pityrosporum*, *Malassezia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Trichosporum* y *Microsporum*, como los principales agentes patógenos (Carrillo, 2004).

En cuanto a las micosis vegetales, éstas se han incrementado últimamente en un 13%, ya sea atacando a los cultivos o bien, a los alimentos almacenados. En México se pierde entre el 10 y 30 % de los granos almacenados derivado del ataque por hongos (Gladstone, 2002).

Lo anterior lo generó el abuso de fungicidas sintéticos provocando varios impactos: uno de importancia ambiental, al generar contaminación en suelo, aire y agua inducido por los residuos de éstos o sus derivados; otro de salud, ocasionando que el 10 % de la población sufra de algún tipo de enfermedad crónica ya sea por contacto directo o por consumo de estos compuestos al ingerir los alimentos contaminados; otro de carácter biológico, pues se han hecho inmunes a los fungicidas por lo menos 100 especies de hongos; y otro más que se refiere al impacto económico, generado por el punto anterior, ya que la resistencia a fungicidas promueve el uso de concentraciones más altas de estos para fumigar y por tanto, elevando los costos de producción.

Para contrarrestar los problemas mencionados, el ser humano ha buscado en la naturaleza sustancias útiles para aliviar y curar enfermedades. Es una búsqueda continua y sigue en auge la explotación de microorganismos, hongos, plantas y animales terrestres y/o acuáticos que contengan moléculas activas prometedoras para desarrollarlas directa o indirectamente como fármacos (Farnsworth, 1990).

En la actualidad, a nivel mundial son por lo menos unos 120 metabolitos derivados de plantas los que se prescriben como medicamentos. Algunos ejemplos de las plantas fuente de estos metabolitos se muestran a continuación en el Cuadro 3 (Taylor, 2000).

Además, las plantas poseen metabolitos con acción antimicrobiana y cuyos principios activos han demostrado tener efecto bactericida y fungicida. Bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) son inhibidas por el uso de diferentes tipos de extractos (acuosos, etanólicos, metanólicos, etc.) y de diversas partes de la planta (hojas, tallos, corteza, flores, raíces, etc.) (Cuadro 4). Desde el siglo XIX se han reportado cientos de plantas potencialmente antibacterianas, ejemplos de ellas son *Blumea ariantha*, *Piper nigrum* y *Zanthoxillum alatum* (Covián y Salgado-Garciglia, 1999). También se ha demostrado el efecto inhibitorio de este tipo de compuestos contra hongos patógenos de humanos y de plantas.

Desde los años 60's del siglo veinte se han reportado sustancias producidas por las plantas con alto potencial antifúngico: Maruzzella (1963) probó cerca de 119 aceites esenciales de origen vegetal, de los cuales 59 fueron efectivos contra hongos. Tokin (1960) reportó el poder antibiótico de extractos de cebolla, ajo y otras plantas, Magboul *et al.* (1977) y otros grupos de investigación han demostrado que los dermatofitos y otros hongos patógenos son sensibles a compuestos producidos por las plantas, como a las sesquiterpen-lactonas presentes como principio activo en plantas de la familia Asteraceae. Son muchos los trabajos con plantas de la familia Asteraceae que indican su efecto contra hongos patógenos aunque las más importantes pertenecen a los géneros *Achillea*, *Ageratum*, *Artemisia*, *Aster*, *Blumea*, *Caesulia*, *Centaurea*, *Crepis*, *Inula*, *Parthenium*, *Pentanema*, *Solidago*, *Tagetes* y *Tanacetum*.

Ejemplo de este tipo de plantas con gran potencial en la medicina son algunos integrantes de la familia Asteraceae (=Compositae), que poseen importancia en la medicina tradicional, aunque plantas de otras 50 familias tienen características

antifúngicas destacando la familias Fabaceae y Brassicaceae (Lima *et al.*, 1993, Mares *et al.*, 1993; Maatooq y Hoffmann, 1996).

Cuadro 3. Algunos de los principios activos derivados de plantas utilizados en la medicina mundial.

PRINCIPIO ACTIVO	ACCIÓN/USO CLÍNICO	FUENTE VEGETAL
Agrimofol	Antihelmíntico	<i>Agrimonia eupatoria</i>
Ajmalicina	Desórdenes circulatorios	<i>Rauvolfia serpentina</i>
Anisodamina	Anticolinérgico	<i>Anisodus tanguticus</i>
Bergenina	Antitusivo	<i>Ardisia japonica</i>
Camptotecina	Anticanceroso	<i>Camptotheca acuminata</i>
Cocaína	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i>
Colchicina	Agente antitumoral, anti-gota	<i>Colchicum autumnale</i>
Curcumina	Anticolesterol	<i>Curcuma longa</i>
L-Dopa	Agente anti-Parkinson	<i>Mucuna sp</i>
Digitalina, Digitoxina o Digoxina	Cardiotónico	<i>Digitalis purpurea</i>
Ácido Kaibico	Ascaricida	<i>Digenea simplex</i>
Kheltina	Broncodilatador	<i>Ammi visaga</i>
Ácido Nordihidroguaiarético	Antioxidante	<i>Larrea divaricata</i>
Quinina	Antimalárico, antipirético	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Reserpina	Antihipertensivo, tranquilizante	<i>Rauvolfia serpentina</i>
Silymarina	Antihepatotóxico	<i>Silybum marianum</i>
Taxol	Antitumoral	<i>Taxus brevifolia</i>
Timol	Antifúngico	<i>Thymus vulgaris</i>
Vinblastina Vincristina	Antitumoral o antileucémico	<i>Catharanthus roseus</i>
Yuanhuadina	Abortivo	<i>Daphne genkwa</i>

(Modificado de Taylor, 2000).

En plantas de la familia Asteraceae se han encontrado compuestos con propiedades biocidas, generalmente sesquiterpen-lactonas, flavonoides y alcaloides (Domínguez, 1985); incluso se ha reportado que el 28% de las plantas empleadas en la medicina tradicional por los Mayas Tzetzales, pertenecen a esta familia (Sepp, 2001).

Cuadro 4. Especies vegetales como fuente de compuestos con actividad antibacteriana.

PRINCIPIO ACTIVO	BACTERIAS	FUENTE VEGETAL	REFERENCIA
Eugenol	Gram (+) y Gram (-)	<i>Ocimum gratissimum</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1999
Aceites esenciales	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Piper regnellii</i>	Barbieri <i>et al.</i> , 2002
β -Sitosterol Peróxido de ergosterol	<i>S. aureus</i>	<i>Prasium major</i>	Mahjoun <i>et al.</i> , 2002
Polifenoles	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Salmonella typhi</i> B <i>S. aureus</i>	<i>Sida acuta</i>	Karou <i>et al.</i> , 2005
Flavonoides	<i>S. aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Combretum woodii</i>	Eloff <i>et al.</i> , 2005
Cumarinas Xanthonas	<i>S. aureus</i>	<i>Haematoxylum brasiletto</i> H. Karst.	Yasunaka <i>et al.</i> , 2005
Catecol 2-hidroxi-bencil alcohol	<i>S. aureus</i> <i>S. typhi</i> <i>E. coli</i>	<i>Salix capensis</i>	Masika <i>et al.</i> , 2005
Taxifilina	<i>S. aureus</i>	<i>Salsola tetrandra</i>	Habib <i>et al.</i> , 2006

III.3.1. Metabolitos secundarios vegetales contra hongos que afectan la salud humana.

Las enfermedades más importantes causadas por hongos en el ser humano son las dermatomicosis, micosis superficiales, micosis subcutáneas y profundas. Éstas son ocasionadas por hongos conocidos tales como *Trichophyton rubrum* (Ascomycetes), *Candida albicans* (Basidiomycetes), *Sporothrix schenckii* (Ascomycetes), *Cryptococcus* sp y *Aspergillus* sp que afectan la piel, tejido subcutáneo y órganos internos como pulmón, huesos, articulaciones, músculos o tracto genitourinario. En la actualidad se han detectado nuevos patógenos, entre ellos a levaduras oportunistas (*Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *Saccharomyces* sp y *Rhodotorula* sp), Hyalohyphomycetes como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Scopulariopsis*; especies de Zygomycetes como *Absidia*, *Mucor* y *Rhizomucor*, Phaeohyphomycetes como *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Pneumocystis carinii*; y otros capaces de causar sinusitis, infecciones cutáneas, endoftalmitis, neumonía y micosis rinocerebral (Jawets *et al.*, 2002).

Los metabolitos vegetales como vernolepina, vernodalina, taraxasterol, parteniol, gayuolona, artemisinina y algunas flavonas, han mostrado toxicidad contra *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Candida albicans*, así como para dermatofitos (Tan *et al.*, 1998). Zheng y col. (1996) probaron el efecto antifúngico de flavonas aisladas de *Artemisia giraldi* contra *Aspergillus flavus* y *T. viride*. *Artemisia mexicana* posee fuerte actividad antifúngica contra *C. albicans* (Navarro-García *et al.*, 2003); las sesquiterpen lactonas de *Vernonia amydalina* inhiben el crecimiento de *A. niger* y *C. albicans* (Al Magboul *et al.*, 1997); extractos de *Rhubarb* son efectivos contra especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton* (Itsuo, 1985). Otros extractos de plantas se reportan también como fuente de metabolitos contra hongos que afectan la salud humana (Cuadro 5). Incluso se ha reportado que los extractos vegetales de algunas plantas potencian el efecto de los fungicidas químicamente sintetizados (Giordani *et al.*, 2004).

Cuadro 5. Especie vegetal y principio activo contra hongos que afectan la salud humana.

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	HONGO	REFERENCIA
<i>Artemisia absinthium</i>	Tujona	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus niger</i>	Kaul <i>et al.</i> 1976
<i>Vernonia amygdalina</i>	Vernolepina Vernodalina Taraxasterol	<i>Candida albicans</i> <i>A. niger</i> <i>C. albicans</i>	Magboul <i>et al.</i> 1977 Magboul <i>et al.</i> 1977 Villarreal <i>et al.</i> 1994
<i>Ageratum conyzoides</i>	Aceites esenciales	<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporium canis</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Singh <i>et al.</i> 1986
	Protoanemonina	<i>E. floccosum</i>	Mares 1987
<i>Solidago virgaurea</i>	Triterpenoides	<i>C. albicans</i>	Bader <i>et al.</i> 1990
<i>Achillea fragrantissima</i>	Terpinenol	<i>C. albicans</i>	Barel <i>et al.</i> 1991
<i>Parthenium argentatum</i> x <i>P. tomentosa</i>	Parteniol Guayulona	<i>A. niger</i>	Maatooq y Hoffmann 1996
<i>Artemisia giraldii</i>	Flavonas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Trichoderma viride</i>	Zheng <i>et al.</i> 1996
<i>Pelargonium graveolens</i>	Clorotalonilo	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Kalra y Parameswaran 1998
<i>Tagetes erecta</i>	Aceite esencial	<i>T. mentagrophytes</i>	Rai y Acharya 1999
<i>Richardia brasiliensis</i>	Taninos	<i>C. albicans</i> <i>E. floccosum</i> <i>Trichophyton verrucosum.</i>	Adekunle 2000
<i>Tribulus terrestris</i>	Espirostanol	<i>C. albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Bedir <i>et al.</i> 2000
<i>Oxalis erythrorhiza</i>	3-Heptadecil-5- metoxi-fenol	<i>Microsporium canis</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	Feresin <i>et al.</i> 2003
<i>Azadirachta indica</i>	Triterpenos Azadiractina	<i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>Microsporium nanum</i>	Natarajan <i>et al.</i> 2003
<i>Citrus bergamia</i>	Bergaptene Limoneno	<i>Candida</i> spp	Romano <i>et al.</i> 2004
<i>Drimys brasiliensis</i>	Sesquiterpen drimanos	<i>E. floccosum</i> <i>T. rubrum</i>	Malheiros <i>et al.</i> 2005
<i>Piper regnellii</i>	Conocarpano	<i>C. albicans</i>	Pessini <i>et al.</i> 2005
<i>Camellia sinensis</i>	Epicatequin-3- O-galato (ECG)	<i>Candida glabrata</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>	Turchetti <i>et al.</i> 2005

III.3.2. Metabolitos secundarios vegetales contra hongos y oomicetos que afectan la agricultura

Las enfermedades vegetales producidas por hongos son causa de pérdidas económicas en la agricultura. Se han descrito unas doscientas especies entre hongos y oomicetos como patógenos causantes de enfermedades importantes de los cultivos. Éstas pertenecen principalmente a diez géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*) (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001). Para su control, consumen la mayor parte de los fungicidas utilizados en todo el mundo y actualmente existen más de trescientos productos químicos que se utilizan para la formulación de fungicidas.

El número de principios activos se incrementa cada año debido a la investigación incesante en este campo. En la mayor parte de los casos, la acción de los fungicidas es principalmente preventiva, siendo efectivos cuando la infección comienza y las hifas aún no han penetrado los tejidos de las plantas. Los fungicidas preventivos no son absorbidos apreciablemente por la cutícula de la planta y no son transportados al interior de la planta, mientras que los fungicidas sistémicos o quimioterapéuticos vegetales de última generación los absorbe la planta a través de la raíz, las hojas o las semillas (Rai *et al.*, 2003).

Contra los hongos fitopatógenos también se han utilizado los triazoles como el tetraconazol, un fungicida de última generación. Sin embargo, los más ampliamente consumidos son los bencenos sustituidos, tiocarbamatos, etilen-bis-ditiocarbamatos, tioftalimidias, benomilo, cicloheximida, triforina y compuestos organometálicos de cobre, mercurio, estaño y cadmio. Todos ellos presentan grandes desventajas debido a su fitotoxicidad, zootoxicidad y gran capacidad de contaminación ambiental (Emmett y Mars, 1973).

Algunos metabolitos producidos por las plantas han sido aplicados con éxito en el control de algunos hongos fitopatógenos. Por ejemplo, el anetol extraído de las semillas de *Pimpinella anisum* (Umbelliferae) ha mostrado actividad antifúngica en contra de *A. niger*, al aplicarse con otro compuesto descrito como un sesquiterpeno dialdehído poligodial, aislado de diversas plantas. Esto es un ejemplo de sinergismo, en donde el efecto antifúngico se ve aumentado con dos o más compuestos (Kubo y Himejima, 1991). También se han aislado dos isoflavonoides, la colutequinona y la colutehidroquinona de la corteza de las raíces de *Colutea arborescens*, que fueron probados contra hongos del género *Aspergillus* sp, donde se observó la actividad antifúngica contra 38 cepas de hongos. Este hongo también fue sensible al niasol, compuesto obtenido de *Anemarrhena asphodeloides* (Grosvenor y Gray, 1996; Lida *et al.*, 1999). Formulaciones comerciales de extractos y aceites esenciales comerciales de *Cassia* sp. mezclado con extractos de *Capsicum* sp./*Sinapis* sp., cuando fueron aplicados en suelo mostraron actividad antifúngica contra el hongo de la marchitez *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Bowers y Locke, 2000). Otros reportes indican un efecto fungitóxico de extractos vegetales contra *Alternaria*, *Aspergillus* spp, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp, *Helminthosporium oryzae*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, entre muchos otros (Cuadro 6). Recientemente se ha demostrado que algunos de los productos derivados de plantas que se aplican en la agricultura, contienen sustancias activas compatibles con el medio ambiente y son inocuos para el hombre, ya que no dejan residuos ni generan ninguna toxicidad para el ser humano. Ejemplo de ello son la lecitina de soya que contiene fosfatidilcolina y un lípido fungistático y la harina de neem (*Azadirachta indica*), un producto de acción sistémica que ha demostrado su eficacia como preventivo y controlador de hongos de suelo como *Ospidium*, *Phytophthora*, etc. y de la parte aérea de las plantas tales como Mildiú, Moho Blanco, etc. (Navarro *et al.*, 1996).

Cuadro 6. Antifúngicos de origen vegetal usados contra hongos y oomicetos fitopatógenos.

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	ORGANISMO BLANCO	REFERENCIA
<i>Lawsonia inermis</i>	Lawsona	<i>Helminthosporium oryzae</i>	Natarajan y Lalithakumari 1987
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Emodin	<i>Fusarium</i> spp	Herger <i>et al.</i> 1988
<i>Wedelia biflora</i>	Ac. metilkaurenoico	<i>Pythium ultimum</i>	Miles <i>et al.</i> 1991
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Terpenoides Partenina	<i>Aspergillus</i> sp <i>Sclerotium rolfii</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Helminthosporium maydis</i>	Ganeshan y Jayachandra 1993
<i>Ananas comosus</i> var. Cayenne	Ácidos cinámico p-Pumárico Ferúlico	<i>Pythium</i> sp	Tawata <i>et al.</i> 1996
<i>Chrysanthemum coronarium</i> var. <i>spatiosum</i>	Crisancorina	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Physalospora piricola</i>	Wang <i>et al.</i> 2001
<i>Holmskioldia sanguinea</i>	Wogonina	<i>B. cinerea</i>	Pal <i>et al.</i> 2003
<i>Curcuma longa</i>	Etil p-metoxi Cinamato	<i>H. oryzae</i>	Harish <i>et al.</i> 2004
<i>Ageratum conizoides</i>	Cromenos	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>S. rolfii</i> <i>Fusarium</i> spp	Iqbal <i>et al.</i> 2004
<i>Clytostoma ramentaceum</i>	Ác. Ursólico	<i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Rocha <i>et al.</i> 2004
<i>Ruta graveolens</i>	Epóxido de Rutacridona	<i>Colletotrichum fragariae</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>C. acutatum</i> <i>B. cinerea</i> <i>F. oxysporum</i>	Meepagala <i>et al.</i> 2005
<i>Zingiber officinale</i>	Extracto acuoso	<i>F. oxysporum</i> <i>A. niger</i>	Okigbo y Nmeka 2005

IV. ANTECEDENTES

IV. 1. IMPORTANCIA DE LA BÚSQUEDA DE ANTIFÚNGICOS VEGETALES

Los trabajos reportados en los últimos años sobre antifúngicos son una muestra clara del interés continuo por la búsqueda de nuevos y mejores antifúngicos. Según la base de datos Agrícola (2006), existen 4,431 reportes sobre trabajos de antifúngicos, de los cuales 2,342 se publicaron en el periodo de 1996 al 2006, los cuales en promedio han ido en aumento, incluso en el 2005 hay un repunte derivado probablemente del interés de países como India y China por patentar y comercializar extractos; sin embargo, esto no ha logrado eliminar o disminuir el problema de las micosis o enfermedades causadas por oomicetos (Fig. 1).

Actualmente, el número de antifúngicos comerciales es mínimo, resultando insuficiente para la diversidad de patógenos, lo que representa y formaliza la prioridad en la búsqueda de mejores y más efectivos biocidas que erradiquen a organismos nocivos.

Las enfermedades producidas por hongos afectan directamente la salud de los seres vivos e indirectamente al medio ambiente, a los alimentos, e incluso a la economía, entre otros. El uso indiscriminado de fungicidas en la agricultura, por ejemplo, ha traído como consecuencia, además de las alteraciones ecológicas, compuestos químicos residuales que son perjudiciales para el hombre. Los estudios indican que estos productos químicos sintéticos provocan mayor actividad carcinogénica que los insecticidas y herbicidas utilizados frecuentemente en la agricultura (Wilson y Wisniewski, 1994).

En base a lo anteriormente expuesto, una alternativa prometedora es el uso de productos naturales derivados de las plantas. La gran biodiversidad de flora en nuestro país es un factor a considerar en la búsqueda de nuevos fármacos, pues el número de trabajos fitoquímicos realizados para identificar, purificar y probar metabolitos vegetales con actividades fungicidas no satisface las demandas que

se requieren. Hasta hoy en día, la continua búsqueda de compuestos químicos con actividades farmacológicas potentes contra hongos patógenos es insuficiente, al considerar la totalidad de plantas medicinales utilizadas por la población, y representa una prioridad económica para la sociedad y de bienestar del hombre y su entorno.

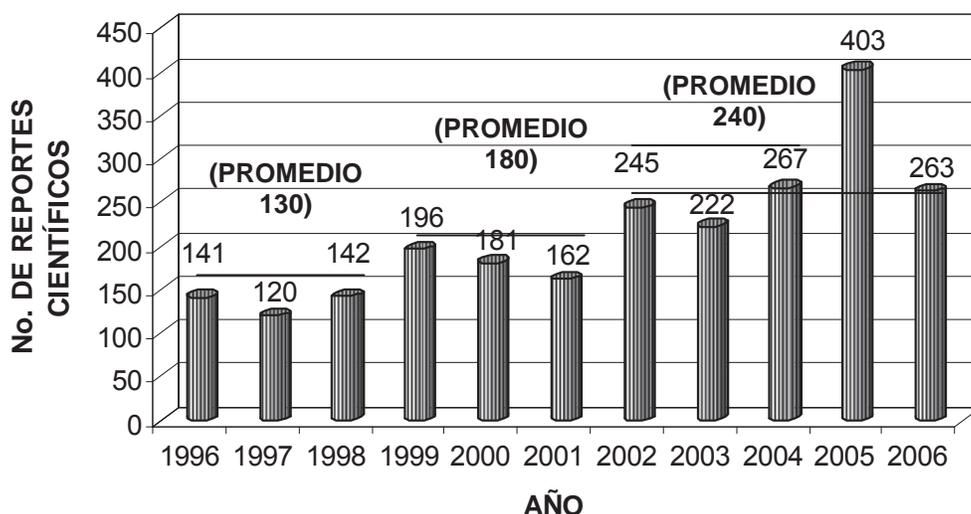


Figura 1. Reportes científicos relacionados con actividades antifúngicas en los últimos 10 años (Base de datos Agrícola, 2006).

Las cifras de las citas bibliográficas al respecto (por ejemplo, en Agrícola), no manifiestan que la disminución o variabilidad de antifúngicos corresponde a la erradicación de hongos patógenos, sino a la dificultad para obtener metabolitos activos, identificados y puros a partir de extractos obtenidos de diferentes partes de la planta en diversas especies con propiedades biocidas, así como a la recalcitrancia y resistencia de los patógenos.

El conocimiento de los vegetales a nivel químico, ha llevado a dilucidar la estructura de aproximadamente 20,000 metabolitos secundarios y se calcula que podrían ser alrededor de 400,000 (Swaminathan, 1998). Un indicador de que no se han encontrado alternativas a los antifúngicos convencionales, ha motivado la búsqueda de un antifúngico ideal para la época actual.

IV.2. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

El hombre ha encontrado que las plantas el alivio para un sinnúmero de enfermedades, hechos se han registrado en textos antiguos en diferentes culturas, incluyendo a las mesoamericanas. La ciencia moderna, en lo general, se ha concretado a aplicar métodos modernos de investigación para comprobar en una multitud de casos las propiedades que los indígenas ya habían encontrado de un modo empírico en las plantas.

México tiene una ubicación privilegiada sobre la superficie terrestre y es puente entre dos subcontinentes, su orografía y sus extensas costas contienen una diversidad y condiciones ecológicas únicas, que albergan a gran número de especies vegetales. Se ha hecho un esfuerzo importante para aumentar los inventarios florísticos, los estudios ecológicos, botánicos y aplicaciones útiles de la flora y con todos ellos se ha calculado que en el país existen más de 20,000 especies vegetales. Se estima que la flora de México contiene entre 3,000 y 5,000 plantas con alto potencial medicinal (Argueta, 1994; Lozoya 1994; Martínez, 1994).

La medicina moderna comenzó a practicarse recientemente en muchas de las zonas rurales mexicanas, en donde sus habitantes rara vez disponen de recursos económicos para pagar fármacos modernos y caros. Por eso, la población continúa confiando en las plantas medicinales de la región y de otras fuentes de la medicina tradicional. El conocimiento de estos aspectos farmacológicos y clínicos de la cultura autóctona mexicana, constituye una fuente importante de información de posibles nuevos agentes activos medicinales (Robinson y López, 1999). Se estima que el 85% de la población de México recurre a las plantas tanto con fines medicinales como ingredientes de alimentos. En Pakistán, se estima que el 80 % de sus habitantes depende de las plantas medicinales para curarse, mientras que en China, el 40 % recurre al mismo recurso. Aún en países tecnológicamente avanzados como los EUA se estima que un 60% de la población utiliza

habitualmente plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, mientras que en Japón existe una demanda mayor de plantas medicinales que de medicinas de patente, interpretándose que el uso de las plantas medicinales son un recurso de salud independiente del desarrollo tecnológico del país (Sarukhán 1995).

Un total de 3,000 especies son empleadas por aproximadamente 62 grupos étnicos mexicanos, pero sólo el 1% de estas plantas se han estudiado exhaustivamente, del resto de plantas se desconocen sus principios activos y los posibles beneficios en la salud humana y en la agricultura (Argueta, 1994). Se han encontrado numerosas especies de plantas mexicanas que contienen metabolitos antifúngicos, destacando las que pertenecen a la familia Asteraceae, Labiatae, Fabaceae y Brassicaceae, que han sido analizadas y se ha determinado cuáles son sus principios activos antifúngicos (Cuadro 7).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado el efecto fungicida de la mezcla de los metabolitos secundarios afinina, decatrienato de bornilo [sintetizados en las raíces de *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake (chilcuague)], y epóxido de timol [metabolito acumulado en flores de *Helenium mexicanum* H.B.K. (cabezona)]. En bioensayos *in vitro*, la mezcla inhibió el desarrollo del hongo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, con lo cual se propuso a estos metabolitos para utilizarse como antifúngicos en plantas de frijol (Covián y Salgado-Garciglia, 1999; Loeza *et al.* 2000) (Cuadro 7).

En la búsqueda de metabolitos secundarios con potencial antifúngico contra hongos patógenos de plantas y animales y contra oomicetos de plantas, este trabajo está enfocado en la obtención de compuestos antifúngicos y antioomicéticos de origen vegetal, específicamente en plantas endémicas utilizadas en la medicina tradicional mexicana del Centro y Occidente de nuestro país.

Cuadro 7. Algunas plantas mexicanas con propiedades antifúngicas y antioomiceto.

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	HONGO	REFERENCIA
<i>Asclepias curassavica</i>	Terpenos Cardenólidos	<i>Candida albicans</i>	Moulin-Traffort <i>et al.</i> , 1990
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Terpenos	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pare <i>et al.</i> , 1993
<i>Heliopsis longipes</i>	Afinina	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Molina y García Chávez 2000; Covián y Salgado-Garciglia 1999; Loeza <i>et al.</i> , 2000
<i>Persea americana</i> Mill.	(E,Z,Z)-1-Acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-5,12,15-trieno	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Domergue <i>et al.</i> , 2000
<i>Flourensia cernua</i> <i>Origanum majorana</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Aceites esenciales	<i>R. solani</i> <i>Phytophthora infestans</i>	Gamboa-Alvarado <i>et al.</i> , 2003
<i>Eupatorium aschenbornianum</i>	Benzofuranos	<i>Tricophyton mentagrophytes</i> <i>Tricophyton rubrum</i>	Ríos <i>et al.</i> , 2003
<i>Larrea tridentata</i>	Resina	<i>Pythium</i> sp	Lira-Saldívar <i>et al.</i> , 2003
<i>Tagetes lucida</i>	6,7-dimetoxi-4-metilcumarina Escoparona	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium sporotrichum</i> <i>R. solani</i>	Céspedes <i>et al.</i> , 2006

En base a lo anterior, nuestro grupo de trabajo seleccionó cuatro especies de la región centro occidente del país [*Artemisia ludoviciana* Nutt. (estafiate), *Heliopsis longipes* A. Gray Blake (chilcuague), *Tagetes lucida* Cav. (santa maría) y *Satureja macrostema* Benth. Briq. (nurite)], por sus antecedentes de uso amplio en la medicina tradicional en la región y debido a que se desconocen sus propiedades antifúngicas o antioomiceto, a excepción de chilcuague, de la cual se han determinado sus efectos antifúngicos (Trinidad, 1998; Morales-López *et al.*, 2000; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000).

A continuación se describen las características botánicas, propiedades medicinales, efecto biocida y algunos de los metabolitos principales que constituyen ciertos tipos de extractos de estas plantas.

IV.2.1. *Artemisia ludoviciana* Nutt. (estafiate)

Artemisia ludoviciana Nutt., es de la familia Asteraceae y pertenece a uno de los géneros (*Artemisia*) con el mayor número de especies y más ampliamente distribuido en el mundo, de los 60 géneros comprendidos en la familia Asteraceae. Este género con cerca de 300 especies se encuentra sobre todo en el hemisferio norte, en zonas áridas e incluso salinas y debe su nombre a la Diosa griega Artemisa (Esteban *et al.*, 1986).

Artemisia ludoviciana es conocida comúnmente como estafiate, ajeno, artemisia, altamira, estomiate, istafiate, ambf (otomí), iztauhyatl (náhuatl), ro'sabl'i (rarámuri), kamaistra (popoloca), zizim (maya) o bien como xukurrhi kameri (purépecha); es una planta herbácea perenne, aterciopelada, cuyas hojas pinnatisectadas tienen entre 5 y 7 lóbulos con una incisión profunda, serradas de color verde oscuro casi sin pelo en la superficie superior y en el envés plateado y aterciopelado (Fig. 2A). Las flores son café amarillentas o púrpuras de sabor amargo y aromático al estrujarse; son plantas de hasta 1.5 m de alto, tallos generalmente varios a muchos partiendo generalmente de una base rizomatosa (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

La especie es de hábito terrestre, crece en asociación con encinos, coníferas y otras latifoliadas, se desarrolla en un rango altitudinal de 1500 a 2800 msnm. Planta originaria de EUA, México y Guatemala, habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. Crece a orillas de caminos y en terrenos de cultivo abandonados. Florece de septiembre a diciembre (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Bello, 1998) (Figura 2A).

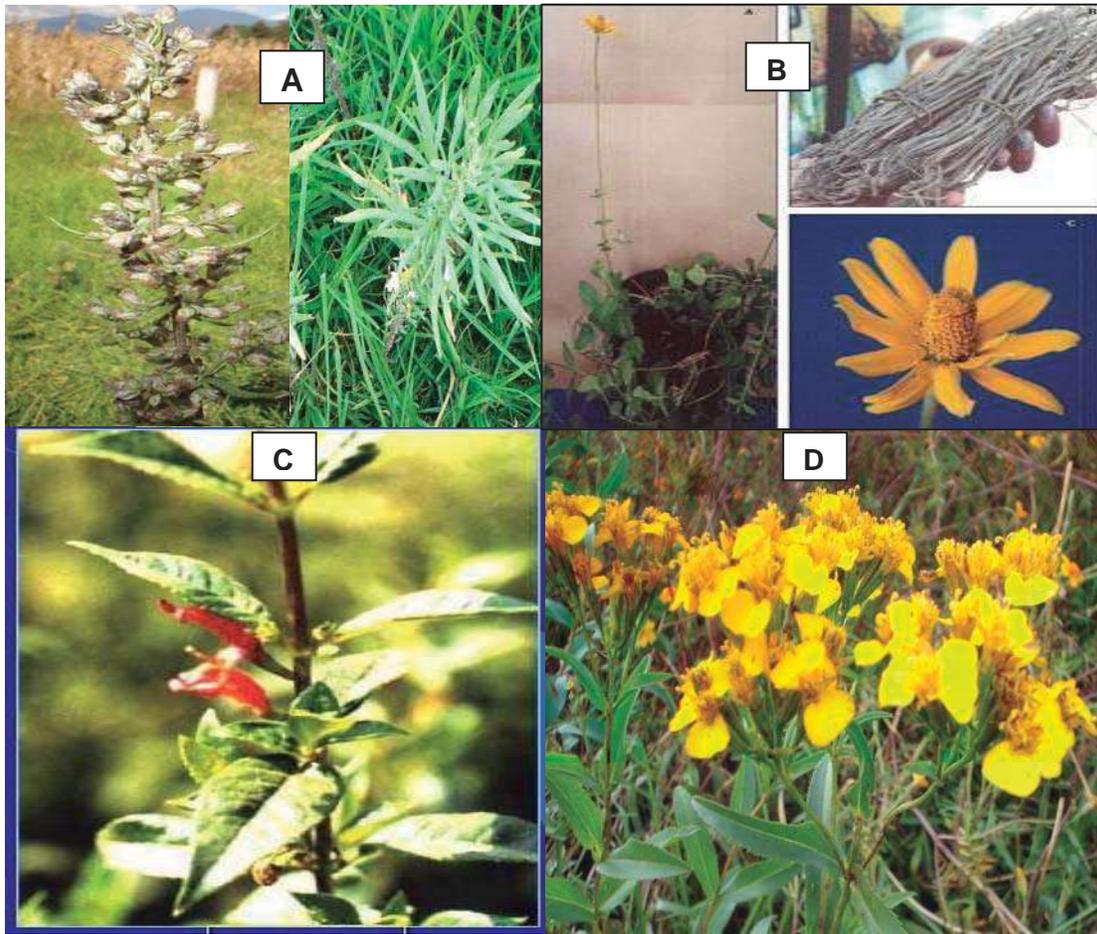


Figura 2. Plantas en estudio: A, *Artemisia ludoviciana* Nutt.; B, *Heliopsis longipes* 'A.Gray' Blake; C, *Satureja macrostema* 'Benth.' Briq.; D: *Tagetes lucida* Cav.

Se han realizado cientos de trabajos sobre este género con diferentes enfoques; al hacer una revisión de ello, se encontró que de 257 reportes, el 79% de ellos corresponde únicamente al análisis fitoquímico y/o a la variación de sus componentes en las diferentes especies con fines quimiotaxonómicos, lugares de procedencia, desarrollo de la planta o estacionales; sólo el 21 % de los estudios han sido para analizar efectos biológicos, de los cuales únicamente 3% se relaciona con propiedades antifúngicas. Los reportes hacen referencia a 96 especies diferentes, 48 se citan por única vez. Los países que más se han interesado en este género son China, Irán, Italia, Arabia Saudita, Alemania y

Japón, aunque en otros países como México, Egipto, España, Canadá, Etiopía, India, Israel, Yugoslavia y Turquía también se han realizado estudios.

En este género, se ha reportado por lo menos 440 compuestos comprendidos principalmente en los siguientes grupos químicos: monoterpenos, sesquiterpenos, sesquiterpen-lactonas, guaianólidos, flavononas, flavonas, flavonoides, eudesmanólidos, cumarinas, algunas alcanidas, santanolidos, poliacetilenos, fenilacetilenos y fenólicos. Esta riqueza y diversidad química hace interesante a este género, siendo entonces una fuente de metabolitos de interés farmacológicos, haciéndose necesario realizar estudios científicos enfocados a la aplicación biológica de éstos, en la búsqueda de alternativas nuevas para el manejo integral de plagas, biocidas, alelopáticos, entre otros, que sean de amplio espectro, fácilmente degradables y que no presenten efectos colaterales tanto al ambiente como al ser humano. Los compuestos más comunes de las especies de este género son: 1-8 cineol, borneol, β -cariofileno, camfor, α y β -tujona, α -pineno, α -terpineol, espatulenol, artemisia alcohol, canfeno, limoneno, artemisia cetona, en diferentes concentraciones dependiendo de la especie, lugar, estación del año y desarrollo de la planta, así como en las diferentes partes que la forman.

La especie más estudiada es *A. annua*, planta que contiene a la artemisinina, metabolito de interés por presentar propiedades antimaláricas y cuya síntesis química se ha logrado con efectos similares al producto natural. Existen 14 trabajos referentes a *A. ludoviciana* que corresponden al 5% del total, de los cuales 8 corresponden a trabajos exclusivamente fitoquímicos (Lee y Geissman, 1970; Geissman *et al.*, 1971; Domínguez *et al.*, 1985; Epstein y Ubben, 1979; Ohno *et al.*, 1980; Liu y Mabry, 1982; Jakupovic *et al.*, 1991; Ruiz-Cancino *et al.*, 1993); dos enfocados a efectos antimaláricos (Malagón *et al.*, 1997; Ramos-Guerra *et al.*, 2004); uno relacionado con propiedades antialérgicas (Axial *et al.*, 1997); otro donde se relaciona la dermatitis al contacto con esta especie (Mitchel *et al.*, 1971); uno contra *Mycobacterium tuberculosis* (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003); y uno más sobre el efecto antifúngico contra nueve especies de hongos

(McCutcheon *et al.*, 1994) que no incluyen los microorganismos probados en este trabajo de investigación.

Varias especies de este género son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes regiones del mundo y se han investigado sus propiedades biocidas. En la India, especies como *A. capillaris*, *A. sacrotum*, *A. absinthium* y *A. herba alba* han mostrado actividad antialimenticia contra insectos lepidópteros; *A. vulgaris*, *A. tridentata* y *A. argentea*, como reguladoras del crecimiento de insectos; el aceite de *A. vulgaris* como larvicida; extractos de *A. annua* como antihelmínticos y estomacales (Rao *et al.*, 1999).

En Sudáfrica, *A. afra* es ampliamente utilizada en la medicina popular contra diversas afecciones, mientras que *A. abyssinica* se utiliza en el Norte de África y Medio Oriente contra diabetes, constipación y reumatismo; otras especies de *Artemisia* son utilizadas para la cicatrización (Burits *et al.*, 2001). Los aceites de algunas especies son utilizados en la perfumería y medicina, mientras que las hojas son utilizadas como condimentos (Klayman *et al.*, 1984).

Respecto a los metabolitos que se han reportado en *A. ludoviciana*, los principales son kaemferol, dihidroarbusculina A, aquilina, apigenina, arglanina, armefolina, artecanina, artemisinina, axilarina, crisantemina, douglanina, eupafolina, eupatilina, hispidulina, jaceosidina, ludovicina –A –B y –C, luteolina, ridentina, santamarina, selagenina, tricina, vulgarina, borneol, derivados de jonona, naringenina, rupicolina A y B, rupina A y alcohol vainillina. El ascaridol es el principio activo más estudiado, del cual se han demostrado sus propiedades vermífugas. El extracto acuoso de la planta completa presenta un efecto antialimentario contra el gusano cogollero (Serrato, 2002). Sólo los metabolitos arteannuina B y artemisinina se han probado contra *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*. (Ramos-Guerra, 2004) y con diferentes extractos se ha observado su actividad fungicida (McCutcheon *et al.*, 1994) así como antimalárica (Malagón *et al.*, 1997), siendo entonces una especie con un

alto potencial para la realización de estudios que determinen el efecto antimicrobiano.

El estafiate se usa contra problemas de tipo gastrointestinal y su forma de empleo es hervir toda o diferentes partes de la planta (tallos, hojas, y/o flores y frutos) con aceite vegetal y tomada como infusión (Serrato, 2002). Se puede encontrar en el estado de Michoacán posterior al tiempo de lluvias.

IV.2.2 *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake (chilcuague)

Heliopsis pertenece a la familia Asteraceae (=Compositae), tribu Heliantheae, que incluye cerca de 2,500 especies. El género se caracteriza por la presencia de flores fértiles en el disco, flores liguladas persistentes, corolas sésiles y persistentes, aquenios gruesos, 3 a 4-angulares y vilano ausente; la mayor parte son perennes aunque cinco son anuales (*H. annua*, *H. anomala*, *H. filifolia*, *H. parviceps* y *H. sinaloenses*) (Rzedowski *et al.*, 2001).

La mayoría de las especies son endémicas de México y en general están restringidas al Hemisferio Occidental, aunque se distribuye desde EUA hasta Bolivia en diversos climas, desde áridos hasta húmedos y desde cálidos hasta templados. Este género está representado por 14 especies conocidas de las cuales ocho son endémicas de nuestro país (García-Chávez *et al.*, 2004).

Las plantas más comercializadas son *H. helianthoides*, conocida como falso girasol y *H. longipes*, conocida como chilcuague, la primera por su uso ornamental en los EUA y la segunda por su uso medicinal en México (Martínez, 1994). No existen muchas investigaciones con las especies de este género, salvo de la especie de interés para este estudio.

H. longipes también es conocida como icha, chilcuán, chimécatl, chilicuau, pelitro o peritre. Es una planta herbácea, perenne de 20–70 cm, con hojas opuestas,

ovadas de 2 a 4 cm, aserradas y con pecíolos cortos, raíces gruesas y fibrosas de 15–30 cm de largo por 3 mm de ancho, sus flores son de 2.5–3 cm con cabezuelas amarillas con largos pedúnculos (Fig.1B) (Martínez, 1994). La zona de localización y propagación de esta planta se encuentra ubicada al norte 21° 52', al sur 19° 55' de latitud al este 99° 41', al oeste 102° 09' de longitud oeste. En la actualidad probablemente esté mucho más restringida su distribución, limitándose a algunas zonas donde es cultivada en forma rústica en los municipios de Atarjea y Xichú pertenecientes al estado de Guanajuato (García-Chávez, 1998).

Chilcuague tiene una larga tradición en la herbolaria indígena que se puede ilustrar por su nombre de origen náhuatl: chilcuague o chilmecatl (de *chili*, chile y *mecatl*, mecate, aludiendo a las raíces filiformes y su sabor picante) (Molina-Torres *et al.*, 1995). Actualmente es utilizada por su acción analgésica contra el dolor de muelas (Martínez, 1994). Su importancia radica en que presenta la acumulación de dos compuestos principales (afinina y decatrién bornilo), aunque se han reportado hasta 10 diferentes alcaloides olefínicos en los extractos etanólicos, que tienen características como bactericidas, fungicidas e insecticidas. Para la afinina se conoce su efecto como antiviral en el tratamiento de las aftas bucales, fungicida en el tratamiento de pie de atleta, molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales (Johns *et al.*, 1982; Molina-Torres *et al.*, 1999).

H. longipes es un ejemplar botánico de interés farmacológico, como los demás ejemplares utilizados para el desarrollo experimental en este trabajo, por presentar metabolitos como afinina, decatrién bornilo, entre otras alcaloides olefínicos. Los extractos de raíz y los compuestos puros inhiben el crecimiento de hongos y bacterias (Trinidad 1998; Molina-Torres *et al.*, 1999; Covián y Salgado-Garciglia, 1999; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; Morales-López, 2003). El mayor índice de inhibición lo ha presentado el extracto crudo por lo que se infiere que existen otros metabolitos no identificados que pueden funcionar como agonistas, por otra parte, se desconoce el mecanismo por el cual actúan.

IV.2.3 *Satureja macrostema* 'Benth.' Briq. (nurite)

Esta especie del género *Satureja*, pertenece a la familia de las labiadas (Labiatae = Lamiaceae), plantas de aromas característicos, de distribución cosmopolita, aunque la mayor concentración de especies se encuentra en el Mediterráneo y Asia Central. Se han identificado cerca de 200 especies de este género, algunas especies de importancia económica son la menta, el orégano, la mejorana y la lavanda.

Presenta un olor a menta al estrujarse, es una planta de 1 a 3 m de alto, tallos erectos, ramas arqueadas y pubescentes, hojas con peciolo de 2 a 5 mm de largo, limbo ovalado a oblongo o lanceolado, de 1 a 4 cm de largo por 0.6 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo, aserradas, base redondeada; flores solitarias o en grupos de 2 a 3 en axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 6 mm de largo. Cáliz pentadentado, bilabiado, de 7 a 10 mm de largo, con la garganta pilosa, corola roja o anaranjada (cambiando a blanquecina o rosada en el secado), de 2–3.5 cm de largo; estambres exsertos, tecas de las anteras divergentes. Estilo saliente de la corola, mericarpios ovoides, lisos o reticulados (Fig. 1C) (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

De los diferentes reportes actuales de algunas especies de *Satureja*, el 40% corresponde a estudios fitoquímicos, con resultados sobre el efecto antimicrobiano, tanto de bacterias como de hongos, con 16% y 13%, respectivamente. Los ensayos antifúngicos se han realizado con extractos etanólicos o bien con el aceite esencial y no con compuestos purificados, a excepción del carvacol y timol (Vokou y Margaris, 1984; Panizzi *et al.*, 1993; Egly *et al.*, 2001; Gulluce *et al.*, 2003; Sahin *et al.*, 2003; Amanlou *et al.*, 2004; Arnal-Schnebel *et al.*, 2004; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Skočibušić y Benzić, 2004; Boyraz y Özcan, 2006; Skočibušić *et al.*, 2006).

Las especies más estudiadas son *S. hortensis* y *S. douglasii*, sobre todo en países como Irán y Turquía, el resto se han realizado en Grecia, Finlandia, Argentina, Croacia, EUA, España y Yugoslavia (Panizzi *et al.*, 1993).

En las especies estudiadas se han identificado hasta 64 compuestos, los cuales pueden ser mono-, di- y sesquiterpenos (cimeno, ciñelo, cariofilenos, geraniol, isomentona, limoneno, linalol, terpinoleno, tujona, timol, pinenos, terpineno, borneol, acetol, camfeno, camfor, carvacrol, tujeno, cubebeno, mirceno, elemeno, pulegona, espatulenol, carvona, felandreno, etc.), flavonoides y flavonas (acacetina, timoquinona, timonina, etc.), principalmente. El compuesto característico de este género es el carvacol, al que se le atribuyen propiedades fungicidas (Chorianopoulos *et al.*, 2004).

El nurite (*S. macrostema*) se conoce comúnmente como té nurite, té de monte o tabaquillo grande, atochietl, borracho, menta, nurhitini te (purépecha), tragorigano, quauhnhuacense, tunché. Es una planta nativa de México que existe en los lugares altos y húmedos de los estados del centro del país (Linares y *et al.*, 1988). Se utiliza para enfermedades gastrointestinales, ya que excita los movimientos del intestino y favorece la digestión cuando es lenta y dolorosa (Martínez y Barajas, 1991).

Es una planta que habita en las laderas de cerros, terrenos planos, barrancas y suelos profundos. A lo largo de la cordillera Neovolcánica, dentro de los estados de Michoacán, se localiza en bosques de pino, encino y oyamel. Se distribuye en la zona localizada al norte a 20°24', al sur 17°55' de latitud norte; al este 100°04', al oeste 103°44' de longitud oeste también se ha identificado al norte 18° 53', al sur 16° 19' de latitud norte; al este 98° 00', al oeste 102° 11' de longitud oeste; al norte 22°45', al sur 18°55' de latitud norte; al este 101°28', al oeste 105°42' de longitud oeste y al norte 18°39', al sur 15°39' de latitud norte; al este 93°52', al oeste 98°32' de longitud oeste (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Bello, 1993; Díaz y Bello, 1996; Rodríguez y Espinosa, 1995).

Se utiliza toda la planta y es usada para dolores de estómago causados por el exceso de alimentos por lo que se le atribuyen propiedades digestivas, antiespasmódicas y antimicrobianas. Se cree que es una planta afrodisíaca, su forma es en infusión (Bello, 1998).

A partir del extracto polar de *S. macrostema* (Benth) Briq. se han identificado los compuestos naringenina y hesperidina, a los cuales se les considera como responsables de las actividades medicinales de tipo antibacteriano de esta planta (Serrato, 2002). Cabe mencionar que los trabajos realizados en México de *S. macrostema* han sido principalmente en tesis o trabajos en instituciones gubernamentales por lo que no se pueden encontrar en las bases de datos. Los trabajos se refieren principalmente a estudios fitoquímicos para conocer la fenomenología de sus componentes, para conocer la composición química y poder relacionarla filogenéticamente (Vázquez *et al.*, 1995; Aguilar, 2002; Aguilar *et al.*, 2004), así como un trabajo relacionado con vasodilatación (Cortés *et al.*, 2004) y uno más sobre efecto bactericida (Serrato, 2002)

Es un género con alto potencial para explorar, debido a que sólo han sido estudiadas 27 especies de las 200 que se han identificado, aunado a que los estudios biodirigidos son escasos. Por otra parte, es necesario publicar los trabajos realizados en *S. macrostema* (Benth.) Briq. realizados en el país y que permitirían generar nuevas líneas de investigación.

IV.2.4. *Tagetes lucida* Cav. (Santa María)

El género *Tagetes*, pertenece a la familia Asteraceae y tiene una amplia distribución en el Continente Americano (Turner y Nesom 1993), cuenta con pocas especies de importancia económica, si bien su potencial de uso es amplio por las propiedades químicas del taxón (Serrato y Quijano, 1993). Las informaciones etnohistóricas y etnobotánicas indican que las especies *T. erecta* y

T. foetidissima se utilizaban durante la época prehispánica y siguen siendo usadas tradicionalmente por las comunidades mestizas e indígenas en México. Son plantas utilizadas como ornamentales, ceremoniales, medicinales y farmacéuticas. Los extractos bioactivos de diferentes especies presentan actividad nematocida, fungicida e incluso insecticida. La actividad nematocida de las raíces se atribuye a los tiofenos, mientras que los componentes biocidas del aceite esencial de flores u hojas son los terpenoides (Neher, 1968).

Una de las especies más representativas es *Tagetes erecta* L., nombre científico del cempazúchitl, calenda azteca, calenda africana, marigold, flor de muerto o veinte flores.

La especie *T. lucida* Cav. llamada comúnmente “Santa María” o Spanish Tarragón, Anicillo, Bashigo (tarahumara), Bashigóko (tarahumara), Cuauhiyautli (náhuatl), Curucumín, Curucumis, Flor de muerto, Flor de Santa María, Guía laga-zaa (zapoteca), Hierba de las nubes, La coronilla, Naná uarhi (purépecha), Pericón, Periquillo, Yauhtli, Yerbanís, Yiauhtli, Yita pericoó, Zacayahucli. Planta que se distribuye principalmente al norte 20°24', al sur 17°55', al este 100°04' y 103°44' de longitud oeste.

Es una planta anual, erecta, de hasta 80 cm de altura, generalmente de varios tallos partiendo de la base, más o menos ramificados, glabros, hojas simoles, sésiles, lineares a oblongas, elípticas u oblanceoladas, de 2 a 10 cm de largo, de 0.5 a 2 cm de ancho, agudas a redondeadas en el ápice, márgenes aserrados; cabezuelas en corimbos, sobre los pedúnculos bracteados hasta de 1 cm de largo, flores liguladas 3 ó 4 amarillas (Figura 1D).

En varios estados de la República tiene una amplia tradición y aprovechamiento. Se tiene conocimiento que esta especie se utilizaba desde la época prehispánica, aunque actualmente sigue teniendo un uso ceremonial, medicinal, insecticida, forrajero, condimenticio y ornamental. Su uso es de las flores y tallos en infusión

para aliviar el dolor de estómago y para bañarse después del parto, se utiliza en ensaladas y como condimento o, como repelente de insectos (Rzedowski, 1985).

Se ha determinado que contiene alcaloides, ácido tánico y tiofenos, los cuales en términos generales tienen efecto letal para algunos microorganismos y nemátodos (López, 1983). Otro compuesto determinado es la herniarina (7-metoxi-cumarina), también con propiedades antimicrobianas (Serrato, 2002)

Las investigaciones recaen en las siguientes especies: *T. patula*, *T. minuta*, *T. erecta*, *T. mandonii*, *T. pusilla* y *T. temiflora*. Los países donde se han realizado mayormente los análisis con estas plantas son Alemania, Canadá y Argentina. La especie más reportada es *T. patula*, seguida de *T. minuta* y el 55.55 % de los trabajos corresponden a estudios fitoquímicos. De éstos, el 19% está enfocado a propiedades insecticidas y antioxidantes, el 13% corresponde a estudios de actividad nematocida y bactericida y sólo el 11% corresponde a estudios relacionados con propiedades antifúngicas (Chan *et al.*, 1975.; Bakker *et al.*, 1979; Rossi *et al.*, 1984; Kourany *et al.*, 1988; Mares *et al.*, 2004., Romagnoli *et al.*, 2005; Rugutt, *et al.*, 2006). Cabe mencionar que no se encontró ningún trabajo de *T. lucida* en relación a esta última propiedad.

Los compuestos identificados en las plantas de este género son aproximadamente 100, siendo los tiofenos y ácidos grasos los más representativos; a los primeros se les atribuyen las propiedades antifúngicas (Romagnoli *et al.*, 2005) y a los segundos las antioxidantes (Aquino *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Algunos de los compuestos reportados para *Tagetes* spp. son linalol, carotenos, piperitona, limoneno, tagetona, helenenos, miricetina, quercetagenina, isoeuparina, bornil acetato, ocimeno, jafrina, patuletina, quercetina, luteína, xantinas, piretrinas, cariofilenos, espatulenol, pineno, felandreno, ramnetina, ácido gálico, ácido benzoico, terpineol, kaemferol, flavonoles, etc.

En cuanto a los trabajos relacionados con *T. lucida*, se han realizado bajo diversos enfoques como son la determinación de la concentración de metales en las diversas partes de la planta (Laferriere *et al.*, 1991), propiedades antioxidantes (Aquino *et al.*, 2002), antibacterial (Cáceres *et al.*, 1990; Cáceres *et al.*, 1991; Serrato, 2002) y el resto esta relacionado con la frecuencia de uso medicinal en América Latina (Linares y Bye, 1987; Girón *et al.*, 1991).

Por lo anteriormente expuesto, se identifica la necesidad de contar con compuestos que presenten propiedades antifúngicas y antioomicetos efectivos de preferencia a bajas dosis, de fácil administración y que sean eco-amigables; para ello y considerando la diversidad vegetal de la región así como el uso tradicional de las plantas medicinales, se propone como una alternativa viable, el uso de metabolitos obtenidos de plantas medicinales de la región.

V. HIPÓTESIS

Extractos de plantas medicinales de la región centro occidente de México contienen metabolitos con propiedades antifúngicas y antioomiceto.

VI. OBJETIVOS

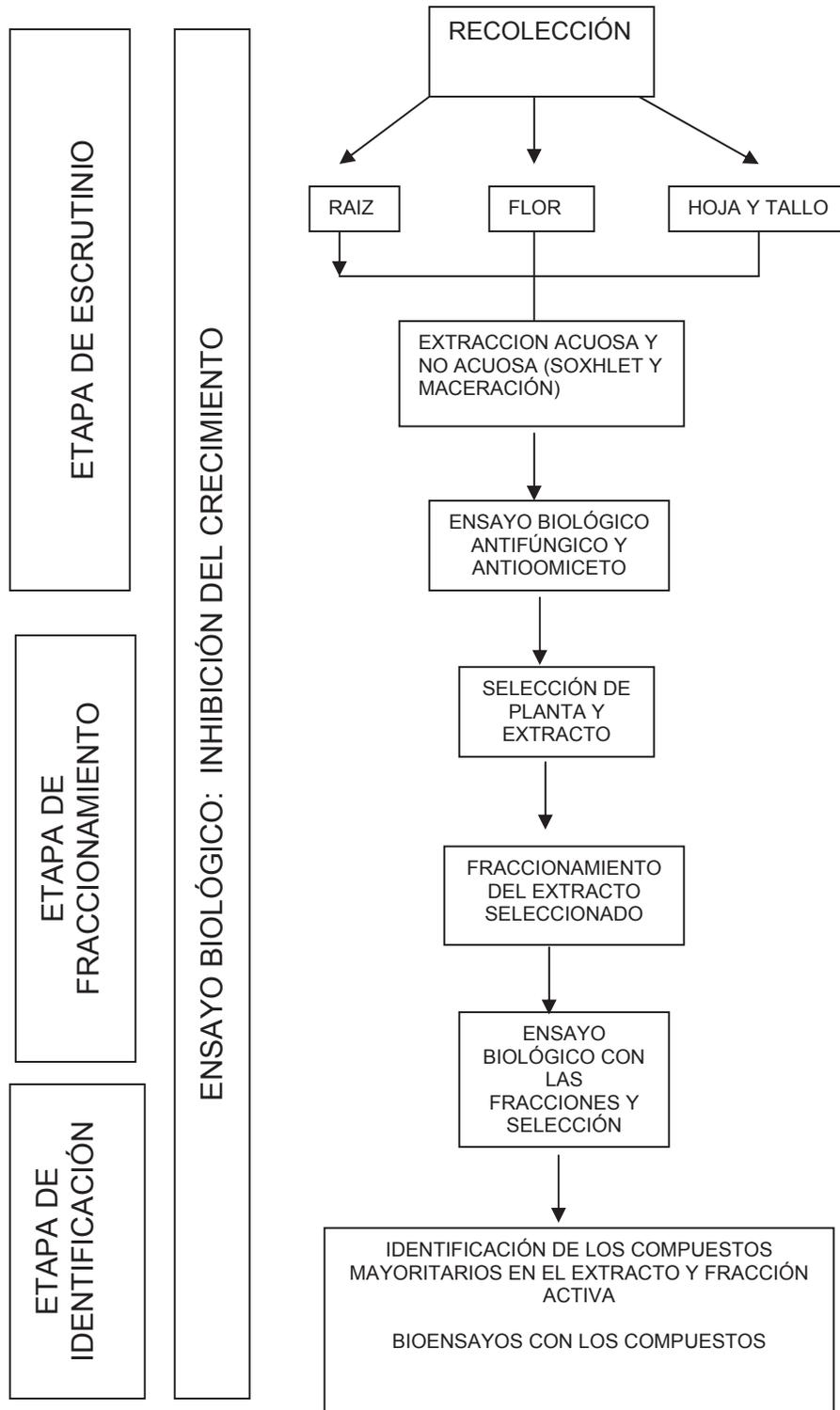
VI.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos de plantas medicinales de la región centro occidente de México.

VI.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar cuatro plantas mexicanas de la región centro occidente de México para la búsqueda de metabolitos con propiedades antifúngicas y antioomiceto.
2. Determinar el efecto sobre el crecimiento de hongos y oomicetos patógenos de diferentes extractos de las plantas seleccionadas
3. Identificar los metabolitos activos con actividad antifúngica y antioomiceto.

V.II ESTRATEGIA METODOLÓGICA



VII.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Plantas: Se seleccionaron cuatro plantas de la región, considerando los antecedentes fitoquímicos, uso medicinal, antecedentes de otras especies con propiedades antifúngicas o antioomiceto y de fácil acceso en la región. Las especies vegetales escogidas fueron: *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliopsis longipes* 'A' Gray Blake., *Satureja macrostema* Benth. Brinq. y *Tagetes lucida* Cav. De cada especie se colectó toda la planta completa, en el período de floración de las plantas. Se sometieron a secado en sombra para su almacenamiento, se dividieron en flores, raíces y parte verde (tallo y hojas), después se pulverizaron y posteriormente se llevó a cabo la extracción de los principios activos. Un ejemplar de las especies vegetales se encuentra en el herbario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Hongos: Los hongos seleccionados fueron aislados silvestres, un fitopatógeno, 3 patógenos oportunistas y 1 como control, identificados como: *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Sporothrix schenckii*. El hongo filamentoso *C. lindemuthianum* y la levadura *S. cerevisiae* fueron cultivados en medio papa dextrosa agar (Difco, EUA). Los dos aislados clínicos dimórficos *C. albicans* y *S. schenckii* fueron cultivados en medio Sabouraud y el hongo saprofito *M. circinelloides* se cultivaron como levadura en medio papa dextrosa agar. Las esporas inoculadas fueron preparadas en agua destilada estéril y el inóculo de levaduras fue preparado en caldo Sabouraud. Todos los inóculos fueron ajustados a 1×10^6 células. ml^{-1} . Los hongos fueron obtenidos de la colección de hongos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

Oomicetos. Las cepas de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. infestans* y *P. mirabilis* fueron aisladas de tejidos enfermos de sus plantas hospedantes (fresa, chile, aguacate y papa, respectivamente). Fueron cultivados

en medio líquido papa dextrosa (Difco, EUA) y posteriormente crecidos en papa dextrosa agar (PDA) entre 19 y 22 °C por 7 a 15 días, según la especie. El micelio inoculado fue de 100 mm², el cual se colocó sobre papel filtro. Los oomicetos fueron donados por la Ph.D. Silvia Fernández Pavía, del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IIAF), UMSNH.

VII.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Obtención de los extractos de plantas. 100 g de material seco y molido fue extraído de manera separada como se describe a continuación: a) el macerado se dejó en refrigeración a 4°C por 5 días con cloroformo–metanol (1:2 v.v⁻¹); b) la extracción con acetato de etilo utilizando un extractor Soxhlet por 2 h (79°C) y c) la infusión con agua destilada en ebullición durante 5 min. Los extractos fueron separados por filtración y el solvente fue removido por vacío a 45°C. El residuo se disolvió en 1ml de alcohol absoluto y se mantuvo a 4°C hasta el momento en que se requería su uso.

De las cuatro especies vegetales se obtuvieron 32 extractos tanto acuosos (infusión) como no acuosos (acetato de etilo y cloroformo-metanol), de las diferentes partes de la planta. En el caso de la flor de *H. longipes* y *S. macrostema*, no se obtuvieron los extractos acuosos ni clorofórmico-metanólicos (macerado), por que la primera especie no genera en gran cantidad flor y la segunda, por que ésta es demasiado pequeña.

VII.3. FRACCIONAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS

Análisis Cromatográfico. Para el fraccionamiento parcial del extracto seleccionado se utilizó cromatografía en capa fina. Una vez seleccionada la fracción más activa, se empleó la cromatografía en columna para la purificación e identificación de metabolitos activos. Para la identificación de compuestos

volátiles y semivolátiles, se realizó cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, utilizando la base de datos NIST.

Cromatografía en capa fina. El extracto seleccionado se llevó a separación de sus componentes por cromatografía en capa fina (gel de sílice 60, Sigma®; placas de 20 x 20 cm) con un sistema de solventes de CH₃Cl₃:MeOH (2:1 v:v) en una cámara cromatográfica. Las placas fueron secadas a temperatura ambiente y se revelaron con luz ultravioleta (*uv*) a 254 nm, marcándose las bandas correspondiente a la fracciones. Para la cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), la fracción se resuspendió en metanol y, para los bioensayos, en etanol.

Cromatografía en columna. El extracto seleccionado se llevó a separación de sus componentes por cromatografía en columna (gel de sílice 60, Sigma®; columna de 50 cm x 2 cm) con un sistema de solventes de CH₃Cl₃:MeOH (2:1 v:v). El solvente de las fracciones fue removido; para la CG/MS, la fracción se resuspendió en metanol, y para los bioensayos, en etanol.

Cromatografía de gases acoplada a masas (CG/EM). El análisis del extracto de la planta y de la fracción activa, y la extracción directa con hexano, se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, con detector de masas HP 5973, con una columna capilar Equity 5 (30m x 20 mm). La temperatura del horno fue de 50 a 200°C a 13°C min⁻¹, 200-300°C y 300 °C·5 min⁻¹ y programada a 250°C a 2°·min⁻¹. La temperatura inicial del inyector fue de 40°C, incrementándose de 2°C a 250°C. El espectro de masas fue tomado a 70 eV con un rango de masas de 20 a 450. La producción del aceite esencial (w·v) fue del 0.94%. La identificación de compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST.

VII.4 ENSAYOS BIOLÓGICOS

El efecto de los extractos, las fracciones y de los compuestos puros se llevó a cabo utilizando el método de difusión de disco tanto en levaduras como en micelio, cuantificando el halo de inhibición de crecimiento. Para la selección del extracto se consideró descartar aquellos que presentaran una inhibición del halo de crecimiento menor al 50% y que además inhibieran a todos los hongos u oomicetos probados.

Prueba antifúngica: Germinación de esporas. Discos de papel filtro estériles (Whatman No.1) de 10 mm de diámetro se impregnaron con 100 μl ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) del extracto disuelto en etanol absoluto y se colocaron por triplicado en cajas Petri con medio Sabouraud o papa dextrosa agar, previamente sembradas con 100 μl de esporas o levaduras de la suspensión fúngica (1×10^6 células. ml^{-1}). Las cajas fueron incubadas a 25°C por 72 h.

Inhibición del crecimiento. Las cajas con agar fueron inoculadas con esporas, levaduras o micelio incubadas por 4 a 8 h, e incluso de 7 a 15 días para los oomicetos, e incubadas a 20°C ó 25°C, dependiendo del hongo probado. Cuando creció la hifa dos o tres veces el tamaño de la espora o cuando la levadura tuvo una yema, se colocó papel filtro impregnado de los extractos, fracciones o compuestos y se cultivaron en las mismas condiciones. Cada 12 h por tres días consecutivos se midió el diámetro de inhibición en los cultivos (20 mm), el correspondiente al disco de papel (10 mm) no fue incluido. Se utilizaron 100 μl de etanol absoluto y agua como referencia. Los resultados obtenidos de las pruebas se trataron estadísticamente; todos los bioensayos se llevaron a cabo por triplicado.

VIII.1. RESULTADOS.

ANTIFUNGAL PROPERTIES OF SOME MEXICAN MEDICINAL PLANTS

L. M. Damián-Badillo, R. Salgado-Garciglia and M.M. Martinez-Pacheco

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed. B-1, C.P. 58030. Cd. Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

Running head: Mexican medicinal plants.

Address all correspondence to Mauro M. Martinez Pacheco.

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mujica, Morelia, Michoacan, C.P. 58060, Mexico.

e-mail: mpacheco@zeus.umich.mx

Tel. (443) 3 26 57 88 ext 121

Fax. (443) 326 57 90

Abstract

The antifungal properties of ethyl acetate, chloroform-methanol and water extracts from *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliosis longipes* 'A. Gray' Blake., *Satureja macrostema* Benth and *Tagetes lucida* Cav. were analyzed using the agar disc diffusion method. After 72 incubation hours, fifty percent of the extracts inhibited the growth fungi, but the ethyl acetate and methanol-chloroform extracts from *A. ludoviciana*, *H. longipes* and *T. lucida* inhibited all fungi assayed: *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *Sacharomyces cerevisiae* and *Sporothrix schenkii*. The result of the spore germination inhibition assay showed that methanol-chloroform extract from *A. ludoviciana* was the most active against the fungi tested. The chloroform-methanol and ethyl acetate extracts from *A. ludoviciana* and *T. lucida* had pronounced antifungal activity against all fungi tested. These results suggest that *A. ludoviciana* and *T. lucida*

could be used for fungal control in the future. Compounds found in the leaf chloroform-methanol extracts from *A. ludoviciana* Nutt., were analyzed using GC/MS, the major compounds were: 1-8 cineole camphor, borneol, *cis*-verbenol, mirtenol, eugenol, caryophyllene, α -farnesene, spathulenol, derivatives of caryophyllene and derivatives of spathulenol.

Key Words: *A. ludoviciana*, *H. longipes*, *S. macrostema*, *T. lucida*, antifungal properties.

Introduction

The treatment of human mycosis has been a great challenge for clinicians and dermatologists. On one hand, opportunistic fungal infections are increasing at an alarming rate, while on the other allergic reactions of the skin are increasing day to day. The latter is due to a higher rate of power sensitization of the present generation of antimycotic agents. Human and plant pathogenic fungi are usually treated by the use of synthetic compounds, mainly drugs belonging to the imidazole family [1]. We believe, it is time to search for new antifungal agents of herbal origin which are relatively economically affordable, safer and easily available to common people. Moreover, sometimes imidazole derivatives are not effective, depending on which alternative drugs are required [2]. A review of literature indicates that many investigators have reported fungistatic and bacteriostatic properties of extracts of higher plants [3]. Plants produce a lot of secondary metabolites with pharmacologic activity, although the exact role of some secondary metabolites in the life processes of the plant is unknown. They are a source of pharmacologic active principles against pathogenic microorganisms, e.g. most members of the Asteraceae family are known to contain sesquiterpene lactones which usually have antifungal and cytotoxic effect [4,5].

Mexico has a rich tradition in medicinal plant utilization among its varied folk healing practices [6,7]. A total of 3,000 species have been compiled in an atlas of medicinal plants employed by diverse ethnic groups. Incredibly, of these only approximately 1% of them have been studied in depth regarding their potential medicinal properties [8]. *Satureja macrostema* Benth. (nurite) a member of Labiateae family and *T. lucida* Cav. (Santamaría), *A. ludoviciana* Nutt. (estafiate) and *H. longipes* 'A. Gray' Blake (chilcuague) members of Asteraceae family, have been described as microbiocides [9-13]. All of them are Mexican medicinal plants that grow throughout central Mexico and were selected in this work on the basis of medicinal folklore reports to analyze their fungitoxic properties.

Materials and methods.

Biological material. *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake, *Satureja macrostema* Benth. and *Tagetes lucida* Cav. plants were collected from INIFAP-Michoacán at the Uruapan Campus and were identified by Facultad de Biología Herbarium, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). The material plant was collected during early flowering stage (the months of March-July) and were dried.

A filamentous phytopathogen isolate *Colletotrichum lindemuthianum* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were cultured on potato dextrose agar (Difco, USA) medium. Two dimorphic clinical isolates, *Candida albicans* and *Sporothrix schenckii* were cultured on Sabouraud medium and dimorphic saprofitic fungus *Mucor circinelloides* cultured on yeast peptone dextrose medium. The spore inocula were prepared in distilled sterile water and yeast inocula were prepared in Sabouraud broth inoculum were adjusted to 1×10^6 cells ml^{-1} . Fungi were obtained from the fungi collection of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH.

Plant extracts obtention: One hundred grams of dried plant materials were finely ground and they were extracted separately as follow: a) macerated, incubated at 4°C for 5 days with methanol-chloroform (2:1 v·v⁻¹); b) extracted with ethyl acetate

using soxhlet extractor for 2 h (79°C); and c) infusion with distilled water. The extracts were separated by filtration and the solvent was evaporated to dryness under vacuum to 45° C. The residue was dissolved in 1 ml of absolute ethanol and was stored at 4° C for further analysis.

Antifungal test: Spore germination test. Sterile filter paper discs (Whatman No. 1) of 10 mm in diameter were impregnated with about 100 µl (1 mg·ml⁻¹) of extract which have been dissolved in absolute ethanol and placed in triplicates on the potato dextrose or Sabouraud agar plates previously seeded with 100 µl of spores or yeast fungal suspension (1x10⁶ cells·ml⁻¹). The plates were then incubated at 25°C for 72 h.

Growth inhibition test. Agar plates inoculated with spores o yeast cells were incubated for 4 to 8 h at 25 °C, when the hypha rise two o three times the size of spore or yeast produced one or two bud, filter paper with extracts plant were put on culture and were incubated at same conditions. Each 12 h for three days the diameter of inhibition zone on the cultures were measured but the diameter of paper disk (10 mm), was not included. Absolute ethanol (100 µl) and water were used as reference standards. The results of both tests are presented as mean ± SD of the zone of inhibition of three independent experiments.

Chromatographyc technique. GC/MS analysis of plant extracts were analyzed using a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph, HP 5973 mass detector, and capillary column Equity 5(30m x 20 mm). Oven temperature was 50 °C for 5 min and programmed to 250°C at 2 for min. Injector temperature initially was 40 °C, increased a rate of 2 °C to 250 °C. Mass spectra were taken at 70 eV with a rank m·z⁻¹ of 20 to 450. The total yield of essential oil (w·v⁻¹) was 0.94%. Components of the peaks were identified by comparison of their mass spectra, relative retention time with those reported in NIST spectral database.

Statistical analysis. All data were analyzed with the PROBIT program and for factorial treatment with P = 0.01 was used for the extracts of all plants.

Results

The results of antifungal screening of extract of four plant species are presented in Tables 1 and 2. The growth inhibitory effects of plant extract was in following order: ethyl acetate and methanol-chloroform extracts from *A. ludoviciana*, *H. longipes*, *T. lucida* and *S. macrostema* showed high growth inhibitory effects against all fungi tested. The aqueous extracts of all the plants showed growth inhibitory effects against *C. albicans*, while the rest of the fungi tested showed a weak or no effect. The most sensitive fungi to plant extract were *C. albicans* and *S. schenckii* vertebrate pathogens and the phytopathogen *C. lindemuthianum* the causal agent of bean anthracnosis (Table 1).

The fungi spore germination inhibitory effect of plant extract was similar (Table 2). The extracts from *A. ludoviciana* inhibited the germination of yeast-like fungi, while spore germination of filamentous fungi only were severely affected by leaves and root methanol-chloroform extracts. The leaves extracts ethyl acetate from *T. lucida* were effective on spore germination of four fungi (filamentous and yeast-like fungi) and chloroform-methanol leaf extract did not inhibited spore germination of filamentous fungi. The extract root chloroform-methanol from *H. longipes* was effective on spore germination inhibition and the methanol-chloroform leaf extracts from *A. ludoviciana* were too. The ethyl acetate flower extract inhibited the germination of all the pathogenic fungi, while germination inhibition of the chloroform-methanol leaves extracts was weak (Table 2). All extracts from *S. macrostema* only inhibited *S. cerevisiae* and *C. albicans* germination. Based on these results, half of the inhibitory concentration (IC_{50}) values of plant extracts were calculated as having significant effects against *C. albicans*, *C. lindemuthianum*, *M. circinelloides*, *S. cerevisiae* and *S. schenckii* and are presented in Table 3. The IC_{50} of extracts from *A. ludoviciana* ranged from 4 to 250 $mg \cdot ml^{-1}$. The root ethyl acetate extract was the most active against *C. albicans* with IC_{50} value of 4 $mg \cdot ml^{-1}$, then leaf ethyl acetate and flower chloroform-methanol with IC_{50} values of 20 to 33 $mg \cdot ml^{-1}$. However, the IC_{50} values of leaf chloroform-methanol extract against filamentous and yeast like fungi ranged 91 to 100 $mg \cdot ml^{-1}$.

The IC₅₀ values of aqueous and ethyl acetate extracts from *T. lucida* against *C. albicans*, *M. circinelloides* and *S. schenckii* ranged of 11 to 330 mg·ml⁻¹. The best IC₅₀ values of ethyl acetate and aqueous extract from *H. longipes* against *C. lindemuthianum*, *M. circinelloides*, *S. cerevisiae* and *S. schenckii* ranged of 4 to 500 mg·ml⁻¹. The IC₅₀ values of extracts from *S. macrostema* against *S. cerevisiae* ranged 18 to 76 mg·ml⁻¹, and against *C. albicans* was ranged 10 to 51 mg·ml⁻¹.

Based on these results and because the methanol-chloroform leaf extract from *A. ludoviciana* inhibited all the fungi tested, this extract was selected as the best antifungal extract and because of this we made the identification of the majority compounds by GS/MS.

The chemical analysis showed that the chloroform-methanol extract of *A. ludoviciana* Nutt. had the major compounds: borneol (6.19 %), spathulenol (3.093 %), derivatives of caryophyllene (5.091 %) and derivatives of spathulenol (1.166 %) (Table 4). These compounds have been identified in other species of *Artemisia* with other minority compounds, for example: 1-8 cineole, camphor, *cis*-verbenol, mirtenol, eugenol, caryophyllene, α -farnesene, derivatives of caryophyllene and derivatives of spathulenol.

Discussion

The antifungal properties of ethyl acetate, chloroform-methanol and water extracts from *A. ludoviciana* Nutt., *H. longipes* 'A. Gray' Blake., *S. macrostema* Benth. and *T. lucida* Cav., showed that fifty percent of the extracts inhibited the fungi growth. Also, the ethyl acetate and methanol-chloroform extracts from *A. ludoviciana*, *H. longipes* and *T. lucida* inhibited all fungi assayed: *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *S. cerevisiae* and *Sporothrix schenckii*. However, the result of the spore germination inhibition assay suggested that the chloroform-methanol extract from *A. ludoviciana* was the most active against the fungi tested. Zheng and coworkers [14] observed in *A. giraldi* an antifungic effect against *Aspergillus flavus* and *T. viride* which was attributed to the flavones of the plant. *A. mexicana* had a strong antifungal activity against *C.*

albicans too [15]. The essential oils of *A. abinthium*, *A. santonicum* and *A. spicigera* showed a toxic effect against phytopathogen fungi, 1-8 cineol and the borneol were found to be the majority compounds. A lot of *Artemisia* species has a lot of references, however *A. ludoviciana* does not. In *Artemisia* genus, more than 96 compounds were determined, the most significant being terpenes: artemisia ketone, 1-8 cineole, camphor, santolina alcohol, borneol, camphene, caryophyllene, sabinene, *p*-cymene and γ -terpinene [16]. These compounds have reported antifungal activity against *C. albicans* and *S. cerevisiae* [17], although in *A. douglasiana* has this activity too but with other compounds such as vulgarone B and verbenone [18]. However, in *A. afra* verbenone, camphor and *cis*-verbenol have not been detected but the lower dilution of *A. afra* oil produced zones of inhibition with larger diameters on yeast [19,20]. However some authors reported borneol and its derivatives, camphor and 1,8-cineole (eucaliptol), have demonstrated low antifungal activity against *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* and *T. beigelii* [21-24].

In the *Tagetes* genus has been looking for new insecticides with a similar or a better effect than piretrinas, moreover it does not affects the environment [4,25]. In this search, *T. patula* turned out to be a good candidate, because it presents larvicide activity against *Aedes aegypti* and the majority of its compounds are terpenes specially limonene, caryophyllene and ocimene, which are directly responsible for this activity [26]. On the other hand, antifungal activity is reported against *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* in *T. patula* essential oils attributed to the compounds piperitone and piperitenone, although this activity does not depend only on these two compounds, but on the synergic activity of all compounds in the oil [27,28]. This may be result of metals like Cu, Zn, Ca and Mg, determined in *T. lucida* and *T. filifolia* or both effects [29].

With respect the *T. lucida*, the determining compounds are quercetagenin, 7-O- β -D-flavonol glycoside, quercetagenin 3-methyl ether 7-O- β -D- glucopyranoside, 6-hydroxykaempferol-7-O- β -D-glucopyranoside, quercetagenin 3,3'-dimethyl ether,

caffeic acid, and derivatives of quercetagenin, 6-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside, 4-(β -D-glucopyranosyloxy)benzoic acid, gallic acid, phenylpropanoid glycosides, 3-(2-O- β -D-glucopyranosyl-4-methoxyphenyl)propanoic acid, methyl 3-(2-O- β -D-glucopyranosyl-4-methoxyphenyl) propanoate and 7-methoxycoumarin, their contribution is mainly their antioxidant properties. In the *Tagetes* genus there are a few reports on antifungal activity, some of them, like piperitone, piperitenone, terpinolene, dihydro tagetone, *cis*-tagetone, limonene and *allo*-ocimene have been attributed to this activity [28,30]. Other reports of the same kind are related with their bactericide activity or including enterobactericide activity [31,32]. *T. lucida* is one of the most used species by the Latin-American population for the stomachache sickness [33]. Sometimes it is possible to confuse *T. filifolia*, *T. micrantha* or even *A. druncuculus*, that is why its necessary to confirm the specie on which someone is working [34].

In *H. longipes* some alkalamides have been identified in the root of this plant, the affinin and bornyl decatrienate seem to be responsible for antifungal activity in this species [35]. It seems the metabolites with this activity are concentrated in the root because different root extracts of *H. longipes* showed this activity, whereas other organs did not show any fungitoxic activity except the chloroform-methanol leaf extract which was observed to inhibit yeast growth and ethyl acetate flowers extract also inhibited growth of dimorphic fungi (Table 1).

Satureja genus, it has been reported that essential oil compounds of *S. timbra* showed a good antifungal activity against soil borne microorganisms and foliage pathogens [36]. *S. hortensis* L. methanol extract herbal parts and callus have shown antifungicidal activity and this property has been attributed to compounds of thymol, carvacrol and eugenol. [37,38]. But in this work, the *S. macrostema* extracts showed a low fungitoxic effect (Table 1 and 2).

The last works, the *Satureja* genus has been reported with fungicide property because of its contents of carvacrol and thymol, compounds with antimicrobial properties [21,22,24]. In *S. parnassica*, ssp. *parnassica* Helar and Sart ex Boiss,

S. timbra and *S. spinosa*, compounds like 1-8 cineole, camphor, borneol, spathulenol and caryophyllene oxide were identified; presumably this activity is not derived only from the presence of monoterpene phenols, but part of the activity was because of the secondary and synergistic presence of minor active constituents, such as γ -terpinene and *p*-cymene [37]. These results are similar to ours because the chloroform-methanol leaf extract of *A. ludoviciana* showed the best fungicide activity, because it has the same compounds (Table 2 and 4). In *S. macrostema* results, no fungitoxic effect was observed and this was probably because of the concentration of compounds, genetic variability or extraction type. In other *Satureja* species like *S. monatanana* L. and *S. cuneifolia*, the essential oils have shown antifungal activity against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. These oils have carvacrol, *p*-cymene, γ -terpinene, borneol, thymol, β -cubebene, limonene, α -pinene, spathulenol, β -caryophyllene, camphor and borneol [13]. These results are similar to ours because the *S. macrostema* extracts inhibited the growth and germination of *C. albicans* and *S. cerevisiae* principally (Table 1 and 2).

It has been demonstrated that the activity and chemical composition in plant, vary considerably depending on geographic location, growing conditions, plant parts from which they are extracted, developmental stage of plant, solvent used for extraction, photosensitivity of some the compounds in the extract, and the methods used to isolate the essential oils. [12,26]. These works are controversial because the eucalyptol has low antifungal activity against human pathogen fungi, *M. furfur*, *T. rubrum* y *T. beigelii* [21,39], whereas other plants, where the eucalyptol is the majority compound, do not have antifungal activity against the soil borne plant pathogen *F. moniliformis*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *P. capsici* [22]. Other authors reported fungitoxic effect against *C. albicans* and soil born plant pathogens by eucalyptol and other majority compounds in *Artemisia* species [12,40]. There are dozens of species of *Artemisia*, many of them used medicinally, *A. aryii* is most often used in the practice of Chinese medicine, the main chemical

constituents being borneol, camphor and cineole, all of which are used in the treatment of pain syndromes [41].

Ruling out majority compounds of *A. ludoviciana* were borneol and its derivatives, it is the camphor and 1-8 cineole, that are responsible for antifungal activity, and this effect is probably due to one minority compound concentration or because of the synergic activity of all compounds in the extract obtained. There are many works about Asteraceae plants and its fungitoxic effect against pathogen fungi, the most important belong to the *Artemisia*, *Tagetes* and *Heliopsis* genus, and in this work we have shown the fungitoxic properties of *A. ludoviciana*, *H. longipes*, *S. macrostema* and *T. lucida*, in our search for new more affordable antifungal compounds.

All the extracts show in general an antifungal effect for fungi tested in this work, but only two plants have been source of metabolites with antifungal properties: *A. ludoviciana* and *T. lucida*. This is the first work that has reported a screening for antifungal effects of different extracts for these species, where the chloroform-methanol and ethyl acetate extracts from *A. ludoviciana* and *T. lucida* had pronounced antifungal activity against fungi tested.

Acknowledgments. This work was supported by UMSNH projects CIC2.10 RSG y CIC2.1 MMP-2002. LMBD received a postgraduate grant of UMSNH. A special gratitude to A Flores Garcia for his help in statistical analysis and to C. Marquez for chemical studies.

References

1. Davis S. An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products-the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses* 2005; 48: 95-100.
2. Lowey M, Parent D, Ledonx-Corbus-les M. A new combination of tolnaphtata and methylparticine (SPA-5-345, Triol). *Mycosen* 1985; 28: 452-456.
3. Rai MK, Qureshi S, Pandey AK. *In vitro* evaluation of inhibitory nature of extracts of 18 plant species of Chindwara against 3-keratinophilic fungi. *Hindustan Antibiotics Bulletin* 1999; 30:33-36.
4. Rai MK, Acharya D. Screenig of some Asteraceous plants for antimycotic activity. *Compositae Newsletter* 1999; 34: 37-43.
5. Singh KV. Studies on the biocidal activities of certain essential oils. *JMAPS* 1999; 21: 1119-1130.
6. Lozoya X, Rivera E. Numeralia. *Arqueología mexicana*. 1999; 7: 45-53.
7. Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. Ed. Botas. 6a ed. México 1993; 656 p.
8. Argueta A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3 Vols. Mexico City: Instituto Nacional Indigenista. 1994; 172 p.
9. Gundidza M. Antifungal activity of essential oil from *Artemisia afra* Jacq. *Centr Afr J Med* 1993; 39: 140-2.
10. Kasahara Y, Yasukawa K, Kitanata S, Taufiq-Khan M and Evans F. Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytother Res* 2002; 16: 217-222.
11. Kishore N, Mishra AK, Chansouria JP. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses* 1993; 36: 211-215
12. Kordali S, Cakir A, Mavi A, Kilic H, Yildirim A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J Agri Food Chem* 2005; 53: 1408-1416
13. Skocibusic M, Basic N. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytother Res* 2004; 18: 967-970.
14. Zheng WF, Tan RX, Yang L, Liv ZL. Two flavones from *Artemisia giraldi* and their antimicrobial activity. *Planta Médica* 1996; 62: 160-162.

15. Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of infection as diseases. *J Ethnopharmacol* 1996; 53: 143-147.
16. Chagonda L, Makanda C, Chalchat JC. The essential oil of cultivated *Artemisia agra* (Jacq.) from Zimbabwe. *Flav Frag J* 1999; 14: 140-142
17. Masotti V, Juteau F, Bessiere JM, Viano J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7114-21
18. Meepagala KM, Kuhajek JM, Surtz GD, Wedge DE. Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. *J Chem Ecol* 2003; 29: 1771-1780.
19. Graven EH, Deans SG, Svoboda KP, Mavi S, Gundidza MG. Antimicrobial and antitoxidative properties of the volatile (essential) oil of *Artemisia afra*. *Flav Frag J* 1992; 7: 121-123.
20. Mangena T, Muyima NYO. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria an yeast strains. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28: 291-296.
21. Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1739-1745.
22. Muller-Riebau F, Berger B, Yegen O. Chemical comosition amd fungitoxic proprieties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing in Turkey. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2262-2266
23. Sivrapoulous A, Nicolau C, Papanicolau E, Kokkin S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oils. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 3197-3201.
24. Soliman FM, El-Sohly MA, Fathy MM, El-Sakhawy FFS. A comparative study of the essential oils of certain *Mentha* and *Salvia* species frown in Egypt. *Egypt J Pharm Sci* 1997; 38: 553-564.
25. Hitmi A, Coudret A, Barthomeuf C. The production of pyrethrins by plant cellll and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 317-337

26. Dharmagadda VS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Tech* 2004; 96: 1235-1240.
27. Mares D, Tosi B, Poli F, Andreati E, Romagnoli C. Antifungal activity of *Tagetes patula* extract on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiol Res* 2004; 159: 295-304.
28. Romagnoli C, Bruni R, Andreati E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 2005; 225: 57-65
29. Laferriere J, Weber CW, Kholhepp EA. Mineral composition of some traditional mexican teas. *Plant Food for Human Nutrition* 1991; 41: 277-282.
30. Aquino R, Cáceres A, Morelli S, Rastrelli L. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J Nat Prod* 2002; 65:1773-1776.
31. Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders.1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharm* 1990; 30: 55-73.
32. Cáceres A, Alvares AV, Ovando AE., Samayoa BE. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases.1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharm.* 1991; 31: 93-208.
33. Girón LM, Freire V, Alonzo A, Cáceres A. Etnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J Ethnopharm* 1991; 34: 173-187.
34. Linares E, Bye RA. A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *J Ethnopharm* 1987; 19: 153-183.
35. Molina-Torres J, Salgado-Garciglia R, Ramírez-Chávez E, Del Río R. Purely aliphatic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem Syst Ecol* 1996; 24: 241-248.
36. Shimoni M, Putievsky E, Ravid U, Reuveni R. Antifungal activity of volatile fraction of essential oils from four aromatic wild plants in Israel. *J Chem Ecol* 1993; 19: 1129-1133.
37. Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligannis N, Mitaku S, Nychas GJ, Haroutounian SA. Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 2004 ; 52: 8261-8267

38. Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Oskan H, Kartal N, Polissou M, Sokmen A, Sahin F. *In vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. J Agric Food Chem 2003; 51: 3958-3965.
39. Garg SC, Siddiqui N Antifungal activity of some essential oil isolates. Pharmazie 1992; 47: 467-468.
40. Setzer W, Vogler B, Achmidt JM, Leahy JG, Rives R. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. Fitoterapia 2004; 75: 192-200.
41. Dharmananda S, Borneol, *Artemisia* and *Moxa*. Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon. USA. 1998; pp.1-17

TABLE 1. Antifungal activities of crude plant medicinal extract determined by mycelial or yeast-like growth inhibition test. *Candida albicans* (Ca), *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), *Mucor circinelloides* (Mc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Sporothrix schenckii* (Ss).

Species	Organ	EXTRACT	Inhibition				
			Ca	Cl	Mc	Sc	Ss
<i>A. ludoviciana</i>	Flowers	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Leaves	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Root	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Flowers	Ethyl acetate	+++	+++	++++	++++	++++
	Leaves	Ethyl acetate	++++	+++	+++	++++	++++
	Root	Ethyl acetate	++++	+++	+++	++++	++++
	Flowers	Methanol/chloroform	++++	+++	+++	++++	++++
	Leaves	Methanol/chloroform	++++	++++	++++	++++	++++
	Root	Methanol/chloroform	+++	+++	++++	++++	++++
<i>H. longipes</i>	Flowers	Aqueous	+	+	+	+	+
	Leaves	Aqueous	+++	+	+	+	+
	Root	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Flowers	Ethyl acetate	+++	++++	++++	+	++++
	Leaves	Ethyl acetate	+++	+++	++++	+	++++
	Root	Ethyl acetate	++++	+++	+++	++++	++++
	Flowers	Methanol/chloroform	+	+	+	+	+
	Leaves	Methanol/chloroform	++++	+++	+++	++++	+++
	Root	Methanol/chloroform	++++	++++	++++	++++	++++
<i>S. macrostema</i>	Flowers	Aqueous	+	+	+	+	+
	Leaves	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Root	Aqueous	++++	+	+	+	+
	Flowers	Ethyl acetate	++	+	+	++++	+
	Leaves	Ethyl acetate	++++	+++	+	++++	+++
	Root	Ethyl acetate	++++	+++	+	++++	++++
	Flowers	Methanol/chloroform	+	+	+	+	+
	Leaves	Methanol/chloroform	+	+	+	++++	+++
	Root	Methanol/chloroform	+++	+++	+	++++	++++
<i>T. lucida</i>	Flowers	Aqueous	++++	+++	++	+	+
	Leaves	Aqueous	++++	++++	++	+	+
	Root	Aqueous	++++	++++	+	+	+
	Flowers	Ethyl acetate	+++	+++	++++	++++	+++
	Leaves	Ethyl acetate	++++	+++	++++	++++	++++
	Root	Ethyl acetate	++++	+++	+	++++	++++
	Flowers	Methanol/chloroform	++++	+++	++++	++++	++++
	Leaves	Methanol/chloroform	++++	+++	++++	++++	+++
	Root	Methanol/chloroform	++++	++++	++++	++++	+++

n = 6 o 9, standar errors < 16 % all cases
 1.99 <++++ ≥ 1.0 cm
 0.99 <+++ ≥ 0.5 cm
 0.49 < ++ ≥ 0.2 cm
 0.2 < + ≥ 0.1

TABLE 2. Antifungal activities of crude plant medicinal extract determined by germination inhibition test. *Candida albicans* (Ca), *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), *Mucor circinelloides*(Mc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Sporothrix schenckii* (Ss).

Species	Organ	EXTRACT	Inhibition of germination %				
			Ca	Cl	Mc	Sc	Ss
<i>A. ludoviciana</i>	Flower	Aqueous	53	-	-	-	-
	Leaf	Aqueous	50	-	-	-	-
	Root	Aqueous	55	-	-	-	-
	Flower	Ethyl acetate	-	-	99	57	56.25
	Leaf	Ethyl acetate	50	-	-	53.5	53.75
	Root	Ethyl acetate	51	50	-	54	61.25
	Flower	Methanol/chloroform	50	-	-	75	60
	Leaf	Methanol/chloroform	52.5	50	61.2	52.5	55
	Root	Methanol/chloroform	-	-	62.5	77.5	50
<i>H. longipes</i>	Root	Aqueous	50	-	-	-	-
	Flower	Ethyl acetate	-	65	72	-	56
	Leaf	Ethyl acetate	-	-	73.7	-	54
	Root	Ethyl acetate	53.5	-	-	60	52
	Leaf	Methanol/chloroform	52	-	-	58.5	-
	Root	Methanol/chloroform	54	60	62.5	53.7	50
<i>S. macrostema</i>	Leaf	Aqueous	64	-	-	-	-
	Root	Aqueous	51	-	-	-	-
	Flower	Ethyl acetate	-	-	-	100	-
	Leaf	Ethyl acetate	50	-	-	63.5	-
	Root	Ethyl acetate	53	-	-	50	53
	Leaf	Methanol/chloroform	-	-	-	60	-
<i>T. lucida</i>	Root	Methanol/chloroform	-	-	-	57.5	50
	Flower	Aqueous	54	-	-	-	-
	Leaf	Aqueous	60	58.5	-	-	-
	Root	Aqueous	65	62	-	-	-
	Flower	Ethyl acetate	-	-	76	90	-
	Leaf	Ethyl acetate	50	-	78.7	81	58.75
	Root	Ethyl acetate	50.5	-	-	50	53.75
	Flower	Methanol/chloroform	62	-	78	78.7	55
	Leaf	Methanol/chloroform	53	-	78.7	50	-
Root	Methanol/chloroform	52	50.5	77.5	56	-	

TABLE 3. Inhibitory growth concentration half (IC₅₀) of crude plant medicinal extract against *Candida albicans* (Ca), *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), *Mucor circinelloides*(Mc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Sporothrix schenckii* (Ss).

Species	Organ	EXTRACT	IC ₅₀ on test fungi* (mg/ml) [#]				
			Ca	Cl	Mc	Sc	Ss
<i>A. ludoviciana</i>	Flower	Aqueous	4	-	-	-	-
	Leaves	Aqueous	108	-	-	-	-
	Root	Aqueous	38	-	-	-	-
	Flowers	Ethyl acetate	-	-	-	160	140
	Leaves	Ethyl acetate	25	-	-	250	250
	Root	Ethyl acetate	4	107	-	107	27
	Flowers	Methanol/chloroform	33	-	-	20	27
	Leaves	Methanol/chloroform	95	100	80	95	91
	Root	Methanol/chloroform	-	-	-	65	100
<i>H. longipes</i>	Root	Aqueous	168	-	-	-	-
	Flower	Ethyl acetate	-	9	-	-	-
	Root	Ethyl acetate	5	-	-	4	4
	Leaves	Methanol/chloroform	500	-	-	430	-
	Root	Methanol/chloroform	100	83	80	93	100
<i>S. macrostema</i>	Leaves	Aqueous	34	-	-	-	-
	Root	Aqueous	51	-	-	-	-
	Leaves	Ethyl acetate	25	-	-	18	-
	Root	Ethyl acetate	10	-	-	10	10
	Leaves	Methanol/chloroform	-	-	-	76	-
	Root	Methanol/chloroform	-	-	-	43	64
<i>T. lucida</i>	Flower	Aqueous	60	-	-	-	-
	Leaves	Aqueous	11	12	-	-	-
	Root	Aqueous	60	68	-	-	-
	Flowers	Ethyl acetate	-	-	21	31	-
	Leaves	Ethyl acetate	88.7	-	51	50	70
	Root	Ethyl acetate	16	-	46	11	14
	Flowers	Methanol/chloroform	37	-	-	250	330
	Leaves	Methanol/chloroform	49	-	310	500	-

TABLE 4. Qualitative composition from leaf *A. ludoviciana* extract obtained with chloroform-methanol

Compounds identified	Relative abundance (%)
camphor	0.35
1-8 cineol	0.14
borneol	6.19
<i>cis</i> -verbenol	0.69
Mirtenol	0.52
Eugenol	0.73
Caryophyllene	0.84
α -farnesene	0.63
Spathulenol	3.093
derivatives of caryophyllene	5.091
derivatives of spathulenol	1.166

VIII.1 RESULTADOS ADICIONALES

VIII.1.1. ACEITES ESENCIALES DE LA HOJA DE ESTAFIATE (*Artemisia ludoviciana* Nutt.) CON ACTIVIDAD CONTRA *Phytophthora* spp.

Damián-Badillo Luz María, Salgado-Garciglia, Rafael y Martínez-Pacheco M. Mauro.

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-1, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mújica s/n. Col. Felicitas del Río, Morelia, Mich, México. C.P. 58060. 443 3 26 57 88. Dirección electrónica: luzdaba@yahoo.com.mx

RESUMEN

El estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt.) es ampliamente utilizado en la medicina tradicional mexicana para aliviar el dolor y malestar intestinal. Fue utilizado en este estudio compuestos contra diferentes especies de *Phytophthora*. La actividad microbicida contra *Phytophthora* spp se encontró en los extractos crudos de la parte aérea de la planta (tallo y hojas). El extracto clorofórmico metanólico de hoja de *A. ludoviciana* inhibió el crecimiento de aislados silvestres del oomiceto *Phytophthora* sp. y del cual se obtuvo una fracción cromatográfica con un $R_f = 0.72$ que contuvo aceites esenciales capaces de inhibir el crecimiento de los oomicetos con una MIC de 0.2-0.4 mg·ml⁻¹. Los compuestos mayoritarios de la fracción microbicida fueron el borneol (16.28), el camfor (7.41 %) y el *cis*-verbenol (1.69 %). Se observó que una mezcla de borneol, camfor y *cis*-verbenol inhibieron el crecimiento de *Phytophthora* spp. con un efecto similar al extracto crudo y a la fracción cromatográfica activa, los compuestos puros aplicados en forma individual no inhibieron el crecimiento de los oomicetos. El extracto con acetato de etilo sólo inhibió el crecimiento de dos especies de *Phytophthora* (*P. capsici* y *P. cinnamomi*).

Palabras clave: *Artemisia ludoviciana*, Borneol, Camfor, *cis*-Vervanol, *Phytophthora* sp.

ABSTRACT

The “estafiate” (*Artemisia ludoviciana* Nutt.) is used in mexican traditional medicine to relieve the pain and intestinal problems. It and was analyzed in this study for chooser antioomicete activity against different *Phytophthora* species. The microbiocide activity against *Phytophthora* spp was found in crude extracts of aerial parts of the plant (leaves and stems). The aerial chloroform methanol extract of leaves of *A. ludoviciana* inhibited the growth of the strains of the oomicete *Phytophthora* sp with the chromtografic fraction with $R_f = 0.72$ that contained scential oils, if inhibitedd the oomycete growth with MIC = 0.2-0.4 mg·ml⁻¹. The most abundant compounds of the microbiocide fraction were borneol (16.28), camphor (7.41 %) and *cis*-verbenol (1.69 %). The borneol, camphor and *cis*-verbenol mixture, inhibited the growth of *Phytophthora* sp. crude extract and chromatografic fraction. The pure compounds alone did not inhibited the oomycete growth. The ethyl acetate extract only inhibited two species *Phytophthora* alone (*P. capsici* and *P. cinnamomi*).

Key words: *Artemisia ludoviciana*, Borneol, Camfor, *cis*-Vervenol, *Phytophthora*.

INTRODUCCIÓN

El género *Phytophthora* se encuentra relacionado a las algas heterokontas y café doradas, despliega diferentes formas de interacción con las plantas hospederas y su control es diferente al que se aplica a los hongos verdaderos y de los cuales se encuentra filogenéticamente alejado, razón por la cual se ha clasificado dentro del reino Chromista (Van de Peer y De Wachter, 1997). Incluye más de 50 especies fitopatógenas para más de 150 cultivos de importancia económica y responsable de la enfermedad de los tizones entre otras enfermedades devastadoras. Dependiendo de la especie puede infectar al follaje (*Phytophthora infestans* y *P. cactorum*), a la raíz y al tallo (*P. cinnamomi*) e incluso fruto. El interés por controlar a este patógeno se renovó al detectar cepas agresivas en el occidente mexicano en la región productora de aguacate y frutillas, así como la detección de la agresiva cepa mexicana A2 (mate type) de *P. infestans* que afecta significativamente a los cultivos de papa, tanto en Europa como en otras partes del mundo (Hohl y Islein 1984; Goodwin 1997). Lo anterior ha motivado a la búsqueda de métodos alternativos al control químico convencional, para obtener sustancias antioomiceto eficaces y eco-amigables. Dentro de la diversidad biológica, una alternativa es el uso de plantas medicinales utilizadas por la población como es el caso del aceite esencial de *Ocimum adscendes* cuyo efecto protector contra hongos de almacenaje en semilla de *Capsicum annum* fue más efectivo que el obtenido por fungicidas convencionales (Asthana *et al.*, 1989). Por otra parte, se ha reportado que el extracto crudo de *Eucalyptus citriodora* y aceites esenciales de otras especies vegetales inhibieron el crecimiento micelial de oomicetos como *Phytophthora infestans* (Schwan-Estrada, 1998; Mine Soylu *et al.*, 2006)

Potencialmente, plantas del género *Artemisia* pueden ser una fuente de compuestos tóxicos para oomicetos del género *Phytophthora*, algunas especies de este género han sido estudiadas extensamente desde el punto de vista fitoquímico, debido principalmente a su uso en la medicina tradicional para el alivio de padecimientos estomacales. En *A. annua*, *A. absinthium*, *A. santonicum* y *A. spicigera*, se han

identificado los compuestos camfor, germacreno D, *trans*-pinocarveol, β -selineno, β -cariofileno, artemisia cetona, *z*-epoxyocimeno, crisantenil acetato, *z*-epoxiocimeno y β -thujona, todos poseedores de cierta actividad antifúngica, mientras que otros como la arteanuina B y artemisinina, tienen efecto tóxico contra los protozoarios intestinales *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Ramos-Guerra, 2004; Juteau *et al.*, 2002; Kordali, *et al.*, 2005).

A. ludoviciana Nutt., es una especie ampliamente distribuida en territorio mexicano y comúnmente conocida como “estafiate”, con propiedades medicinales y uso similar a otras especies del mismo género, como las descritas anteriormente, se reporta que también posee actividad antifúngica contra hongos patógenos de plantas y vertebrados (Damián-Badillo *et al.*, 2006).

Por lo que dentro del contexto de la utilización de las plantas medicinales mexicanas para el control de fitopatógenos, específicamente oomicetos, el propósito de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto tóxico de *A. ludoviciana* sobre el crecimiento de cinco especies de *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. infestans* y *P. mirabilis*).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Reactivos. Todas las sustancias fueron grado reactivo y los aceites esenciales puros Camfor, Borneol y *cis*-Verbenol, fueron adquiridos de Sigma Co.

Material Vegetal. Especímenes de *A. ludoviciana* Nutt. fueron colectadas en la zona ubicada en; norte 20°24', al sur 17°55' de latitud norte; al este 100°04', al oeste 103°44' de longitud oeste, en la época de floración y en su ambiente natural, entre los meses de septiembre y octubre. Un ejemplar se preparó para su identificación en el Herbario de la UMSNH. El material fue secado a temperatura ambiente, se separó en raíz, área verde (tallo y hojas) y flor, después se pulverizó y se guardó protegido de la luz directa hasta el momento de la extracción.

Cultivo de oomicetos. Las cepas silvestres de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. infestans* y *P. mirabilis*, fueron aisladas de tejidos enfermos de sus plantas hospederas (fresa, chile, aguacate y papa, respectivamente). Fueron cultivados en medio papa dextrosa, una vez crecido el micelio, se mantuvieron en papa dextrosa agar (PDA) (Difco, USA) y crecidos entre 19 y 22 °C por 7 a 15 días según la especie.

Extracción. A 100 g de la planta en polvo se le añadió como solvente, una mezcla de $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (1:2 v.v⁻¹) y se dejó en maceración por 5 días a 4°C, después se filtró, se removió el solvente y el extracto fue resuspendido en etanol. Para el extracto con acetato de etilo se utilizó un equipo soxhlet por 2h a 74°C, se filtró, se removió el solvente y el residuo fue también resuspendido en etanol y mantenido a 4°C hasta el momento de realizar los bioensayos.

Cromatografía en capa fina. El fraccionamiento del extracto de cloroformo-metanol de *A. ludoviciana* se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (gel de sílice 60, Sigma®; placas de 20 x 20 cm) con un sistema de solventes de $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (2:1 v.v⁻¹) en una cámara cromatográfica. Las placas fueron secadas a temperatura ambiente y se revelaron con luz ultravioleta (*uv*) a 254 nm, marcándose las bandas correspondiente a la fracciones. Se calculó el R_f para cada una de las bandas. Se obtuvieron seis fracciones diferentes y fueron eluidas con 10 ml de la mezcla cloroformo-metanol (2:1 v.v⁻¹). Se removió el solvente a cada fracción utilizando un rotavapor a una temperatura de 45°C y se disolvió en 1 ml de etanol absoluto para los bioensayos y en metanol para la cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).

Cromatografía de gases acoplada a masas (CG/EM). El análisis del extracto de la planta y de la fracción activa, se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, con detector de masas HP 5973, con una columna capilar Equity 5 (30m x 20 mm). La temperatura del horno fue de 50 a 200°C a 13°C·min⁻¹, 200-

300°C y 300 °C·5 min⁻¹ y programada a 250°C a 2°·min⁻¹. La temperatura inicial del inyector fue de 40°C, incrementándose de 2°C a 250°C. El espectro de masas fue tomado a 70 eV con un rango de masas de 20 a 450. La producción del aceite esencial (w·v⁻¹) fue del 0.94%. La identificación de compuestos se llevó a cabo por la comparación de los espectros de masas y el tiempo de retención, con la base de datos espectrales NIST, el porcentaje de confiabilidad fue del 94%.

Inhibición del crecimiento. Las cajas con agar papa dextrosa fueron inoculadas con fragmentos de micelio de 0.2 mm² en el centro de la caja Petri, incubadas de 7 a 15 días a 19°C ó 22°C dependiendo del oomiceto. Cuando creció el micelio, se colocó 1cm² de éste sobre papel filtro impregnado con 100 µl de los extractos, fracciones o compuestos diluídos en etanol y se cultivaron en las condiciones mencionadas anteriormente. La concentración de los compuestos mayoritarios fue la contenida en la fracción: borneol (63 µg.ml⁻¹), canfor (28 µg.ml⁻¹) y *cis*-verbenol (6.5 µg.ml⁻¹). Cada 12 h por quince días consecutivos se midió el diámetro de inhibición en los cultivos (20 mm), el correspondiente al disco de papel (10 mm) no fue incluido. Los resultados obtenidos de las pruebas se presentan como promedio ± EE de la zona de inhibición ($I \% = (C-T)/CX100$: *I*% = Inhibición relativa, *C* = diámetro colonial del control, *T* = diámetro colonial del hongo tratado). Se utilizaron 100 µl de etanol absoluto y agua como referencia para su comparación. Se midió el crecimiento máximo siendo de 2 cm, lo que se consideró como el 100% de crecimiento, para calcular el % de inhibición se midió el halo y se hizo la proporción correspondiente en cada uno de los casos. En el caso de la inhibición del 100% no hubo crecimiento. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

La concentración mínima de extracto vegetal y aceite esencial requerido para un control completo del crecimiento del patógeno (MIC) se expresó en mg·ml⁻¹ y se clasificó como efecto biocida sobre *Phytophthora* sp.

Análisis de Resultados. Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces con tres réplicas de cada tratamiento. El programa Statistic 7.0, fue usado para calcular la significancia de los datos por la prueba de Tukey ($p < 0.001$).

RESULTADOS

De los diferentes tipos de extractos obtenidos de *A. ludoviciana* para encontrar un efecto antioomiceto en esta planta, se observó que los extractos acuosos no presentaron esta actividad (datos no presentados). El extracto obtenido con la mezcla de cloroformo metanol del área verde de esta especie, inhibió el crecimiento al 100 % en cuatro de los oomicetos y en el caso de *P. infestans* se observó una inhibición del 60 %. Solo *P. capsici* y *P. cinnamomi* fueron sensibles a los extractos obtenidos con acetato de etilo. También se observó que la raíz no contiene metabolitos que afecten el crecimiento de los oomicetos (Cuadro 1). El extracto de hoja obtenido con cloroformo metanol se fraccionó por cromatografía de capa fina y se obtuvieron seis señales cromatográficas, la cuales se ubicaron en base a su R_f y se probaron contra las cinco especies de *Phytophthora*, de las cuales la fracción tres (F3) inhibió el crecimiento de todos los oomicetos con una DL_{50} menor en relación a las otras fracciones que inhibieron el crecimiento, por lo que es una fracción que contiene metabolitos vegetales capaces de inhibir el crecimiento de *Phytophthora* sp (Tabla 2).

Para conocer la composición de los aceites esenciales de las fracciones, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas, dando como resultado la identificación de compuestos principalmente terpenoides; se observa que a diferencia de la fracción uno, el resto de las fracciones contienen borneol (16.2 %), canfor (7.4 %) y/o *cis*-verbenol (1,69 %) como los compuestos mayoritarios (Tabla 3).

Para conocer cual de los componentes mayoritarios detectados en el extracto de hoja de *A. ludoviciana* es el responsable del efecto inhibitorio del crecimiento, los oomicetos se expusieron a los compuestos puros en forma aislada y en una mezcla de ellos. Los resultados muestran que los compuestos puros de manera aislada no

tienen efecto sobre el crecimiento de los oomicetos probados. Sin embargo, con la mezcla de ellos, el efecto inhibitorio del crecimiento de *Phytophthora* sp llega a ser del 100 % (Figura 1A), de manera similar al observado por el extracto crudo y la TLC fracción 3 (Figura 2B).

DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas en sus diferentes estadios de desarrollo, en la competencia natural por nuevos nichos ecológicos o en sus mecanismos de defensa contra microorganismos y depredadores son la fuente natural para buscar alternativas de control de microorganismos que causan daño a la salud animal y vegetal, a los alimentos y causan biodeterioro a materiales diversos. En este trabajo se buscó en *A. ludovisiana* compuestos volátiles que inhibieran el crecimiento de *Phytophthora* spp. Los resultados del escrutinio fue que el extracto cloroformo metanol del área verde de *A. ludovisiana* inhibió el crecimiento de los oomicetos y que el contenido de los metabolitos comunes en los extractos de diferentes partes de *A. ludovisiana* varía de un órgano a otro, ya que el extracto con mayor actividad lo presentó el obtenido con hojas y tallos, mientras que los obtenidos de la raíz resultaron sin ningún efecto aparente (Tabla 1). Mientras que los otros extractos inhibieron a dos especies únicamente, estos resultados demuestran que la variabilidad de especies en un mismo género es significativa. Lo anterior permite comentar que los oomicetos más susceptibles a los extractos de esta especie vegetal, fueron *P. capsici* y *P. cinnamomi* aún cuando pertenecen a grupos diferentes (II y IV respectivamente) dentro de la clasificación del género *Phytophthora*, mientras que el resto no fueron susceptibles. Cabe mencionar que tanto *P. cactorum* como *P. infestans* y *P. mirabilis* pertenecen al grupo I, por lo que esta diferencia puede ser ocasionada por las características particulares de los grupos citados (Cooke *et al.*, 2000).

Cuando las fracciones cromatográficas se ensayaron contra los oomicetos, se observó que sólo la fracción tres (F3) fue tóxica para las cinco especies de

Phytophthora. Por otra parte, *P. capsici* y *P. infestans* fueron sensibles por los menos a cinco fracciones. Una observación de interés porque se esperaría que *P. infestans* y *P. mirabilis* hubieran tenido el mismo comportamiento ya que pertenecen al mismo subgrupo I, mientras que *P. capsici* se encuentra en el segundo grupo (Cooke *et al.*, 2000). Una explicación probable es que se deba al efecto de la concentración de metabolitos y a la sensibilidad de cada especie frente a los mismos.

En cuanto a la identificación de los compuestos borneol, camfor y *cis*-verbenol como componentes principales del aceite esencial en el extracto de hoja de *A. ludoviciana* con propiedades antioomiceto, es el primer reporte donde se incluyen estos tres compuestos. Aceites esenciales han sido reportados para *A. dracunculus*, *A. absinthium*, *A. santonicum* y *A. spicigera*, los cuales presentaron una potente actividad antifúngica contra 34 especies de fitopatógenos entre los que se halla *P. capsici* y se le atribuye esta actividad a monoterpenos oxigenados entre los que sólo se encuentran los dos primeros compuestos identificados en nuestra fracción (Meepagala *et al.*, 2002; Kordali *et al.*, 2005). Por otra parte, también se ha reportado que la parte aérea de *A. dracunculus* L. Var. *dracunculus*, contiene compuestos que presentaron actividad microbicida contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Celletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*, pero tampoco corresponden a los identificados en este trabajo (Meepegala, *et al.*, 2002, 2003). Otro reporte de actividad antifúngica en relación al género *Artemisia*, es el que se refiere a los extractos obtenidos de la parte aérea de *A. verlotorum* contra el oomiceto *Saprolegnia ferax*, trabajo en el que no se indican los compuestos responsables de dicha actividad (Macchioni *et al.*, 1999).

La mezcla de borneol, canfor y *cis*-verbenol es indispensable para obtener el efecto antioomiceto, ya que de manera aislada no lo presentan, como lo reportó Shafi (2004), al describir que el borneol no tiene actividad antioomiceto contra *P. capsici*. Este último hecho nos sugiere que al realizar bioensayos se tenga la precaución de probar tanto compuestos puros, como las mezclas del resto de los metabolitos que

se encuentran presentes en un extracto o fracción activa, ya que un efecto puede ser el resultado del sinergismo de varios componentes.

Este trabajo además de presentar el efecto antioomiceto del extracto cloroformo-metanol del área verde de *A. ludoviciana* y la importancia de utilizar mezclas de compuestos, genera nuevas líneas de investigación que permitan la obtención de otros compuestos más eficientes y eficaces, así como el conocimiento de su mecanismo de acción.

CONCLUSIONES

El extracto cloroformo-metanol del área verde de *A. ludoviciana* y la fracción 3 obtenida de este, contienen a los metabolitos borneol, canfor y *cis*-verbenol, los cuales presentaron propiedades antioomiceto al encontrarse mezclados, por lo que se puede afirmar que esta planta es tóxica para *Phytophthora* spp.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue apoyado por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a los proyectos; CIC-2.10-RSG y CIC-2.1-MMP. LMBD fue becaria de la UMSNH. Un agradecimiento especial a C. Márquez, A. Flores García por la asistencia en los análisis químico y estadístico, a la Ph.D. Silvia Fernández Pavia del IIAF-UMSNH por la donación de los aislados de *Phytophthora* sp.

LITERATURA CITADA

Asthana , A., Dixit, K., Tripathi, N.N. y Dixit, S.N. 1989. **Efficacy of *Ocimum* oil against fungi attacking chilli seed during storage.** *Tropical Science* 49: 15-20.

Byers, J.A. 1995. **Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles.** En R.T. Cardé, W.J. Bell (eds). *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall, New York. pp. 154-213.

Byers, J.A., Zhang, Q.H. y Birgersson, G. 2000. **Strategies of a bark beetle, *Pityogenes bidentatus*, in an olfactory landscape.** *Naturwissenschaften* 87: 503-507.

Cooke, D.D., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. y Brasier, C.M. 2000. **A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes.** *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-37.

Damián-Badillo, L. M., Salgado-Garciglia, R. y Martínez-Pacheco, M.M. 2005. *Revista Latinoamericana de Química*, pp. 122.

Fun, C.E. y Svendsen, A.B. 1990. **The essential oil of *Limpia alba* (Mill) N.E. Br.** *Journal Oil Research* 2: 265-267.

Goodwing, S.B. 1997. **The population genetics of *Phytophthora*.** *Phytopathology* 87: 462-473.

Hohl, H.R. y Iselin, K. 1984. **Strains of *Phytophthora infestans* with A2 mating type behaviour.** *Trans. Br. Mycologia*. 83: 529-530.

Jakupovic, J., Tan, R.X., Bohlmann, F., Boldt, P.E. y Jia, Z.J. 1991. **Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*.** *Phytochemistry* 30: 1573-1577.

Juteau, F., Masotti, V., Bessiere, J.M., Dherbomez, M. y Viano J. 2002. **Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil.** *Fitoterapia* 73: 532-535.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. y Yildirim, A. 2005. **Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53 (24); 9452-9458

Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. y Yildirim, A. 2005. **Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 1408-1416.

Macchioni, F., Perrucci, S., Flamini, G., Cioni, P.L. y Morelli, I. 1999. **Antimycotic activity against *Saprolegnia ferax* of extracts of *Artemisia verlotorum* and *Santolina etrusca*.** *Phytotherapy Research* 13: 242-244.

Meepagala, K.M., Sturtz, G. y Wedge, D.E. 2002. **Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. Var. *dracunculus*.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 6989-6992.

Meepagala, K.M., Kuhajek, J.M., Surtz, G.D. y Wedge, D.E. 2003. **Vulgarone B, the Antifungal Constituent in the Steam-Distilled Fraction of *Artemisia douglasiana*.** *Journal of Chemical Ecology* 29(8): 1771-1780.

Mine Soyly, E., Soner S. y Kurt, S. 2006. **Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*.** *Micopathologia* 161: 119-128.

Ramos-Guerra, M.C., Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villareal, J., Oranday-Cárdenas, A. y Treviño-Villareal, L. 2004. **Actividad *in vitro* del extracto acuoso y orgánico de las hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt (istafiate) sobre *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.** *Revista Salud Pública y Nutrición* 4: 66-67.

Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R, Cruz, S.M., Bonaldo, S.M. y Pascholati, S.F. 1998. **Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogenicos.** *Summa Phytopathologica* 21: 101.

Shafi, P. M., Nmabiar, M.K., Clero, R.A., Sar,a, Y.R. y Verna, S. 2004. **Composition and antifungal activity of the oil of *Artemisia nilagirica* (Clark) Pamp.** *Journal of Essential Oil Research*. 4 pp.

Van de Peer, Y., De Wachter, R. 1997. **Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking account site-to-site rate variation in 18S rRNA.** *Journal of Molecular Evolution* 45: 619-630.

Cuadro 1. Dosis efectiva media de extractos de *Artemisia ludoviciana* Nutt. sobre *Phytophthora* sp.

TEJIDO	EXTRACTO	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)				
		<i>P. cactorum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. infestans</i>	<i>P. mirabilis</i>
Flor	Acetato de etilo	-	40	60	-	-
Área verde	Acetato de etilo	-	47	-	-	-
Raíz	Acetato de etilo	-	-	-	-	-
Flor	Cloroformo metanol	-	90	93	-	-
Área verde	Cloroformo metanol	100	100	100	60	100
Raíz	Cloroformo metanol	-	-	-	-	-

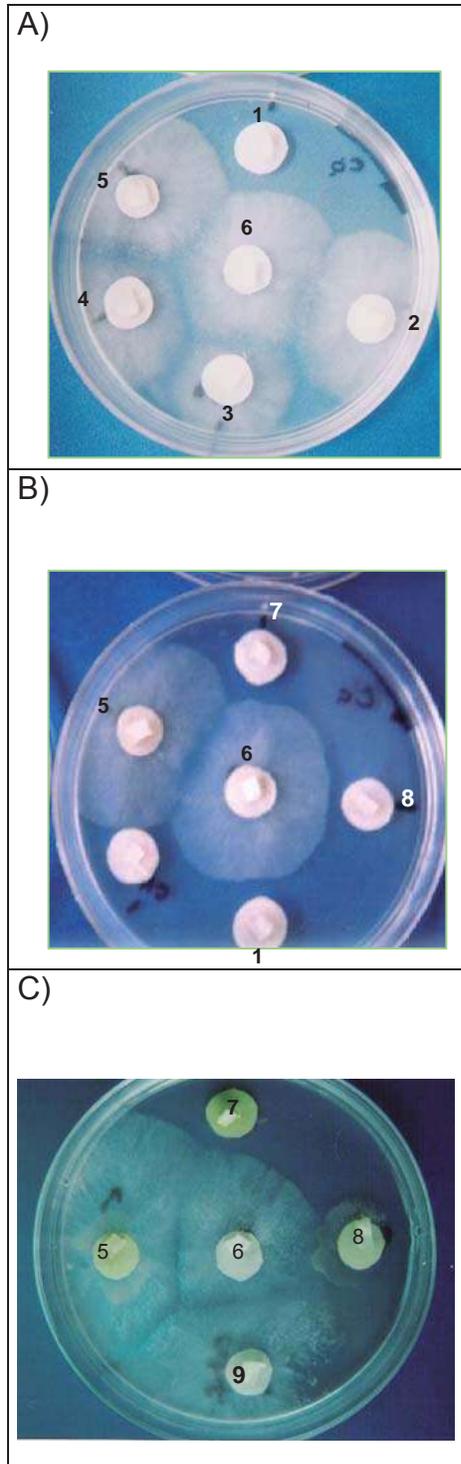
Cuadro 2. Actividad antioomiceto de las fracciones de extracto cloroformo-metanol del área verde *Artemisia ludoviciana* Nutt. sobre *Phytophthora* spp.

FRACCIÓN	R_f	MIC (mg·ml ⁻¹)				
		<i>P. cactorum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. infestans</i>	<i>P. mirabilis</i>
F1	0.79		3.9			
F2	0.74		3.2		5.3	
F3	0.72	0.4	0.2	0.2	0.2	0.28
F4	0.70		0.5		0.7	
F5	0.58		0.5		1.1	
F6	0.57		1.6		2.3	

Cuadro 3. Compuestos mayoritarios del extracto cloroformo-metanol del área verde de *Artemisia ludoviciana* Nutt. detectados por CG/EM

MUESTRA	COMPUESTOS	Abundancia	Tiempo Retención (min)	Porcentaje
FRACCIÓN 1	Limoneno	5 800	5.62	0.116
FRACCIÓN 2	Canfor Borneol	2 000 5 000	7.04 7.27	0.291 0.912
FRACCIÓN 3	Eucaliptol Terpineol cis-verbenol Canfor Borneol Mirtenal Espatulenol Derivado de cariofileno Derivado de Espatulenol	10 000 10 000 30 000 100 000 220 000 8 000 9 000 10 000 15 000	5.6 6.45 6.97 7.04 7.27 7.594 7.623 11.6 11.7	0.530 0.340 1.69 7.41 16.28 0.342 0.422 0.553 0.843
FRACCIÓN 4	Eucaliptol Terpineol cis-verbenol Canfor Borneol Espatulenol Derivado del cariofileno Derivado del Espatulenol	15 000 10 000 25 000 80 000 300 000 10 000 12 000 8 000	5.67 6.47 6.97 7.04 7.27 11.60 11.68 12.13	0.258 0.328 1.29 4.270 12.51 0.442 0.607 0.211
FRACCIÓN 5	cis-verbenol Canfor Borneol	2 800 5 000 28 500	6.97 7.05 7.27	0.318 1.824 3.779
FRACCIÓN 6	Canfor Borneol	6 000 20 000	7.05 7.27	0.79 1.59

Figura 1. Bioensayos contra *Phytophthora* sp. de 1: mezcla de borneol, canfor y *cis*-verbenol; 2: borneol; 3: canfor; 4: *cis*-verbenol; 5: Etanol; 6: Agua; 7: Extracto cloroformo-metanol del área verde de *Artemisia ludovisiana*, 8: Fracción 3 y 9: borneol y canfor.



VIII.1.2. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL Y UNA FRACCIÓN ACTIVA ANTIFÚNGICA Y ANTIOOMICETO DE ESTAFIATE (*Artemisia ludoviciana* Nutt.).

Damián-Badillo Luz María, Salgado-Garciglia Rafael y Martínez-Pacheco Mauro M. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. e-mail: luzdaba@yahoo.com.mx

RESUMEN

El aceite esencial de hojas y tallos de *Artemisia ludoviciana* Nutt. (estafiate), una planta medicinal mexicana, fue obtenido por medio de la maceración con cloroformo-metanol (1:2) y por extracción directa con hexano, una fracción activa fue separada del aceite esencial con propiedades antifúngicas y antioomiceto por la técnica de cromatografía en capa fina (CCF). Su composición química fue analizada usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Con la técnica de maceración, en el aceite se identificaron más de 34 compuestos, principalmente terpenos, algunos esteroides y compuestos hidrocarbonados, que representaron un 81.68% del aceite esencial. Los compuestos identificados en el aceite extraído con hexano fueron mayormente volátiles. Los principales componentes encontrados por CG/EM en el aceite esencial obtenido con cloroformo-metanol fueron borneol, cariofileno, espatulenol, farnesol y tetradecano; mientras que los de extracción con hexano fueron tujol, borneol, terpineol, escualeno, tetradecano y espatulenol. La fracción activa está constituida por tres compuestos mayoritarios, borneol (46.9%), canfor (17.9%) y *cis*-verbenol (2.56%),

PALABRAS CLAVE. *Artemisia ludoviciana*, Asteraceae, composición del aceite esencial, camfor, borneol, *cis*-verbenol.

ABSTRACT

The essential oil of the leaves and stems of *Artemisia ludoviciana* Nutt. (estafiate), a Mexican medicinal plant, was obtained using both chloroform-methanol (1:2) maceration and hexane direct extraction, an antifungal active fraction was separated of the essential oil with antifungal properties by thin layer chromatography (TLC)

technique. Their chemical composition were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). With the maceration technique, in the oil there were identified more than 34 compounds, mainly terpenes, some sterols and hydrocarbons compounds, representing 81.68% of the essential oil. The identified compounds in the hexane extracted oil were mainly volatile compounds. The main components found by GC/MS in the chloroform-methanol extracted oil were borneol, caryophyllenes, spathulenol, farnesol and tetradecane; whereas those of extraction with hexane were thujol, borneol, terpineol, squalene, tetradecane and spathulenol. The active fraction was constituted by three majority compounds, borneol (46.9%), camphor (17.9%) and *cis*-verbenol (2.56%).

KEY WORDS. *Artemisia ludoviciana*, Asteraceae, essential oil composition, camphor, borneol, *cis*-verbenol.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y aromáticas han sido usadas por muchos siglos y aún son todavía una alternativa para diversas enfermedades o padecimientos. En la medicina tradicional de los pueblos, diferentes especies de *Artemisia* tienen aplicaciones medicinales debido en parte a sus aceites esenciales, dependiendo del lugar donde crecen. Las plantas del género *Artemisia* son de la familia Asteraceae, crecen principalmente en Asia, África y América, y se conocen más de 300 especies (Esteban *et al.*, 1986). Las partes con propiedades medicinales pueden ser tallos, hojas, flores, savia o jugo y son usados para el tratamiento de enfermedades tales como diabetes, constipación, reumatismo, cicatrización, infecciones urinarias, de la piel y padecimientos estomacales o contra parásitos intestinales (Rao *et al.*, 1999; Burits *et al.*, 2001). Los aceites de algunas especies son utilizados en la perfumería y medicina, mientras que las hojas de ciertas especies son utilizadas como condimentos (Klayman *et al.*, 1984). Hay diferentes formas de uso (infusión, tintura, aceite, extracto crudo, etc.), la infusión de hojas se recomienda en México como antihelmíntico (Serrato, 2002).

Diversas investigaciones fitoquímicas en especies de *Artemisia* han mostrado que contienen principalmente terpenos, sesquiterpenlactonas, esteroides y flavonoides (Esteban *et al.*, 1986; Tan *et al.*, 1999; Burits *et al.*, 2001). Algunos de estos metabolitos como canfor, germacreno D, trans-pinocarveol, β -selineno, β -cariofileno, artemisia cetona, z-epoxiocimeno, crisantenil acetato, z-epoxiocimeno y β -tujona, han sido identificados en *A. annua*, *A. absinthium*, *A. santonicum* y *A. spicigera*, y se ha reportado que tienen propiedades antifúngicas (Juteau *et al.*, 2002; Kordali, *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales y aromáticas actualmente se utilizan en la fitoterapia moderna ejemplo de ellas, es una especie mexicana conocida comúnmente como estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt.). Aunque existen estudios sobre la composición química del aceite esencial de esta planta (Ramos-Guerra *et al.*, 2004), este estudio principalmente contribuye al análisis del aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana*, así como de los metabolitos con propiedades antifúngicas. Con nuestras investigaciones se ha mostrado que el aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana* y la fracción 3, inhiben el crecimiento de hongos patógenos de humanos y de plantas (Damián-Badillo *et al.*, 2006).

Con la técnica de macerado con cloroformo-metanol se obtuvo el aceite esencial, el cual fue subsecuentemente separado por cromatografía en capa fina para obtener una fracción activa antifúngica y antioomiceto. Tanto el aceite como esta fracción fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal. Las plantas fueron colectadas en floración y en su ambiente natural entre los meses de septiembre y octubre en Uruapan, Michoacán, México. Un ejemplar fue herborizado para ser identificado en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH. Se separó el área verde y el material fue secado a

temperatura ambiente, después se pulverizó y se almacenó en oscuridad hasta el momento de la extracción.

Extracción. a) Cloroformo-metanólica: A 100 g de polvo se le añadió 100 ml de la mezcla $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (1:2 v:v) y se dejó en maceración por 5 días a 4°C, después se filtró, se removió el solvente para obtener el aceite esencial, el cual fue resuspendido en 10 ml de hexano (1 ml/10g) para realizar la cromatografía en capa fina y el análisis por CG/EM. **b) Hexánica:** A 1 g de polvo se le añadió 1 ml de hexano, realizando la extracción con agitación vigorosa, se recuperó el sobrenadante (solvente) por filtración e inmediatamente se sometió al análisis por CG/EM.

Cromatografía en capa fina. El aceite esencial con actividad antifúngica (cloroformo-metanol) se llevó a la separación de sus componentes por cromatografía en capa fina (gel de sílice 60, Sigma®; placas de 20 x 20 cm) con un sistema de solventes de $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (2:1 v:v) en una cámara cromatográfica, aplicando 500 μl del aceite por cada placa. Las placas fueron secadas a temperatura ambiente y se revelaron con luz ultravioleta (uv) a 254 nm, marcando la banda correspondiente a la fracción activa antifúngica 13.7–14.6 ($R_f = 0.72$). La fracción fue eluída con 1 ml del solvente de extracción $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (1:2 v:v), sometida a agitación vigorosa por 2 min y posteriormente fue separada del gel de sílice por centrifugación (10 000 rpm/10 min). Para el análisis de esta fracción por CG/EM, se resuspendió en metanol.

CG/EM. El análisis del aceite esencial y de la fracción activa, se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, con detector de masas HP 5973, con una columna capilar Equity 5 (30m x 20 mm). La temperatura del horno fue de 50 a 200°C a $13^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 200-300°C y $300^\circ\text{C}\cdot 5\text{ min}^{-1}$ y programada a 250°C a $2^\circ\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura inicial del inyector fue de 40°C, incrementándose de 2°C a 250°C. El espectro de masas fue tomado a 70 eV con un rango de masas de 20 a 450. La identificación de compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el análisis por CG/EM (98% de confiabilidad) del aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana* obtenido por maceración con cloroformo-metanol, se identificaron 34 constituyentes, representando el 81.68% del total del aceite (Cuadro 1). En este caso la producción del aceite esencial fue del 0.94% (v/w), similar a lo reportado en otras plantas aromáticas (Mastelic *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2002; Judzentiene y Mockute, 2005) o relacionadas (Pappas, 2001; Lai *et al.*, 2006). En general, los terpenos fueron el grupo dominante en el aceite como borneol, 1-8 cineol, canfor, canfeno, *cis*-verbenol, mirtenol, mirtenal, eugenol, cariofilenos, farnesol, espatulenol, etc.; sin embargo también fueron detectados estigmasterol, γ -sitosterol, escualeno, α -amirina y β -amirina, entre otros (Cuadro 1, Figura 1).

En total, 10 compuestos fueron identificados en la muestra con extracción directa con hexano, representando un 78.8% del aceite, como se describe en el Cuadro 2. Se identificaron terpenos volátiles como el grupo dominante de compuestos encontrados en el aceite obtenido por maceración, como el borneol, terpineol, eugenol, cariofileno o espatulenol; no se detectaron *cis*-verbenol, cineol o canfor y además se identificó el monoterpeno tujol (Figura 2). La comparación de ambas muestras de aceite esencial de estafiate demuestra la diferencia en la composición de los compuestos, resultando solo compuestos volátiles al extraer con hexano y tanto volátiles como semivolátiles con la técnica de maceración. Al realizar el bioensayo con el extracto hexánico, no se observó inhibición del crecimiento (datos no presentados).

Ocho de los compuestos detectados en el aceite con propiedades antifúngicas y antioomiceto fueron identificados en la fracción activa (F3) (Cuadro 3), siendo también en su mayoría monoterpenos, aunque los más representativos fueron borneol (46.9%), canfor (17.9%) y *cis*-verbenol (2.56%), que representan el 67.36% de la fracción total (Figura 3). En la Figura 4 se muestran sus respectivos espectros de masas y estructura molecular, obtenidos de acuerdo a la base de datos NIST,

donde se pueden observar los iones moleculares correspondientes a cada uno de los compuestos.

La fracción activa antifúngica y antioomiceto, y el aceite esencial por maceración de hojas y tallos de *A. ludoviciana* inhibieron hasta el 100% algunos hongos patógenos como *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum* y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, no así el extracto con hexano (Damián-Badillo *et al.*, 2006). Por ello, con este estudio se demuestra que los metabolitos mayoritarios presentes en el aceite esencial y fracción antifúngicos, no corresponden a los del extracto con hexano, siendo los responsables de la actividad antifúngica y antioomiceto. Propiedades antifúngicas del aceite esencial de *Artemisia dracuncululus* se deben al contenido de canfor, 1-8 cineol, borneol, α -terpineol, terpineol-4-ol y acetato de bornilo (Kordali *et al.*, 2005), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que tanto el aceite como la fracción activa contienen algunos de estos metabolitos. Los constituyentes *cis*-verbenol, mirtenol, eugenol, cariofileno, α -farneseno y espatulenol se reportan por primera vez en esta especie de *Artemisia*.

El *cis*-verbenol se ha identificado en otras especies vegetales como en el aceite esencial de *Lippia alba*, planta con propiedades antibacterianas (Fun y Svendsen, 1990). Tanto el borneol como el canfor, han sido determinados en esta misma especie y se les han atribuido propiedades antioxidantes y antibacterianas (Yu *et al.*, 2003; Cha *et al.*, 2005; Kordali *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Se identificaron un mayor número de compuestos volátiles y semivolátiles en el aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana*, obtenido por maceración con cloroformo-metanol, al compararse con la extracción directa con hexano. En la fracción antifúngica y antioomiceto activa, claramente se detectaron canfor, borneol y *cis*-verbenol, como los responsables de la actividad, lo cual postula a este aceite esencial como una fuente de compuestos antifúngicos y antioomicetos.

LITERATURA CITADA

- Burits, M., Asres, K. y Bucar, F. 2001. **The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*.** *Phytotherapy Research* 15: 103-108.
- Cha, J.D., Jeong, M.R., Choi, H.J., Zeong, S.I., Moon, S.E., Yun, S.I., Kim, Y.H., Kil, B.S. y Song, Y.H. 2005. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavanulaefolia*.** *Planta Medica* 71(6):575-577.
- Damián-Badillo *et al.*, 2006. Enviado a publicación.
- Esteban, M.D., González Collado, L., Macías, F.A., Massanet, G.M. y Rodríguez, F.L. 1986. **Flavonoids from *Artemisia lanata*.** *Phytochemistry* 25: 1502-1504.
- Fun, C.E. y Svendsen, A.B. 1990. **The essential oil of *Limpia alba* (Mill) N.E. Br.** *Journal Oil Research* 2: 265-267.
- Judzentiene, A. y Mockute, D. 2005. **Composition of Inflorescence and Leaf Essential Oils of *Achillea millefolium* L. with White, Pink and Deep Pink Flowers Growing Wild in Vilnius (Eastern Lithuania).** *Journal Essential Oil Research* 17(6).
- Juteau, F., Masotti, V., Bessiere, J.M., Dherbomez, M. y Viano J. 2002. **Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil.** *Fitoterapia* 73(6) :532-5
- Klayman, D.L. 1993. ***Artemisia annua*. From weed to respectable antimalarial plant.** In **Human Medical Agents from Plants.** Ed. A.D. Kinghorn and M.F. Balanotrin. Washington D.C. USA. p. 242-255.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A. Fakir, A., Ala, A. y Yildirim, A. 2005. **Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum* and *A. spicigera* essential oils.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53:1408-1416.
- Lai, F., Wissing, S.A., Müller, R.H. y Fadda, A.M. 2006. ***Artemisia arborescens* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization.** *AAPS PharmSciTech.* 7(1): Article 2. (<http://www.aapspharmstech.org>).
- Mastelic, J., Milos, M., Kustrak, D. y Radonic, A. 1998. **Essential oil and volatile compounds of *Calaminthia nepeta* (L.) Savi.** *Croatica Chemica Acta* 71(1):147-154.
- Moretti, M.D.L., Sanna-Passino, G., Demontis, S. y Bazzoni. E. 2002. **Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control.** *AAPS PharmSciTech.* 3(2): article 13. (<http://www.aapspharmstech.org>).

Pappas, R.S. 2001. **Unusual alkynes found in the essential oil of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus* from the pacific northwest.** *Journal Essential Oil Research* 13: 187-188.

Ramos-Guerra, M.C., Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villareal, J., Oranday-Cárdenas, A. y Treviño-Villareal, L. 2004. **Actividad *in vitro* del extracto acuoso y orgánico de las hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt (istafiate) sobre *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.** *Revista Salud Pública y Nutrición.* 4: 66-67.

Rao, P.J., Kumar, M., Singh, S. y Subrahmanyam, B. 1999. **Effect of *Artemisia annua* oil on development and reproduction of *Dysdercus koenigi* F. (Hem., Pyrrhocoridae).** *Journal Apply Entomology* 123: 315-318.

Serrato, B. E. 2002. **Estudio fitoquímico de plantas medicinales.** Boletín INIFAP-Morelia. 10 p.

Tan, R. X. Tang, H.Q., Hu, J. y Shuai, B. 1998. **Lignans and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*.** *Phytochemistry* 49(5):157-161.

Yu, H.H., Kim, Y.H., Kil, B.S., Kim, K.J., Jeong, S.I. y You, Y.O. 2003. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Artemisia iwayomogi*.** *Planta Medica* 69 (12): 1159-62.

Cuadro1. Compuestos (CG/EM) que constituyen el aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana* Nutt. obtenidos por maceración con cloroformo-metanol, así como el porcentaje de los mismos en el contenido del aceite.

NÚMERO DE COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	COMPUESTO	CONTENIDO EN EL ACEITE (%)
1	5.66	1,8 cineol	0.32
2	6.44	terpineol	0.31
3	6.97	<i>cis</i> -verbenol	0.70
4	7.04	camfor	0.36
5	7.27	borneol	6.19
6	7.60	mirtenol	0.52
7	7.62	mirtenal	0.41
8	7.81	carveol	0.35
9	8.58	timol	0.52
10	8.83	farnesol	5.73
11	8.97	camfeno	1.25
12	9.31	eugenol	0.73
13	9.66	tetradecano	19.9
14	10.09	cariofileno	0.84
15	10.26	β -farneseno	0.29
16	10.42	α -humuleno	0.20
17	10.58	ledol	0.16
18	10.68	germacreno D	0.63
19	10.76	α - farneseno	0.12
20	10.82	germacreno B	0.69
21	11.61	espatulenol	5.09
22	11.69	óxido de cariofileno	7.09
23	13.18	santalol	0.8
24	14.18	ácido hexadecanóico	1.5
25	14.41	pentadecano	0.48
26	15.06	fitol	0.40
27	15.17	ácido 9-octadecanóico	3.94
28	15.37	9-octadecenal	1.28
29	15.92	estigmasterol	2.03
30	16.86	γ -sitosterol	1.78
31	17.61	α -amirina	4.74
32	18.49	escualeno	4.88
33	19.28	β -amirina	4.38
34	20.36	hentriacontano	3.07

Cuadro 2. Compuestos (CG/EM) que constituyen el aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana* Nutt. obtenidos por extracción directa con hexano, así como el porcentaje de los mismos en el contenido del aceite.

NÚMERO DE COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	COMPUESTO	CONTENIDO EN EL ACEITE (%)
1	5.46	tujol	3.16
2	5.65	borneol	12.62
3	6.68	terpineol	6.70
4	6.98	eugenol	1.66
5	7.20	tetradecano	31.36
6	7.91	germacreno D	1.29
7	8.54	espatulenol	6.36
8	8.61	óxido de cariofileno	10.39
9	10.68	ácido tetradecanoico	2.64
10	15.51	escualeno	2.7

Cuadro 3. Compuestos (CG/EM) de la fracción activa antifúngica (F3) del aceite esencial de *A. ludoviciana* Nutt., así como el porcentaje de los mismos.

NÚMERO DE COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	COMPUESTO	CONTENIDO EN LA FRACCIÓN (%)
1	5.6	1-8 cineol	0.69
2	6.97	<i>cis</i> -verbenol	2.56
3	7.04	camfor	17.9
4	7.27	borneol	46.9
5	7.60	mirtenol	0.545
6	8.81	farnesol	0.462
7	11.61	espatulenol	0.988
8	11.69	cariofileno	0.72

Figura 1. Cromatograma del aceite esencial de hojas y tallos de *Artemisia ludoviciana* Nutt. obtenido por maceración con cloroformo-metanol.

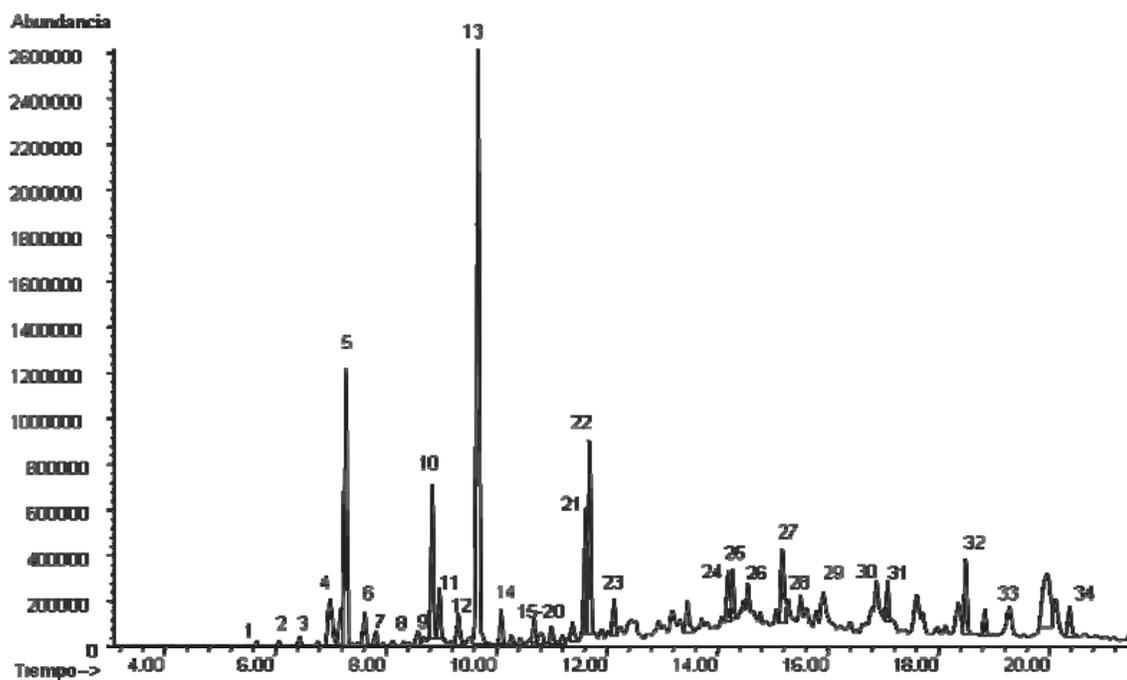


Figura 2. Cromatograma del aceite esencial de hojas y tallos de *A. ludoviciana* Nutt. obtenido por extracción directa con hexano.

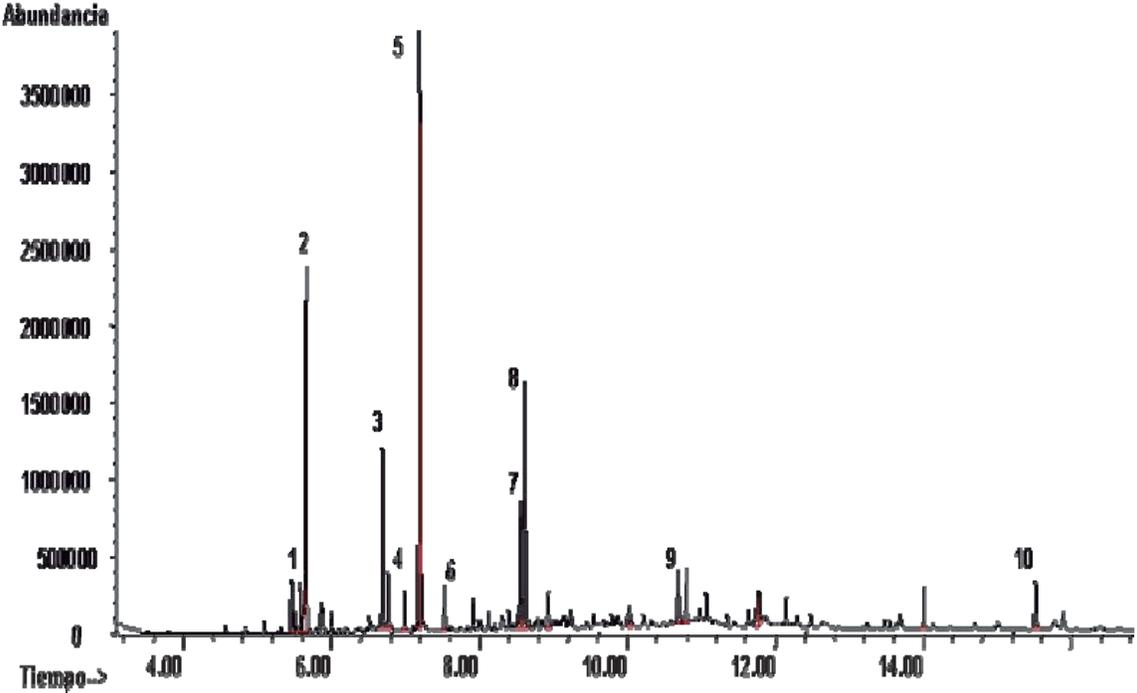


Figura 3. Cromatograma de la fracción activa antifúngica (F3) del aceite esencial de hojas y tallos de *Artemisia ludoviciana* Nutt.

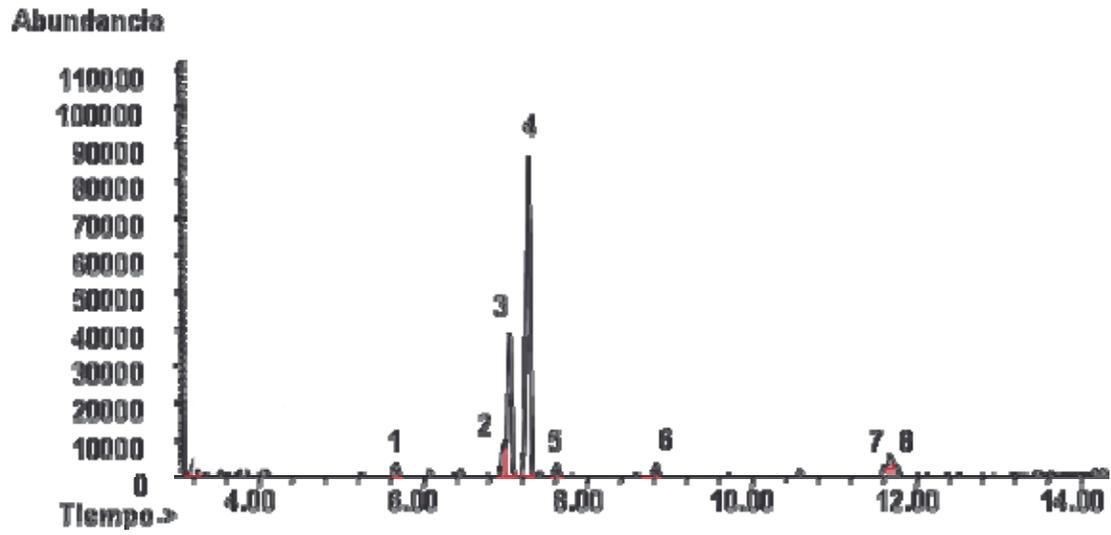
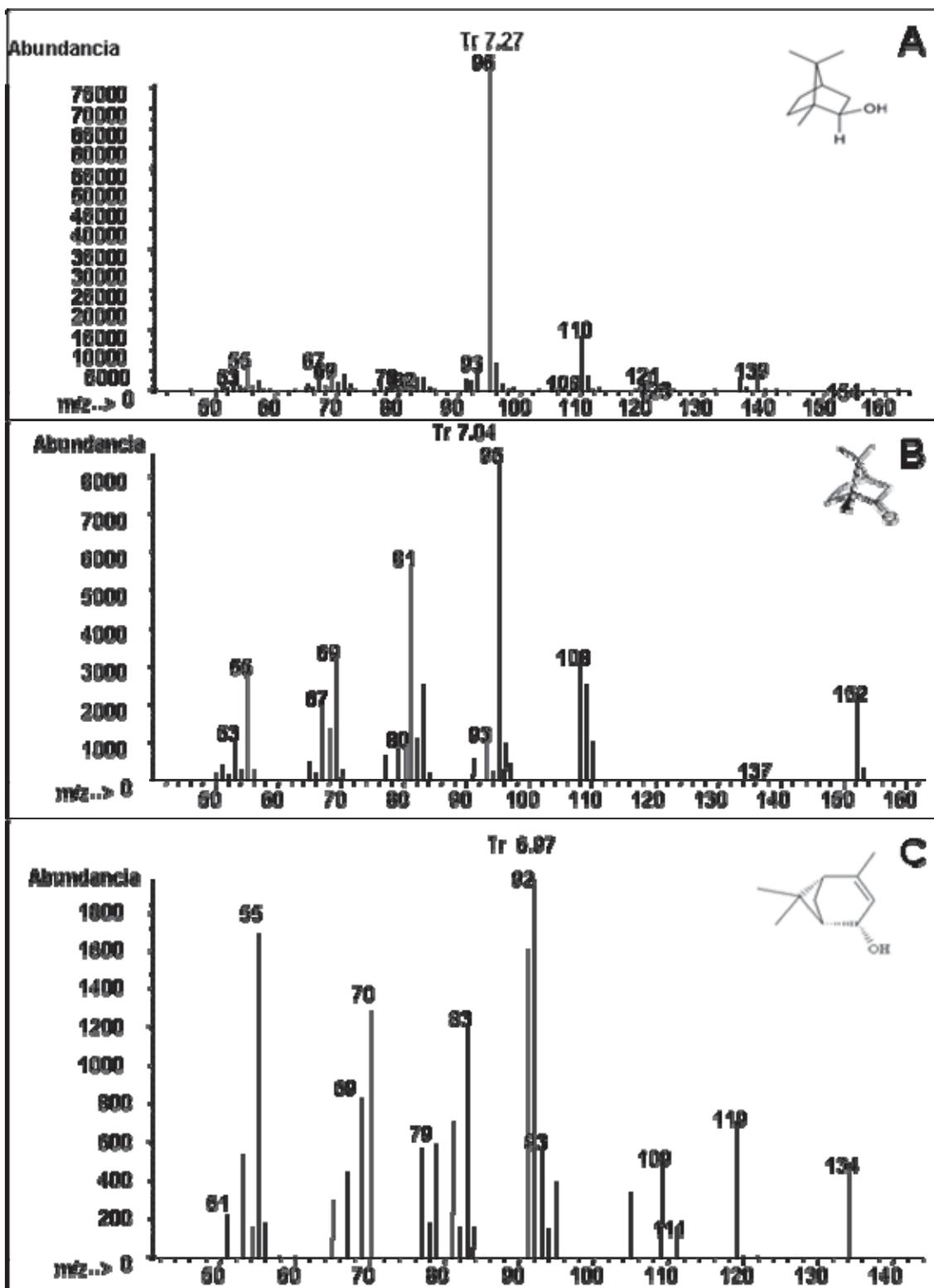


Figura 4. Espectros de masas de metabolitos mayoritarios de la fracción activa antifúngica del aceite esencial de hojas y tallos de *Artemisia ludoviciana* Nutt.: A, borneol; B, canfor; C, *cis*-verbenol.



IX. DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades causadas por hongos (micosis) en humanos se han incrementado a nivel mundial en los últimos 20 años, derivado del aumento de pacientes con alteraciones en su estado inmunitario y al estrés entre otros factores; de acuerdo a los registros de consultas con las que se cuenta, se ha detectado que entre el 5-10%, corresponde a padecimientos causados por estos organismos, siendo las más comunes las micosis en piel y mucosas. En los hospitales representan hasta el 15 % de infecciones e incluso llegan a causar la muerte en algunos pacientes por invasión fúngica masiva (Aiello *et al.*, 2006). Mundialmente, el costo promedio diario para tratar a una persona con problemas micóticos oscila entre 16 y 1,300 dólares dependiendo del país, del tratamiento, y de la gravedad de la misma (Anónimo, 2003), además los tratamientos son largos y se requiere de un seguimiento médico para alternar o combinar los fármacos adecuados para abatir o controlar el problema de resistencia. Lo anterior refleja una problemática real que requiere atención, ya que independientemente del costo, estos patógenos no son específicos de personas adultas, sino que atacan a cualquier edad.

El interés por abatir enfermedades causadas por hongos, ha generado una variedad de compuestos antifúngicos que además del costo por producción, compra y uso, son relativamente caros, presentan efectos secundarios y que en su mayoría son altamente cancerígenos. A partir de 1930 se cuenta con una serie de compuestos antifúngicos comerciales que se catalogan en primera, segunda y tercera generación, tal clasificación ha dependido de manera general de la naturaleza de los mismos, composición y mecanismo de acción. Los antifúngicos de la primera generación fueron metales pesados como el yoduro potásico, metaloides, derivados azufrados y sulfonamidas (Kauffman y Carver, 1997), todos ellos en general con problema de solubilidad lo que dificulta la vía de administración, la biodisponibilidad y genera efectos secundarios adversos que puede incluir en el mejor de los casos alergias o en el peor de los escenarios inducir procesos cancerígenos. Los compuestos de la segunda generación se caracterizan por ser productos de síntesis química, aunque

algunos otros son derivados de productos naturales o también de la actividad metabólica de ciertos microorganismos. Dentro de la nueva gama de compuestos antifúngicos, se ha procurado conjugar la bioquímica y la fisiología de la relación huésped-patógeno para obtener mejores resultados (Lumbreras *et al.*, 2003). Los mecanismos de acción de todos ellos son variados (inhibición de la respiración, del metabolismo de ácidos nucleicos, de la división celular, etc.), aunque en su mayoría se trata de compuestos que inhiben la síntesis de quitina o la síntesis del ergosterol. Sin embargo, la resistencia a estos antifúngicos es hoy en día uno de los principales problemas a resolver para poder controlar a este tipo de patógenos.

En relación a las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos, a nivel mundial también se han incrementado en los últimos cinco años hasta en un 13%, incluso en México se llega a perder hasta el 30% de los granos almacenados por esta misma causa. Los antifúngicos utilizados para solucionar este problema son del mismo tipo que los empleados para abatir las micosis en humanos, cabe resaltar que los fungicidas empleados para este fin, han generado resistencia de por lo menos 100 especies de hongos, induciendo el abuso de pesticidas, lo que impacta directamente sobre el medio ambiente ya que sólo el 1% alcanza al organismo “blanco”, mientras que el 25 % es retenido en el follaje, el 30 % llega al suelo y el 44 % restante es exportado a la atmósfera y a los sistemas acuáticos por escurrimiento y lixiviación, lo anterior eleva los costos de producción hasta en un 16% (Gladstone, 2002).

En cuanto a los oomicetos fitopatógenos, se refiere que éstos llegan a infectar hasta en un 30% a los principales cultivos. Para controlarlos, el gasto de producción llega a ser hasta de la tercera parte ya que son de las plagas más difíciles de erradicar y para su control se utilizan los fungicidas comerciales (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001). Además, en el mercado no existen en el mercado compuestos antioomicéticos para controlar a estos patógenos en los cultivos, pues se aplican antifúngicos para tratar de abatirlos, sin considerar que se trata de organismos con características diferentes a los hongos, por lo que los oomicetos se han clasificado en el reino Chromista.

Entre las diferencias marcadas, es la composición de la pared celular y que las esporas son biflageladas, lo que relaciona a los oomicetos con las algas café y no con los animales como es el caso de los hongos (Judelson y Blanco, 2005).

Por ello se genera la necesidad de buscar fungicidas y oomiceticidas de bajo costo, fácilmente degradables para evitar contaminación, sin efectos adversos y de fácil administración. Para lograr lo anterior, se ha utilizado como alternativa el uso de algunas plantas medicinales para ser empleadas como extractos o bien como base para la purificación y un posterior diseño y elaboración de metabolitos activos, que controlen hongos y oomicetos patógenos. Países como la India y China ya cuentan con un mercado sólido de productos obtenidos a partir de plantas, en América Latina: Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Honduras y recientemente Panamá, hacen lo correspondiente (Acosta, 2006). No obstante, México no figura dentro de los países con un mercado en este tipo de productos, por lo que sería conveniente explotar racionalmente este recurso.

Aunque México cuenta con una vasta riqueza vegetal, el número de estudios biodirigidos para resolver los problemas causados por hongos y oomicetos con plantas o derivados de ellas, son de número reducido, por lo que aún no se ha encontrado un biocida ideal en este sentido. Específicamente en este trabajo se seleccionaron cuatro especies de plantas medicinales de la región centro occidente de México considerando diversos aspectos tales como: que pertenezcan a familias reportadas con propiedades antifúngicas y que algunas especies del mismo género hayan sido reportadas con propiedades antifúngicas o antioomicéticas (Maatooq y Hoffmann, 1996), que sean utilizadas en la medicina tradicional y con escasos estudios fitoquímicos o biodirigidos.

Una vez seleccionadas, colectadas, secadas y separadas cada una de las partes de cada una de las plantas, se logró contar con extractos conformados por compuestos no polares (acetato de etilo), parcialmente polares (cloroformo-metanol) y polares (infusión), para contar con toda una gama de metabolitos y aumentar la posibilidad

de encontrar alguno(s) con características antifúngicas o antioomiceto; lo anterior es importante porque se debe considerar que la concentración de metabolitos varía dependiendo del órgano donde se producen, del solvente utilizado, del método de extracción, del estado de desarrollo de la planta, etc. (Akrouit *et al.*, 2003; Haider *et al.*, 2003; Taho *et al.*, 2004).

Posteriormente se realizó el escrutinio con los 32 extractos obtenidos de las plantas en estudio contra cinco especies de hongos entre patógenos de humanos y fitopatógenos, un grupo conformado con diferentes tipos de hongos patógenos con estilos de crecimiento diferentes: monomórficos miceliares, monomórficos levaduriformes, dimórficos y cinco oomicetos del género *Phytophthora*. Se observó que en general, los extractos acuosos inhibieron el crecimiento de *C. albicans*, estos datos concuerdan con trabajos realizados en otras especies de los géneros utilizados en este estudio, donde reporta el efecto antifúngico contra esta especie (Amanlou, *et al.*, 2004; Bakker, *et al.*, 1979; Morales-López, 2004; Setzer *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este estudio, muestran la posibilidad de contar con metabolitos hidrosolubles alternativos a los fungicidas comerciales ya que son principalmente de naturaleza lipofílica (Balfour *et al.*, 1992). Sin embargo, no es objetivo de este trabajo contar con un antifúngico específico, sino de uno de amplio espectro que pueda ser utilizado en todas las regiones y en todos los niveles económicos, ya que un antifúngico específico requiere de un análisis previo para caracterizar la especie patógena e identificar el compuesto biocida específico, lo que encarece el tratamiento (Waterman, 1991). Normalmente no existe una cultura médica, de salud y de prevención en este sentido, pues en la mayoría de los casos la gente se auto medica, atiende a sugerencias no profesionales e incluso no se cuenta con el recurso suficiente para llevar a cabo los análisis requeridos, o por las deficiencias de las instituciones de salud públicas mexicanas.

Por otra parte, aunque el extracto de *T. lucida* resulta ser de gran interés derivado de que tuvo efecto sobre la mayoría de los hongos contra los que fue probado, este hecho puede sugerir que esta especie contiene compuestos antifúngicos, como ha

sido reportado en otras especies del mismo género, que demuestran efecto biocida contra dermatofitos y hongos fitopatógenos (Chan, *et al.*, 1975; Mares *et al.*, 2004; Romagnoli, *et al.*, 2005).

No se obtuvo un extracto que pudiera inhibir a todos los hongos tratados, sin embargo, los extractos cloroformo-metanol y acetato de etilo del área verde y flor de de *T. lucida*, inhibieron hasta en un 100% a *M. circinelloides*, por lo que se puede considerar a esta planta, potencialmente específica para controlar a este patógeno oportunista que invade e infecta a sujetos inmunosuprimidos (Eaton, 1994).

Al comparar el efecto de los diferentes extractos de *H. longipes* y *A. ludoviciana*, se observó que de ambas se obtuvo un extracto que inhibió a todas las especies contra las que fue probada. El extracto cloroformo-metanol de *A. ludoviciana* presentó un efecto similar e incluso mayor sobre los hongos, que el extracto de raíz de *H. longipes*, reportado anteriormente con propiedades antifúngicas, siendo responsable de ello la presencia de dos alcaloides: afinina y decatrien bornilo (Trinidad 1998; Molina-Torres *et al.*, 1999; Covián y Salgado-Garciglia, 1999; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; Morales-López, 2003). Al hacer el análisis estadístico, se comprobó que *A. ludoviciana* es la planta más efectiva para controlar el crecimiento del mayor número de patógenos utilizados en este estudio ya que muestra diferencia significativa con respecto al resto de las plantas. Derivado de que el extracto cloroformo-metanol fue el que inhibió a todos los hongos patógenos contra los que se probó, se seleccionó para llevar a cabo su fraccionamiento e identificar a los metabolitos responsables de dicha actividad. Además este extracto también inhibió el crecimiento de las cinco especies del oomiceto *Phytophthora* spp. probadas.

Los resultados demuestran que *A. ludoviciana* es una planta que contiene metabolitos con propiedades antifúngicas y antioomicéticas. Estos resultados concuerdan con los de Ramos-Guerra (2004), quien observó efecto antifúngico del extracto hexánico de esta planta contra *C. albicans*, siendo éste el primer reporte al respecto, sin embargo no probó los extractos contra *Phytophthora* spp.

Otras especies de este género han sido reportadas con estas características como *A. absinthium*, *A. santonicum*, *A. spicigera*, *A. douglasiana*, *A. molinieri*, *A. dracunculus* L. var *dracunculus*, *A. asiatica* Nakai, *A. afra*, *A. nelagrica* y *A. sieversiana*, que han presentado esta capacidad principalmente contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y otros dermatofitos (Gundidza, 1993; Kishore *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1998; Kalemna *et al.*, 2002; Juteau *et al.*, 2003; Masotti *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004). De estas especies de *Artemisia* no se ha reportado efecto antioomicético contra *Phytophthora* spp. Otras especies como *A. douglasiana*, *A. dracunculus* y *A. nilagirica* (Clarke) Pamp, se han reportado con efecto contra fitopatógenos tales como *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora capsici* (Meepagala *et al.*, 2002; Shafi *et al.*, 2004; Kordali *et al.*, 2005). Lo que apunta a que el género *Artemisia* cuenta con metabolitos con activos contra hongos y oomicetos. En este trabajo se reporta por primera vez que *A. ludoviciana* contiene metabolitos secundarios con propiedades antioomicéticas.

Los oomicetos son patógenos difíciles de erradicar por las características biológicas propias del género. Son fitopatógenos de importancia económica para la región, pues son agentes causales de muchas enfermedades de plantas de interés agronómico, alimentario como son: aguacate, papa, chile, fresa, jitomate, etc. Controlar el desarrollo de *Phytophthora* spp. con extractos de *A. ludoviciana* resultaría en un gran aporte a la economía de la región.

Cabe mencionar que al probar las fracciones obtenidas contra *Phytophthora* spp., se pudo observar que aunque *P. infestans* y *P. mirabilis* son especies semejantes que incluso resulta difícil establecer su diferenciación (Cooke *et al.*, 2000). Ambas se comportaron de manera diferente en presencia de las fracciones, ya que *P. infestans* fue sensible a cinco de las seis fracciones obtenidas, mientras que *P. mirabilis* sólo a la fracción 3, una explicación es que se deba al efecto de la concentración y a la sensibilidad de cada especie frente a los metabolitos contenidos en la fracción.

La fracción 3, al igual que el extracto cloroformo-metanol del área verde de *A. ludoviciana* inhibió a todos los hongos y oomicetos probados, por lo que quedó seleccionada para continuar con la fase experimental consistente en tratar de conocer su composición para identificar a los compuestos responsables de estas propiedades.

Para seleccionar a los metabolitos extraídos con cloroformo-metanol del área verde de *A. ludoviciana* y responsables de la actividad antifúngica y antioomiceto, se realizó una extracción directa con hexano para compararlo con el del extracto crudo donde se observó que los principales componentes del extracto hexánico son de naturaleza terpenoide, como es característico de esta especie (Masotti *et al.*, 2003). Sin embargo, al probar su efecto sobre hongos u oomicetos, éste no mostró efecto alguno. Lo que permitió descartar a compuestos presentes en el extracto y en la fracción activa; de hecho, los metabolitos no eran los mismos pues en el extracto cloroformo-metanol se identificaron 34 compuestos, mientras que en el extracto hexánico sólo 10, dentro de los mayoritarios se encontró el borneol. Esto último confirma que el método de extracción, el solvente utilizado, la parte de la planta, entre otros factores, influyen en la presencia y concentración de metabolitos (Akrouit *et al.*, 2003; Haider *et al.*, 2003; Tahoe *et al.*, 2004) Por lo que es importante mencionar que en este tipo de trabajos, se deben reportar en detalle todos los aspectos a considerar para lograr la reproducibilidad.

Al verificar si corresponden los metabolitos de la fracción con los del extracto crudo, se observó que sí estaban contenidos en él, pero no en el extracto hexánico. Se asumió que los componentes mayoritarios contenidos en la F3 son los responsables de la actividad antioomicética y también de la antifúngica. Una vez identificados los compuestos mayoritarios, se verificó con el espectro de masas y con los compuestos puros, siendo estos iguales, hecho que garantiza que se tratan de los mismos compuestos pues los iones moleculares son los correspondientes. Posteriormente se probaron sobre los hongos y oomicetos de interés hecho que resalta, ya que en la

mayoría de los trabajos de este tipo, sólo se reporta el efecto y la composición del aceite esencial.

Los resultados muestran que los compuestos mayoritarios en el extracto crudo corresponden a los componentes presentes en la F3, siendo estos el borneol, canfor y *cis-verbenol*. Los dos primeros identificados previamente en otras especies de *Artemisia* como *A. absinthium*, *A. santonicum* y *A. spicigera* a los cuales se les ha reportado con actividad antioxidante (Kordali *et al.*, 2005). En *A. lavandulaefolia*, como bactericidas (Cha *et al.*, 2005) y el último compuesto es reportado en este trabajo por primera vez en la especie y en el género.

El borneol es un polvo cristalino blanco, inodoro, con punto de fusión a los 208°C y punto de ebullición a los 210°C, su punto de inflamación es a 66 °C, soluble en solventes orgánicos, en pruebas de toxicidad se determinó DL₅₀ oral en rata, siendo de 5800 mg.Kg⁻¹ y el test de sensibilización piel (conejos) fue de 500 mg.24h⁻¹, mostrando una irritación leve. Las propiedades del canfor son similares, ya que éste es producto de la oxidación del borneo. El *cis-verbenol* es un polvo cristalino blanco, su punto de inflamación es a los 52°C, su punto de fusión a los 85°C, soluble en alcohol, con olor balsámico, no se reporta toxicidad. Estas características permiten trabajar libremente con estos compuestos ya que no se requiere de un cuidado especial para su manejo, no son tóxicos a las concentraciones que se trabajaron y su solubilidad facilita su empleo (Ficha de datos de Seguridad).

Una vez probado el efecto del borneol, canfor y *cis-verbenol* sobre *Phytophthora* spp., los resultados mostraron que sólo la mezcla de ellos tuvo el efecto antioomicético de manera similar al de la fracción 3 y el extracto crudo. Es importante mencionar que estos compuestos de manera independiente no mostraron ninguna actividad antioomicética. Los resultados observados con estos aceites esenciales son similares a los reportado por Shafi *et al.*, (2004) quienes reportan que no se observó actividad antifúngica del borneol contra *P. capsici* pero sí con el extracto de hojas de *A. nilagirica* (Clarke) Pamp., lo que puede deberse a la sinergia del borneol

con los otros compuestos, pues tampoco se observó actividad en el extracto hexánico obtenido, el cual contenía borneol pero no los otros metabolitos. Cabe la posibilidad de que al mezclarse estos componentes se unan y formen un complejo químico, el cual fuera entonces, responsable de la actividad observada en este trabajo; por otra parte, se podría deber a que tanto el borneol como el canfor inhiben la bomba de protones y los canales de Ca^{+2} , en las células del yeyuno de conejo (Garzouli *et al.*, 1999; Gilani *et al.*, 2006), lo que pudiera sugerir que los tres actúan de manera similar y que al estar presentes al mismo tiempo, desencadenan un cambio de turgencia tan violento que provocan la muerte celular o bien, que cada uno de ellos presente un mecanismo diferente y que la suma de estos provoque el efecto observado en este estudio.

La mezcla de borneol y canfor presentó un ligero efecto inhibitorio contra *P. cactorum*, *P.cinnamomi* y *P. mirabilis*, un hecho que está de acuerdo con los resultados de diferentes grupos de trabajo, donde mencionan la baja actividad antifúngica del borneol, canfor y 1,8 cineol contra dermatofitos pero sin ninguna referencia en oomicetos (Muller-Ribeau *et al.*, 1995; Sivrapoulus *et al.*, 1997; Soliman *et al.*, 1997; Adam *et al.*, 1998). Otra posibilidad es que, la aplicación independiente a bajas concentraciones no se manifieste dicha actividad, siendo necesario incrementar las dosis o realizar diferentes acciones (sinergismo) combinando más de dos metabolitos o un fungicida y un(os) metabolito(s) para obtener el efecto deseado, ya que es preferible utilizar bajas concentraciones. Las concentraciones altas tienen mayor probabilidad de causar efectos secundarios incluso generar toxicidad y encarecer el producto como es el caso de los fungicidas comerciales que generalmente se aplican a granel, sin ningún control, sin un análisis previo para identificar al tipo de patógeno y poder generar un plan de acción que realmente los controle, además de que están considerados como compuestos peligrosos por generar problemas de tipo cancerígeno en el hombre (Wilson y Wisniewski, 1994). Por lo que es preferible utilizar bajas concentraciones, ya que esto facilita su degradación y evita toxicidad.

El presente trabajo demuestra que las plantas son una alternativa para encontrar compuestos en diferentes presentaciones, que controlen hongos y oomicetos patógenos o bien, que pudieran ser utilizados para prevenir las enfermedades causadas por estos organismos. Por otra parte, esto nos permite contar con una vasta diversidad de metabolitos derivados del proceso de la interacción de la planta con el patógeno a través de la coevolución natural.

En base a los resultados obtenidos en el presente, se sugiere que la mejor opción es la combinación de varias estrategias. Además, esto contribuye a fomentar el uso de plantas medicinales o sus derivados para controlar enfermedades causadas por hongos u oomicetos con las consecuencias que ello implica, generando una independencia tecnológica, pues México se podría consolidar con un mercado independiente en este sentido.

X. CONCLUSIONES

Los extractos de las cuatro plantas seleccionadas de la región centro-occidente de México presentaron efecto inhibitorio contra al menos uno de los hongos y oomicetos probados.

La actividad antifúngica y antioomiceto de *Artemisia ludoviciana* se debe a la mezcla de borneol, canfor y *cis*-verbenol, contenidos en el extracto cloroformo-metanol del área verde.

XI. PERSPECTIVAS

El borneol y canfor han sido estudiados previamente para conocer su mecanismo de acción y se observó que son capaces de inhibir la bomba de protones presente en células del yeyuno de conejo (Garzouli *et al.*, 1999). También bloquean los canales de Ca^{+2} (Gilani *et al.*, 2006), lo que significa que esto mismo pudiera provocar un cambio en la turgencia de la célula fúngica con la consecuente muerte celular. Estos efectos se presentan cuando se aplican de manera independiente cada uno de los compuestos, sin embargo, el mecanismo por el cual actúan los tres juntos se desconoce, por lo que será necesario llevar a cabo estudios a nivel celular de hongos y oomicetos, que permita elucidar el mecanismo por el cual actúan. Esto significa continuar con el trabajo para identificar el blanco celular y con ello, lograr la especificidad, evitando afectar las células del huésped, entre otros.

Por otra parte, al no observarse con la mezcla de los compuestos puros una inhibición mayor al del extracto crudo, nos indica que pueden existir otros compuestos involucrados en dicha actividad, por lo que no se descarta que metabolitos “no volátiles” contenidos en el extracto también presenten propiedades antifúngicas y antioomiceto, pues el análisis cromatográfico de gases acoplado a masas nos permitió identificar compuestos volátiles. Un análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas podría ser la opción, por lo que se sugiere continuar con el trabajo fitoquímico.

Otra posibilidad sería realizar ensayos *in situ* e *in vivo* tanto con el extracto, como con la fracción y con la mezcla de compuestos para valorar su efecto en plantas y animales infectados con hongos u oomicetos o bien, valorar el efecto preventivo. También se podrían realizar los estudios de toxicidad correspondientes (toxicidad aguda, toxicidad crónica, genotoxicidad, cancerogenicidad), así como el tiempo efectivo del extracto y los compuestos.

Asímismo, se puede continuar con trabajos relacionados en el control de *C. albicans* con los extractos acuosos obtenidos en el presente trabajo, pues al observar su efecto contra esta especie, genera la expectativa de poder utilizarlos para su control o de otras especies del mismo género, ya que en la actualidad ésta presenta resistencia a los antifúngicos liposolubles actuales; los extractos acuosos entonces plantean la posibilidad de contar con metabolitos hidrosolubles que controlen a este patógeno dimórfico.

Finalmente, este trabajo abre múltiples líneas de investigación, algunas de ellas mencionadas anteriormente, incluyendo la posibilidad de trabajar con el proceso requerido para la producción, venta y aplicación de plantas medicinales mexicanas de acuerdo a las normas establecidas para ello.

XII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Acosta, L. 2006. **Plantas medicinales-oportunidades y perspectivas de mercado.** (www.herbotecnia.com.ar/c-public-012.html) (Accesada en enero del 2007).

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis, M. 1998. **Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 46: 1739-1745.

Adekunle, A.A. 2000. **Antifungal property of the crude extracts of *Brachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*.** *Nig. Journal Natural Products and Medicines* 4: 70-72

Aguilar, M., Muñoz, H.J., Hernández, M., Bello, M.A. y Salgado-Garciglia, R. 2004. **Observaciones fenológicas de *Satureja macrostema* (Benth) Briq. en dos localidades de Michoacán, México.** *Ciencia Forestal en México* 29(96): 91-111.

Aguilar Ramírez, J.M. 2002. **Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas de *S. macrostema* var. *laevigata*.** Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Colima, Colima, México. 156pp.

Aiello, E., Dignani, C., De Vedia, L., Devato, F. y Lorenzo, H. 2006. **Costo-efectividad de voriconazol versus anfotericina B deoxicolato en el tratamiento de aspergilosis invasiva.** *Revista Panamericana de Infectología* 8(1): 18-15.

Akrout, A.A., Chemli, R., Simmonds, M., Geoffrey, K., Hammami, M. y Chreif, I. 2003. **Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L.** *Journal of Essential Oil Research.* Sep.-Dic. 4 pp.

Al Magboul A.Z.I., Bashir A.K., Khalid S.A. y Farouk A. 1997. **Antimicrobial activity of vernolepin and vernodalín.** *Fitoterapia* 68(1): 83-84.

Amanlou, M., Fazeli, M.R., Arvin, A., Amin, H.G. y Farsam, H. 2004. **Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzistanica*.** *Fitoterapia* 75: 768-770.

Anaya, A.L. y Espinosa, G., Cruz, O. 2000. **Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación.** Plaza y Valdés Editores. México. pp. 36-189.

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

Argueta, A. 1994. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**. México. Instituto Nacional Indigenista. 3:172-173.

Arnal-Schnebelen, B., Hadji-Minaglou, F., Peroteau, J., F. Ribeyre, F. y De Billerbeck, V.G. 2004. **Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases**. *International Journal of Aromatherapy* 14: 192-197.

Axial, R.K., Lin, F.L., Stafford, W.W., Ledoux, R.A., Westley, C.R. y Weber, R.W. 1997. **Mugwort and sage (*Artemisia*) pollen cross-reactivity: ELISA inhibition and immunoblot evaluation**. *Annual Allergy Asthma Immunology* 79(4): 340-346.

Bader, G., Kulhanek G. y Ziegler-Bohme H. 1990. **The antifungal action of polygalacic acid glycosides**. *Pharmazie* 45(8): 618-620.

Bakker, J., Gommers, F.J., Nieuwenhuis, I. y Wynberg, H. 1979. **Photoactivation of the nematocidal compound α - terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes Species*)**. *Journal of Biological Chemistry* 254(6) : 1841-1844.

Balandrin, M. J. y Klocke, J.A. 1988. **Medicinal, aromatic and materials from plants**. En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plant*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 4: 1-36.

Balfour, J., Faulds, A. y Terbinafine, D. 1992. **A review of its Pharmacodynamic and Pharmacological properties, and therapeutic potencial in superficial mycoses**. *Drugs* 43: 259-284.

Barbiéri H.F., Pessini G.L., Sanches N.R., Garcia-Cortez D.A., Nakamura C.V. y Dias-Filho B.P. 2002. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases**. *Memoria Institucional Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97(7): 1027-1031.

Barel, S., Segal R. y Yashphe J. 1991. **The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima***. *Journal of Ethnopharmacology* 33(1-2): 187-191.

Battista, G. y Bettolo, M. 1988. **Natural Products as ecological mediators**. *Interciencia* 13:224-225.

Bedir, E., Khan I. y Moraes R.M. 2000. **Bioprospecting for podophyllotoxin**. En: *Trends in newcrops and new uses* (J. Janick y A. Whipkey, Eds.), ASHS Press, Alexandria, VA. p. 545-549.

Bello G., M. A. 1993. **Plantas útiles no maderables de la sierra purépecha, Michoacán, México, INIFAP**. México. Folleto Técnico No 10. 115 p.

Bello, G.M.A. 1998. **Proyecto Nacional de Plantas Medicinales**. INIFAP. SAGAR. México.

Bowers, J. H. y Locke J.C. 2000. **Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse.** *Plant Disease* 84:300-305.

Boyraz, N. y Özcan, M. 2006. **Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey.** *International Journal of Food Microbiology* 107: 238-242.

Brizuela, M.A., García, L., Pérez, L. y Mansur, M. 1998. **Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios.** *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.

Burits, M., Asres, K. y Bucar, F. 2001. **The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*.** *Phytotherapy Research* 15: 103-108.

Cáceres, A., Alvares, A. V., Ovando, A. E. y Samayoa, B. E. 1991. **Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases.1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria.** *Journal of Ethnopharmacology* 31: 193-208.

Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. y Aguilar L. 1990. **Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders.1. Screening of 84 plants against enterobacteria.** *Journal of Ethnopharmacology* 30: 55-73.

Carillo, A. 2000. **Antifúngicos tópicos en micosis superficiales (Revisiones clínicas y estudios terapéuticos).** Actualidad Dermatológica. Barcelona, España. 361-372 pp.

Céspedes, C.L., Ávila G., Martínez A., Serrato B., Calderón-Múgica J.C. y Salgado-Garciglia R. 2006. **Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*).** *Journal Agricultural Food Chemistry* 54(10):3521-3527.

Cha, J.D., Jeong, M.R., Choi, H.J., Zeong, S.I., Moon, S.E., Yun, S.I., Kim, Y.H., Kil, B.S. y Song, Y.H. 2005. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavanulaefolia*.** *Planta Medica* 71(6):575-577.

Chan, G.F., G. H., Towers, N. y Mitchell, J.C. 1975. **Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of *Tagetes*.** *Phytochemistry* 14: 2295-2296.

Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligannis, N. Mitaku, S., Nychas, G. J. y Haroutounian, S.A. 2004. **Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* Species : chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 52 : 8261-8267.

Cordero, C. 2002. **La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explorar la biodiversidad.** www.semarnat.gob.mx/pfnm/PlantaCompleta.html (Accesada en mayo del 2004)

Cortés A. A .R., Lara, Ch. B., Hernández C. J. y Auki, M. K. 2004. **Screening and Selection of Plants by Positive Pharmacologic Effect on Jejunum Muscular Contractility.** *Pharmaceutical Biology* 42 (1): 24-29.

Covián, F. y Salgado-Garciglia, R. 1999. **Los productos vegetales y su uso potencial en la agricultura.** *Ciencia Nicolaita* 21: 55-63.

Díaz, B. H. y Bello, G. M. A. 1993. **Contribución al conocimiento de la flora de la Cuenca del Lago de Pátzcuaro.** Libro Técnico No. 1, CIPAC-Mich., INIFAP (SAGAR). México. 161 pp.

Domergue, F., Helms G.L., Prusky D. y Browse J. 2000. **Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado.** *Phytochemistry* 54(2):183-189.

Domínguez, X. A. 1985. **Métodos de investigación fitoquímica.** Ed. LIMUSA. México. 250 pp.

Eaton, D.L. 1994. **EP: Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis.** *Annual Review Pharmacology Toxicology* 34: 135-172.

Egly, G., Tapia, A., López, S.N. y Zacchino, S.A. 2001. **Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine.** *Journal of Ethnopharmacology* 78: 103-107.

Eloff, J.N., Famakin J.O. y Katerere D.R.P. 2005. **Combretum woodii (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria.** *African Journal of Biotechnology* 4 (10): 1161-1166.

Emmett. E.A. y Mars J.M. 1973. **Allergic contact dermatitis from tolnaftate** *Archives of Dermatology* 108:98-99.

Epstein, W.W. y Ubben, E. E. 1979. **Anthemidin, a new sesquiterpene lactone from Artemisia ludoviciana.** *Journal of Natural Products* 42(3): 279-281.

Esteban, M.D., González Collado, L., Macías, F.A., Massanet, G.M. y Rodríguez, F.L. 1986. **Flavonoids from Artemisia lanata.** *Phytochemistry* 25: 1502-1504.

Farnsworth, N.R. 1990. **The role of ethnopharmacology in drug development. Bioactive compounds from plants.** Ed. Wiley & Sons. Inglaterra.

Feresin, G.E., Tapia A., Sortino M., Zacchino S., de Arias A.R., Inchausti A., Yaluff G., Rodriguez J., Theoduloz C. y Schmeda-Hirschmann G. 2003. **Bioactive alkyl**

phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *Journal of Ethnopharmacology* 88(2-3):241-247.

Gamboa-Alvarado, R., Hernández-Castillo F.D., Guerrero-Rodríguez E., Sánchez-Arizpe A. y Lira-Saldívar R.H. 2003. **Inhibition of mycelial growth of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) with methanolic plant extracts of *Flourensia cernua* D.C., *Origanum majorana* L., and *Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(1):13-18.**

Ganeshan, G. y Jayachandra.1993. **Antifungal activity of parthenin. *Indian Phytopathology* 46: 193-194.**

García, H., Pastor, A. y Vargas, J. 1993. **Diagnóstico situacional de unidades médicas de PEMEX. *Salud Pública de México* 35(6): 3-5.**

García-Chávez, A. 1998. **Estudio de la actividad de la afinina sobre los microorganismos y la homología del gene fab A de *Escherichia coli* en plantas productoras de alcaloides. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN-Irapuato, México.**

García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E. y Molina-Torres, J. 2004. **El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcaloides presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* 69: 115-131.**

Geissman, T.A. y Lee, K.H. 1971. **Sesquiterpene lactones of *Artemisia verlotorum*. *Phytochemistry* 11: 663-664.**

Ghannoum, M. A. 1997. Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome. *Journal Chemotherapy* 9 Suppl 1:19-24.

Gilani, A.H., Janbaz, K.H. Lateef, A. y Zaman, M. 2006. **Ca ++ channel blocking activity of *Artemisia scoparia* extract. *Phytotherapy Research* 8: 161-165.**

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikaïl, C., Abou, L. y Portugal, H. 2004. **Antifungal effecto of various essential oils against *Candida albicans*. Potenciation of antifungal action of Amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research* 18: 990-995.**

Giordani, R., Tregaux, J., Masi, M. y Regli, P. 2001. **Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* 78(1): 1-5.**

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikaïl, C., Abou, L. y Portugal, H. 2004. **Antifungal effecto of various essential oils against *Candida albicans*. Potenciation of antifungal action of Amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research* 18: 990-995.**

Giri, A., Trippi, V.S. 2000. **Transgenic hairy roots: recent trends and applications.** *Biotechnology Advances* 18: 1-22.

Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A. y Cáceres, A. 1991. **Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala.** *Journal of Ethnopharmacology* 34: 173-187.

Gladstone, S. 2002. **Contaminación por plaguicidas en las cuencas hidrográficas que desembocan en el Golfo de Fonseca y Oportunidades para su Prevención y Mitigación.** Programa Ambiental Regional para Centroamérica. Guatemala. 29 pp.

Grainge, M. y Ahmed, S. 1988. **Handbook of plants with pest control properties.** Ed. John Wiley and Sons. 470 pp.

Grosvenor, P.W. y Gray D.O. 1996. **Colutequinone and colutehydroquinone, antifungal isoflavonoids from *Colutea arborescens*.** *Phytochemistry* 43(2):377-380.

Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Oskan, H., Kartal, N., Polissou, M., Sokmen, A. y Sahin, F. 2003. **In vitro Antibacterial, Antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 51:3958-3965.

Gundidza, M. 1993. **Antifungal activity of essential oil from *Artemisia afra* Jacq.** *Central African Journal Medicine*. 39 (7):140-142.

Gupta, I.J., Schmitthenner A.F. y McDonalds M.B. 1993. **Effect of storage fungi on seed vigour of soybean.** *Seed Science & Technology* 21: 581-591.

Habib, O.M., Hichem, B. J., Mighri, Z., Cría, J. y Abreu, P.M. 2006. **Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*.** *Journal of Natural Products* 69:1366-1369.

Haider, F., Dwivedi, P.D., Naqvi, A.A. y Bagchi, G. D. 2003. **Essential oil composition of *Artemisia vulgaris* harvested at different growth periods under Indo-gargetic plain conditions.** *Journal of Essential Oil Research*. 3 pp.

Harborne, B.J. y Baxter H. 1993. **Phytochemical dictionary.** Ed. Taylor and Francis Ltd. London, Great Britain. 520 pp.

Harish, S., Saravanan T., Radjacommare R., Ebenezar E.G. y Seetharaman K. 2004. **Mycotoxic effect of seed extracts against *Helminthosporium oryzae* Breda de Hann, the incitant of rice brown spot.** *Journal of Biological Sciences* 4 (3): 366-369.

Herger, G., Klingauf F., Mangold D., Pommer E.H. y Scherer M. 1988. **Efficacy of extracts of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (Polygonaceae) against fungal diseases, especially powdery mildews.** *Nachrichtenblatt Deutschen Pflanzenschutzdienstes Braunschweig* 40, 56-61.

Hersch, P. 1999. **De hierbas y herbolarios en el México actual.** Arqueología Mexicana. Vol. VII. Num. 39. 25pp.

Iqbal, M.C.M., Jayasinghe U.L.B., Herath M.T.B., Wijesekara K.B. y Fujimoto Y. 2004. **A fungistatic chromene from *Ageratum conyzoides*.** *Phytoparasitica* 32(2):119-126.

Jakupovic, J., Tan, R.X., Bohlmann, F., Boldt, P.E. y Jia, Z.J. 1991. **Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*.** *Phytochemistry* 30: 1573-1577.

Jawets, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E. A. 2002. **Microbiología Médica.** 17a ed. Ed. Manual Moderno. 661-685 pp.

Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J. y Luna-Herrera, J. 2003. **Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases.** *Phytotherapy Research* 17(8):903-908.

Johns, T., Graham, K. y Towers, G.H. 1982. **Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the asteraceae.** *Phytochemistry* 21: 2737-2738.

Judelson, H. y Blanco, F. 2005. **The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer.** *Nature Reviews* 3: 47-58.

Juteau, F., Jerkovic, I., Masotty, V, Milos, M., Matelic, J., Bessiere, J.M. y Viano, J. 2003. **Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France.** *Planta Medica* 69(2): 158:161.

Kalemna, D., Kusewicz, D. y Swiader, K. 2002. **Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai.** *Phytotherapy Research* 16 (3):288-291.

Kalra, A. y Parameswaran T.N. 1998. **Relative efficacy of chlorothalonil for controlling leaf blight (*Colletotrichum gloeosporioides*) of scented geranium (*Pelargonium graveolens*).** *Indian Journal of Agricultural Sciences* 68(7): 364-366.

Karou, D., Savadogo, A., Canini A., Yameogo, S., Montesano, C., Simporé, J., Colizzi V. y Traore, A.S. 2005. **Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*.** *African Journal of Biotechnology* 4 (12):1452-1457.

Kauffman, C.A. y Carver P.L. 1997. **Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments.** *Drugs* 53(4):539-49.

- Kaul, V.K., Nigam S.S. y Dhar K.L. 1976. **Antimycotic activities of essential oils of *Artemisia absinthium* Linn., *A. vestita* Wall., and *A. vulgaris* Linn.** *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 38: 21.
- Kishore, N., Mishra, A.K. y Chansouria, J.P. 1993. **Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes.** *Mycoses* 36 (5-6): 211-215.
- Klayman, D.L. 1993. ***Artemisia annua*. From weed to respectable antimalarial plant.** In **Human Medical Agents from Plants.** Ed. A.D. Kinghorn and M.F. Balanotrin. Washington D.C. USA. 242-255 pp.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A. Fakir, A., Ala, A. y Yildirim, A. 2005. **Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia deacunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum* and *A. spicigera* essential oils.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 53 (24):9452-9458.
- Kourany, E., Arnason, J. T. y Schneider, E. 1988. **Accumulation of phototoxic thiophenes in *Tagetes erecta* (Asteraceae) elicited by *Fusarium oxysporum*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 287-297.
- Kubo, I. y Himejima M. 1991. **Anethole, a synergist of polygodial against filamentous micro-organisms.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 39:2290-2292.
- Laferriere, J., Weber, C.W. y Kohlhepp, E. 1991. **Mineral composition of some traditional Mexican teas.** *Plant Foods for Human Nutrition* 41: 277-282.
- Lee, H. J., Choin, G. J. y Cho, K.Y. 1998. **Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicerboximide fungicides with their fungicidal activity.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 46: 737-741.
- Lee, K.H. y Geissman, T.A. 1970. **Sesquiterpene lactones of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*.** *Phytochemistry* 9: 403-408.
- Levy, A. y Milo, J. 1998. **Genetics and breeding of *Papaver somniferum*.** En **Poppy, The Genus Papaver.** J. Bernath Ed. Harwood Academic Publ. pp. 93-103.
- Linares, E. y Bye, R.A. 1987. **A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States.** *Journal of Ethnopharmacology* 19: 153-183.
- Lida, Y., Ki-Bong Oh., Saito M., Matsuoka H., Kurata H., Natsume M. y Abe H. 1999. **Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BTC method and isolation of its active compound.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47: 584-587.

Lima, E.O., Gompertz O.F., Giesbrecht A.M. y Paulo M.Q. 1993. ***In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes.** *Mycoses* 36: 333-336.

Lira-Saldívar, R.H., Balvantín-García G.F., Hernández-Castillo F.D., Gamboa-Alvarado R., Jasso-de-Rodríguez D. y Jiménez-Díaz F. 2003. **Evaluación del contenido de resina y el efecto antifúngico de extractos de *Larrea tridentata* (Sesse y Moc. Ex D.C.) Coville provenientes de dos desiertos mexicanos sobre *Pythium* sp. Pringsh.]** *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2):97-101.

Liu, Y., Mabry, T.J. 1982. **Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*.** *Phytochemistry* 21: 209-214.

Loeza-Lara P.D., Pérez-López H, José C. Calderón Mújica y Rafael Salgado Garciglia. **Actividad antimicrobiana de extractos de seis diferentes plantas (Asteraceae).** Memorias del XXI Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Instituciones organizadoras del evento: INIFAP, PRODUCE, INAH, CIDEM, Morelia, Mich. 6 y 7 De Noviembre.

López, B.E. 1983. **Plantas Medicinales de Santa María Guido.** Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 75 pp.

Lozoya, X. 1994. **Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs.** En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.

Lozoya X. y Rivera E. 1999. **Numeralia.** *Arqueología Mexicana*. Vol.VII No. 39 pp 45.

Lozoya, X. 1999. **Libellus de medicinalibus indorum herbis** (Librito de las yerbas medicinales de los indios) o Códice Badiano. *Arqueología*. VII (39): 22.

Lumbreras, C., Lizasoain, M. y Aguado, J.M. 2003. **Antifúngicos de uso sistémico.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(7): 366-380.

Maatooq, G.T. y Hoffmann J. J. 1996. **Fungistatic sesquiterpenoids from *Parthenium*.** *Phytochemistry* 43 (1): 67-69.

Maestre, J.R. y Alou, L. 2001. **Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico.** *Revista Española de Quimioterapia*. 14 (3): 3-7.

Magboul, A.Z.I., Bashir A.K., Khalid, S.A. y Farouk A. 1977. **Antimicrobial activity of Vernolepin and Vernodaline.** *Fitoterapia* 68 (1):83-84.

Mahjoul, A.Z., Ben, Jannet, H.P., Abreu, P.J. y Mighri, Z. 2002. **Études biologique et chimique de la plante *Prasium major* poussant en Tunisie. Structure d'un**

heteroside steroidique et d'un steroide. Identification de constituents de la fraction volatile. *Journal of Society Chemical of Tunisian* 4 : 1419.

Malagón, F., Vázquez, J., Delgado, G. y Ruiz, A. 1997. **Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in a rodent malaria model.** *Parasitologia* 39 (1): 3-7.

Malheiros, M. M., Marques D. y Gavini G. 2005. **In vitro evaluation of the cytotoxic effect of acid solutions used as canal irrigants.** *Journal of Ethnopharmacology* 31 (10):746-748.

Mares, D. 1987. **Antimicrobiol activity of protoanemonin, a lactose from *Ranunculaceous* plant.** *Mycopathologia* 98(3): 133-140.

Mares, D., Romagnoli C. y Bruni A. 1993. **Antidermatophytic activity of Hernarin in preparations of *Chamomilla reticulata* (L.) Rauschert.** *Plantes Medicinale et Phytoterapie* 26 (2):91-100.

Mares, D., Tosi, B., F. Poli, F., Andreotti, E. y Romagnoli, C. 2004. **Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*.** *Microbiological Research* 159(8): 295-304.

Martínez G., R.E. y M. Barajas, B. 1991. **Estudio etnobotánico de las plantas medicinales en el mercado Libertad " San Juan de Dios" del área metropolitana de Guadalajara, Jal.** Tesis Licenciatura. Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 100 p.

Martínez, M. 1994. **Las plantas medicinales de México.** Edit. Botas. México.

Maruzzella, J.C. 1963. **The effect of perfume oils on the growth of phytopathogenic fungi.** *Plant Disease* 47: 756-757.

Masika, P.J., N. Sultana y A.J. Afolayan. 2005. **Isolation of two antibacterial compounds from the bark of *Salix capensis*.** *South African Journal of Botany* 71(3&4): 441-443.

Masotti, V., Juteau, F., Bessiere, J.M. y Viano, J. 2003. **Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 51 (24):7114-7121.

McCutcheon, A.R., Ellis, S.M., Hancock, R.E.W. y Towers, G.H.N. 1994. **Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples.** *Journal of Ethnopharmacology* 44: 157-169.

- Meepagala, K.M., Sturtz, G. y Wedge, D.E. 2002. **Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus***. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50 (24): 6989 -92.
- Meepagala, K.M., Schrader K.K., Wedge D.E. y Duke S.O. 2005 **Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs**. *Phytochemistry* 66 (22): 2689-2695.
- Miles, D. H., Chittawong V., Payne A. M., Hedin P. A. y Kokpol U. 1991. **Cotton boll-weevil antifeedant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia lani* and *Pythium ultimum*) of extracts of the etems of *Wedelia biflora***. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38: 1591.
- Mitchell, J.C., Geissman, T.A. y Towers, H.N. 1971. **Allergic contact dermatitis causes by *Artemisia* and *Chrysanthemum* species**. *Jornal of Investigative Dermatology* 56(2): 98-101.
- Molina-Torres, J., García-Chávez A. y Ramírez-Chávez, E. 1999. **Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamérica: affinin and capsaicin**. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 241-248.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R. y Ramírez-Chávez, E.1995. **Presence of the bornyl estero f deca-2E-6Z-8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots**. *Journal of Natural Plant* 58: 1590-1591.
- Molina-Torres, J. y García-Chávez A. 2000. **Alcamidas en plantas: distribución e importancia**. *Avance y Perspectiva* 20: 377-387.
- Morales-López, M.E., Salgado-Garciglia R. y Martínez-Pacheco M.M. 2000. **Chilcuague (*Heliopsis longipes* “A Gray” Blake) (Asteraceae): fuente de compuestos con acción fungicida**. *Divulga*. 1: 21-25.
- Morales-López, M. E. 2003. **Efecto de la afinina y el decatrién bornilo sobre hongos patógenos humanos**. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UMSNH. Morelia, México. 1-98 pp.
- Moulin-Traffort, J., Giordani R. y Régli P. 1990. **Antifungal action of latex saps from *Lactuca sativa* L. and *Asclepias curassavica* L**. *Mycoses*. 33 (7-8): 383-392.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., y Yegen, O. 1995. **Chemical comosition amd fungitoxic propierties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing in Turkey**. *Journal Agricultural Food Chemistry* 43: 2262-2266.
- Nakamura C. V., Nakamura T. U., Bando E., Melo A. F. N., Cortez D. A. G. y Dias Filho B. P. 1999. **Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil**. *Memoria Institucional Oswaldo Cruz*. 94: 675-678.

Natarajan, M.R. y Lalithakumari D. 1987. ***Lawsonia inermis* on *D. oryzae***. *Indian Phytopathology* 13 (40): 390-395.

Natarajan, V., Venugopal, P.V., y Menon, T. 2003. **Effect of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes**. *Indian Journal of Medical Microbiology* 21 (2): 98-101.

Navarro-García, V.M., Gonzalez A., Fuentes M., Aviles M., Rios M.Y., Zepeda G. y Rojas M.G. 2003. **Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology* 87 (1): 85-88.

Navarro, V., Villarreal M.L., Rajas G. y Lozoya X. 1996. **Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infection as diseases**. *Journal of Ethnopharmacology* 53 (3): 143-147.

Neher RT. 1968. **The ethnobotany of Tagetes**. *Economic Botany* 22(4):317 –325.

Ohno, N., Gershenzon, J., Roane C. y Mabry, T. 1980. **11-13-dehydrodesacetylmatricarin and other sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana***. *Phytochemistry* 19: 103-106.

Okigbo, R.N. y Nmeka, I. A. 2005. **Control of yam tuber rot with leaf extracts of *Xylopiya aethiopica* and *Zingiber officinale***. *African Journal of Biotechnology* 4(8):804-807.

Pal, M., Joshi H., Kapoor V.P., Pushpangadan P. y Chaurasia L. 2003. **Antifungal activity of wogonin**. *Phytotherapy Research* 17(10): 1215-1216.

Palacios, Y., García, O., Hernández, P., Jiménez, M., Pérez, R., Reza, J. y Quiroz, P. 2005. **Incidencia de dermatomicosis en el medio industrial mexicano**. División de Medicina Industrial Janssen-Cilag. México, D.F. 15 pp.

Panizzi, L. Flamini, G., Cioni, P.L. y Morelli, I. 1993. **Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae**. *Journal of Ethnopharmacology* 39: 167-170.

Pare, P-W., Zajicek J., Vera L. y Ferracini I.S. 1993. **Antifungal terpenoids from *Chenopodium ambrosioides***. *Biochemical Systematics and Ecology* 21(6-7):649-653.

Perfect, J. 1990. **Antifungal therapy and its use in surgical treatment**. *Surgery* 171: 41-48.

Pessini, G.L., Dias-Filho B.P., Nakamura C.V. y Cortez D.A.G. 2005. **Antifungal activities of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var.**

***pallescens* (C. DC.) Yunck.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(6):1130-1133.

Phillipson, J. D. 1990. **Plants as source of valuable products. Secondary products from plant tissue culture.** Ed. Crop Sci. USA. 19: 59-64.

Rai, M.K. y Acharya D. 1999. **Screening of some Asteraceous plants for antimycotic activity.** *Compositae Newsletter* 34: 37-43.

Rai, M.K., Deepak A. y Wadegaonkar P. 2003. **Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants.** En: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects*, Haworth press, N-York, London, Oxford, pp. 165-185.

Ramachandra, R. y Ravishankar, G.A. 2000. **Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*.** *Journal of Biotechnology* 76: 137-146.

Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. 2000. **Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*.** *Agrociencia* 34: 207-215.

Ramos-Guerra, M.C., Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villareal, J., Oranday-Cárdenas, A. y Treviño-Villareal, L. 2004. **Actividad *in vitro* del extracto acuoso y orgánico de las hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt (istafiate) sobre *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.** *Revista Salud Pública y Nutrición*. 4: 66-67.

Rao, P.J., Kumar, M., Singh, S. y Subrahmanyam, B. 1999. **Effect of *Artemisia annua* oil on development and reproduction of *Dysdercus koenigiiv* F. (Hem., Pyrrhocoridae).** *Journal Applied Entomology* 123: 315-318.

Rhodes M. J. 1994. **Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems.** *Plant Molecular Biology* 24(1):1-20.

Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama A.B. y Navarro V. 2003. **Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity.** *Planta Medica* 69 (10): 967-970.

Robinson, G.G. y López C.B. 1999. **Patrones del uso de plantas medicinales entre los amuzgos del estado de Guerrero, México.** <http://www.sil.org.mexico/amuzga/guerrero/A006e-PlantasMedicinales-AMU.pdf>. Instituto Lingüístico de Verano, A.C. (Accesada en agosto del 2006).

Rocha, A.D., de Oliveira A.B., de Souza Filho J.D., Lombardi J.A. y Braga F.C. 2004. **Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*.** *Phytotherapy Research* 18 (6): 463-467.

Rodríguez J., S. y J. Espinoza, G. 1995. **Listado Florístico del estado de Michoacán. Sección I. Flora del Bajío y regiones adyacentes.** Fascículo complementario VI. Instituto de Ecología. 210 pp.

Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M.K., Vicentini, C.B. y Mares, D. 2005. **Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L.** *Protoplasma* 225:57-65.

Romano, L., Battaglia F., Masucci L., Sanguinetti M. Posteraro B., Plotti G., Zanetti S. y Fadda G. 2005. **In vitro activity of bergamot natural essence and furocoumarin free and distilled extracts, and their associations with boric acid, against clinical yeast isolates.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:110–114.

Rossi, R., Carpita, A. y Leéis, A. 1984. **Palladium-catalyzed syntheses of naturally-occurring acetylenic thiophens and related compounds.** *Tetrahedron letters* 40: 2773-2779.

Rugutt, J.K., Ngigi, A.N., Rugutt, K.J. y Ndalut, P.K. 2006. **Native Kenyan plants as possible alternatives to methyl bromide in soil fumigation.** *Phytomedicine*. 13: 576-583.

Ruiz-Cancino, A., Cano, A. E., Delgado, F. 1993. **Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. ludoviciana.** *Phytochemistry*. 33:113-115.

Russell, A. D., McDonnell, G. 2000. **Concentration: a major factor in studying biocidal action.** *Journal of Hospital Infection* 44: 11–13.

Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. **Flora Fanerogámica del Valle de México.** Volumen II. ENCB-INE. 674 pp.

Rzedowski, G.C. y Rzedowski, J. 2001. **Flora fanerogámica del Valle de México.** 2a ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro. 1406 pp.

Sahin, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcu, H.O., Sengul, M. Adiguzel, A., Ozturk, S. Y Kotan, R. 2003. **Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L.** *Journal of Ethnopharmacology* 87: 61-65.

Sánchez Pérez, J. de la L., Alcántar Rocillo J. J., Coria Avalos V. M., Anguiano Contreras J., Vidales Fernández I., Tapia Vargas L. M., Aguilera Montañéz J. L., Hernández Ruíz G. y Vidales Fernández J. A. 2001. **Tecnología para la producción de aguacate en México.** INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México, 208 p.

Sarukhán, J. 1995. **Diversidad Biológica.** UNAM. 536:3-10.

Sepp, J. R. y Moerman, E.D. 2001. **The importance of weeds in ethnopharmacology.** *Journal of Ethnopharmacology* 75:19-23.

Serrato, B., Cruz M.A. y Quijano M.L. 1993. **Usos de algunas especies de Tagetes: revisión bibliográfica (1984 –1992).** En: Proceedings of the I International Symposium and II National Meeting of Sustainable Agriculture: Importance and contribution of traditional agriculture. CEICADAR, Puebla, México. 228 –238 pp.

Serrato, B. E. 2002. **Estudio fitoquímico de plantas medicinales.** INIFAP-Morelia. 10 pp.

Setzer, W.N., Vogler, B., Achmidt, J.M., Leahy, J.G. y Rives, R. 2004. **Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil.** *Fitoterapia*. 2004 Mar; 75(2):192-200.

Shafi, P. M., Nmabiar, M.K., Clero, R.A., Sar,a, Y.R. y Veerna, S. 2004. **Composition and antifungal activity of the oil of *Artemisia nilagirica* (Clark) Pamp.** *Journal of Essential Oil Research*. 4 pp.

Singh, S.P., Shukla H. S., Singh R.S. y Tripathi S.C. 1986. **Antifungal properties of essential oil of *Ageratum conyzoides* L.** *Natural Academy Science Letters* 9: 97-99.

Sivrapoulous, A., Nicolau, C., Papanicolau E, Kokkin S, Lanaras T, Arsenakis M. 1997. **Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oils.** *Journal Agricultural Food Chemistry* 45: 3197-3201.

Skočibušić, M., Bezic, N. 2004. **Phytochemical Analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils.** *Phytotherapy Research* 18:967-970.

Skočibušić, M., Bezić, N. y Dunkić, V. 2006. **Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia.** *Food chemistry* 96: 20-28.

Soliman, F.M., El-Sohly, M.A., Fathy, MM., y El-Sakhawy FFS. 1997. **A comparative study of the essential oils of certain *Mentha* and *Salvia* species grown in Egypt.** *Egyptian Journal Pharmaceutical Sciences* 38: 553-564.

Swaminathan, S. M. 1998. En: **Handbook of plants with pest control properties.** Grainge, M. and Ahmend. Ed. John Wiley and Sons p.v.

Swedlow, J. L. 2000. **Remedio natural.** *National Geographic* 6(4): 3-7.

Taho, N., Tuy, N.T. Hoy, T.M. y Thai, T.H. 2004. **Artemisia vulgaris L. from Vietnam: chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant.** *Journal of Essential Oil Research* 4 pp.

Tan, R. X. Tang, H.Q., Hu, J. y Shuai, B. 1998. **Lignans and sesquiterpene lactones from Artemisia sieversiana and Inula racemosa.** *Phytochemistry* 49(5):157-161.

Tawata, S., Taira S., Kobamoto N., Zhu J., Ishihara M. y Toyama S. 1996. **Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60(5):909-10.

Taylor, L. 2000. **Plant based drugs and medicines.** Raintree Nutrition Inc., Carson City, <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>.

Tokin, B.P. 1960. **Phytoncides, the destroyers of microbes.** Moscow Izdat. Sov. Russia, p. 198.

Trinidad, P. V. 1998. **Efecto fungicida del extracto vegetal de Heliopsis longipes sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos.** Tesis Licenciatura, Esc. de Químico-Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

Turchetti, B., Pinelli P., Buzzini P., Romani A., Heimler D., Franconi F. y Martini A. 2005. **In vitro antimycotic activity of some plant extracts towards yeast and yeast-like strains.** *Phytotherapy Research*. 19(1):44-9.

Vázquez G., J. A., R. Cuevas, G., S. Cochrane, T., H. Iltis, H., F. J. Santana, M. y L.Guzmán, H.1995. **Flora de Manantlán.** UdeG-IMECBIO/University of Wisconsin-Madison, BRIT. Forth Worth, TX, USA. 315 p.

Villarreal, M.L., Alvarez L., Alonso D., Navarro V., Garcia P. y Delgado G. 1994. **Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species.** *Journal of Ethnopharmacology* 42: 25-29.

Vokou, D. y Margaris, N.S. 1984. **Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms.** *Soil Biology and Biochemistry* 16: 509-513.

Wang, H., Ye X.Y. y Ng T.B. 2001. **Purification of chrysancorin, a novel antifungal protein with mitogenic activity from garland chrysanthemum seeds.** *Journal of Biological Chemistry* 382:947-51.

Waterman, P.G. 1992. **Roles for secondary metabolites in plants.** En: Secondary metabolites: their function and evolution. Wiley Chichester Ciba Foundation Symposium 171. pp. 225-275.

Werenga, J.M., Whalon M.E., Maredia K. y Hollintongworth R. 1994. **Global Pest Resistance Management. Summer Institute.** En IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. (8, 1994, Washington, D. C.). Book of Abstracts. Vol. 1. p. 412.

Wilson, C. L. y Wisniewski M.E. (eds.). 1994. **Biological control of postharvest diseases, theory and practice.** CRC Press, Inc., Boca Raton, FL 182 p.

Wink, M. 1999. **Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology.** Sheffield Academic Press, Sheffield, Inglaterra. 304 pp.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Muñíz, E.E., Aguilar, A. y Reyes-Chilpa, R. 2005. **Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes.** *Journal of Ethnopharmacology* 97(2):293-299.

Zheng, W.F., Tan R.X., Yang L. y Liv, Z.L. 1996. **Two flavones from *Artemisia giraldi* and their antimicrobial activity.** *Planta Medica* 62(2): 160-162.

XIII. ANEXOS

GLOSARIO

AQUENIO O AQUENO: es un tipo de fruto seco producido por numerosas especies de plantas de flor, contienen una única semilla.

BIOCIDA: Sustancias químicas sintéticas, naturales o de origen biológico o de origen físico con capacidad para destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier microorganismo considerarlo nocivo para el hombre. Ejemplo de ello son los pesticidas y antibióticos.

BIODISPONIBILIDAD. Término farmacéutico que alude a la porción de la dosis, de un fármaco o nutriente administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción.

CANCERÍGENO: Se dice de una sustancia que induce o causa cáncer.

CANCEROGENICIDAD: Consisten en la evaluación de un eventual efecto carcinogénico y el riesgo que implica.

ETNOBOTÁNICA: Estudio de las relaciones entre plantas y el ser humano, incluyendo sus aplicaciones y usos tradicionales, para de esta forma determinar su valor cultural científico.

FUNGICIDA SISTÉMICO: Sustancia química destinada a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de los hongos considerados como plagas y que se distribuye por todo el organismo infectado.

FUNGICIDA QUIMIOTERAPÉUTICO: Sustancia química destinada a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de los hongos considerados como plagas y que además es un medicamento usado para tratar el cáncer.

GENOTOXICIDAD: Estudios orientados a determinar la proporción de carcinógenos correctamente identificados (sensibilidad) y la proporción de sustancias no carcinogénicas que han sido descartadas por técnicas *in vivo* e *in vitro*.

HERBOLARIA: Conocimiento adquirido a través del tiempo para conocer a las plantas y sus propiedades medicinales, así como sus características.

INFUSIÓN: Bebida obtenida de las hojas secas, flores o de los frutos de diversas hierbas aromáticas, a las cuales se les vierte o se los introduce en agua a una temperatura mayor a la ambiente, pero sin llegar a hervir.

LIPOFÍLICA: Sustancia capaz de disolver lípidos (grasas), ser disuelto en ellos o absorberlos.

LIXIVIACIÓN: Desplazamiento de sustancias solubles o dispersables (arcilla, sales, hierro, humus, etc.); y es por eso característico de climas húmedos (Pluvisilva, etc.). Esto provoca que los horizontes superiores del suelo pierdan sus compuestos nutritivos, arrastrados por el agua; se vuelvan más ácidos, ya que queda compuestos insolubles (Aluminio); y a veces, también se origine toxicidad. También se pierden grandes cantidades de fertilizantes, al igual que los compuesto nutritivos.

MEDICINA ALÓPATA: Es la medicina convencional de occidente. La medicina alopata permite utilizar la tecnología y avances médicos y farmacéuticos para entregar mayor salud al paciente.

PATÓGENO: Del griego *pathos*, enfermedad y *gainein*, engendrar). Toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal, vegetal, etc.) sensiblemente predispueto.

PLAGUICIDA O PESTICIDA: Se aplica a aquellas sustancias u organismos capaces de exterminar toda vida animal o vegetal que pueda afectar a la salud, la alimentación o a la economía del hombre. Entre los plaguicidas se encuentran los insecticidas, ascaricidas, herbicidas y fungicidas.

RESISTENCIA BIOLÓGICA: Es la capacidad, tanto biológica como física, que tiene un organismo ante sustancias que pueden ser tóxicas para el mismo. Es la propiedad de un germen de ejercer propiedades protectoras, haciéndolo estéril el tratamiento con determinado antibiótico.

TAXÓN: Grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un "tipo", que si el taxón es una especie es un espécimen o ejemplar concreto.

TOXICIDAD: Medida usada para calcular el grado tóxico ó venenoso de algunos elementos. La toxicidad puede referirse al efecto de esta sobre un organismo completo, como un ser humano, una bacteria o incluso una planta, o a una subestructura, como una célula (citotoxicidad).

TOXICIDAD AGUDA: Se considera que existe "toxicidad aguda" cuando la acción de la sustancia empleada en una dosis única o durante un período corto de tiempo (24 h) se expresa en forma de interferencias de las funciones fisiológicas, alteraciones morfológicas de sus órganos o la muerte

TOXICIDAD CRÓNICA: Consiste en la evaluación de los efectos de la droga sobre el organismo cuando ésta se administra repetidamente por periodos mayores de tres meses hasta varios años.

TURGENCIA: En biología, turgencia (del latín *turgere*; hinchar) determina el estado de rigidez de una célula, es el fenómeno por el cual las células al absorber agua, se hinchan, ejerciendo presión contra las membranas celulares, las cuales se ponen tensas. De esto depende que una planta esté marchita o firme.