



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Hamelia patens* Jacq. Y *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl. EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y EL TRATAMIENTO DE DIABETES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Catalina Rugerio Escalona

DIRECTORES

Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo
Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Tepetitla, Tlaxcala

2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 5 del mes de noviembre del año 2018, el (la) que suscribe Catalina Rugerio Escalona alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro B140407, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo y del Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y cede los derechos del trabajo intitulado Potencial Biológico de *Hamelia patens* Jacq. y *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl. en el control de *Fusarium oxysporum* y el tratamiento de diabetes, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección catrugesc@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Catalina Rugerio Escalona

CONTENIDO

Resumen.....	1
I Introducción.....	5
II Antecedentes.....	7
III Perfil fitoquímico y potencial antioxidante de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) <i>Schltl</i> y <i>Hamelia patens</i> Jacq.	16
Hipótesis	16
Objetivos.....	16
General.....	16
Específicos.....	16
Metodología	16
Obtención de extractos.....	16
Identificación y cuantificación de constituyentes mayoritarios.....	17
Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo)	19
Resultados.....	19
Conclusión	26
IV Potencial antidiabético de los extractos de <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) <i>Schltl</i> y <i>Hamelia patens</i> <i>Jacq</i>.....	27
Diabetes mellitus	27
Diabetes mellitus tipo 1	28
Diabetes mellitus tipo 2	29
Diabetes mellitus y estrés oxidativo	29
Tratamiento farmacológico de la DM2.....	30
Hipótesis	33
Objetivos.....	33

General.....	33
Específicos.....	33
Metodología	33
Ensayo de inhibición de α -glucosidasa.....	33
Inducción de diabetes por estreptozotocina en ratas Wistar	34
Actividad anti-hipergluceante.....	34
Ensayo de toxicidad aguda.....	34
Resultados.....	35
Conclusión	38
<i>V Plantas de la familia Rubiaceae como alternativa en el control de la fusariosis.....</i>	39
Fusarium agente causal de daños en cultivos de importancia económica.....	40
Fusarium oxysporum.....	41
Rutas de señalización y patogénesis de Fusarium oxysporum	42
Mecanismo de infección de hongos fitopatógenos	43
Métodos de control de hongos fitopatógenos.....	51
Hipótesis	53
Objetivos	53
General.....	53
Específicos.....	53
Actividad antifúngica de los extractos de Bouvardia ternifolia (Cav.) Schldl Y Hamelia patens Jacq frente a Fusarium oxysporum.....	54
Metodología	54
Microorganismos	54
Identificación molecular.....	54
Identificación de razas de Fol mediante cultivares diferenciales de tomate	58
Resultados.....	59
Conclusión	60
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de B. ternifolia y H. patens	61
Método de dilución en agar	61

Resultados.....	61
Conclusión.....	64
Actividad fitotóxica de los extractos de Bouvardia ternifolia Y Hamelia patens sobre la germinación de semillas de tomate.....	65
Metodología.....	65
Resultados.....	65
Conclusión.....	66
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de B. ternifolia y H. patens frente a Forl 1045 a nivel invernadero.....	67
Metodología.....	67
Siembra de las semillas de tomate embebidas en los extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	67
Resultados.....	68
Conclusión.....	71
Actividad inhibitoria de enzimas hidrolíticas de Fusarium spp frente a Bouvardia ternifolia (cav.) Schltdl y Hamelia patens Jacq.....	72
Metodología.....	72
Evaluación de la actividad celulolítica de <i>Fusarium</i> spp.....	72
Actividad celulolítica de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	73
Actividad amilolítica de ForlC3 frente a extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	75
Conclusión.....	77
VI Fraccionamiento y elucidación estructural del extracto metanólico de Hamelia Patens.....	78
Metodología.....	78
Análisis cualitativo de los extractos metanólico de <i>H. patens</i> por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	78
Fraccionamiento y elucidación estructural del extracto metanólico de Hamelia patens (BHm).....	78
Resultados.....	79
Literatura citada.....	83
ANEXOS.....	92
Anexo II. Evaluación de la actividad enzimática cualitativa.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso tradicional en la obtención de principios activos naturales.....	8
Figura 2. Proceso moderno en la obtención de principios activos naturales.....	8
Figura 4. Trompetilla.....	9
Figura 5. Bayetilla.....	12
Figura 6. Diagrama de trabajo para la obtención de extractos.	17
Figura 7. Cromatoplasmas de los extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	24
Figura 8. Cromatoplasmas de los extractos polares de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	24
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	42
Figura 9. Diagrama que muestra las actividades enzimáticas encargadas de degradar la celulosa.	45
Figura 10. Diagrama que muestra las actividades enzimáticas encargadas de degradar la hemicelulosa. ...	46
Figura 11. Diagrama que muestra la actividad de las enzimas encargadas de degradar pectina.	48
Figura 12. Estructuras celulares afectadas por antifúngicos.	52
Figura 13. Región ITS1 e ITS2 del ADNr, amplificada con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.	55
Figura 14. Patrón de amplificación de los productos de PCR de fragmentos de ADN de <i>F. oxysporum</i> y FORL. Los oligonucleótidos empleados fueron uni (670-672 pb) ITS1-ITS4 (620 pb).	59
Figura 15. Altura de las plantas en presencia de extractos e inoculadas con Forl.	69
Figura 16. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en presencia de extractos e inoculadas con Forl.	70
Figura 17. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en presencia de extractos e inoculadas con Forl.	70
Figura 18. Índice de Severidad de los tratamientos con extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i> sobre plantas de tomate infestadas con Forl 1045.	71
Figura 19. Número de conidios (líneas sólidas) y azúcares reductores (líneas punteadas) de <i>Fusarium</i> spp.	72
Figura 20. Número de conidios (líneas sólidas) y actividad enzimática (líneas punteadas) de <i>Fusarium</i> spp.	73
Figura 21. Actividad enzimática (líneas punteadas) y biomasa (líneas sólidas) de <i>Fusarium</i> spp.	73
Figura 23. Espectro de RMN-1H de 1 (400 MHz, CD3OD).	81
Figura 24. Espectro de RMN-13C de 1 (100 MHz, CD3OD).	81

Índice de Tablas

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	20
Tabla 2. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos de <i>B. ternifolia</i>	21
Tabla 3. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos de <i>H. patens</i>	21
Tabla 4. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de hojas de <i>B. ternifolia</i>	22
Tabla 5. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de tallos de <i>B. ternifolia</i>	22
Tabla 6. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de hojas de <i>H. patens</i>	23
Tabla 7. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de tallos de <i>H. patens</i>	23
Tabla 8. EC ₅₀ de los extractos de <i>H. patens</i> por el método de DPPH.....	25
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa.....	35
Tabla 10. Niveles de glucosa e insulina sérica sobre animales experimentales.....	36
Tabla 11. Perfil renal y hepático en ratas experimentales.....	36
Tabla 12. Perfil lipídico (mg/dL) de ratas experimentales.....	37
Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para amplificar fragmentos de genes de la poligalacturonasa.....	56
Tabla 14. Oligonucleótidos específicos para razas de FOL y FORL.....	57
Tabla 15. Patrón de amplificación para identificar razas Fol y Forl.....	57
Tabla 16. Identificación molecular de género y especie de <i>Fusarium</i> spp.....	59
Tabla 17. Identificación de razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol).....	59
Tabla 18. Porcentaje de inhibición de extractos de hojas de <i>B. ternifolia</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> spp.	61
Tabla 19. Porcentaje de inhibición de extractos de tallos de <i>B. ternifolia</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> spp.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 20. Porcentaje de inhibición de extractos de hojas de <i>H. patens</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> spp.	63
Tabla 21. Porcentaje de inhibición de extractos de tallos de <i>H. patens</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> spp.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 22. Porcentaje de inhibición de extractos <i>B. ternifolia</i> sobre el crecimiento de Forl 1045.....	63
Tabla 23. Porcentaje de inhibición de extractos <i>H. patens</i> sobre el crecimiento de Forl 1045.....	64
Tabla 24. Efecto de extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i> sobre la germinación de la variedad de semillas de tomate TORO F1.....	65
Tabla 25. Efecto de extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i> sobre la germinación de la variedad de semillas de tomate variedad N6394.....	66
Tabla 26. Escala para la evaluación de severidad de Forl en plantas de tomate.....	67
Tabla 27. Evaluación de la actividad celulolítica de ForlC3.....	73
Tabla 28. Evaluación de la actividad celulolítica de <i>F. oxysporum</i> frente a extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	74
Tabla 29. Evaluación de la actividad amilolítica de ForlC3 frente a extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	75
Tabla 30. Evaluación de la actividad amilolítica de ForlC3 frente a extractos de <i>B. ternifolia</i> y <i>H. patens</i>	76

Resumen

El uso de plantas medicinales ha venido en aumento a través de los años, ya que son consideradas fuentes de un sin número de compuestos bioactivos. *Bouvardia ternifolia* y *Hamelia patens* son empleadas en el tratamiento de diversos padecimientos como la Diabetes, y en el control de enfermedades de plantas provocadas por hongos del género *Fusarium* que atacan a cultivos de tomate. En ambos casos para el control de dichas enfermedades se emplean compuestos de origen sintético, los cuales han presentado diversas desventajas. Por lo que el uso de extractos se ha considerado como una alternativa económica y amigable tanto a nivel humano como ambiental. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto anti-hiperglucemiante y la actividad antifúngica de los extractos de ambas plantas. Se hizo la separación de las partes aéreas de las plantas en hojas y tallos las cuales fueron extraídas con disolventes de baja, media y alta polaridad (hexano, diclorometano, metanol y agua). Los resultados de la extracción mostraron que los extractos acuosos presentaron los mayores rendimientos, seguido de los metanólicos. Al realizar el perfil fitoquímico todos los extractos estos dieron positivo para la presencia de alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos observándose en mayor abundancia sobre las hojas que en tallos. Al realizar la cuantificación de estos metabolitos, los extractos hexánicos y diclorometánicos de hojas y tallos de ambas plantas mostraron altos contenidos de compuestos terpénicos, mientras que los extractos metanólicos de las hojas de *H. patens* presentaron la mayor concentración de compuestos de origen fenólico, mientras que ambas plantas contenían menos de 1mg de compuestos de origen alcaloideo.

Debido a que los extractos presentaron altas concentraciones de compuestos de origen fenólico, y los cuales han sido reportados como importantes antioxidantes, se evaluó la actividad antioxidante hasta determinar su EC_{50} donde los extractos de *H. patens* obtuvieron la mejor EC_{50} con un valor de 51.7 y 50.7 $\mu\text{g/mL}$, para los extractos metanólico y metanólico total, respectivamente. En el caso de los demás extractos estos tuvieron valores superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Como siguiente objetivo se evaluó la actividad anti-hiperglucemiante de los extractos. Como primer paso se determinó su efecto sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa reportando su concentración inhibitoria media (IC_{50}), nuevamente los extractos metanólicos de hojas de *H. patens* presentaron la mejor inhibición con una IC_{50} de 67.8 y 78.3 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico y metanólico total. Estos valores fueron mejores que los obtenidos por el fármaco control que fue acarbosa. Los extractos hexánicos de *H. patens* hojas y *B. ternifolia* tallos, también presentaron valores de IC_{50} importantes, sin embargo, para el siguiente paso, solo los extractos metanólicos de hojas fueron considerados para evaluar la actividad anti-hiperglucemiante en un modelo murino. A la par de este estudio se determinó la dosis letal media de los extractos sobre ratones, mientras que para la evaluación de la actividad anti-hiperglucemiante se emplearon ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, a las cuales se les administraron dosis de 150, 75 y 35 mg/Kg de extracto. Los parámetros que se evaluaron fueron glucosa sanguínea, insulina, colesterol, LDL, HDL, triglicéridos, BUN, AIT y AsT.). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que a dosis de 150 mg/Kg los extracto metanólico y metanólico total bajaban los niveles de glucosa en sangre con valores de 117.5 y 93.25 mg/dL, respectivamente, comparado con el control sano y el fármaco control

(metformina) que fue de 112.70 mg/dL y 123.90 mg/dL respectivamente. A esta misma dosis se mostró un efecto protector en relación a la creatinina sérica, además de una disminución en la concentración de las enzimas ALT (45.50 y 73.25 mg/dL para BHm y BHmt respectivamente) y AsT (141 y 138 μ U/mL). Dentro del perfil hepático a una dosis de 150mg/Kg los extractos metanólico y metanólico total disminuyeron los niveles de triglicéridos y de las LDL 31.50 y 31.25 mg/dL, comparado con el control diabético el cual contenía 82.50 mg/dL, sin embargo, solo el extracto metanólico total incremento la concentración de las HDL a 73.25 mg/dL y el extracto metanólico las disminuyo con 45.50 mg/dL, mientras que la del control sano fue de 65.33 mg/dL.

Por otro lado se evaluó la actividad antifúngica de los extractos frente a cepas de *Fusarium* spp (*F. sp1*, *F. sp2* y *F. oxysporum*), sin embargo debido a que no se conocía la especie, así como su posible forma especial, se identificaron empleando cultivares diferenciales (Bonny Best, N6394, Walter e I3R3) los cuales indicaron que las tres cepas de *F. oxysporum* evaluadas se trataban de la forma especial *radici-lycopersici*, además se identificaron a través de técnicas moleculares de las cuales 2 mostraron una identidad del 100% con *Fusarium oxysporum*, y la ultima una identidad del 100% con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radici-lycopersici*.

Mediante el ensayo de dilución en agar, se evaluaron los extractos a las concentraciones de 0.5 y 2%, frente a las tres cepas de *Fusarium*, donde todos los extractos metanólicos consecutivos al 2% presentaron el mejor efecto inhibitorio a las 72 h del 49% y 20% para hojas y tallos respectivamente de *H. patens*, mientras que para los extractos de *B. ternifolia*, fue de 31% y 36% para hojas y tallos. Posteriormente se evaluó la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radici-lycopersici* (Forl) aislada de un cultivo de tomate del estado de Sinaloa, se decidió evaluar solo los extractos metanólicos a concentraciones superiores de 6, 4 y 2, donde BHm al 6% tuvo el mejor efecto inhibitorio con un 48.6% de inhibición hasta las 72 h, mientras que los extractos de *B. ternifolia*, no presentaron ningún efecto inhibitorio, sino que propicio un mayor crecimiento de Forl.

Por lo que decidió llevarlo a un modelo *in vivo*, empleando solo los extractos de mayor polaridad, primero se evaluó el efecto fitotóxico de los extractos en semillas de tomate de las variedades TORO F1 y N6394, donde ninguno de los extractos ocasiono algún efecto sobre la germinación de estas semillas. Por lo que se llevó a cabo un estudio del efecto de los extractos en plántulas de tomate infestadas con Forl, empleando una concentración del 2% del extracto. La aplicación de los extractos desde las semillas, así como aplicaciones posteriores no mostro un efecto negativo sobre las plantas que no se encontraban infestadas con Forl, mientras que para las plantas contaminadas con Forl se observó un efecto protector de los extractos destacando al extracto de *B. ternifolia* acuoso.

Estos resultados nos hacen suponer que los extractos están actuando de manera diferente en el control de Forl por lo que son necesarios más experimentos que nos permitan conocer su posible mecanismo de acción contra *Fusarium*.

Abstract

The use of medicinal plants has been increasing over the years, since they are considered as sources of a number of bioactive compounds. *Bouvardia ternifolia* and *Hamelia patens* are used in the treatment of various diseases such as Diabetes, and in the control of plant diseases caused by fungi of the genus *Fusarium* that attack tomato crops. In both cases for the control of said diseases synthetic compounds are used, which have presented several disadvantages. So the use of extracts has been considered as an economic and friendly alternative both human and environmental. Therefore, in this work the anti-hyperglycaemic effect and antifungal activity of the extracts of both plants was evaluated. The aerial parts of the plants were separated into leaves and stems which were extracted with low, medium and high polarity solvents (hexane, dichloromethane, methanol and water). The results of the extraction showed that the aqueous extracts had the highest yields, followed by the methanolic ones. When performing the phytochemical profile all the extracts were positive for the presence of alkaloids, terpenes and phenolic compounds, being observed in greater abundance on the leaves than on stems. When quantifying these metabolites, the hexane and dichloromethane extracts of leaves and stems of both plants showed high contents of terpene compounds, while the methanolic extracts of the leaves of *H. patens* showed the highest concentration of compounds of phenolic origin, while that both plants contained less than 1 mg of compounds of alkaloid origin.

Because the extracts presented high concentrations of compounds of phenolic origin, and which have been reported as important antioxidants, the antioxidant activity was evaluated until its EC₅₀ was determined where the *H. patens* extracts obtained the best EC₅₀ with a value of 51.7 and 50.7 µg/mL, for the methanolic and total methanolic extracts, respectively. In the case of the other extracts, they had values higher than 200 µg/mL.

The anti-hyperglycaemic activity of the extracts was evaluated as the next objective. As a first step, its effect on the inhibition of the α-glucosidase enzyme was determined by reporting its mean inhibitory concentration (IC₅₀), again the methanolic extracts of *H. patens* leaves showed the best inhibition with an IC₅₀ of 67.8 and 78.3 µg/mL for the total methanolic and methanolic extract. These values were better than those obtained by the control drug that was acarbose. Hexanic extracts of *H. patens* leaves and *B. ternifolia* stems also showed significant IC₅₀ values however, for the next step, only the methanolic extracts of leaves were considered to evaluate the anti-hyperglycemic activity in a murine model. In addition to this study, the mean lethal dose of the extracts was determined on mice, while diabetic rats induced by streptozotocin were used for the evaluation of anti-hyperglycaemic activity, to which doses of 150, 75 and 35 mg/Kg of extract were administered. The parameters evaluated were blood glucose, insulin, cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, BUN, AIT and AsT. The results obtained in this study showed that at a dose of 150 mg/Kg the methanolic and total methanolic extracts lowered the blood glucose levels with values of 117.5 and 93.25 mg/dL,

respectively, compared with the healthy control and the control drug (metformin) which was 112.70 mg/dL and 123.90 mg/dL respectively. At this same dose, a protective effect was shown in relation to serum creatinine, in addition to a decrease in the concentration of ALT enzymes (45.50 and 73.25 mg/dL for BHm and BHmt respectively) and AsT (141 and 138 μ U/mL). Within the hepatic profile at a dose of 150mg/kg methanolic and total methanolic extracts decreased the levels of triglycerides and LDL 31.50 and 31.25 mg/dL, compared with the diabetic control which contained 82.50 mg/dL, however only the total methanolic extract increased the HDL concentration to 73.25 mg/dL and the methanolic extract decreased them to 45.50 mg/dL, while that of the healthy control was 65.33 mg/dL.

On the other hand, the antifungal activity of the extracts against *Fusarium* spp (*F. sp1*, *F. sp2* and *F. oxysporum*) strains was evaluated, however, because the species was not known, as well as its possible special form, they identified using differential cultivars (Bonny Best, N6394, Walter and I3R3) which indicated that the three strains of *F. oxysporum* evaluated were the special form *radici-lycopersici*, in addition they were identified through molecular techniques of which 2 showed a 100% identity with *Fusarium oxysporum*, and the last 100% identity with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radici-lycopersici*.

Through the agar dilution test, the extracts were evaluated at concentrations of 0.5 and 2%, compared to the three strains of *Fusarium*, where all the methanolic extracts at 2% had the best inhibitory effect at 72 h of 49% and 20% for leaves and stems respectively of *H. patens*, while for extracts of *B. ternifolia*, it was 31% and 36% for leaves and stems. Subsequently, the strain evaluated of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radici-lycopersici* (Forl) isolated from a tomato crop from the state of Sinaloa, it was decided to evaluate only the methanol extracts at higher concentrations of 6, 4 and 2, where BHm at 6% had the best inhibitory effect with a 48.6% inhibition until 72 h, while the extracts of *B. ternifolia*, did not present any inhibitory effect, but rather favored a greater growth of Forl.

So we decided to take it to an *in vivo* model, using only the extracts of greater polarity, first the phytotoxic effect of the extracts on tomato seeds of the varieties TORO F1 and N6394 was evaluated, where none of the extracts caused any effect on the germination of these seeds. Therefore, a study of the effect of the extracts on tomato seedlings infested with Forl was carried out, using a concentration of 2% of the extract. The application of the extracts from the seeds as well as subsequent applications did not show a negative effect on the plants that were not infested with Forl, while for the plants contaminated with Forl a protective effect of the extract extracts was observed, highlighting the extract of *B. ternifolia* aqueous.

These results lead us to suppose that the extracts are acting differently in the control of Forl, so more experiments are necessary to know their possible mechanism of action against *Fusarium*.

I Introducción

Desde la antigüedad el hombre ha sabido aprovechar a las plantas para cubrir necesidades básicas como la alimentación, vestido, herramientas y refugio; también ha utilizado a éstas para aliviar diversos padecimientos y enfermedades humana tales como la diabetes, el cáncer y las infecciones microbianas. También han sido empleadas para evitar enfermedades en animales e incluso en plantas de interés agrícola, como un método alternativo de control de plagas de estas especies vegetales que representan un mayor valor al ser fuente de alimentos.

Actualmente el consumo de plantas para el control de diversas enfermedades o padecimientos va en aumento, de acuerdo a la OMS más del 80% de la población en todo el mundo recurre a este tipo de tratamientos, en muchos de los casos debido a la falta de recursos económicos. Sin embargo, son diversos los estudios que se han encargado de validar el efecto de las plantas sobre tales enfermedades mediante diversas evaluaciones biológicas. Tal es el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (DM 2), la cual es una de las enfermedades que mayor impacto está causando en el sector salud, ya que se reportan más de 46 millones de casos tan solo en América del Norte y va en aumento, por lo que diversos estudios han sido realizados en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* para corroborar dicho efecto e incluso conocer el posible mecanismo de acción por el cual están actuando, ya que además se han realizado aislamientos de los diversos compuestos de las plantas y se ha encontrado a algunos responsables de la actividad.

Otro de los usos que se le están dando a las plantas empleadas en la medicina tradicional es como antagonistas contra los principales microorganismos que causan enfermedades en cultivos de interés económico como son los hongos fitopatógenos, que anualmente están generando pérdidas económicas importantes y su control ha sido una de las limitantes para contrarrestar dichos efectos. Dentro de los hongos que mayores pérdidas están ocasionando se encuentran los géneros de *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* entre otros. Dentro del género *Fusarium* destaca la especie *oxysporum* la cual cuenta con más de 100 formas especiales, de las cuales podemos destacar a *F. oxysporum* f. sp *radici-lycopersici* que afecta al cultivo de tomate el cual se encuentra dentro de las principales hortalizas que son exportadas de México hacia los Estados Unidos, y la importancia en este hongo radica en que una vez que el hongo infecta a la planta este no se puede controlar ocasionando la pérdida total de la cosecha. Por este caso estudios se han encargado de conocer el posible mecanismo por el cual los hongos atacan a una planta el cual consiste en que el hongo al entrar en contacto con la raíz de la planta este se encarga de secretar enzimas hidrolíticas capaces de penetrar la pared vegetal y comienzan a invadir todo el tejido ocasionando la muerte. Por lo que las plantas como medio de control contra dichos hongos es una alternativa que ha sido retomada nuevamente, aprovechando sus principios activos. En este contexto existen pocos estudios científicos que avalen el uso medicinal de estas especies y no se ha establecido un principio activo responsable de las diferentes actividades biológicas reportadas como lo es la actividad antihiperglucemiante y su potencial antifúngico.

Por ello, en el presente trabajo se pretende llevar a cabo un estudio fitoquímico biodirigido de *H. patens* y *B. ternifolia* sobre su efecto anti-hiperglucemiante y antifungico.

II Antecedentes

Los productos de origen vegetal como las plantas, siguen contribuyendo en la medicina tradicional en todo el mundo, debido a que representan uno de los principales recursos usados por las poblaciones para tratar diversos padecimientos y/o enfermedades y que han trascendido por generaciones. Se ha reportado el uso de plantas desde hace aproximadamente 60 000 años (Anokwuru, 2011), por lo que el empleo de plantas medicinales ha formado y seguirá formando parte de nuestra historia y costumbres debido a que son fuente de sustancias bioactivas.

A lo largo del tiempo, el uso de plantas ha sido un apoyo en la atención primaria de salud por ser una fuente directa de agentes terapéuticos (Schlaepfer, 2010) y son empleados como materia prima en la elaboración de diversos productos, asimismo, las estructuras químicas de sus principios activos sirven como modelo para la elaboración de nuevos medicamentos (Esquivel-Gutiérrez, 2012). De las 500 mil especies vegetales que existen más del 10% son utilizadas en productos farmacéuticos y cosméticos (Jamshidi-Kia, 2018), por lo que los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de todos los medicamentos en uso clínico en la actualidad, de los cuales el 25% son obtenidos de las plantas (Gurib-Fakim, 2006). Debido a esto el comercio de plantas medicinales ha ido en aumento en cuanto a volumen y exportaciones que son estimadas en 800 millones de dólares por año (Singh, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que el 80% de la población a nivel mundial aún depende de remedios herbolarios para el cuidado de su salud. En México dada la gran biodiversidad de ecosistemas que presenta el país, alrededor de 4 500 especies han sido atribuidas con propiedades medicinales lo que hace que México ocupe el segundo lugar en plantas registradas con dichas propiedades (García de Alba, 2011). De éstas plantas solo al ~5% se les han realizado una validación química, farmacológica y/o biomédica. La Secretaría de Salud de México reporta que al menos el 90% de la población usa plantas medicinales, y de este la mitad únicamente utiliza estas en el tratamiento de enfermedades como único recurso, mientras que la otra mitad además de emplear plantas lo complementa con la medicina alópata (Estrada-Lugo, 2017).

La concentración y calidad de los principios activos depende de diversos factores como edad del organismo, clima, época del año, tipo de suelo y la humedad, entre otros (Ocegueda, 2014). Por ejemplo, las plantas muy jóvenes o muy viejas presentan una menor concentración de principios activos, mientras que suelos ácidos favorecen la producción de alcaloides, además, la humedad del suelo tiene un efecto directo sobre la concentración de estos compuestos. Una sola planta medicinal puede contener una infinidad de compuestos activos los cuales son producidos para su protección o defensa ante el ataque de algunos fitopatógenos, herbívoros, cambios climáticos etc., lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza (Jamshidi-Kia, 2018). Entre los principios activos presentes en distintas partes u órganos de la planta (semillas, raíz, hojas, flores y frutos) los más importantes desde el punto de vista de la salud humana son los aceites esenciales, alcaloides, polifenoles, terpenos y heterósidos, y son considerados como una fuente potencial de agentes quimioterapéuticos.

En la Figura 1 se muestra el proceso tradicional de obtención de metabolitos secundarios bioactivos, el cual consiste en la obtención de los extractos empleando uno o varios disolventes, los cuales son evaluados la actividad biológica de interés y posteriormente son sometidos a fraccionamientos donde dichas fracciones son nuevamente evaluadas hasta encontrar y elucidar al o los compuestos bioactivos a través de técnicas espectroscópicas (UV, IR, SM, RMN).

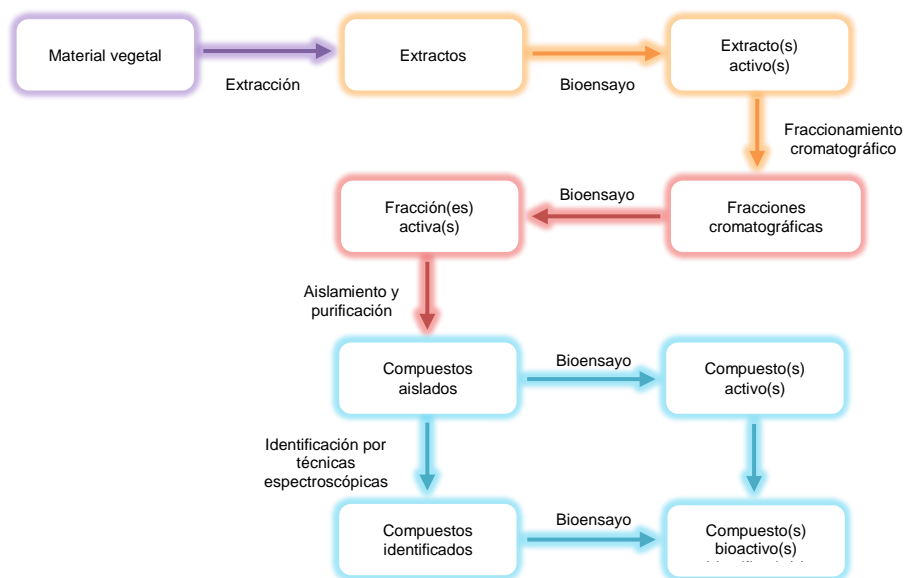


Figura 1. Proceso tradicional en la obtención de principios activos naturales.

Otro método empleado es el uso de procesos modernos (Figura 2) que incluyen ensayos de alto rendimiento (High-throughput screening, HTS) los cuales permiten la identificación de dichos compuestos a través de protocolos específicos, procesamientos de datos, y softwares de control (estudios de relación estructura-actividad, SAR), métodos computacionales y combinación de estrategias.

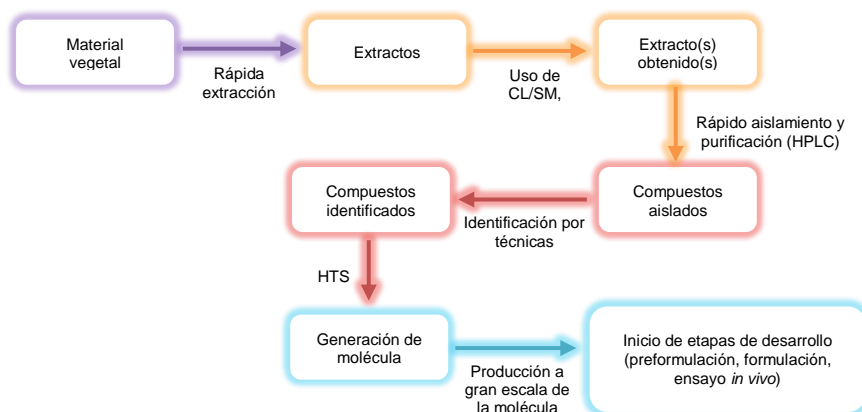


Figura 2. Proceso moderno en la obtención de principios activos naturales.

Familia Rubiaceae

Debido a su amplia distribución, esta familia se encuentra entre las más empleadas en la medicina tradicional, además de ser usadas como ornamentales y alimentos. En términos de número de género y especie, se encuentra dentro de las seis familias más grandes de plantas, después de Asteraceae,

Orchidaceae, Fabaceae, Poaceae y Euphorbiaceae con un total de alrededor de 637 géneros y 13 500 especies (Karou, 2011). Esta familia ha sido dividida en 3 subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae y Ixoroideae. Constituyen un componente importante de toda la vegetación leñosa tropical además de que son fácilmente reconocibles por la presencia de hojas decusadas, estípulas, flores actinomorfas y un ovario interior (Martins, 2015).

Una variedad de metabolitos secundarios es producida en esta familia: terpenoides, antraquinonas y alcaloides indólicos los cuales se encuentran ampliamente documentados y pueden estar presentes en forma de anillos tetracíclicos y pentacíclicos. La proporción de estos compuestos depende de la ubicación y temporada de cosecha. Así mismo se han aislado flavonoides de las hojas, saponinas y saponinas triterpénicas del tallo, entre otros (Sirigiri, 2015).

Dada la diversidad de compuestos sintetizados por esta familia se han realizado una variedad de estudios de los miembros de esta familia, reportando propiedades anti-inflamatorias, analgésicas, antifúngicas, antidiabéticas, mutagénicas, antivirales, antioxidantes, efectos sobre enfermedades vasculares y el sistema nervioso central (Sirigiri, 2015 y Moreira, 2015).

Dentro de los nombres comunes de especies conocidas de esta familia se encuentran el café, guayaba de mono, noni, gardenia, malacahuite, coralillo, ixora, cafecillo, raicilla, crucilla, espino blanco, palo de cruz, canelito, mielcilla, uña de gato y pastora de monte. De estas el café es una bebida estimulante hecha de las semillas de *Coffea arabica* y *C. robusta*. Del género *Cinchona* se ha extraído la quinina, que es un fármaco utilizado en el combate de la malaria. Además, muchas especies nativas son visitadas por colibríes y abejas y los frutos son alimento de muchas especies de aves (Karou, 2011). En este proyecto se emplearon 2 plantas de esta familia, las cuales son detalladas a continuación.

***Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltldl**



Figura 3. Trompetilla.

Taxonomía:

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Rubiales

Tribu: Spermaceae

Nombres comunes: Cántaris, cerillito, chilillo, cigarrillo, cometa, erisipela, escobilla, flor de valleta, hierba del burro, hierba del indio, lengua de víbora, sombra de la virgen, trompetilla.

a) Distribución geográfica

Ésta es una planta nativa de México y Texas, presente en sitios con clima cálido, semicálido, semiseco y templado. Asociada a bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque de

encino, de pino, mixto de encino-pino y de juníferos. En México se ha registrado en Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz.

b) Identificación y descripción

Arbusto o arbolito de 3 a 7 metros de altura con las hojas delgadas en grupos de 3 a 5. Sus flores son de color amarillo oscuro, anaranjado o rojas y están en las partes terminales. Los frutos son carnosos, globosos o alargados y de color rojo que al madurar cambian a negro. Esta planta tiene la particularidad de producir flores y frutos casi ininterrumpidamente a lo largo del año.

c) Usos

Es un arbusto ornamental importante, en regiones más templadas, se cultiva como hierba perenne, también es preferida como forraje por los caprinos, además de su valor ornamental, el néctar y el color rojo de las flores son atractivos para las mariposas y colibríes, y sus frutos carnosos, rojos o negruzcos (maduros), atraen a aves y lagartijas.

En la medicina tradicional mexicana es empleada para curar granos, heridas, cicatrizar, detener hemorragias, reumas, golpes, lesiones, cortadas, para la comezón por piquetes de mosco, salpullido, así como para aliviar problemas digestivos tales como dolor de estómago, diarrea, gastritis, disentería, dolor de muelas, úlcera, o tumores en el estómago. También, se le utiliza en alteraciones de tipo gineco-obstétrico como el flujo, sangrado oscuro, para después de la menstruación o del parto, para prevenir el cáncer o como antihemorrágico; para afecciones del riñón o infecciones intestinales; para tratar la anemia y la diabetes, con el propósito de purificar la sangre (CONABIO, Biblioteca digital, 2009)

Pérez-Gutiérrez *et al.*, en 1998 analizaron la actividad hipoglucemiante en ratones normales y diabéticos (alloxan) por la administración de ácido ursólico y ácido oleanólico obtenidos del extracto clorofórmico de hojas de *B. ternifolia* vía intraperitoneal. Al administrar 75 mg/Kg de estos compuestos se observó que estos disminuía el nivel de glucosa sanguínea en ratones diabéticos en un 66.35 y 52.23% a las 4.5 h, mientras que el control tolbutamida la redujo en 67% (75 mg/Kg), por otro lado el efecto de ácido ursólico y ácido oleanólico sobre ratones normoglucémicos redujeron los niveles de glucosa sanguínea en un 36.52 y 30.43% respectivamente comparado con tolbutamida que fue de 31.30% (50 mg/Kg), indicando que *B. ternifolia* produce un efecto hipoglucémico debido a la presencia de los compuestos aislados.

Gamboa-Alvarado *et al.*, en 2003 evaluaron el efecto de extractos sobre el control de patógenos de suelo, donde el extracto metanólico de hojas de *B. ternifolia* frente a *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* inhibió el crecimiento micelial de estos hongos, con una inhibición de 70.78% y 34.98% para *R. solani* y *P. infestans* respectivamente, esto a una concentración de 20000 ppm a las 96 h.

^aJiménez-Ferrer *et al.*, en 2005 evaluaron extractos hexánicos y metanólicos de raíces de *B. ternifolia* contra veneno de escorpión, evaluando además la DL₅₀ que fue de 120 mg/kg de peso. Al evaluar la actividad antitoxina se reportó la DL₅₀ del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* que fue de 0.750 mg/kg, mientras

que para el extracto hexánico fue de 1.65 mg/kg y de 1.17 mg/Kg para el extracto metanólico ambos mostraron una diferencia significativa.

^bJiménez-Ferrer *et al.*, en 2005 evaluaron el efecto de los extractos hexánico y metanólico de raíces de *B. ternifolia* sobre la inflamación aguda del páncreas en ratas y sobre la liberación de amilasa en un aislado de páncreas de ratón, esto inducido por el veneno de escorpión *Centruroides limpidus limpidus* teniendo como resultado que el edema del páncreas en ratas producido por el veneno de escorpión fue reducido por los extractos hexánico y metanólico los cuales fueron capaces de reducir en un 60% la extravasación (salida) del líquido plasmático. Por otro lado, el efecto secretagogo de amilasa del aislado del páncreas de ratón mostro una EC_{50} del veneno de 3.76×10^{-3} mg/mL mg/kg la cual fue reducida al emplear los extractos hexánico y metanólico a 9.13×10^{-3} mg/mL y 0.01629 mg/mL respectivamente.

Cornejo-Garrido *et al.*, en 2012 determinaron la toxicidad aguda y subaguda en ratones de ambos sexos, los cuales fueron tratados con una mezcla de ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO), obtenidos a partir del extracto metanólico de hojas de *B. ternifolia* mediante cromatografía en columna abierta. Para la evaluación de la toxicidad aguda se administró la mezcla a una dosis de 300 mg/Kg donde los ratones fueron monitoreados durante la hora 1, 2, 4 y 6 y una vez al día por 14 días. Por otro lado, para la toxicidad subaguda se administró una dosis de 6.5 y 13 mg/Kg durante 28 días. Los resultados obtenidos indican que la mezcla de AU/AO es prácticamente inocua con una $DL_{50} > 300$ mg/Kg para toxicidad aguda, mientras que para la toxicidad subaguda no hubo muerte de animales, alteraciones en el crecimiento, ni alteraciones en el peso de los diferentes órganos, además se realizó un análisis histopatológico de los principales órganos los cuales no presentaron cambios o anormalidades.

Herrera-Ruíz *et al.*, (2012) estudiaron el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. ternifolia*, así como tres fracciones obtenidas a partir de este extracto (acetato de etilo, fracción acuosa insoluble en metanol y fracción acuosa soluble en metanol) sobre la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, además realizaron un análisis cromatográfico por HPLC para el extracto y sus fracciones, el cual indico la presencia de los flavonoides rutina, quercetina y kaempferol así como la presencia de ácido ursólico. El extracto hidroalcohólico inhibió a la enzima de manera competitiva con una IC_{50} de 0.6 μ g/mL, mientras que la fracción de acetato de etilo y la fracción insoluble en metanol presentaron una inhibición mixta de $IC_{50} = 0.96$ μ g/mL, la fracción insoluble en metanol mostró una inhibición mixta, esto fue comparado con un control positivo que fue tacrina que mostró una inhibición no competitiva.

García-Morales *et al.*, en 2015 evaluaron el potencial biológico del extracto hidroalcohólico de *B. ternifolia*, iniciando con el efecto antiinflamatorio en oreja de ratón, reportando que el extracto y la fracción de acetato de etilo inducían un efecto antiinflamatorio en más del 70%, además de evaluar la actividad antioxidante por el método TBARs, la fracción enriquecida de flavonoides ($IC_{50} = 30.67 \pm 2.09$ μ g/ml) y la fracción de acetato de etilo ($IC_{50} = 42.66 \pm 0.93$ μ g/ml) mostraron la mejor actividad, por otra parte la fracción que contenía escopoletina mostró la máxima inhibición de la enzima acetilcolinesterasa ($38.43 \pm 3.94\%$) y la fracción de acetato de etilo presentó el mejor efecto neuroprotector al evaluarlo contra el péptido β -amiloid

(83.97 ± 5.03%), por último a través del análisis cromatográfico por HPLC se mostró la presencia de la 3-O-quercetina glucopiranosido, ácido ursólico, ácido oleanólico 3-O-quercetina ramnopiranosido, ácido clorogénico y la escopoletina, lo que hace a esta planta un posible agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

***Hamelia patens* Jacq (Rubiaceae)**



Figura 4. Bayetilla.

Taxonomía:

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Gentianales

Tribu: Hamelieae

Nombres comunes: Hierba coral, tochomite, coralillo, firebush, scarlet Bush.

a) Distribución geográfica

Planta silvestre nativa de las selvas tropicales del continente americano, habita en climas cálido y semicálido entre los 8 y los 1,100 msnm. En México se ha registrado en Campeche, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán.

b) Identificación y descripción

Hierba o arbusto de 50 cm hasta 3 m de altura, con los tallos frondosos. Los agrupamientos de las flores crecen en la parte terminal de la planta, con la corola roja en forma de trompeta y vistosas. Los frutos son cápsulas pequeñas y las semillas son de color café-rojizo.

c) Usos

Es utilizada en la medicina tradicional para tratar mordeduras de víbora, picaduras de abeja, alacranes, arañas, ciempiés y hormigas, en moretones, para aliviar la disentería, el dolor de estómago, la tosferina, granos o abscesos vaginales, fatiga y debilidad del corazón, males nerviosos, cólicos, dolor de cabeza e inflamación. Se le atribuyen propiedades analgésicas y sedantes (Trejo-Torres, 2009 y CONABIO, 2009).

d) Estudios fitoquímicos y pruebas biológicas

Pérez *et al.*, en 1996 experimentaron la actividad antidiarreica del extracto metanólico de *H. patens* comparado con aceite de castor y sulfato de magnesio (MgSO₄), además se evaluó su efecto en la defecación normal y el tiempo de tránsito en el intestino delgado. El extracto fue adicionado 30 y 60 min antes de adicionar el agente catártico, se utilizó difenoxilato como control positivo. Los resultados mostraron que la mejor actividad antidiarreica fue al administrar 100 mg/Kg de extracto con un 61.1% de inhibición

mientras que para el control positivo fue de 83.3% esto en un promedio de 3 horas, ambos mostraron diferencia significativa comparado con el control (sin extracto o difenoxilato), observándose además una tendencia dosis-respuesta.

Soto-Sobenis *et al.*, en 2001 realizaron un análisis cromatográfico mediante cromatografía en capa fina y el uso del revelador Dragendorff para evaluar la presencia de alcaloides en especies de la familia Rubiaceae incluyendo a *H. patens*, la cual dio positivo para alcaloides del tipo indol

Sosa *et al.*, en 2002 estudiaron la actividad antiinflamatoria de extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de plantas usadas en América Central para tratar problemas en la piel, el estudio del potencial antiinflamatorio fue realizado en ratones. Las hojas de *H. patens* tuvieron la mejor actividad (inhibición de edema). El extracto clorofórmico redujo el edema en un 81%, el metanólico en un 54% y el hexánico en un 48%. La IC₅₀ para el extracto clorofórmico fue de 255 µg/cm², para el metanólico fue de 779 µg/cm² y para el extracto metanólico fue >1000 µg/cm². Estos resultados fueron comparados con indometacina como control.

Camporese *et al.*, en 2003 probaron la actividad antibacterial de plantas medicinales de Belice obteniendo extractos hexánico, clorofórmico y metanólico. Los extractos hexánico y metanólico de hojas de *H. patens* tuvieron actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pero no sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Ambos extractos exhibieron una CMI 2.5 µmg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 solo el extracto metanólico presentó actividad con una CMI de 2.5 mg/mL.

Ramos *et al.*, en 2003 analizaron la anti-mutagenicidad de plantas medicinales de Cuba vía actividad antioxidante. La actividad antioxidante de *H. patens* fue medida empleando los métodos de reducción de DPPH, peroxidación lipídica e inhibición del radical OH. Dando resultados positivos para el método de DPPH (IC₅₀ = 116 µg/mL) pero con los siguientes ensayos no se reportó actividad alguna.

Gómez-Veloz *et al.*, en 2003 examinaron el efecto de *H. patens* sobre la cicatrización. Se utilizó una doble incisión en ratones y se demostró que la aplicación del extracto etanólico de *H. patens* al 5 y 10% (empleando jalea de petróleo como base) incrementaba la resistencia de la cicatrización en las heridas a los 12 días posteriores, con 17.13 y 17.22 Newton (N) respectivamente, ambos mostraron diferencia significativa comparada con el control 15.23 y 15.00 N.

Reyes-Chipa *et al.*, en 2004 identificaron la presencia de alcaloides mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas de *H. patens* colectada de cinco regiones diferentes de México en extractos metanólicos de la planta. Se detectaron los alcaloides oxoindólicos: isopteropodina, rumberina, palmirina, maruquina y el alcaloide A. En todas las muestras la isopteropodina, seguidas del alcaloide A fueron los más abundantes.

Ríos *et al.*, en 2006 determinaron el contenido de compuestos químicos de hojas de *H. patens* mediante una extracción con acetona, el extracto se fraccionó mediante una cromatografía de columna abierta y cada fracción fue purificada mediante sucesivos procesos cromatográficos para posteriormente analizarlos por espectroscopia de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C y por espectrometría de masas (MS). Se identificaron 10 compuestos: 24-metilenecicloartan-3 β -ol, 24-metilcicloart-24-en-3 β -ol, 2*E*-3,7,11,15,19-pentametil-2-eicosaen-1-ol, estigmasterol, β -sitosterol, ácido ursólico, aricina, aricina oxindol, ácido rotúndico y catequina.

Suárez *et al.*, en 2008 examinaron la actividad leishmanicida de alcaloides de *H. patens*. Se usó el extracto metanólico el cual fue fraccionado por cromatografía en columna abierta y elucidado por IR, RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas. Los compuestos identificados fueron isopteropodina, palmirina, rumberina, mitrajavina, kaempferol-3-*O*-rutinosido y epicatequina. Se probó el potencial de isopteropodina, palmirina, rumberina y mitrajavina para inhibir a *Leishmania mexicana*. La palmirina y rumberina mostraron la mayor actividad, con una IC_{50} de 56 y 61 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Mena *et al.*, en 2009 estudiaron nueve plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya, incluyendo a *H. patens*. probaron extractos metanólicos de hojas, tallo y raíz frente a 4 líneas celulares: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de laringe (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix (HeLa) y líneas celulares de carcinoma cervical (SiHa) y una línea celular normal de riñón canino (MDCK), encontrando que el extracto de raíz de *H. patens* mostró actividad citotóxica frente a células HeLa (13 $\mu\text{g/mL}$) y células SiHa (22 $\mu\text{g/mL}$), estos resultados fueron correlacionando con el uso de *H. patens* en la medicina tradicional para padecimientos ginecológicos.

Khandelwal *et al.*, en 2012 probaron que el extracto etanólico de hojas de *H. patens* a una concentración de 50 mg/mL provoca la parálisis y posterior muerte en *Pheritima posthuma* (lombriz de tierra), así como un efecto antifúngico sobre *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *Penicillium* sp a una concentración de 1000 ppm.

Ramírez-Aristizabal *et al.*, en 2013 evaluaron la actividad ictiotóxica y citotóxica de extractos de plantas de la flora colombiana. Se probaron los extractos butanólico y acuoso de *H. patens* resultando que el extracto acuoso presentó actividad ictiotóxica, y no tuvo efectos citotóxicos sobre las células Vero.

Taylor *et al.*, en 2013 realizaron un screening de 308 extractos pertenecientes a 12 especies de plantas usadas en la medicina tradicional venezolana frente a 6 líneas tumorales, donde el extracto de flores de *Hamelia patens* mostró actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer de próstata PC3 (IC_{50} = 104 $\mu\text{g/mL}$), cáncer de mama 4T1 (IC_{50} = 36 $\mu\text{g/mL}$) y de leucemia RAW267 (IC_{50} = 39 $\mu\text{g/mL}$).

Cornejo-Garrido *et al.*, en 2015 evaluaron la actividad antifúngica de extractos de acetona de 5 plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana, en la cual *H. patens* presentó un 100% de inhibición sobre

el crecimiento en placa de *Trichophyton mentagrophytes* a 100 µg/mL y de *Epidermophyton floccosum* a 50 µg/mL.

Alonso-Castro *et al.*, en 2015 evaluó la toxicidad aguda del extracto etanólico de hojas de *H. patens* obteniendo una DL₅₀ >5000 mg/Kg al ser administrada oralmente y una DL₅₀ de 2964 mg/Kg al ser administrada de manera intraperitoneal, la cual fue ser considerada como ligeramente toxica. Los autores afirman que no induce alteraciones hematológicas, y no afecta el metabolismo de carbohidratos. *H. patens* mostro un efecto antinociceptivo (intensidad de dolor) a 100 y 200 mg/Kg con una actividad similar al naproxeno (100 mg/Kg). Considerándolo como una buena fuente de agentes antinociceptivos.

Jiménez-Suárez *et. al.*, en 2016 evaluaron 4 extractos de hojas de *H. patens* sobre su efecto anti-inflamatorio, antioxidante y antidiabético y validar así su uso en la medicina tradicional mexicana. Al administrar oralmente 500 mg/kg de extracto hexánico, este disminuyo de manera significativa el edema en oreja de ratón, inducido por carragenina después de 6 horas, mientras que de manera tópica el extracto MeOH-EtOAc inhibió de manera significativa la actividad de la mieloperoxidasa (83.5%), por otro lado este mismo extracto mostró la mejor actividad antioxidante sobre el radical DPPH con una EC₅₀ de 18.6 µg/mL, y la mejor actividad sobre la inhibición de la enzima α-glucosidasa con una IC₅₀ de 26.07 µg/mL. Por último, aislaron el compuesto (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno.

III Perfil fitoquímico y potencial antioxidante de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq.

Hipótesis

Los disolventes y la secuencia de extracción que se usaran en las plantas de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq., influirán en el contenido y enriquecimiento de ciertos tipos de metabolitos secundarios de los extractos vegetales y favorecer así la capacidad antioxidante de alguno de ellos.

Objetivos

General

Establecer el perfil fitoquímico y el potencial antioxidante de los extractos de las plantas de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq.

Específicos

1. Identificar y cuantificar el contenido de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq.
2. Evaluar el potencial antioxidante de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq. Por el método de DPPH.

Metodología

Obtención de extractos

Se colecto *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld y *Hamelia patens* Jacq de los estados de Tlaxcala y Puebla respectivamente, los especímenes se secaron a temperatura ambiente a la sombra, posteriormente se separaron las partes aéreas en hojas y tallos, las cuales fueron molidas hasta un polvo fino. La extracción se llevó a cabo por maceración cada 24 h y se realizó una extracción metanólica, una extracción acuosa y una extracción consecutiva con hexano, diclorometano y metanol, todas ellas por triplicado (Figura 6). Los extractos fueron filtrados y se les retiró el disolvente en un rotavapor, posteriormente fueron secados empleando una bomba de alto vacío para la eliminación completa de dichos disolventes. Y por último cada extracto se liofilizó y se refrigeró a 4°C para su conservación y posterior uso.

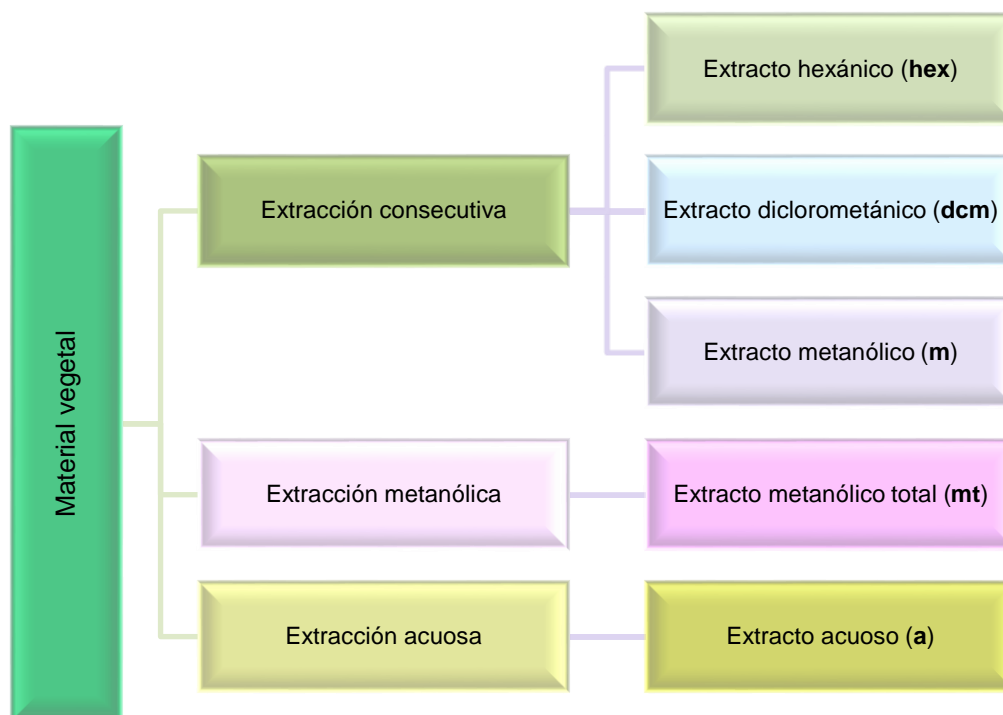


Figura 5. Diagrama de trabajo para la obtención de extractos.

Identificación y cuantificación de constituyentes mayoritarios

Para la identificación de metabolitos secundarios se realizó como primer paso un análisis cualitativo mediante pruebas colorimétricas en tubo (Anexo 1), que consistieron en reacciones químicas que producen alteraciones en la estructura molecular de un compuesto (modificación de un grupo funcional, apertura de un sistema anular, formación de un complejo de coordinación entre otras) dando como resultado la formación ya sea de precipitados, cambios en la coloración o el desprendimiento de un gas, esto mediante el uso de reactivos específicos. El segundo paso fue el análisis cuantitativo el cual consistió en el uso de curvas de calibración de estándares representativos de los metabolitos secundarios presentes, como: polifenoles (ácido tánico), fenoles totales (ácido gálico), flavonoides (quercetina), alcaloides (gramina) y esteroides (colesterol), además de la cuantificación de azúcares reductores (glucosa).

Se realizó además un análisis de los constituyentes de cada extracto por cromatografía en capa fina empleando dos sistemas de elución, el primero fue hexano/acetato de etilo (7:3) para los compuestos de baja polaridad y el segundo sistema fue diclorometano/metanol/ácido acético (6:4:0.2) para los compuestos polares.

a) Cuantificación de polifenoles totales

Se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta por García *et. al.*, con algunas modificaciones. Este método consistió en colocar 250 μL de una solución de Folin-Ciocalteu 1:9 (v/v) y 50 μL de extracto (5 mg/mL), posteriormente se adicionaron 500 μL de agua destilada y se dejó reposar por 1 min a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 750 μL de Na_2CO_3 al 20% y se llevó a incubación por 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se leen las muestras a 760 nm. Se realizó una curva

de calibración empleando diluciones del estándar ácido tánico y los resultados se reportaron como mg Equivalentes de ácido tánico por gramo de extracto de planta.

b) Cuantificación de fenoles totales

Este método consistió en colocar 50 μ L de extracto (5mg/mL) y 500 μ L de la solución A (Na_2CO_3 , CuSO_4 y tartrato de sodio y potasio), seguido de la adición de 100 μ L de NaOH (0.5N). Se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 50 μ L de Folin-Ciocalteu (1:1, v/v) y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron leídas a 750 nm. Ácido gálico fue utilizado como estándar. Los resultados fueron expresados como mg Equivalentes de ácido gálico por g de extracto (Sampietro *et. al.*, 2009).

c) Cuantificación de flavonoides

En un Eppendorf se colocaron 50 μ L de extracto (5mg/mL) a los cuales se le adicionaron 1.5 mL de EtOH absoluto. En seguida se agregaron 0.1 mL de AlCl_3 (10%) y 0.1 mL de CH_3COOK (1M). Finalmente se adicionaron 2.8 mL de agua destilada y se llevaron a incubación por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron leídas a 415 nm. Se empleó quercetina como estándar para realizar una curva de calibración y los resultados fueron expresados como mg Equivalentes de quercetina por gramo de extracto (Sampietro *et. al.*, 2009).

d) Cuantificación de alcaloides

Se evaluaron de acuerdo a la metodología propuesta por Shamsa en 2008, con ligeras modificaciones. La preparación de los extractos consistió en pesar 10 mg de cada extracto a los cuales se le adicionaron 2 mL de HCl (2N), posteriormente los extractos fueron filtrados. Se tomó 1 mL de extracto el cual fue colocado en un embudo de separación con 6 mL de cloroformo (3 lavados de 2 mL), y se extrajo la fase clorofórmica la cual se ajustó a un pH neutro con una solución de NaOH 0.1N. Por último, esta solución se transfiere a un embudo de separación, a la cual se le adicionaron 5 mL de verde de bromocresol y 5 mL de buffer de fosfato (pH 4.7), esta mezcla se agita y se adicionaron 10 mL de cloroformo (3 lavados de 3.5 mL) y se colecto la fase clorofórmica. La absorbancia se leyó a 470 nm. Se empleó una curva de calibración de gramina y se reportó como mg Equivalentes por g de extracto.

e) Cuantificación de esteroides

Para la preparación de los extractos se pesaron 25 mg de extracto al cual se le adicionaron 5 mL de cloroformo/metanol (2:1), y se llevó a baño de agua a 50°C por 10 min. Después se filtraron los extractos. Al filtrado se le adicionó 0.5 mL de una solución saturada de CaCl_2 , se mezcló y se dejó reposar hasta la formación de 2 fases, posteriormente se removió la fase superior y a la fase inferior se duplico su volumen con cloroformo/metanol/agua (2:50:50) y se dejó reposar hasta la formación de 2 fases. Se retiró la fase superior y se conservó la parte inferior (contiene lípidos), la cual se empleó para la cuantificación de esteroides.

Para la cuantificación se tomaron 0.2 mL de extracto y se adicionaron 2 mL del reactivo de Liebermann-Burchard. Se llevó a baño de agua a 35°C durante 10 min. Finalmente, se leyó a 550 nm. Se realizó una curva de calibración de colesterol. Los resultados se reportaron como mg Equivalentes por g de extracto (Sampietro *et. al.*, 2009).

f) Cuantificación de azúcares reductores

Se empleó el método de DNS propuesto por Bello Gil en 2006, con algunas modificaciones, cual consistió en colocar en un Eppendorf 0.125 mL de extracto (5mg/mL) y 0.125 mL del reactivo DNS (96mM), posteriormente las muestras se llevaron a ebullición (85-100°C) durante 5 min, y seguido se colocaron en un baño de hielo por 5 min. Finalmente se adicionaron 1.25 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se empleó una curva de calibración de glucosa y los resultados se expresaron como mg Equivalentes por gramo de extracto.

Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo)

La actividad antioxidante fue evaluada empleando la metodología propuesta por Cevallos en 2003, con ligeras modificaciones. Se preparó una concentración inicial de 4000 ppm de extracto, de la cual se tomaron 50 µL y se colocaron en una placa de 96 pozos, por último, se adicionaron 150 µL de una solución de DPPH 133.33 µM. Se incubaron por 30 minutos a 37°C y 400 rpm. La absorbancia se leyó a 517 nm.

Para determinar el porcentaje de reducción de DPPH de los extractos, se obtuvo el promedio de las absorbancias de los extractos a los cuáles además se le resto el blanco de cada extracto, y se empleó la siguiente ecuación para obtener el porcentaje de reducción de DPPH. Por último, la actividad antioxidante se expresó como la concentración efectiva media (CE₅₀).

$$\% \text{ Reducción de DPPH} = \frac{(D - E)}{D} \times 100$$

Donde:

D: Absorbancia de DPPH

E: Absorbancia del extracto

Resultados

La planta *B. ternifolia* (Cav.) Schltdl. fue colectada en el estado de Tlaxcala en el municipio de Santa Anita Nopalucan y *H. patens* Jacq., fue colectada en el municipio de Xicotepec de Juárez en el estado de Puebla. Para la obtención de los extractos el proceso se realizó por triplicado cada 24 horas para la extracción consecutiva. En el caso de los extractos totales el proceso se llevó por cuadruplicado cada 24 horas, mientras que los extractos acuosos se extrajeron cada 24 horas con agua destilada por duplicado. Cabe resaltar que de aquí en adelante las plantas serán identificadas con las siguientes siglas: para *Bouvardia ternifolia* será **Tr** y para *Hamelia patens* será **B** y dependiendo de la parte de la planta empleadas será añadida una letra **H** para hojas o **T** para tallos, además por disolvente empleado para su extracción será añadido **hex** (hexano), **dcm** (diclorometano), **m** (metanol) y **a** (agua). Finalmente, para diferenciar los

extractos metanólicos consecutivos y totales solo se le agregara una letra **t** a los extractos totales. Ejemplo: extracto metanólico total de los tallos de *Bouvardia ternifolia* seria **TrTmt**.

En el proceso de extracción, la maceración y el uso de disolventes de alta polaridad sigue siendo uno de los métodos más empleados (Anokwuru *et al.*, 2011, Iloki-Assanga *et al.*, 2015 y Felhi *et al.*, 2017). En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos de las extracciones, donde los extractos acuosos presentaron los más altos rendimientos, seguido de los extractos metanólicos, esto es indicativo del alto contenido de metabolitos glucosilados en partes aéreas utilizadas de la plantas y es por ello su fácil solubilidad en agua y/o metanol. Los extractos de baja y media polaridad (hexánico y diclorometánico) mostraron bajos rendimientos. Esto nos confirma que tanto el disolvente de extracción, como la parte de planta empleados son importantes para la cantidad de metabolitos extraídos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Carrillo-López *et al.*, Abarca-Vargas *et al.*, y Zazouli *et al.*, en 2016 quienes al emplear diferentes partes de plantas y diferentes disolventes muestran que los extractos de baja polaridad como hexano y diclorometano presentan bajos rendimientos de extracción entre 0.35-1.3, por lo tanto, el rendimiento si dependerá de la parte de la planta empleada, donde se puede resaltar que los extractos de hojas presentan los más altos rendimientos comparado con los extractos de flores o raíz. En la Tabla 1 se observa que los extractos de las hojas mostraron mayores rendimientos que los tallos. **Los rendimientos a través de una extracción consecutiva con metanol varían entre un 5-10%, siendo el extracto de los tallos de *H. patens* el que presento el menor rendimiento, mientras que la extracción empleando solo metanol o agua mostraron los mayores rendimientos entre un 5-18%, sin embargo, Diem Do *et al.*, obtuvo resultados superiores al 25%, cabe mencionar que estos autores realizaron una extracción inicial con hexano y posteriormente con metanol y agua.**

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

Planta	Clave	Rendimiento (%)	Planta	Clave	Rendimiento (%)
Trompetilla	TrHhex	1.60	Bayetilla	BHhex	0.89
	TrHdcm	2.40		BHdcm	2.40
	TrHm	10.10		BHm	5.40
	TrHmt	14.70		BHmt	9.00
	TrHa	18.60		BHa	16.70
	TrThex	0.31		BThex	0.19
	TrTdcm	0.62		BTdcm	0.52
	TrTm	5.00		BTm	4.97
	TrTmt	5.80		BTmt	5.48
	TrTa	7.30		BTa	6.87

BH: bayetilla hojas, BT: Bayetilla tallos, TrH: trompetilla hojas, TrT: trompetilla tallos, hex: hexano, dcm: diclorometano, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Análisis fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos, como primer paso se realizó un análisis fitoquímico preliminar o cualitativo, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2. *B. ternifolia* (trompetilla), muestra la presencia de alcaloides (extractos acuosos y metanólicos), terpenos como glucósidos cardiotónicos y triterpenos, así como compuestos fenólicos del tipo flavonoide, estos resultados fueron comparados con lo reportado por Mendoza-Espinoza *et al.*, quienes emplean la planta completa de *B. ternifolia* y presentan resultados

semejantes a lo obtenido en este estudio, a excepción de su extracto metanólico que presentaba una abundante presencia de saponinas y cumarinas, algo que no se observó en nuestros resultados, además en ambos estudios se observó una escasa presencia de taninos, así como de alcaloides.

Los extractos de *H. patens* (bayetilla) revelaron abundante presencia de alcaloides, saponinas, triterpenos y flavonoides (Tabla 3), estos resultados son semejantes a lo reportado por algunos autores donde emplean los mismos disolventes y las partes aéreas de la planta (Singh *et. al.*, 2016 y Jafrabano *et. al.*, 2017). En ambas plantas se observó ausencia de cumarinas.

La máxima diversidad de metabolitos se observó en los extractos metanólicos para ambas plantas. Por lo que se puede concluir que hay similitud en cuanto a la naturaleza de la mayoría de metabolitos presentes en ambas partes aéreas, diferenciándose en la concentración de estos.

Tabla 2. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos de *B. ternifolia*.

Metabolito secundario		Trompetilla									
		hojas					tallos				
		hex	dcm	m	mt	a	hex	dcm	m	mt	a
Alcaloides	Alcaloides	-	-	++	+	++	-	-	++	++	++
Terpenos	Saponinas	+	-	+	+	+	+	-	-	±	-
	Glucósidos cianogénicos	-	-	+	±	-	-	±	-	-	-
	Glucósidos cardiotónicos	++	++	++++	++	++++	++	+	+	++	++
	Triterpenos	++	+	+	+	-	++	++	++	+	-
Compuestos fenólicos	Taninos	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	Flavonoides	±	±	+	++	++	+	++	++	++	-
	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abundante: +++++, Moderado: ++, Escaso: +, Dudoso: ±, Negativo: -, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Tabla 3. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos de *H. patens*.

Metabolito secundario		Bayetilla									
		hojas					tallos				
		hex	dcm	m	mt	a	hex	dcm	m	mt	a
Alcaloides	Alcaloides	-	++++	++++	++++	±	++	++	+	+	±
Terpenos	Saponinas	++	++++	++++	++++	+	±	++	+	+	-
	Glucósidos cianogénicos	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	Glucósidos cardiotónicos	+	±	+	+	++	-	-	-	±	±
	Triterpenos	++	++	++	++	+	++	++	-	-	-
Compuestos fenólicos	Taninos	-	-	+	+	+	±	±	+	+	+
	Flavonoides	±	++	++++	++++	±	±	-	-	±	-
	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abundante: +++++, Moderado: ++, Escaso: +, Dudoso: ±, Negativo: -, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Al realizar el perfil fitoquímico cualitativo observamos la presencia de los principales metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y fenoles, por lo que se realizó la cuantificación de este tipo de

compuestos empleando curvas de calibración con estándares comerciales representativos para cada metabolito.

En la Tabla 4 se observa que los extractos de baja polaridad de las hojas de *B. ternifolia* presentan un alto contenido de esteroides, mientras que los extractos de alta polaridad presentan contenidos similares de compuestos fenólicos y de esteroides, siendo los extractos acuosos los que muestran el mayor contenido de compuestos fenólicos, seguido de los extractos metanólicos. Para el caso de los extractos de tallos (Tabla 5) se observa un comportamiento similar a lo mostrado en las hojas sin embargo el contenido de compuestos fenólicos es menor a lo obtenido por las hojas. Mendoza-Espinoza en 2016 evaluaron la planta completa mostrando diferencias en cuanto al contenido de los siguientes metabolitos: 147 ± 4 mgE de ácido gálico por gramo de extracto para fenoles totales y 755 ± 64 mgE de quercetina por gramo de extracto para flavonoides, estos resultados son superiores a lo obtenido en la Tabla 4. En cuanto al contenido de alcaloides estos fueron menores a 1 mgE de gramina por gramo de extracto, en todos los casos. Finalmente, el mayor contenido de azúcares reductores se obtuvo en los extractos de tallos.

Tabla 4. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de hojas de *B. ternifolia*.

Metabolito secundario	mgE/g extracto				
	TrHhex	TrHdcm	TrHm	TrHmt	TrHa
Polifenoles totales (ácido tánico)	0.97 ± 0.04	15.58 ± 0.01	50.32 ± 0.01	38.59 ± 0.02	53.76 ± 0.01
Fenoles totales (ácido gálico)	7.32 ± 0.03	827.48 ± 0.03	71.32 ± 0.01	59.27 ± 0.01	80.74 ± 0.01
Flavonoides (quercetina)	8.10 ± 0.02	85.98 ± 0.01	14.92 ± 0.01	40.36 ± 0.02	0.92 ± 0.11
Alcaloides (gramina)	<1	< 1	<1	< 1	<1
Esteroides (colesterol)	476.77 ± 0.02	906.88 ± 0.01	76.06 ± 0.06	490.75 ± 0.01	7.96 ± 0.00
Azúcares reductores (glucosa)	50.35 ± 0.15	10.64 ± 0.00	208.53 ± 0.02	75.64 ± 0.02	289.65 ± 0.02

TrH: trompetilla hojas, TrT: trompetilla tallos, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Tabla 5. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de tallos de *B. ternifolia*.

Metabolito secundario	mgE/g extracto				
	TrThex	TrTdcm	TrTm	TrTmt	TrTa
Polifenoles totales (ácido tánico)	2.08 ± 0.02	67.90 ± 0.01	35.65 ± 0.01	27.03 ± 0.03	22.20 ± 0.04
Fenoles totales (ácido gálico)	7.53 ± 0.05	123.43 ± 0.01	59.19 ± 0.01	48.32 ± 0.01	48.91 ± 0.01
Flavonoides (quercetina)	8.10 ± 0.02	85.98 ± 0.01	1.66 ± 0.03	16.97 ± 0.01	0.51 ± 0.13
Alcaloides (gramina)	<1	< 1	< 1	< 1	< 1
Esteroides (colesterol)	381.43 ± 0.01	406.88 ± 0.00	28.39 ± 0.05	45.59 ± 0.00	9.03 ± 0.00
Azúcares reductores (glucosa)	26.06 ± 0.15	53.99 ± 0.09	286.44 ± 0.01	186.01 ± 0.01	430.67 ± 0.01

TrH: trompetilla hojas, TrT: trompetilla tallos, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Los resultados de la cuantificación de metabolitos secundarios de los extractos de *H. patens* se observan en la Tabla 6, los extractos de mayor polaridad de las hojas mostraron un alto contenido de compuesto de origen fenólico, siendo el extracto metanólico obtenido por extracción consecutiva el que presenta el mayor contenido de estos. Ruíz-Terán en 2008 evaluó el contenido de fenoles totales de extractos de hojas de *H. patens* mediante el empleo de extractos de polaridad creciente: hexano, acetona y metanol, de este último reportaron el contenido de fenoles totales con 125 mg/g aproximadamente, mientras que en este trabajo se obtuvieron 486.65 mg/g de extracto. Por otro lado, Sinhg en 2016 determino el contenido de fenoles totales de las hojas mediante el uso de los disolventes metanol y agua, obteniendo 113.33 mg/g y 82.5

mg/g, en ambos casos el contenido fue menor a lo reportado en este trabajo. Así mismo cuantificaron el contenido de flavonoides con 331.54 y 245.73 mg/g, estos resultados son superiores a lo obtenido. En cuanto a los extractos de baja polaridad, todos mostraron una mayor concentración de esteroides, mientras que el contenido de alcaloides fue menor a 1 mg/g extracto en ambas plantas. Estudios han reportado la presencia de compuestos alcaloides del tipo indólico para *H. patens*, los cuales han sido aislados a través de un extracto metanólico como lo reportado por Suarez *et. al.*, esto hace referencia a que, si influye el método de extracción, así como el método de cuantificación.

Tabla 6. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de hojas de *H. patens*.

Metabolito secundario	mgE/g extracto				
	BHhex	BHdcm	BHm	BHmt	BHa
Polifenoles totales (ácido tánico)	1.36 ± 0.07	23.17 ± 0.04	361 ± 0.02	353 ± 0.01	181 ± 0.02
Fenoles totales (ácido gálico)	8.10 ± 0.02	85.98 ± 0.01	486.65 ± 0.01	442.74 ± 0.01	25.65 ± 0.01
Flavonoides (quercetina)	8.10 ± 0.02	85.98 ± 0.01	44.09 ± 0.01	23.97 ± 0.01	3.25 ± 0.03
Alcaloides (gramina)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Esteroides (colesterol)	473.91 ± 0.01	1005.81 ± 0.01	38.78 ± 0.02	258.14 ± 0.01	9.39 ± 0.43
Azúcares reductores (glucosa)	23.25 ± 0.15	8.86 ± 0.00	379.48 ± 0.01	204.35 ± 0.01	255.65 ± 0.01

BH: bayetilla hojas, BT: Bayetilla tallos, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Tabla 7. Contenido de metabolitos secundarios de los extractos de tallos de *H. patens*.

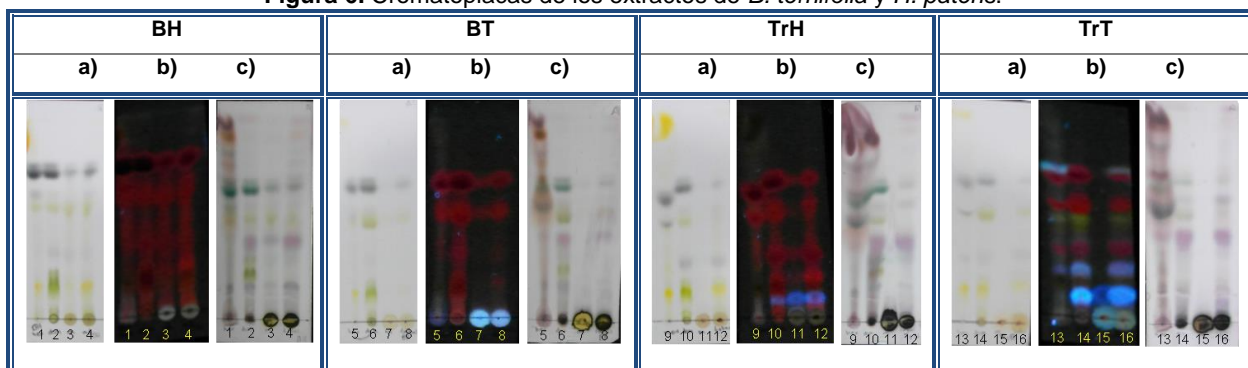
Metabolito secundario	mgE/g extracto				
	BThex	BTdcm	BTm	BTmt	BTa
Polifenoles totales (ácido tánico)	-	7.25 ± 0.01	126.38 ± 0.02	108.76 ± 0.01	18.51 ± 0.01
Fenoles totales (ácido gálico)	5.56 ± 0.06	16.35 ± 0.01	170.87 ± 0.004	128.16 ± 0.01	29.14 ± 0.02
Flavonoides (quercetina)	3.25 ± 0.03	8.10 ± 0.02	85.98 ± 0.01	1.63 ± 0.02	4.86 ± 0.03
Alcaloides (gramina)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Esteroides (colesterol)	402.48 ± 0.01	428.04 ± 0.002	11.60 ± 0.11	10.89 ± 0.17	-
Azúcares reductores (glucosa)	24.49 ± 0.13	107.96 ± 0.05	259.62 ± 0.01	231.69 ± 0.01	278.35 ± 0.01

BH: bayetilla hojas, BT: Bayetilla tallos, hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso, -: no detectado

Perfil cromatográfico cualitativo

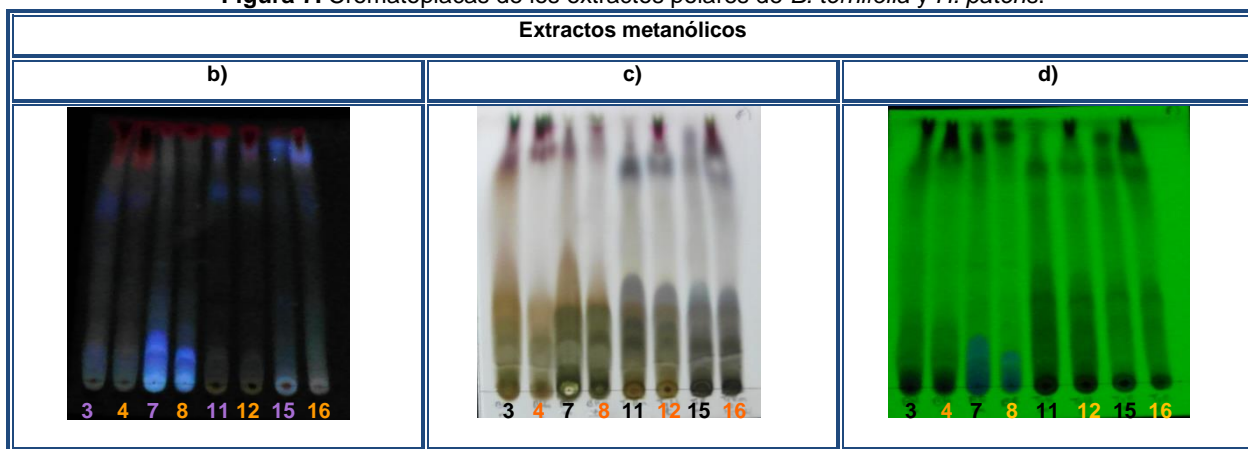
En la evaluación del perfil cromatográfico de los extractos inicialmente se realizaron una serie de ensayos para determinar la fase móvil idónea para visualizar los componentes de los extractos, encontrándose un sistema de elución [A] hexano/acetato de etilo (7:3), para los componentes de baja a mediana polaridad y para el caso de los metabolitos más polares se utilizó el sistema de elución [B], CH₂Cl₂/MeOH/ácido acético (6:4:0.2), las cromatoplasmas que se muestran a continuación muestran los componentes: (a) sin revelador, (b) luz ultravioleta 365 nm y (c) con una solución de H₂SO₄/EtOH 5% y posteriormente calentada y (d) luz ultravioleta 254 nm. Con estos sistemas de elución se observaron los diferentes metabolitos presentes en cada uno de los extractos. Los extractos hexánicos y diclorometánicos muestran similitud en algunos componentes diferenciándose en la presencia de componentes de mediana polaridad en los extractos diclorometánicos, también se pudo observar que los componentes de baja y mediana polaridad se encuentran presentes en los extractos totales y de manera escasa o nula en los extractos metanólicos (Figura 7). Por lo que se realizó una CCF con los extractos metanólicos empleando un sistema de elución de mayor polaridad [B], encontrándose una mayor diferencia en la concentración que en el número de sus componentes (Figura 8).

Figura 6. Cromatoplasmas de los extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.



Fase móvil: Hex/AcOEt (7:3), a) Sin revelador, b) Luz UV 365nM, c) H₂SO₄/EtOH 5%, 1: BHhex, 2: BHdcm, 3: BHm, 4: BHmt, 5: BThex, 6: BTdcm, 7: BTm, 8: BTmt, 9: TrHhex, 10: TrHdcm, 11: TrHm, 12: TrHmt, 13: TrThex, 14: TrTdcm, 15: TrTm, 16: TrTmt.

Figura 7. Cromatoplasmas de los extractos polares de *B. ternifolia* y *H. patens*.



Fase móvil: CH₂Cl₂/MeOH/ácido acético (6:4:0.2), b) Luz UV 365nM, c) H₂SO₄/EtOH 5%, 3: BHm, 4: BHmt, 7: BTm, 8: BTmt, 11: TrHm, 12: TrHmt, 15: TrTm, 16: TrTmt.

Dentro de los compuestos identificados en las plantas de *B. ternifolia* y *H. patens* los compuestos fenólicos fueron los que se presentaron en mayor concentración para los extractos de alta polaridad, dicho metabolitos son importantes debido a que poseen una diversidad de propiedades biológicas como son antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas, anticancerígenas y antiinflamatorias entre otras. Por lo que se en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de los extractos mediante el método de DPPH, y se reportó la concentración efectiva media de cada uno de los extractos, lo cual se presenta en la Tabla 8, en la cual además se muestra los valores de algunos estándares, que son considerados antioxidantes.

Los extractos de *B. ternifolia* presentaron actividad antioxidante a altas concentraciones (4000 µg/mL), y su EC₅₀ se encontró entre 4000 y 600 µg/mL. Estos resultados no pudieron ser comparados con los estándares comerciales que mostraron valores menores a 40 µg/mL.

En el caso de los extractos de *H. patens* los extractos metanólicos de hojas mostraron la mejor EC₅₀ (51.7 y 50.7 µg/mL para BHm y BHmt respectivamente), seguido del extracto acuoso con una EC₅₀ de 118.13 µg/mL, estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Singh en 2016, donde los extractos metanólico y acuoso de hojas tuvieron un valor de 27.28 y 74.86 µg/mL. Jiménez-Suarez en ese mismo año evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH de extractos de hojas de *H. patens* donde mencionan que el extracto metanol-acetato de etilo (MeOH-EtOAc) tenía la mejor EC₅₀ con 18.6 µg/mL

además de que al evaluar el extracto hexánico este no mostro actividad, mientras que en nuestros resultados obtuvimos una EC₅₀ de 1534.58 µg/mL. Todos estos resultados fueron comparados con compuestos a los que se les ha atribuido una actividad antioxidante importante, tal es el caso del BHT (butilhidroxitolueno) el cual se empleaba para la conservación de alimentos. Al comparar la EC₅₀ de este último aditivo observamos que su valor es mayor al obtenido por los extractos de hojas metanólicos, así como el acuoso, sin embargo, al comparar estos mismos extractos con compuestos fenólicos puros su valor es mayor al obtenido por estos del cual resaltamos a la quercetina con una EC₅₀ de 13.6 µg/mL, además se comparó con el ácido ascórbico el cual no es un compuesto fenólico, pero sin embargo se ha reportado su actividad antioxidante (Amorati, 2018).

Tabla 8. EC₅₀ de los extractos de *H. patens* por el método de DPPH.

		IC ₅₀ (µg/mL)				
		hex	dcm	m	Mt	a
Trompetilla	hojas	2152.32 ± 2.03	907.93 ± 1.76	782.03 ± 0.95	621.95 ± 3.19	671.41 ± 3.47
	tallos	>4000	406.15 ± 0.12	1380.70 ± 1.29	1285.89 ± 3.39	2017.76 ± 1.08
Bayetilla	hojas	1534.58 ± 0.81	815.76 ± 2.10	51.7 ± 1.1	50.7 ± 1.3	118.13 ± 1.50
	tallos	>4000	1767.62 ± 2.11	244.74 ± 1.66	254.52 ± 1.61	3883 ± 1.51
Catequina		33.01 ± 0.77				
Epicatequina		23.39 ± 0.34				
Ácido ascórbico		38.28 ± 1.96				
Quercetina		13.60 ± 0.55				
Ácido clorogénico		35.83 ± 0.67				
Trolox		25.65 ± 1.63				
BHT		201.57 ± 1.49				

hex: hexánico, dcm: diclorometánico, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Los metabolitos secundarios son producidos por las plantas como mecanismo de defensa contra diversos depredadores o factores ambientales, lo que los ha hecho una fuente importante de compuestos con diversas actividades biológicas. Una de ellas es su potencial antioxidante, ya que es bien sabido que en muchas enfermedades influye el estrés oxidativo, además de que compuestos con potencial antioxidante pueden ser empleados como conservadores de alimentos, tal como el BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno), BHQ (Butilhidroxiquinona), entre otros, quienes tienen la desventaja de producir efectos secundarios sobre la población que los consume. Tal es el caso de Maestro en 1993, quien reporto que el BHT podía ocasionar daños en pulmones y mucosa intestinal, por lo que fue considerado como no seguro. Es por esto la importancia de estos compuestos de origen natural como antioxidantes. Minatel *et al.*, mencionan que son diversos los estudios que han encontrado una relación positiva entre el contenido de compuesto fenólicos y la actividad antioxidante la cual puede ser debida a la posición y número de grupos hidroxilo y lo cual se conoce como relación estructura-actividad. Por lo que los extractos metanólicos y acuoso de hojas de *H. patens* pueden ser considerados con potenciales antioxidantes.

Conclusión

Los extractos metanólicos presentaron el más alto contenido de compuestos de origen fenólico, principalmente las hojas de *H. patens*. Los extractos de baja polaridad como hexano y diclorometano presentan un mayor contenido de compuestos de origen terpénico.

Al hacer la separación de las partes aéreas (hojas y tallos) de ambas plantas, se obtiene un mejor panorama sobre el posible efecto de los extractos y su actividad antioxidante. Además de que el o los posibles metabolitos con potencial antioxidante podrían estar presentes también en el extracto acuoso. Por lo que es necesario hacer un análisis cromatográfico más detallado sobre los constituyentes presentes en los extractos metanólicos de *H. patens*.

IV Potencial antidiabético de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltidl y *Hamelia patens* Jacq

La salud de los mexicanos se ha ido deteriorando a lo largo del tiempo debido al aumento en las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), ocasionadas por los cambios en el estilo de vida. La Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que en México el 77% de las muertes fueron debido a estas enfermedades. Dentro de las enfermedades de mayor preocupación en México se encuentran la obesidad y el sobrepeso que son consideradas la nueva gran epidemia con un impacto en la salud pública, esto es debido a las enfermedades que favorece, como lo es la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer entre otras.

Reportes nacionales muestran que las enfermedades de mayor prevalencia nacional son la hipertensión arterial, diabetes mellitus, la hipercolesterolemia y el Síndrome Metabólico. De Estas enfermedades la diabetes tipo 2 se ha convertido en una de las principales causas de incapacidad prematura, ceguera, insuficiencia renal la cual va en aumento con la edad haciéndola la primera causa de muerte en las mujeres y segunda en hombres, en nuestro país.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, que sucede cuando el páncreas no produce suficiente cantidad de la hormona insulina o el organismo no la utiliza eficazmente, resultando en una deficiencia o ineficiencia en la secreción de insulina, alterando así el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Esta es ocasionada principalmente por predisposición hereditaria, factores ambientales y el estilo de vida. Esta se caracteriza por una hiperglucemia crónica (niveles elevados de glucosa en sangre por tiempos prolongados). Es así que la hiperglicemia postprandial se debe a un deterioro en la supresión de la producción de glucosa hepática por insulina y a una disminución de la captación de glucosa mediada por insulina en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. En esta enfermedad es importante entender la digestión de carbohidratos la cual consiste en descomponer los alimentos hasta unidades más sencillas que podamos absorber para que puedan incorporarse a nuestro organismo y generar energía o formar nuevos compuestos (OMS, 2017, Islas Andrade, 2013 y Diabetes, 2016).

La digestión de los carbohidratos comienza en la boca, donde se encuentra la enzima ptialina o α -amilasa esta se encarga de hidrolizar el almidón convirtiéndolo en oligómeros más cortos, de los cuales solo el 5% de los almidones aquí son hidrolizados. Posteriormente en el duodeno se reanuda la digestión de los carbohidratos mediante la enzima α -amilasa pancreática la que descompone hasta unidades de disacáridos, que se encuentran en las vellosidades intestinales y son convertidos en monosacáridos por la enzima α -glucosidasa para después entrar en el torrente sanguíneo a través de un sistema de transporte específico. Los productos finales de la digestión en el tubo digestivo son glucosa (80%), fructosa, galactosa y pentosas (Tundis *et. al.*, 2010).

El paso a través de las células intestinales de glucosa, fructosa y galactosa se realiza por medio de un mecanismo de transporte activo-bomba de Na^+/K^+ el cual requiere energía mientras que las pentosas lo hacen por un mecanismo de difusión, es así que en el torrente circulatorio el azúcar que existe es casi exclusivamente glucosa.

Para el ingreso de la glucosa en el interior celular debe atravesar la membrana celular por lo que se han descrito 2 sistemas de transporte de glucosa:

- a) Mecanismo de difusión facilitada o transportadores de glucosa, GLUT (glucose transporter): Son proteínas que se encargan del ingreso de los monosacáridos en todas las células del organismo, de las cuales se han identificado 13 y se han enumerado desde GLUT1 hasta GLUT13.
- b) Mecanismo de cotransporte activo de sodio o transportadores de sodio y glucosa (SGLT, sodium-glucose-transporters): son proteínas que efectúan un transporte acoplado mediante el cual ingresan conjuntamente en la célula, de estas se han identificado 3 transportadores SGLT1, SGLT2 y SGLT3 y son encontrados fundamentalmente en las células intestinales y en el riñón.

La insulina juega un papel importante en el transporte de glucosa ya que la glucosa que penetra en las células en ausencia de insulina es muy baja, por lo que la utilización celular de la glucosa depende directamente de la secreción pancreática de insulina. La función de la insulina entonces es controlar la velocidad a la que la glucosa ingresa en las células mediante mecanismos complejos.

Cuando la insulina se une a su receptor de membrana se genera un desplazamiento de vesículas cargadas de GLUT hacia la membrana citoplasmática, aumentando así el número de los mismos en la superficie celular y favoreciendo por tanto la captación de glucosa en el torrente circulatorio. Pero cuando los niveles de insulina decaen, los GLUT son eliminados de la membrana plasmática por endocitosis formando pequeñas vesículas que pasan al interior de las células. Y una vez que la glucosa está dentro de la célula esta puede seguir 2 caminos, el primero es utilizarse para proporcionar energía a la célula (oxidación vía glucólisis u oxidación vía de las pentosas) o almacenarse en forma de glucógeno.

La Federación Internacional de Diabetes (FID), reporta que en 2017 había 327 millones de personas de 20 a 60 años con diabetes en todo el mundo, y para el 2045 este número aumentara a 438 millones de personas con dicha enfermedad, México ocupa el séptimo lugar (FID, 2017).

Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) también conocida como dependiente de insulina, juvenil o de inicio en la infancia, es una enfermedad crónica que se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β presentes en los islotes de Langerhans del páncreas (Baraja, 2008, Cervantes-Villagrana 2013, FID, 2017) resultando en una producción deficiente o nula de insulina, predisponiendo a los individuos a una cetoacidosis diabética (niveles altos de cetonas acumuladas en sangre que pueden producir un coma diabético). Esta enfermedad se presenta a cualquier edad, pero principalmente en niños o adultos jóvenes. Entre las causas que contribuyen a la destrucción de las células β se encuentran los virus, agentes

químicos, autoinmunidad cruzada o una predisposición genética. Dentro de los genes involucrados se encuentran los genes del antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6 y que son asociados con polimorfismos genéticos en los sitios de unión del péptido. Por otro lado el primer anticuerpo dirigido hacia las células β es dirigido a la insulina o GAD65 (descarboxilasa del ácido glutámico), sin embargo todavía no es claro este proceso. Los tratamientos para pacientes con DM1 son inyecciones diarias de insulina, sin embargo trasplantes de islotes han sido eficaces en el tratamiento de esta enfermedad (Cervantes-Villagrana, 2013 y Katsarou, 2017).

Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 o no dependiente de la insulina es el tipo más común y representa alrededor del 90% de los casos, se caracteriza por una producción inadecuada de insulina o a la utilización ineficaz de esta por el organismo. Esta se presenta principalmente en adultos mayores, sin embargo, se ha reportado casos en niños, adolescentes y jóvenes adultos. Entre las causas de esta enfermedad influyen diversos factores como el sobrepeso, la obesidad, la hipertensión arterial física, tabaquismo y una dieta rica en carbohidratos.

Como resultado de esta enfermedad hay un incremento en la concentración de los niveles de glucosa en plasma, lo que estimula la liberación de insulina, lo que lleva a una hiperglucemia y una hiperinsulinemia, alterando también la concentración de ácidos grasos libres, la cual es un punto clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa.

Diabetes mellitus y estrés oxidativo

La diabetes mellitus usualmente ha sido relacionada con un incremento en la producción de radicales libres, sin embargo hay que mencionar que estos se generan de manera fisiológica en las reacciones orgánicas de oxidación-reducción. Dentro de los radicales libre tenemos a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), además del ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}), las cuales además están involucradas en la señalización de insulina, por un lado, para ejercer su función fisiológica como mecanismo de defensa y por el otro en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Maritim, 2003 y Calderón Salinas, 2013).

El estrés oxidativo es definido como cualquier alteración en el equilibrio de moléculas antioxidantes y prooxidantes, debido a diferentes factores como el envejecimiento, inflamación, la toxicidad y acción de algunos medicamentos entre otros. Dicho estrés origina que células sanas pierdan su estructura y función. Por lo que se ha reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de DM2, ya que hay una variación en los niveles de enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH) (Ulla, 2016).

Altos niveles de radicales libres causan daño a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Dentro de las principales fuentes de radicales libres se ha reportado la oxidación de la glucosa, ya que esta es capaz de auto-oxidarse en condiciones de mayor concentración de glucosa en la célula, lo cual lleva a un incremento en la glucólisis y sus intermediarios, sin embargo un exceso de esta también puede generar compuestos

pro-oxidantes. El aumento en la glucólisis resulta en la formación de piruvato aumentando así la producción de acetil-CoA que acelera la producción de cofactores reducidos y aumenta la cadena respiratoria llevando a la formación de O_2^* , así mismo el gasto excesivo de cofactores reducidos $NADH + H^+$ y $NADPH + H^+$ y el aumento de la actividad de la cadena de electrones generan daño oxidativo. Otros de los mecanismos implicados en el estrés oxidativo son la glucación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes (Calderón Salinas, 2013, Storino, 2014).

Una manera de medir el estrés oxidativo ha sido a través de la determinación de los productos de oxidación de las proteínas, lípidos, vitaminas y enzimas (Ulla, 2016).

Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2

En pacientes con DM2 se siguen diversas estrategias en el manejo de la enfermedad, que van desde cambios en el estilo de vida, la práctica de ejercicio, modificación en la dieta y la pérdida de peso. Sin embargo, a pesar de que estos cambios son efectivos en control de la enfermedad, muchas veces son necesarios los medicamentos orales (Del Olmo González, 2008, Reyes Sanamé, 2016, Upadhyay, 2018). Los cuales se han clasificado de acuerdo al mecanismo de acción por el cual actúan.

- 1) Fármacos que aumentan la secreción de insulina en el páncreas independiente del nivel de glucosa.
 - a) Sulfonilureas las cuales presentan una rápida absorción y su acción inicia 30 minutos después de su administración
 - Primera generación: clorpropamida, glibenclamida, glicazida y glimepiride.
 - Segunda generación: glibenclamida, glipizida.
 - Tercera generación: glimepirida glicazida.
 - b) Meglitinidas actúan principalmente sobre hiperglicemia postprandial. Su mecanismo de acción es similar al de las sulfonilureas, pero estos reducen el riesgo de hipoglicemia.
 - Repaglinida, nateglinida, y mitiglinida.
- 2) Fármacos que disminuyen la insulino-resistencia.
 - a) Biguanidas: metformina esta disminuye la producción de glucosa hepática y mejora la sensibilidad a la insulina.
 - b) Tiazolidinedionas: pioglitazona y rosiglitazona actúan a través del músculo esquelético y el tejido adiposo activando el factor de transcripción nuclear y el receptor gama activado por el proliferador de peroxisimas (PPAR).
- 3) Fármacos que incrementan la secreción de insulina dependiente del nivel de glucosa suprimiendo la secreción de glucagón.
 - a) Agonistas del receptor GLP-1 (Peptido-1 similar al glucagón) y GIP (Péptido inhibitorio dependiente de glucosa), en este grupo se encuentran la exenatida y liraglutida, estos se unen a los receptores GLP-1 de las células β pancreáticas y estimulan la secreción de insulina.
 - b) Inhibidores de la DPP4 (dipeptidil peptidasa-4) como sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina y linagliptina, los cuales al inhibir la enzima DPP-4, aumentan los niveles posprandiales de GLP-1 y

GIP resultando en la disminución de la resistencia a la insulina así como de los triglicéridos posprandiales.

- 4) Insulinas
 - a) Insulina NPH, es de acción intermedia.
 - b) Análogos de insulina de acción rápida: aspart, lispro y glulisina, se absorben con mayor facilidad regulando los picos de insulina de 2 a 4 horas.
 - c) Análogos de insulina de acción lenta: glargina y detemir, comienza a actuar a la 1-1.5 horas y su liberación es gradual y constante durante 24 horas.
 - d) Insulina inhalada es más rápida que los análogos de insulina y su duración es de 2-3 horas.
- 5) Fármacos que disminuyen la absorción de glucosa en el tracto digestivo.
 - a) Inhibidores de α -glucosidasa: acarbosa, miglitol y voglibosa, estos inhiben de manera competitiva y reversible a las α -glucosidasas, retrasando la absorción de los hidratos de carbono y disminuyendo la glucemia posprandial.

Desde hace algunos años se han encaminado estudios para encontrar potentes inhibidores de origen natural contra las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, ya que estos contienen un sin número de compuestos con importantes actividades biológicas.

García *et. al.*, en 2009 mencionan que hay más de 400 tratamientos naturales con plantas para tratar la diabetes *mellitus* de los cuales solo a un pequeño número de estos se les ha realizado una evaluación científica para validar su eficacia y a pesar de esto siguen siendo uno de los principales tratamientos, pero al igual que las plantas son empleadas como tratamiento para la diabetes también han sido empleadas como tratamiento para los regular los altos niveles de triglicéridos (hiperlipidemia). Es así que una estrategia para tratar estos padecimientos es mediante la inhibición de enzimas digestivas de carbohidratos (α -amilasa y α -glucosidasa) y la inhibición, digestión y absorción de grasas (lipasa), mediante el uso de plantas medicinales.

α -amilasa: Es una enzima hidrolasa que tiene la función de digerir el almidón para formar azúcares simples y es más rápida que la β -amilasa. La actividad de la enzima α -amilasa salival desaparece cuando el pH desciende a un pH de 4. Mientras que la α -amilasa a nivel intestinal se encarga de romper los enlaces α -1-4.

α -glucosidasa: Se encarga de inhibir la hidrólisis de los carbohidratos en el tubo digestivo y así retrasar su digestión.

Existen 3 tipos de inhibidores de esta enzima basados en su estructura química generalmente hidroxilados:

- Compuestos heterocíclicos N-sustituidos poli-hidroxilados
- ciclo-alquenos poli-hidroxilados
- Oligómeros de pseudoazúcares

Ante niveles elevados de glicemia el cuerpo desencadena mecanismos de defensa como la proteólisis en el músculo, la oxidación de ácidos grasos y la formación de cuerpos cetónicos generando cambios en los

indicadores bioquímicos que sugieren una situación de estrés oxidativo, además también se ha reportado que hay una disminución en las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, hay un incremento en la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación así como un daño en el material genético. Por lo que se ha postulado que el posible mecanismo por el cual la hiperglucemia produce estrés oxidativo es a través de la vía de los polioles y el aumento de la autooxidación de la glucosa, causando de manera conjunta un aumento de radicales libres que a su vez estos desencadenan daño a las proteínas por la fragmentación y oxidación de lípidos.

Hipótesis

Los extractos de las plantas de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltl y *Hamelia patens* Jacq., además de inhibir la enzima α -glucosidasa, tienen la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en un modelo murino.

Objetivos

General

Evaluar el potencial inhibitorio de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltl y *Hamelia patens* Jacq., sobre la enzima α -glucosidasa, así como su efecto sobre los niveles de glucosa en un modelo *in vivo*.

Específicos

1. Evaluar la actividad inhibitoria de los extractos *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltl y *Hamelia patens* Jacq. sobre la enzima α -glucosidasa.
2. Evaluar el potencial antihiper glucemiante de los extractos que presentaron inhibición sobre la enzima α -glucosidasa en un modelo murino.

Metodología

Ensayo de inhibición de α -glucosidasa

Se empleó la metodología propuesta por Salehi que consistió en una mezcla de 480 μ L de buffer de fosfato (0.1 M, pH 6.9), 40 μ L del extracto y 80 μ L α -glucosidasa (0.5 U/ml), esta mezcla fue incubada a 37°C por 15 min en una placa de 96 pozos. La reacción enzimática fue iniciada adicionando 80 μ L de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, (5 mM en buffer de fosfato 0.1M, pH 6.9) y nuevamente se incubo por 15 min a 37°C. La reacción fue terminada agregando 320 μ L de Na₂CO₃ (0.2 M). La absorbancia fue determinada a 405 nm. LA actividad inhibitoria de la α -glucosidasa fue expresada como IC₅₀.

Animales experimentales

Ratones ICR machos (27 \pm 2g) y hembras (20 \pm 2g) y ratas Wistar (180 \pm 30g) fueron obtenidas de la Facultad de Estudios superiores Acatlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estos fueron mantenidos en condiciones estándar y a los cuales se les suministro alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron autorizados por el Comité de Ética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, cumpliéndose con los principios nacionales e internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Inducción de diabetes por estreptozotocina en ratas Wistar

Se emplearon 110 ratas Wistar macho las cuales se mantuvieron a una temperatura de $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y en ciclos de luz/oscuridad 12:12 h con acceso libre a alimento y agua. Para la inducción de hiperglucemia, todos los grupos de ratas (excepto control sano) fueron administrados con una dosis única de 50 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal. Después de tres días de la administración se midió el nivel de glucosa, mediante tiras reactivas y fueron seleccionados los animales que presentaron niveles de glucosa en sangre ≥ 200 mg/dL (Furman, 2015).

Actividad anti-hiperglucemiante

Las ratas Wistar fueron divididas en 11 grupos de 10 animales cada uno.

Grupo I: Control sano (agua estéril)

Grupo II: Control diabético (STZ)

Grupo III: Vehículo (300 μL , propilenglicol)

Grupo IV: metformina (100 mg/Kg)

Grupo V: Acarbosa (10 mg/Kg)

Grupo VI-VIII: Extracto de BHm (35, 75 y 150 mg/Kg)

Grupo IX-XI: Extracto de BHmt (35, 75 y 150 mg/Kg)

Todas las muestras fueron administradas intragástricamente cada tres días. Después de la administración la glucosa periférica fue monitoreada cada 48 h. Después de la 15va administración los animales fueron sacrificados y se obtuvo una muestra de sangre para el análisis bioquímico.

Ensayos bioquímicos

Se tomaron muestras de sangre para medir la concentración de glucosa (GS), insulina (INS), colesterol total (CT), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicéridos (Tg), creatinina (CrS), urea (UrS), nitrógeno ureico en sangre (BUN), alanina aminotransferasa (AIT) y aspartato aminotransferasa (AsT). La evaluación se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante para cada kit de diagnóstico.

Ensayo de toxicidad aguda

La evaluación de la toxicidad aguda se adhirió a las directrices de la OCDE (Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos) para la prueba de sustancias químicas (Método clase de toxicidad aguda-toxicidad oral aguda, sección 423). Este ensayo consistió en la administración oral de 300mg/Kg del extracto metanólico y el extracto metanólico total de *H. patens* a tres ratones ICR hembras y tres ratones ICR machos, después de un día de ayuno. El grupo control solo recibió agua. Se observaron los síntomas y la variación de peso a intervalos de 1, 3 y 4 h después de la administración, y dos veces por día durante los siguientes 14 días. Los animales fueron mantenidos a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 50% de humedad en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h. A lo largo del estudio se les fue proporcionada una alimentación estándar y agua *ad libitum*. Estos resultados permitieron clasificar los extractos de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado (SGA).

Análisis estadístico

Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey con el programa SAS versión 9.0. La evaluación de la actividad antihiper glucémico y los parámetros bioquímicos fueron analizados por la comparación de varianza múltiple mediante la aplicación del método Holm-Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.0).

Resultados

Como primer paso para evaluar el potencial anti-hiperglucemiante de los extractos se evaluó su capacidad para inhibir la enzima α -glucosidasa y con esto retrasar la absorción de glucosa en sangre. Los extractos metanólicos de *H. patens* presentaron la mejor actividad inhibitoria sobre esta enzima, seguido de los extractos de tallos hexánicos de ambas plantas (Tabla 9), además estos extractos se compararon con estándares comerciales del tipo fenólico como la epicatequina, quercetina y ácido clorogénico, así como del tipo terpénico con ácido ursólico, además del fármaco control que fue la acarbosa. Se ha reportado que metabolitos de origen fenólico son potenciales inhibidores de la enzima α -glucosidasa (Asgar, 2103) ya que pueden regular o modular los niveles de glucosa en sangre después de la ingesta de alimentos (Rasouli *et. al.*, 2017)

Jiménez en 2016, evaluó el efecto inhibitorio de extractos de hojas de *H. patens* empleando disolventes de polaridad creciente, donde el extracto hexánico mostro una importante actividad inhibitoria sobre dicha enzima con una $IC_{50} = 26.07 \mu\text{g/mL}$, sin embargo, en este trabajo el extracto hexánico no presento actividad alguna, pero los extractos de los tallos sí. Cabe resaltar que estos resultados mostraron IC_{50} mucho menores que las del fármaco control, lo cual coincide con diversos autores donde los extractos de plantas medicinales presentar un mejor efecto inhibitorio de la enzima α -glucosidasa que el fármaco control. Algunos reportes muestran valores de IC_{50} para la Acarbosa que van desde 93.0, 377.0, 990, 1081.27, 2596.04 hasta 4687.06 $\mu\text{g/mL}$, este último valor es similar a lo obtenido en este trabajo con una IC_{50} de 4996.7 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa.

Extracto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
TrThex	144.6 \pm
BThex	304.1 \pm
BHm	67.8 \pm 3.09
BHmt	78.3 \pm 1.88
Acarbosa	4996.7 \pm 1.22
Epicatequina	282.6 \pm 2.28
Ácido ursólico	116.8 \pm 1.15
Quercetina	2.7 \pm 1.05
Ácido clorogénico	6167.1 \pm 1.16

BH: bayetilla hojas, BT: Bayetilla tallos, TrH: trompetilla hojas, TrT: trompetilla tallos, hex: hexano, dcm: diclorometano, m: metanólico, mt: metanólico total, a: acuoso.

Una vez evaluada la actividad de los extractos sobre la inhibición de α -glucosidasa, los extractos metanólicos de *H. patens* se eligieron para llevar a cabo su evaluación en un modelo murino empleando

ratas diabéticas vía la administración de estreptozotocina (STZ) y de estas se eligieron aquellas con niveles mayores a 300 mg/dL.

En la Tabla 10 se muestran los niveles de glucosa después de 15 administraciones de extracto, en la cual los extractos metanólicos de *H. patens* redujeron los niveles de glucosa, siendo en la concentración de 150 mg/Kg donde se observó la mayor disminución de glucosa para ambos casos. Al analizar el efecto sobre la insulina periférica, la metformina y los extractos metanólicos mostraron una disminución de esta comparado con el control diabético.

Tabla 10. Niveles de glucosa e insulina sérica sobre animales experimentales.

Grupo	GS (mg/dL)	INS (mUI/mL)
Control Sano	112.70 ± 22.11	2.10 ± 1.27
Control Diabético	437.50 ± 0.71 ^{###}	2.50 ± 1.31
Control Diabético/Vehículo	429.00 ± 2.83	1.95 ± 0.07
Metformina	123.90 ± 33.99 ^{***}	1.74 ± 0.06
Acarbosa	142.30 ± 31.99 ^{***}	2.15 ± 0.39
BHm 150 mg/Kg	117.50 ± 41.35 ^{***}	1.47 ± 0.55
BHm 75 mg/Kg	168.80 ± 11.67 ^{***}	2.00 ± 0.87
BHm 35 mg/Kg	162.00 ± 28.77 ^{***}	2.75 ± 0.35
BHmt 150 mg/Kg	93.25 ± 20.22 ^{***}	1.63 ± 0.71
BHmt 75 mg/Kg	156.00 ± 15.13 ^{***}	1.33 ± 0.15
BHmt 35 mg/Kg	153.00 ± 30.36 ^{***}	2.32 ± 1.32

BH: bayetilla hojas, m: metanólico, mt: metanólico total, GS: glucosa en sangre; INS: insulina; Promedio ± desviación estándar: ^{###}P < 0.001 comparado con el control sano, y ^{***}P < 0.01 comparado con el control diabético.

Debido a que se ha reportado que la hiperglicemia es causante de daño renal, se evaluó el efecto de los extractos sobre este órgano. En la Tabla 11 muestra que los extractos metanólicos a una concentración de 150 mg/Kg presentaron el mejor efecto protector en relación a la concentración de creatinina sérica. Las transaminasas del hígado (AIT y AsT) estas enzimas están presentes en las células de corazón, músculo, cerebro, riñones y sobre todo en hígado son consideradas marcadores de daño hepático, siendo AIT el principal marcador debido a que se incrementa sus valores cuando el hígado sufre algún daño al mismo tiempo se ha observado una asociación entre altos niveles de AIT y la resistencia a la insulina. Al observar las concentraciones de ambas enzimas en suero de las ratas tratadas se encontró que BHm a una concentración de 150 mg/Kg muestra una disminución en la concentración de alanino aminotransferasa (AIT), mientras que ambos extractos a las tres concentraciones evaluadas mostraron una disminución de los valores de aspartato aminotransferasa (AsT).

Tabla 11. Perfil renal y hepático en ratas experimentales.

Grupo	CrS (mg/dL)	UrS (mg/dL)	BUN (mg/dL)	AIT (mg/dL)	AsT (µU/mL)
Control Sano	1.20 ± 0.03	47.83 ± 15.20	23.94 ± 6.50	65.33 ± 21.72	156.20 ± 60.50
Control Diabético	1.05 ± 0.02	82.50 ± 24.69 [*]	38.53 ± 11.49	99.33 ± 26.27	208.50 ± 93.26
Control Diabético/Vehículo	0.75 ± 0.01	76.00 ± 27.13	32.08 ± 16.24	61.33 ± 13.20	188.80 ± 81.49
Metformina	0.74 ± 0.02	34.50 ± 10.63 [*]	20.53 ± 5.04 [*]	65.50 ± 12.22	145.40 ± 26.60
Acarbosa	0.83 ± 0.31	48.33 ± 1.53	22.67 ± 1.16	59.50 ± 14.57	136.00 ± 36.17
BHm 150 mg/Kg	0.67 ± 0.05	31.50 ± 4.07 ^{***}	14.68 ± 2.39 ^{**}	45.50 ± 5.07 [*]	141.00 ± 36.40

BHm 75 mg/Kg	1.20 ± 0.32	56.00 ± 5.77	24.68 ± 4.02	76.25 ± 19.28	136.30 ± 22.29
BHm 35 mg/Kg	1.10 ± 0.14	47.00 ± 10.86*	21.93 ± 5.07	76.75 ± 26.04	134.00 ± 31.23
BHmt 150 mg/Kg	0.63 ± 0.02	31.25 ± 1.71***	14.55 ± 0.81*	73.25 ± 24.68	138.00 ± 22.07
BHmt 75 mg/Kg	0.90 ± 0.10	43.00 ± 3.61*	20.07 ± 1.65	69.67 ± 11.15	139.30 ± 31.18
BHmt 35 mg/Kg	1.37 ± 0.38	54.33 ± 7.52	26.50 ± 3.66	73.25 ± 14.06	157.80 ± 28.49

BH: bayetilla hojas, m: metanólico, mt: metanólico total, CrS: creatinina sérica; UrS: urea sérica; BUN: nitrógeno ureico en sangre; ALT: alanina aminotransferasa; AsT: aspartato aminotransferasa; Promedio ± desviación estándar; *P < 0.05 comparado con el control sano, *P < 0.05 comparado con el control diabético, **P < 0.05 comparado al control diabético, ***P < 0.05 comparado al control diabético.

Se ha reportado que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan un patrón característico el cual consiste en un aumento en los niveles séricos de triglicéridos, una disminución en los niveles de HDL, un aumento en las LDL y un ligero aumento en colesterol. Estas características fueron observadas en el control diabético (Tabla 12), mientras que el extracto de BHmt a una concentración de 150 g/Kg tiene un efecto positivo sobre las ratas diabéticas ya que además de disminuir los niveles de glucosa, disminuyó la concentración de triglicéridos y LDL, y aumentó las HDL, esto mismo ocurre para el extracto de BHm sin embargo no se observa un aumento en los niveles de HDL. Sin embargo, el fármaco de referencia Acarbosa no mostro ningún efecto favorable sobre los valores antes mencionados.

Tabla 12. Perfil lipídico (mg/dL) de ratas experimentales.

Grupo	CT	Tg	LDL	HDL
Control Sano	1.20 ± 0.03	47.83 ± 15.20	23.94 ± 6.50	65.33 ± 21.72
Control Diabético	1.05 ± 0.02	82.50 ± 24.69*	38.53 ± 11.49	99.33 ± 26.27
Control diabético/vehículo	0.75 ± 0.01	76.00 ± 27.13	32.08 ± 16.24	61.33 ± 13.20
Metformina	0.74 ± 0.02	34.50 ± 10.63*	20.53 ± 5.04*	65.50 ± 12.22
Acarbosa	0.83 ± 0.31	48.33 ± 1.53	22.67 ± 1.16	59.50 ± 14.57
BHm 150 mg/Kg	0.67 ± 0.05	31.50 ± 4.07***	14.68 ± 2.39**	45.50 ± 5.07*
BHm 75 mg/Kg	1.20 ± 0.32	56.00 ± 5.77	24.68 ± 4.02	76.25 ± 19.28
BHm 35 mg/Kg	1.10 ± 0.14	47.00 ± 10.86*	21.93 ± 5.07	76.75 ± 26.04
BHmt 150 mg/Kg	0.63 ± 0.02	31.25 ± 1.71***	14.55 ± 0.81*	73.25 ± 24.68
BHmt 75 mg/Kg	0.90 ± 0.10	43.00 ± 3.61*	20.07 ± 1.65	69.67 ± 11.15
BHmt 35 mg/Kg	1.37 ± 0.38	54.33 ± 7.52	26.50 ± 3.66	73.25 ± 14.06

BH: bayetilla hojas, m: metanólico, mt: metanólico total, CT: colesterol total; Tg: triglicéridos; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; Promedio ± desviación estándar; *P < 0.05 comparado con el control diabético; **P < 0.05 comparado con el control diabético; *P < 0.05 comparado con el control sano; *P < 0.05 comparado con la Acarbosa; **P < 0.05 comparado con la metformina.

Algunos autores reportan que el efecto de los extractos sobre ratas diabéticas es debido a la presencia de compuesto fenólicos como los flavonoides, dentro de los cuales ya se han reportado algunos posibles mecanismos de acción como la inhibición de la ruta NF-κB, evitando la inflamación hepática.

Al evaluar la toxicidad aguda de los extractos metanólicos de *H. patens*, se obtuvo que a dosis ≥2000 mg/Kg los extractos no mostraron mortalidad en los ratones, por lo que de acuerdo al Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación de la OCDE los extractos se clasificaron como de baja toxicidad.

Conclusión

Los extractos metanólicos de *Hamelia patens* son fuente de metabolitos inhibidores de la enzima α -glucosidasa, en un modelo murino el extracto metanólico total de las hojas a una dosis de 150 mg/Kg tuvo un efecto en los niveles de glucosa e insulina similar al fármaco metformina. *Hamelia patens* es una planta con alto potencial antihiper glucemiante, lo que hace necesario conocer los metabolitos secundarios que le confieren dicha actividad.

V Plantas de la familia Rubiaceae como alternativa en el control de la fusariosis

La agricultura es uno de los sectores productivos más importantes en México, nuestro país cuenta con un territorio de 198 millones de hectáreas, de las cuales cerca de 30 millones son tierras de cultivo (La Agricultura y el desarrollo rural en México). La variedad de climas que México posee, lo ha hecho un país con un potencial para el desarrollo de una amplia variedad de cultivos, así como de largos periodos de abastecimiento. Lo que ha colocado a México en el 13° lugar en producción de cultivos agrícolas a nivel mundial (SIAP, 2016).

Dentro de la composición agrícola podemos encontrar cereales, leguminosas, café, caña de azúcar, maíz, frutas y hortalizas, entre otros. La categoría de frutas y hortalizas representan el 40.9% del valor de la producción agrícola, lo que contribuye con cerca de la mitad del valor de la producción, haciéndola una de las actividades más rentables. Los cultivos de mayor producción son el tomate rojo (21.5%), chile verde y pimientos (19%) y la cebolla (13.2%); los estados de Sinaloa, Baja California Norte, Sonora y Chihuahua tienen un alto valor y elevado volumen de producción, donde Sinaloa representa al mayor productor de tomate rojo con un 25.6%, generando en 2015 un aporte económico de 3 mil 535 millones de pesos (SAGARPA, 2010, SIAP, 2016).

La producción hortofrutícola es la más importante ya que contribuyen con el 64% de las exportaciones totales principalmente hacia los Estados Unidos (SIAP), lo que la mantiene como una industria competitiva a nivel mundial, pero existen factores que traen como consecuencia algunas complicaciones en la calidad de los productos agrícolas como son cambios climáticos, ataque de plagas (artrópodos, roedores y malezas) y presencia de patógenos (microorganismos causantes de enfermedades) esto durante las etapas de pre y post-cosecha, generalmente ocasionando daños durante su crecimiento, maduración e incluso durante el manejo que va de la cosecha hasta su exposición en anaquel en el punto de venta (Serrano Carreón, 2009).

Actualmente el combate de plagas y enfermedades representa un 20% más en el costo de producción dependiendo de la severidad del daño, estimando pérdidas económicas de un 5 a un 25% en los países desarrollados y de un 20 a un 50% en países en desarrollo como el nuestro (Juárez-Becerra *et. al.*, 2010)

Los hongos fitopatógenos son las especies que causan el mayor deterioro debido a su enorme capacidad de reproducción y su difícil control ya que además de las pérdidas económicas también ocasionan alteraciones en el desarrollo y crecimiento de la planta. Dentro de los hongos que se han caracterizado como causantes de dichas enfermedades podemos encontrar a los géneros: *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, y *Fusarium*, entre otros; la importancia de estos hongos resalta en que pueden atacar un sin número de cultivos (Juárez-Becerra, 2010 y Rodríguez, 2001). Los hongos pueden afectar todas las partes de la planta originando síntomas como marchitez (los hongos colonizan la raíz, tallo o tejido vascular), tizón (oscurecimiento de hojas, tallos y órganos florales), chancros (los hongos colonizan por heridas en tallos leñosos), crecimiento anormal (hinchazón en los tallos de las plantas, raíces, tubérculos,

hojas y tallos), damping off (muerte rápida y colapso de plantas jóvenes), antracnosis (manchas necróticas en tallos, frutos, hojas o flores), royas (lesiones pequeñas en hojas o tallos) entre otras, y éstas pueden estar asociadas entre sí. También han desarrollado una gran variedad de mecanismos de infección para persistir en los cultivos; ya sea en forma de micelio en los tejidos infectados (chancros) o como esporas en la superficie infectada y algunos de estos son habitantes del suelo lo que hace que tengan la capacidad para sobrevivir por tiempo indefinido como organismos saprófitos, tal es el caso de *Phytium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Agrios, 2005)

Fusarium agente causal de daños en cultivos de importancia económica

Uno de los hongos que están ocasionando mayores problemas en cultivos agrícolas es la presencia de hongos del género *Fusarium*. Del 80% de enfermedades en cultivos de interés económico, al menos una es generada por alguna de las especies de *Fusarium*, ya que éstas atacan un amplio rango de plantas hospedantes y su distribución es cosmopolita (Arbeláez, 2000). Muchas especies de este género, además de ocasionar enfermedades en diversas especies de plantas cultivadas, también pueden causar infecciones oportunistas en el hombre y en los animales. En las plantas, los síntomas más frecuentes causados por este género consisten en marchitamientos vasculares, manchas, pudrición de raíces y tallos, pudrición de frutos granos y semilla.

Dentro de este género se han reconocido más de mil especies y desde la década de 1980 el número de especies que se han identificado por técnicas más precisas, tal como el empleo de la filogenia molecular ha aumentado gradualmente (Agrios 2005).

Fusarium agrupa especies que se encuentran en los suelos de los cuales obtienen nutrientes del material orgánico y de las raíces de las plantas, pero dado que el aporte de nutrientes desaparece rápidamente por la presencia de numerosos microorganismos, hace que la mayoría de los hongos permanezcan en estado latente mediante la formación de estructuras de resistencia (clamidosporas), las cuales pueden sobrevivir durante tiempos prolongados, en condiciones poco favorables para el crecimiento del micelio (Walter *et. al.*, 2010)

Fusarium produce una variedad de metabolitos secundarios como policétidos, terpenos, péptidos ribosomales y micotoxinas (Di Pietro, 2004). Algunas de estas micotoxinas son dañinas para la salud humana y animal (fumonisinas, tricotecenos, y zearalenona), por lo que son monitoreadas y reguladas por el comercio internacional y doméstico.

Este hongo es capaz de sintetizar múltiples metabolitos secundarios los cuales presentan un efecto sinérgico al estar combinados causando mayor daño que estando solos, por ejemplo, DON (desoxinivalenol) y ácido giberélico. DON no es necesario en al inicio de la infección, pero si es importante en la dispersión del hongo sobre el tejido infectado. Por otro lado, las fumonisinas pueden inducir apoptosis en las células vegetales (Kistler, 1997). La importancia de *Fusarium* como patógeno de plantas también se ha manifestado, debido a la dificultad para controlar las enfermedades que produce. La presencia de *Fusarium* en plantas se puede dividir en tres grupos de acuerdo al tipo de enfermedad que producen.

El primer grupo es el marchitamiento vascular cuyo principal agente causal es *F. oxysporum*. El segundo grupo son las podredumbres de raíz causadas por *F. solani* y por último las especies que provocan enfermedades en plantas gramíneas como *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum*. Durante el proceso de infección se ha reportado que las especies de *Fusarium* secreta enzimas hidrolíticas como cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas.

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum (FO) es una de las especies de mayor importancia fitopatológica debido a que tiene la capacidad de infectar a un gran número de plantas de importancia agrícola generando un grave daño económico. Las esporas de este hongo cosmopolita se diseminan por el viento, unidas a semillas, al realizar las labores del suelo, plantas enfermas o por herramientas contaminadas. Es decir, es un colonizador agresivo y competitivo y es capaz de penetrar la raíz a través de las puntas de las raíces o de heridas. En el caso de cepas no patogénicas, estas son capaces de colonizar la raíz sin desencadenar la enfermedad ya que son incapaces de penetrar en el sistema vascular de la planta (Arbeláez, 2000). En plantas infectadas, *Fusarium oxysporum* se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y producir esporas asexuales como microconidios, macroconidios y clamidosporas. Las clamidosporas son estructuras de resistencia que sobreviven en forma latente por largos períodos de tiempo ya que tiene la capacidad de perdurar en el suelo bajo condiciones desfavorables (Di Pietro, 2004 y Leslie, 2006).

Fusarium oxysporum presenta también un ciclo de reproducción asexual. Su ciclo de vida es complejo y puede ser dividido en dos fases, una como parásito, dentro de su huésped específico y otra de crecimiento saprofito. La fase saprófita comienza cuando los tejidos infectados de la planta comienzan a morir, esto lo hace mediante la producción de clamidosporas las cuales se producen cuando se disminuyen los niveles de carbohidratos en el tejido muerto y así son liberadas al suelo junto con restos de hifas. Una vez que las clamidosporas germinan sobre residuos vegetales comienza el desarrollo de la fase saprofitica y así el hongo penetra a una planta susceptible, desencadenando la fase parasitaria. En la planta, el hongo invade los vasos xilémicos y se extiende rápidamente mediante el crecimiento de las hifas y la producción de esporas. Posteriormente comienza la aparición de los síntomas en la planta como el que se presenta en la Figura 8.

Los mecanismos que desencadenan la aparición de los síntomas, pueden ser debidos a factores ambientales (temperatura, luz, aireación y humedad), la presencia de calcio y nitrógeno o el pH, pero también a factores mecánicos tales como la obstrucción del sistema vascular de la planta, o bien, a factores químicos como la producción de toxinas.

Tal es el caso de la toxina ácido fusárico (ácido 5-*N*-butil-piridina-2-carboxílico) la cual tiene la capacidad de inhibir a la enzima citocromo oxidasa, y por ende la respiración mitocondrial de la planta. Esta toxina causa una alteración de la permeabilidad de la membrana provocando la pérdida de electrolitos y afectando la estabilidad del potencial de membrana, la conductancia de la misma y la generación de ATP a nivel celular. Además, el ácido fusárico también interfiere con la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa

(PAL), la cual es clave en el metabolismo de compuestos fenilpropanoides los cuales están involucrados en la respuesta de defensa de algunas plantas ante el ataque de algún patógeno (Di Pietro, 2004).

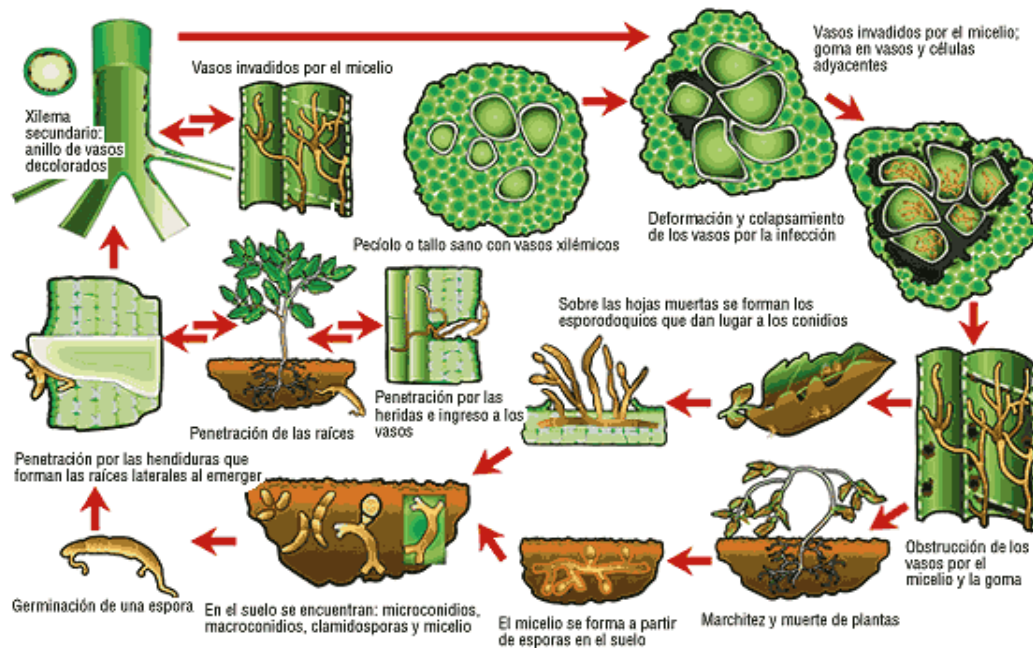


Figura 8. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La especificidad de *Fusarium oxysporum* para infectar un tipo de cultivo se ha descrito ampliamente. Así, en *F. oxysporum* se han reconocido más de 120 formas especiales específicas para cada cultivo, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de plátano, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* en melón, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* en frijol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* en chícharo, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* de gladiola, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, específicos para tomate, siendo estas dos últimas, unas de las más estudiadas, debido a que estas formas especiales tienen la capacidad de afectar al mismo hospedero con la diferencia de que producen enfermedades diferentes (Di Pietro, 2004 y Boix-Ruíz, 2015). Por ejemplo, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FoI*) causa marchitez vascular, la cual se desarrolla a temperaturas por arriba de los 34°C, el síntoma característico es la decoloración amarilla de un solo lado de la planta, la cual puede expandirse hacia arriba; por otro lado, se han reportado 3 razas fisiológicas de esta especie, las cuales presentan diferentes genes de resistencia. En contraste *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FoII*) produce podredumbre de cuello y raíces, este se desarrolla a una temperatura óptima entre 15-18°C, ocasionando una pudrición donde todo el sistema de las raíces se torna café, expandiéndose al sistema vascular.

Rutas de señalización y patogénesis de *Fusarium oxysporum*

La naturaleza de las señales y los receptores que se encargan de activar la respuesta patogénica es desconocida. Durante la fase inicial de la infección el hongo es capaz de sensar estímulos de la planta por lo que a través de cascadas de señalización éste responde con cambios morfogénéticos y bioquímicos tales como la adhesión a la superficie del hospedador, la diferenciación de estructuras de infección, la

secreción de enzimas líticas y toxinas. Entre las rutas de señalización implicadas en la patogénesis destaca una cascada MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno) (Di Pietro, 2004). Estas rutas se caracterizan por un módulo con tres proteínas cinasas secuenciales, las cuales transfieren un grupo fosfato a la siguiente proteína y así sucesivamente, la MAPKKK se encarga de activar la MAPKK la cual a su vez activa la MAPK. La función biológica de las cascadas MAPK es la transducción de señales desde la superficie celular al núcleo, controlando así procesos tan vitales como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. En *F. oxysporum* se identificó una enzima MAPK denominada *fmk1*, al inactivar ésta se encontró que es esencial para la colonización y penetración en las raíces (Hayes, 2014).

Mecanismo de infección de hongos fitopatógenos

A lo largo de la evolución los hongos fitopatógenos han desarrollado diferentes estilos de vida y modos de interacción con su hospedero. El primer intento de colonización, en algunos casos, consiste en sintetizar y secretar metabolitos secundarios tóxicos (necrótrofos), mientras que otros viven de los nutrientes proporcionados por el huésped vivo durante tiempos prolongados sin producir toxinas (biótrofos), y otros viven de la materia orgánica muerta de su hospedero (saprótrofos). Para su supervivencia, los hongos dependen de sustancias producidas por sus hospederos, en la mayoría de los casos no se encuentran de forma disponible para el hongo fitopatógeno, lo que hace que estos tengan que penetrar primeramente las barreras externas de su hospedero como la cutícula y la pared celular para transformarlas en unidades más simples y fáciles de asimilar. Dentro de los primeros pasos de infección estos hongos tienen proteínas receptoras específicas, las cuales se encargan de sensar las señales entorno al medio ambiente, y transmitir estas señales hacia la célula fúngica, lo que facilita el reconocimiento del hospedero (Horbach, 2011 y Kubicek, 2014). Pero al igual que el patógeno, las plantas también emplean una variedad de proteínas que le ayudan en su reconocimiento, es así que el hongo puede ser reconocido por los principales componentes de su pared celular como son la quitina, la cual es reconocida por quitinasas y los glucanos que son reconocidos por glucanasas. Además, las plantas activan de manera sistémica cascadas de señalización (principalmente vía hormonal), tales como ácido jasmónico (AJ), ácido metil-jasmónico (AMJ), ácido salicílico (AS) y etileno, para proteger tejidos distantes una vez que el patógeno comience a causar la infección en la primera planta (Lagaert, 2009).

Una vez que el hongo reconoce a su hospedero, inicia el proceso de infección hacia la planta el cual se da mediante la formación de estructuras altamente especializadas como la formación de un tubo germinal apresorial sobre la cutícula de la planta, dando lugar así a células de infección llamadas apresorios los cuales hacen que aumente la zona de unión entre los dos organismos, permitiendo que el hongo se fije con mayor firmeza rompiendo la célula mediante una combinación de fuerza mecánica y enzimas que degradan la pared celular vegetal secretadas desde el apresorio (Horbach, 2011).

Entre los principales grupos de sustancias secretadas por los hongos fitopatógenos y que participan en la aparición de enfermedades se encuentran las enzimas que se encargan de degradar las sustancias nutritivas de las células afectando directamente al protoplasto e interfiriendo con los sistemas funcionales las cuales son conocidas como enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE por sus siglas del inglés

“Cell Wall Degrading Enzymes”), las toxinas que dificultan la permeabilidad de las membranas así como su funcionamiento y los reguladores de crecimiento que ejercen un efecto hormonal al aumentar o disminuir la capacidad de dividirse y crecer (Kubicek, 2014).

Secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE)

Algunos hongos fitopatógenos matan y degradan activamente los tejidos de la planta para liberar monosacáridos y oligosacáridos para su crecimiento y reproducción, pero la pared celular vegetal es un gran obstáculo para la penetración y propagación de estos, ya que esta funciona como una primera barrera de protección ante el ataque de dichos patógenos (Kubicek, 2014). La estructura de la pared celular vegetal continuamente se ve modificada ya sea por la etapa de desarrollo en la que se encuentra o por condiciones ambientales. Durante el crecimiento celular se establece la lamela media y la pared primaria (Wolf-Dieter, 2002) que contribuye con la integridad estructural, la adhesión celular y la transducción de señales, esta posee un alto contenido de pectina y una menor cantidad de celulosa de bajo grado de polimerización (hasta 2000 unidades de glucosa). Posteriormente la pared es engrosada y reforzada por la formación de una pared secundaria, donde se encuentran la celulosa con alto grado de polimerización (13,000 y 14,000 moléculas de glucosa), microfibrillas embebidas en una matriz de pectina, hemicelulosa, lignina y proteínas estructurales, por lo que el hongo al reconocer dichos componentes ataca la pared celular vegetal produciendo CWDE las cuales se encargan de degradar dichos polisacáridos estructurales y han sido clasificadas como glucósido hidrolasas (GHs) debido a que inciden hidrolíticamente sobre los enlaces glucosídicos (Glass). Estas actividades enzimáticas se describen a continuación:

a) Celulasas

La celulosa es un polisacárido que constituye entre el 30 y 50% del peso seco de plantas, está compuesta de cadenas lineales de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4, se localiza en la pared celular y es sintetizada en la membrana plasmática. Las fibras de celulosa muestran dos regiones: las primeras son estructuras organizadas (región cristalina) que se encargan de prevenir la penetración de enzimas y agua, además de que se encuentran rodeadas por polisacáridos hemicelulósicos mediante la unión por puentes de hidrogeno y enlaces covalentes, lo que la hace más resistente a la hidrólisis química; las segundas son estructuras desordenadas (región amorfa) con una composición heterogénea caracterizada por una variedad de enlaces (Martínez-Anaya, 2008).

La hidrólisis enzimática de la celulosa se da por la acción de enzimas encargadas de degradarla mediante un complejo enzimático que afecta de forma sinérgica su degradación. El complejo enzimático está conformado por endoglucanasas o endocelulasas (1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas, (EC.3.2.1.4)) que actúan sobre enlaces β -1,4 glucosídicos, estas cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa generando oligosacáridos de varias longitudes, resultando en nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas, (EC.3.2.1.91)) que se encargan de liberar unidades de celobiosa de los extremos reductores y no reductores de cadenas de polisacáridos liberando celobiosa o glucosa y las β -glucosidasas o celobiosas (β -D-glucósido glucohidrolasas, (EC 3.2.1.21)) que hidrolizan las celodextrinas o celobiosas para liberar monómeros de glucosa (Gutiérrez-Rojas *et. al.*, 2015).

Las glucósido o glucosil hidrolasas están clasificadas en 135 familias (CAZY) de las cuales se han caracterizado 453 GHs de origen fúngico de 131 especies fúngicas diferentes (Murphy). Este grupo enzimático discutido en este apartado en partículas se restringe a algunas de estas familias. Se han reportado endocelulasas en las familias GH6 y GH7, exocelulasas en un gran número de familias GH5, GH7, GH12 y GH45, y β -glucosidasas principalmente encontradas en las GH1 y GH3, además estas familias contienen otras glucosidasas. Se ha reportado por ejemplo que enzimas de la familia GH61 codifican una nueva clase de enzimas dependientes de cobre y son las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs, por sus siglas en inglés) ya que catalizan una escisión oxidativa de la celulosa en presencia de un donador externo (Glass). Para una hidrólisis eficiente el sistema de las enzimas celulasas actúa de manera coordinada y sinérgica como las endocelulasas y exo celulasas (endo-exo), las exocelulasas que actúan sobre los extremos reductores y no reductores (exo-exo), las exocelulasas y β -glucosidasas actuando sobre celobiosa y celodextrinas y un sinergismo intermolecular entre los dominios catalíticos de la enzima y los dominios de unión a la celulosa (Figura 9).

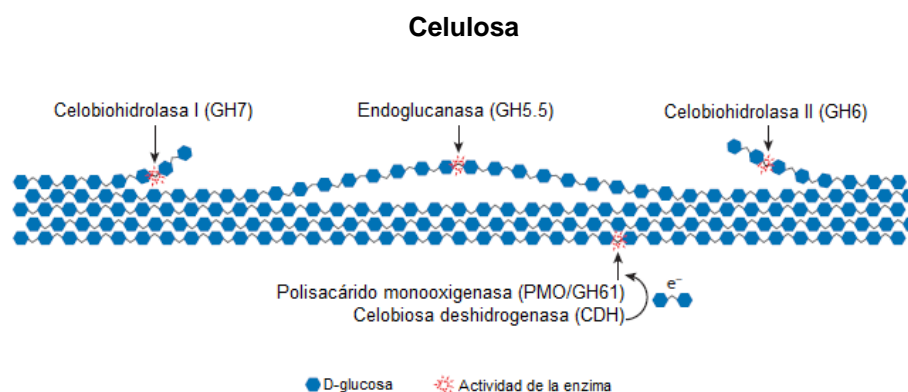


Figura 9. Diagrama que muestra las actividades enzimáticas encargadas de degradar la celulosa.

b) Hemicelulasas

La hemicelulosa es un polisacárido no celulósico producido dentro del aparato de Golgi por las glucano sintasas y las glucosiltransferasas (Obembe). Se encuentran localizadas entre la lignina y las fibras de celulosa y es el segundo componente más abundante de la pared celular. Las hemicelulosas están compuestas de heteropolímeros lineales y ramificados de D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico, los cuales pueden ser acetilados o metilados. Las hemicelulosas contienen de dos a seis de estos azúcares y se encuentran en mayor abundancia en la pared secundaria que en la pared primaria, siendo el xilano el componente más abundante, seguido de los glucomananos. El xilano comprende cadenas lineales de β -1,4-D-xilopiranosas (Xylp) y puede ser encontrado como O-acetil, α -L-arabino-furanósido, ácido α -1,2-glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico (Singh *et. al.*, 2003).

Para la degradación de hemicelulosas existen enzimas que actúan tanto endo como exo, dentro de las endo se encuentran las β -manasas y β -xilanasas y en el caso de las exo son las β -manosidasas, α -galactosidasas y β -glucosidasas. La mayoría de las xilanasas han sido clasificadas dentro de las familias

GH10 y GH11, las mananas dentro de la GH5 (subfamilias 6 y 7) y la GH26 y las manosidasas en las familias GH1 y GH2 (Figura 10).

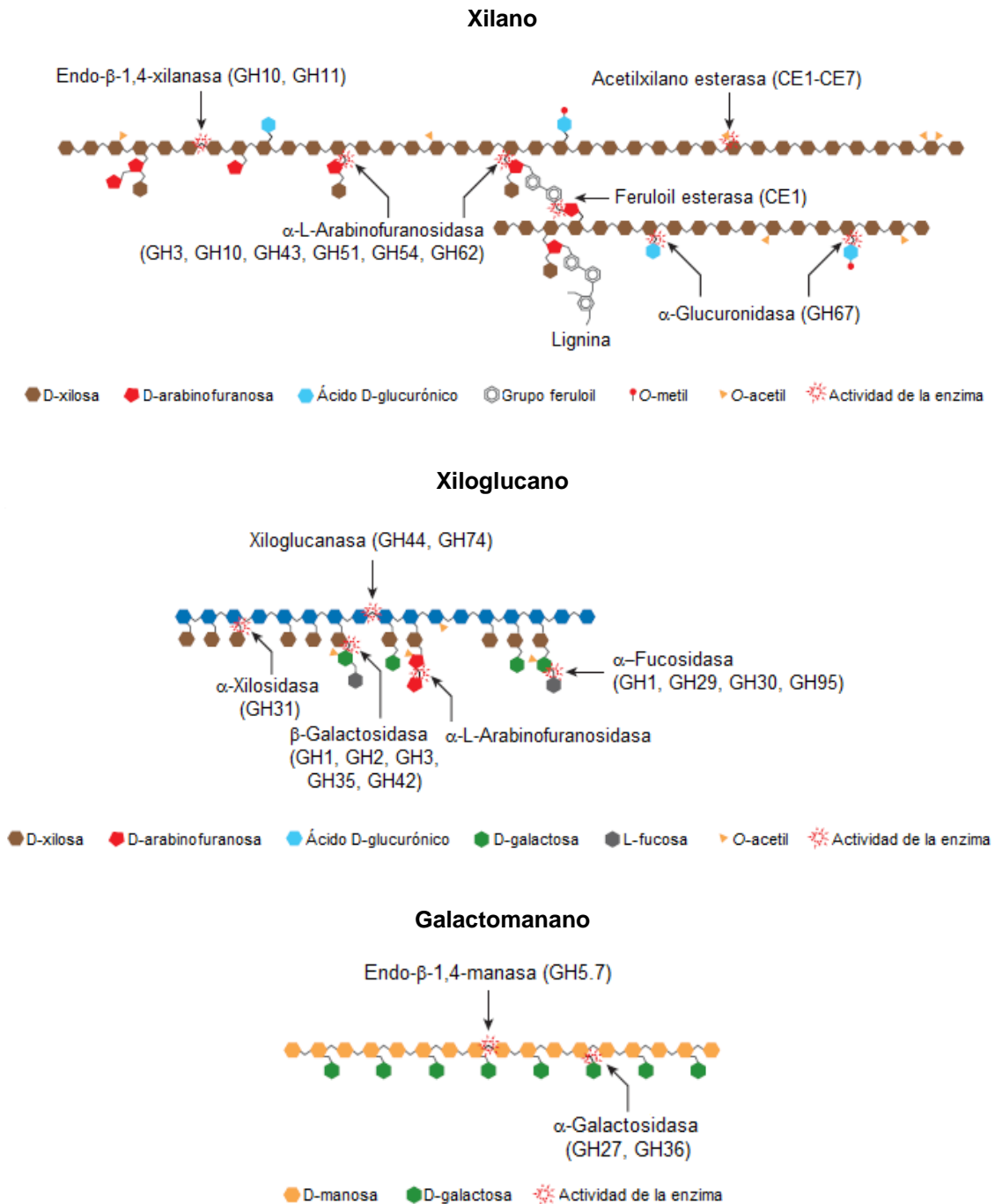


Figura 10. Diagrama que muestra las actividades enzimáticas encargadas de degradar la hemicelulosa.

c) Pectinasas

La pectina en plantas presenta la mayor complejidad funcional y estructural, se encuentra localizada en la lámina media de la pared celular primaria y secundaria proporcionando fuerza y apoyo a la pared celular además de que influye en propiedades como porosidad, carga de superficie, pH y balance iónico, está compuesta por cuatro clases principales de polisacáridos: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano

I (RG I), xilogalacturonano (XG) y ramnogalacturonano II (RG II). El homogalacturonano (HG) está conformado de cadenas lineales de residuos de ácido α -1,4-D-galacturónico (AG), donde algunos grupos carboxilo se encuentran metil esterificados, por otro lado, grupos de más de 10 residuos de ácido galacturónico no esterificados generan moléculas de pectina dependientes de Ca^+ , además se ha reportado que elementos de HG pueden intercalarse con residuos de L-ramnosa (Glass *et. al.*, 2013). El HG representa aproximadamente el 60% de la pectina total de las paredes celulares y se encuentra unido covalentemente a RG I y RG II.

El ramnogalacturonano I es la siguiente clase más abundante de pectina que está conformada por unidades repetidas de [ácido α -1,2-D-galacturónico-1,4-L-ramnosa]_n. que pueden ser sustituidos en la posición del carbono cuatro por arabinanos, galactanos o por cadenas laterales de arabinogalactanos. Los residuos de AG se encuentran no metil esterificados y si pueden estar acetilados. El xilogalacturonano (XGA) está representado por HG sustituido por simples unidades de (1-3)- β -xilopiranosido donde parte de los residuos de AG son metil esterificados y han sido identificados principalmente en frutos y semillas. El ramnogalacturonano II, es caracterizado como una región distinta dentro de los HG el cual está constituido por grupos de cuatro cadenas laterales diferentes de residuos de apiosa, ácido acérico, ácido 3-desoxi-lixo-2-heptulosárico (DHA) y ácido 3-desoxi-mano-2-octulosónico (KDO) los cuales se encuentran unidos a un fragmento de HG de aproximadamente 9 residuos de AG y en algunos casos se encuentran metil esterificados (Voragen, 2009).

Dentro de las enzimas encargadas de degradar pectina se encuentran: 1) las poligalacturonasas (PGs) que comprenden enzimas endo y exo, han sido clasificadas dentro de la familia GH28 y se encargan de hidrolizar los enlaces entre AG y HG no metilados, 2) las pectato-liasas (POLs) son específicas para sustratos no metilados, 3) las pectino liasas (PL) escinden en el mismo enlace que las PGs pero degradan formas metiladas y la escisión se produce por β eliminación resultando en la formación de un enlace insaturado en el extremo no reductor y 4) las pectin metilesterasas (PME) se encargan de la desmetilación de HG, haciendo a la pectina disponible para su degradación por PG y POL (Figura 11).

Pectina

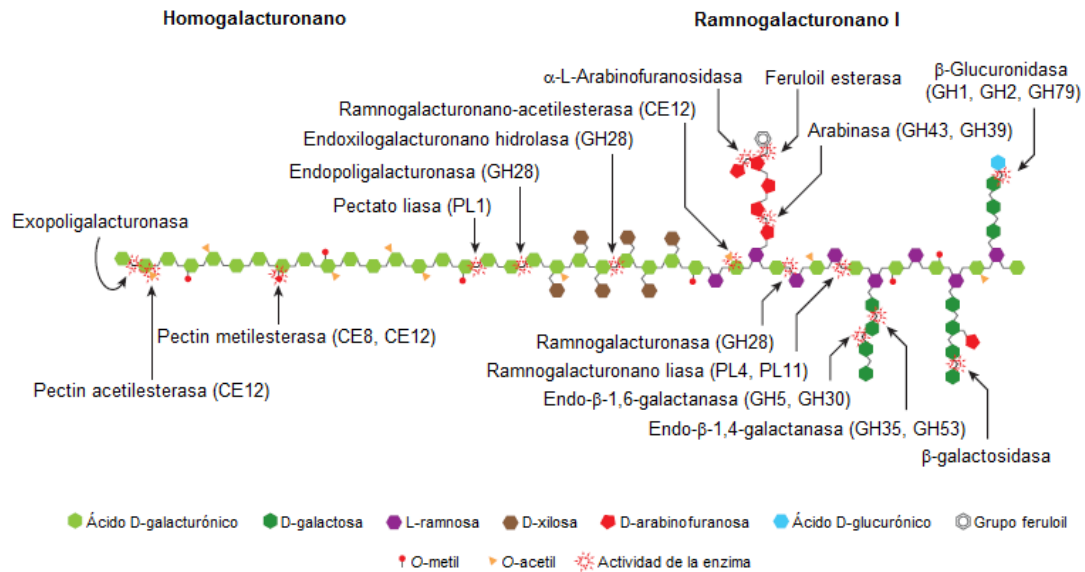


Figura 11. Diagrama que muestra la actividad de las enzimas encargadas de degradar pectina.

d) Proteasas

Las proteínas de las plantas son clave en la defensa vegetal y son clasificadas de acuerdo a su patrón de expresión, es así que pueden ser constitutivas (o de mantenimiento). Pueden ser expresadas en algún tejido específico pero su expresión no está relacionada a la infección. Generalmente, se encuentran en tejidos de almacenamiento, gomas y látex; su presencia le confiere resistencia al daño o infección, además de actuar como proteínas de reserva. Estas proteínas son también inhibidores de enzimas hidrolíticas y son clasificadas en familias de acuerdo a la secuencia de aminoácidos, su estructura y especificaciones (Meller).

Otro grupo de proteínas protectoras son las expresadas en respuesta a la infección o daño, como lo son las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) que suelen ser acumuladas en la savia dentro del xilema en la planta infectada.

Las proteasas incluyen a todas las enzimas que catalizan la escisión de los enlaces peptídicos resultando en péptidos o aminoácidos libres. Las proteasas se clasifican en endo-proteasas las cuales actúan sobre los enlaces peptídicos internos dentro de un polipéptido y las exo-proteasas que escinden solo en los extremos N o C terminal. Las endo-proteasas secretadas por hongos fitopatógenos son proteasas aspárticas pertenecientes a la familia pepsina, serín proteasas de la subfamilia de la subtilisina y metaloproteasas de dos familias diferentes. La ruta de secreción de las proteínas se da a través de la membrana del retículo endoplásmico (Monod, 2002).

e) Lipasas

La cera epicuticular de los vegetales consiste en una mezcla de ácidos grasos de cadena larga, aldehídos, alcanos, alcoholes y ésteres, mientras que la cutícula contiene material lipídico polimérico insoluble llamado cutina la cual forma una barrera contra la deshidratación y proporciona resistencia frente a enfermedades mecánicas (Feng, 2005). En las plantas también podemos encontrar grasas y aceites principalmente en

semillas que sirven para el almacenamiento de energía. Las lipasas catalizan la hidrólisis y síntesis de enlaces éster de triacilgliceroles en glicerol y ácidos grasos libres, originando la destrucción de la matriz fosfolipídica de las membranas celulares y con esto una desorganización de las proteínas de membrana, estas pueden actuar extracelularmente reduciendo la tensión superficial de los tejidos o intracelularmente interrumpiendo compartimientos intracelulares (Voigt, 2005).

Mecanismos de defensa de plantas contra hongos fitopatógenos

Las plantas presentan mecanismos de defensa complejos lo que las hacen resistentes ante el ataque de patógenos. Las plantas ejercen mecanismos físicos y químicos los cuales han sido adquiridos durante todo su proceso evolutivo reduciendo así la posibilidad de infección.

Las plantas pueden presentar una **defensa activa o constitutiva y pasiva o de resistencia inducida** (Montes) las cuales se activan solo ante la respuesta al ataque de un patógeno, involucrando cambios en el metabolismo secundario pero además de afectar al agente patógeno también puede afectar a los consumidores de las plantas y a sus enemigos naturales por la producción de compuestos como toxinas.

Defensa pasiva o constitutiva, la cual incluye barreras físicas, procesos de lignificación, así como la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Estos se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos como la presencia de capas gruesas de cutícula, tricomas, o deposición de ceras entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos con la acumulación de compuestos tóxicos en las células de las plantas (Montes de Gómez, 1990). Este tipo de compuestos químicos suelen encontrarse en concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de patógenos como el ácido protocatéquico y catecol. En ocasiones suelen incrementarse con la infección como las cumarinas y el ácido clorogénico. También pueden encontrarse en plantas sanas de manera inactiva donde al darse la infección son convertidas en productos antifúngicos mediante reacciones bioquímicas sencillas como la hidrólisis enzimática.

Las plantas generalmente exudan una variedad de sustancias en su superficie (Lundstedt) y consisten en compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y enzimas así como también compuestos inorgánicos como fenoles, ácido málico y algunos aminoácidos los cuales tienen una función inhibitoria ante el ataque de diversos patógenos como son:

- **Compuestos fenólicos:** Se encuentran en altas concentraciones en las células de las hojas o frutos jóvenes y son tóxicos para los patógenos ya que se producen y acumulan con mayor rapidez cuando se ha producido una infección. Un ejemplo de este tipo de compuestos son el ácido clorogénico, el ácido cafeico y la escopoletina. El sitio y el número de grupos hidroxilo en el anillo de fenol se considera que son los que están relacionados con su toxicidad, esto incluye la inhibición de enzimas a través de la reacción con grupos sulfhidrilos o a través de interacciones no específicas con las proteínas.

- Flavonoides: Su actividad es debida a su capacidad para formar complejos con proteínas extracelulares, proteínas solubles y para formar complejos en la pared celular de hongos. Flavonoides de naturaleza lipofílica pueden romper las membranas fúngicas de los hongos.
- Terpenos: En este caso algunos aceites esenciales causan la ruptura de la membrana por la acción de compuestos lipofílicos los cuales son generalmente empleados como extractos, además de que a estos se les ha considerado como un nuevo grupo de inhibidores de la β -(1,3)-D-glucano sintasa.
- Alcaloides: A este tipo de compuestos se les atribuye la propiedad de intercalarse con el ADN ocasionando múltiples efectos sobre el patógeno.

Defensa pasiva o de resistencia inducida: Esta es activada en respuesta ante el ataque de un organismo invasor, generando cambios en su metabolismo, una rápida generación de especies reactivas de oxígeno, cambios en los polímeros de la pared celular, síntesis de fitoalexinas, producción de proteínas relacionadas con la defensa y muerte celular hipersensible, además de contar con un sistema de vigilancia que le permita reconocer la amenaza mediante un sistema de transducción de señales y una ruta de respuesta la cual es regulada a nivel transcripcional por medio de genes relacionados con la patogenicidad (Madriz Ordeñana, 2002).

Esta respuesta cuenta también con genes de reconocimiento los cuales se encargan de codificar proteínas receptoras asociadas con rutas de transducción de señales y genes de respuesta que codifican proteínas que actúan como factores de defensa o como enzimas biosintéticas a través de rutas que son dirigidas a la producción de compuestos de defensa (Montes-Belmont, 2009). Tal es el caso de los polímeros de carbohidratos de pared celular los cuales inducen la expresión de dichos genes de defensa.

Proteínas vegetales como inhibidores de CWDE

Las plantas a lo largo del tiempo han evolucionado su pared celular resultando en la resistencia de estas a ataques hidrolíticos, mediante la producción de proteínas inhibidoras de las CWDE, éstas proteínas juegan un papel importante en la planta como respuesta de defensa ante el ataque de hongos y son inducidas de forma temprana durante este proceso de infección, limitando el crecimiento y la proliferación del hongo. Por ejemplo, **1)** las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (PIPGs), son consideradas elicitores ya que son empleadas por el sistema inmune de la planta en tejidos sanos circundantes y están ampliamente distribuidas en un sin número de plantas. Estas son efectivas frente a poligalacturonasas (PGs) fúngicas, pero no así para PGs bacterianas. Las PIPGs pertenecen a una familia de proteínas que posee repeticiones ricas en leucina, y existen una variedad de isoenzimas; **2)** Las proteínas inhibidoras de la pectin metil-esterasa (IPME), están asociadas con el grado de metil esterificación de la pectina en los diferentes procesos del desarrollo de la pared vegetal, además de que estas enzimas pueden unirse a la pectina y competir con las PGs (Salazar, 2013); **3)** Proteínas inhibidoras de hemicelulosas, como endoxilanasas de las cuales se han reportado a las XIP (Inhibidores de proteínas xilanasas) y a las TAXI, (Inhibidores de xilanasas *Triticum aestivum*), específicas para endoxilanasas de la familia GH11, pero no tienen ningún

efecto sobre endoxilanasas de la familia GH10, y endoglucanasas PLEX (Proteínas inhibidoras de endoglucanasas de xiloglucano) (Lagaert, 2009).

Métodos de control de hongos fitopatógenos

Los métodos de control más empleados comprenden el uso de semillas sanas (libres de patógenos), la destrucción de restos de plantas que albergan al patógeno, el uso de herramientas y maquinaria limpia, una buena ventilación de las plantas de cultivo, la rotación de cultivos, así como el uso de variedades resistentes, pero desafortunadamente el método más eficiente es el uso de agroquímicos los cuales han sido utilizados durante muchos años. Actualmente se encuentran más de 113 ingredientes activos registrados como fungicidas comerciales (Arbeláez, 2000).

Algunos fungicidas pueden tener un efecto directo al destruir al hongo o al inhibir la esporulación del hongo sin destruirlo (Greep). Otros fungicidas son de acción sistémica debido a que pueden ser absorbidos por alguna zona de los tejidos de la hoja y ser translocados por vía interna a toda la superficie de esta. Estos compuestos se encargan de inhibir la síntesis de algunas sustancias de la pared celular del patógeno, actuando como disolventes de las membranas celulares, formando complejos con algunas de sus coenzimas esenciales (inactivándolas de esta manera) o bien inactivando sus enzimas (Marreno Ponce).

Se sugieren al menos seis diferentes mecanismos de acción de los antifúngicos (Figura 12) (Gregori Valdés, 2005):

1. **Inhibición en la formación de la pared celular:** La pared celular sirve como cubierta protectora, provee la morfología celular, facilita el intercambio de iones y la filtración de proteínas. Está constituida principalmente de quitina y β -glucanos y si la síntesis de estos compuestos es inhibida, la integridad de la pared se compromete y es incapaz de soportar el estrés osmótico, provocando la muerte.
2. **Ruptura de la membrana celular:** Los ergosteroles son esenciales para la membrana celular y pueden ser inhibidos por antifúngicos que se fijan a los esteroides de la membrana, alterando su estructura y ocasionando una despolarización de la membrana lo que causa una pérdida del contenido citoplasmático. También se puede inhibir la dimetilación del lanosterol al unirse el antifúngico a una de las proteínas del citocromo P450 lo que conlleva a la acumulación de metil-esteroides generando una reducción en la concentración de ergosterol. De este modo la membrana se vuelve permeable.
3. **Disfunción de la mitocondria del hongo:** La mitocondria participa en la homeostasis y producción de ATP y en el proceso de apoptosis. Cuando se inhibe el transporte de electrones en la mitocondria se da una reducción en el potencial de la membrana mitocondrial. La inhibición puede ser a través de la inhibición del bombeo de protones de la cadena respiratoria, lo que disminuye la producción de ATP y posteriormente ocasiona la muerte.
4. **Inhibición de la división celular:** Su acción está limitada a bloquear la reproducción del hongo ya que inhibe el proceso de la mitosis. La inhibición puede ser originada inhibiendo la polimerización

de microtúbulos y causando la inhibición de la formación del huso mitótico. La inhibición se da sobre los hongos que se encuentran en la fase reproductiva.

5. **Inhibición de la síntesis de ADN/ARN o síntesis de proteínas:** Si el antifúngico entra en contacto con la célula a través del transporte activo de ATPasas y este interfiere con el ARN que a su vez puede causar la síntesis de ARN defectuoso y la inhibición de la transcripción del ADN. La inhibición en la síntesis de proteínas se da al bloquear el ciclo de elongación de los pasos iniciales de la translocación, previo a la hidrólisis de GTP.
6. **Inhibición de bombas de eflujo:** la función de las bombas de eflujo es la de transportar sustancias tóxicas fuera de la célula y al inhibir las bombas de eflujo de salida, la resistencia a los antifúngicos puede reducirse.

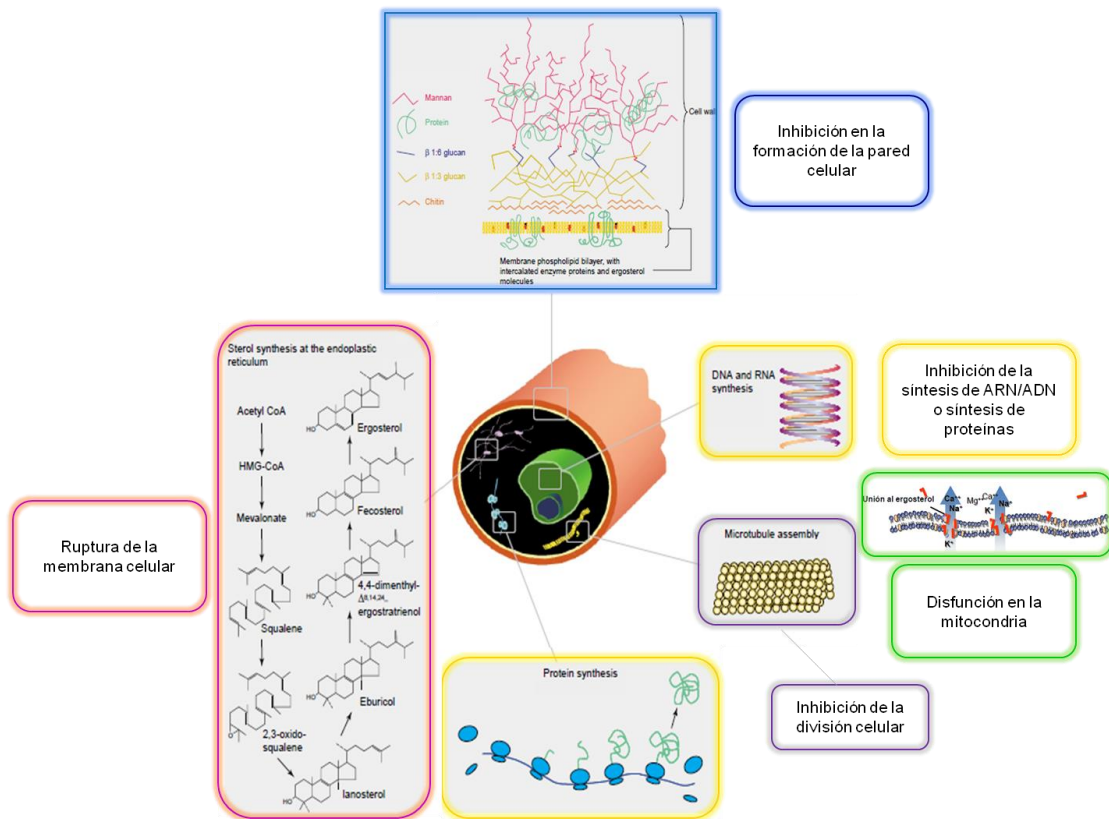


Figura 12. Estructuras celulares afectadas por antifúngicos.

Por lo que el uso indiscriminado y la alta frecuencia de aplicación de fungicidas de origen químico sobre cultivos agrícolas han tenido un efecto negativo sobre esta actividad (Serrano). Provocando principalmente la pérdida de eficiencia, el aumento de la resistencia a los ingredientes activos, daños al medio ambiente y un impacto negativo sobre la salud humana.

Es así que es de gran interés la búsqueda de productos de origen biológico que ayuden a restar los efectos negativos indeseables de los agroquímicos. Una alternativa es el uso de fitoquímicos bioactivos (metabolitos secundarios) con propiedades antifúngicas que sean eficientes para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Hipótesis

Los extractos de las plantas de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl y *Hamelia patens* Jacq., además de inhibir el crecimiento de *Fusarium*, tienen la capacidad de inhibir enzimas hidrolíticas relacionadas con la patogenicidad de *Fusarium* empleando sustratos específicos.

Objetivos

General

Establecer el potencial antifúngico de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl y *Hamelia patens* Jacq., así como su efecto sobre las enzimas hidrolíticas producidas por *Fusarium oxysporum*.

Específicos

- 1) Identificación molecular e identificación de razas Fol mediante cultivares diferenciales de *Fusarium* spp.
- 2) Evaluar la actividad antifúngica de extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl y *Hamelia patens* Jacq sobre *Fusarium* spp.
- 3) Evaluar el efecto de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl y *Hamelia patens* Jacq. en la prevención de la fusariosis en semillas y plántulas de *Solanum lycopersicum* (tomate) a nivel invernadero.
- 4) Evaluar el efecto de extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl. y *Hamelia patens* Jacq. sobre enzimas relacionadas con la patogenicidad de ForIC3.

Actividad antifúngica de los extractos de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltidl Y *Hamelia patens* Jacq frente a *Fusarium oxysporum*.

Metodología

Microorganismos

Las cepas empleadas para este trabajo fueron FoC1, FoC2, ForIC3, y ForI 1045 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radici-lycoprsic*). La primera cepa fue aislada de plantas de jitomate que presentaron sintomatología de fusariosis en invernadero, las siguientes 2 cepas son de la colección del Departamento de Micología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y la última es un aislado de campo del Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR-Sinaloa-IPN).

Identificación molecular

Se realizó la identificación de tres cepas de *Fusarium* (*F. sp1*, *F. oxysporum* y *F. sp2*) para conocer su forma especial mediante la siguiente metodología:

a) Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de cada aislamiento se realizó empleando el kit de extracción DNAzol® (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se tomó cantidad suficiente de micelio de cada aislado y se colocaron 500 µl de DNAzol® para promover la lisis celular, el tejido se maceró con un pistilo estéril. El macerado se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min; el sobrenadante fue recuperado y se adicionaron 500 µl de etanol absoluto mezclando por inversión y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 75% (500µl), cada lavado se incubó por 1 min y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min. Finalmente, la pastilla de ADN se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente y fue resuspendida con 30 µl de agua ultrapura (GIBCO™) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para verificar la presencia de ADN fúngico se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X (24.2 g/L de Tris-HCl 40mM, 5.71 g/L de ácido acético, 1.86 g/L de EDTA, pH 8.0) y bromuro de etidio como agente intercalante (1.5 µl). En el gel de agarosa se colocó en cada pozo 4.5 µl de ADN (3 µl de muestra y 1.5 µl de buffer de carga 6x) y se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (ADN Ladder Plus Invitrogen™). Las bandas del gel se visualizaron en un fotodocumentador (CHEMIDOC Universal Hood II, BioRad).

La cuantificación de ADN se realizó en un fluorómetro (Qubit® 2.0 Fluorometer) y con el kit Quant-iT™ dsDNA HS assay (Invitrogen), siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Se preparó la solución de trabajo diluyendo el reactivo Quant-iT 1:200 en el Buffer Quant-iT. El kit Quant-iT utiliza 2 estándares para su calibración.

En tubos Eppendorf de 0.6 µl se colocaron 199 µl de la solución de trabajo y 1 µl de la muestra problema de ADN y para los estándares se tomaron 190 µl de solución de trabajo y 10 µl de cada estándar. Se vortexearon las muestras por 2-3 seg. Se dejaron incubar los tubos por 2 min a temperatura ambiente. Una vez calibrado el equipo se colocaron las muestras (el fluorómetro Qubit® muestra los valores en ng/ml) y el valor se multiplico por el factor de dilución para determinar la concentración, los resultados son expresados en ng/µl.

$$\text{Concentración de la muestra} = \text{Valor QF} \times \left(\frac{200}{x}\right)$$

Donde:

QF es el valor dado por el Qubit®

x es la cantidad de µl de muestra que se agregaron

b) Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa PCR

La amplificación se llevó a cabo con el par de oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Fig. 13), los cuales amplifican a 620 pares de bases (pb). El volumen total de la reacción fue de 25 µl el cual contenía 16.8 µl de agua ultrapura, 2.5 µl de buffer de reacción (sin MgCl₂), 0.75 µl de MgCl₂ (50 µM), 1.25 µl de desoxirribonucleótidos (dNTP's) (10 µM), 1.25 µl de cada oligonucleótido (ITS1-ITS4) (10 µM), 0.2 µl de Taq platinum polimerasa y 1 µl de ADN de la muestra correspondiente.

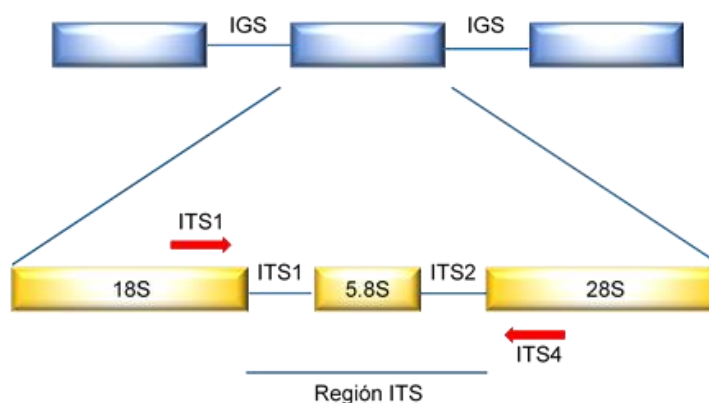


Figura 13. Región ITS1 e ITS2 del ADNr, amplificada con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

La amplificación se realizó en un termociclador Multigene (Labnet International, Inc., EUA). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 4 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, anillamiento de 30 seg a 56°C y elongación 30 seg a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72 °C. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR, bajo las mismas condiciones arriba mencionadas. De igual manera se cuantificó el ADN mediante el Quant-iT®.

c) Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con el Kit QIAquick®, siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Por cada volumen del producto de PCR se agregaron 5 volúmenes de Buffer PB (clorhidrato de

guanina e isopropanol) y se centrifugo a 13 000 rpm durante 1 min, posteriormente se desechó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de Buffer PE (composición confidencial) y se centrifugo a 13 000 rpm durante 1 min, para recuperar el ADN se agregaron 50 µl de buffer EB (Tris Cl 10 mM, pH 8.5) se dejó reposar por 1 min y se centrifugo a 13 000 rpm durante 1 min; para incrementar la concentración de ADN agregar nuevamente 30 µl de buffer de elución EB y se dejó reposar por 1 min y se centrifugo nuevamente a 13 000 rpm durante 1 min.

d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR anidado)

Esto se realizó solo para la cepa ForIC3. Para la primera reacción de PCR se amplificaron los fragmentos de los genes *endo* poligalacturonasa (*pg1*) y *exo* poligalacturonasa (*pgx4*) empleando el conjunto de oligonucleótidos endo F + endo R y exo F + exo R descritos por Di Pietro *et al.* (1998), Arie *et al.* (1998), Posada *et al.* (2000) (Tabla 13).

Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para amplificar fragmentos de genes de la poligalacturonasa.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición
<i>pg1</i> (<i>endo</i> poligalacturonasa) ^a		
Endo F	5'-CCAGAGTGCCGATACCGATT-3'	458-478 del gen U96456
Endo R	5'-AAGTGTTGGTAGGATAGTTG-3'	2034-2015 del gen U96456
<i>pgx4</i> (<i>exo</i> poligalacturonasa) ^b		
Exo F	5'-CAAGAGAAGTCATCGCAAGG-3'	800-819 del gen AF136444
Exo R	5'-ACCCCAACCCCCTCATCT-3'	2277-2259 del gen AF136444

^aFragmento de 1535-1537 pb

^bFragmento de 1439 pb

El volumen de la primera reacción de PCR fue de 10 µl el cual contenía 5.8 µl de agua ultrapura, 1 µl de Buffer de reacción, 0.5 µl de MgCl₂ (50 µM), 0.5 µl de dNTP's (10 µM), 0.5 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 0.2 µl de Taq platinum polimerasa y 1 µl de ADN de la muestra correspondiente.

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 5 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, anillamiento de 1 min a 60°C y elongación 2 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72 °C.

Para la segunda reacción de PCR se emplearon los oligonucleótidos unif + unir, sp23f + sp23r y sp13f + sp13r, sprlf + sprlr descritos por Hirano y Arie (2006) (Tabla 14), utilizando la misma concentración de reactivos y programa de PCR de la primera reacción de PCR pero a un volumen final de 25 µl.

Nuevamente los productos de la segunda reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% siguiendo la misma metodología que en la primera reacción de PCR.

Tabla 14. Oligonucleótidos específicos para razas de FOL y FORL.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición
uni ^a		
Unif	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	170-190 del gen U96456
Unir	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	841-820 del gen U96456
sp13 ^b		
sp13f	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	896-915 del gen AF136444
sp13r	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'	1340-1321 del gen AF136444
sp23 ^c		
sp23f	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	240-260 del gen U96456
sp23r	5'-GCAACAGGTCTGTGGGGAAAA-3'	757-738 del gen U96456
sprl ^d		
sprlf	5'-GATGGTGGAACGGTATGACC-3'	385-404 del gen AF136444
sprlr	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'	1330-1310 del gen AF136444

^a Amplifica fragmento de 670-672 pb de FOL y FORL

^b Amplifica fragmento de 445 pb de FOL raza 1 y 3

^c Amplifica fragmento de 518 pb de FOL raza 2 y 3

^d Amplifica fragmento de 947 pb de FORL

e) Purificación del producto de PCR

El producto de PCR se purificó empleando el kit QIAquick® gel extraction. Se cortó la banda deseada del gel de agarosa de la segunda reacción de PCR y se adicionaron 3 volúmenes del buffer QG por 1 volumen del gel y se incubó a 50°C durante 10 min, posteriormente se adicionó 1 volumen por peso de gel de isopropanol y se mezcló por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min. Después se adicionaron 500 µl de buffer QG y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min. Para el lavado se agregaron 750 µl de buffer PE y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min, nuevamente se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min. Para recuperar el ADN se agregaron 30 µl de buffer EB y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min, para incrementar la concentración de ADN se agregaron nuevamente 30 µl de buffer EB y centrifugar nuevamente a 13 000 rpm por min.

El patrón de amplificación de los fragmentos de ADN para la identificación de razas de Fol y Forl con el conjunto de oligonucleótidos de la endo y exo poligalacturonasa (Hirano) se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Patrón de amplificación para identificar razas Fol y Forl.

Raza/f. sp	Oligonucleótidos			
	uni	Sp13	Sp23	sprl
Forl	+	-	-	+
Fol r1	+	+	-	-
Fol r2	+	-	+	-

(+) fragmento amplificado, (-) fragmento no amplificado, (r) raza

f) Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN purificadas se secaron en un termoblock a 50°C durante 12 horas. La secuenciación de las muestras se realizó de manera bidireccional en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato).

g) Análisis de las secuencias

Las secuencias se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.gov) utilizando el programa BLAST-N. Como criterio de identificación se utilizó un valor de homología mayor al 90%.

Identificación de razas de Fol mediante cultivares diferenciales de tomate

A la par de la identificación molecular se realizó la identificación empleando cultivares diferenciales de semillas de tomate. Los genotipos empleados fueron Bonny Best (sin genes de resistencia), N6394 (resistencia a raza 1), Walter (resistente a raza 2) e I3R3 (resistente a raza 3). Las semillas de cada variedad primero fueron desinfectadas en una solución de EtOH (70%) por 2 min, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) (0.12%) durante 10 min, finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril de 1 min cada uno y se secaron las semillas en papel estéril.

En placas de agar-agua 2%, se colocaron las semillas de cada variedad y se dejaron incubar por 72 h para seleccionar semillas germinadas.

Para preparar el inóculo, a placas de FoC1, FoC2 y ForIC3 de 7 días de crecimiento se les adicionaron 10 ml de agua destilada estéril y se raspo la superficie del micelio con una espátula Drigalsky y se recuperó la suspensión de conidios de cada una, posteriormente se ajustó el número de conidios a una concentración de 1×10^4 usando una cámara de Neubauer.

Para la inoculación de las semillas, se colocaron 4 semillas germinadas en placas de agar-agua al 2% a las cuales se adicionaron 10 μ l de inóculo, esto se realizó por triplicado, y las placas fueron colocadas de manera vertical e incubadas en un fotoperiodo de 8:16 h luz/oscuridad a una temperatura de 25°C.

La estimación de la severidad se llevó a cabo de 5 a 10 días después de la inoculación, evaluando la incidencia de las plántulas con síntomas y la severidad mediante la siguiente escala (Apodaca *et. al.*, 2001): 0= sin síntomas visibles; 1= puntos necróticos aislados en el hipocótilo y/o en hojas cotiledonales; 2= oscurecimiento en la base del hipocótilo; 3=lesión necrótica de 1-5 mm en la base del hipocótilo; 4= lesión necrótica de 6-10 mm en la base del hipocótilo; 5= lesión necrótica mayor a 11mm en la base del tallo o hipocótilo.

Posteriormente los datos son convertidos a porcentaje de severidad mediante la siguiente fórmula:

$$S = \frac{(\sum nV)}{5N} \times 100$$

Donde:

S=Índice de severidad

n=Número de plantas por cada categoría

V=valor numérico de cada categoría

N=Número de plantas en una unidad experimental

De acuerdo a los resultados de severidad (S), se tomará como referencia lo propuesto por Apodaca en 2001 en el cual se considerarán como genotipos susceptibles a aquellos con una severidad superior al 25%.

Resultados

Identificación de *Fusarium* spp.

La identificación de la especie de las cepas empleadas de *Fusarium* spp., se muestran en la Tabla 16, donde se mostró que *F. sp1* y *F. sp2* correspondieron a la especie *oxysporum* con una identidad de 99-100%. Para la cepa de *F. oxysporum* se obtuvieron las secuencias de la *endo* y *exo* poligalacturonasa donde los patrones de amplificación coincidieron con lo reportado con Hirano y Arie en 2006, esto con la amplificación del fragmento de la *endo* poligalacturonasa y específicamente con el oligonucleótido uni de la región de FORL (Fig.14).

Tabla 16. Identificación molecular de género y especie de *Fusarium* spp.

Muestra	Bases	Descripción	Query cover	E-value	Identidad
<i>F. sp1</i>	543	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	0.0	100%
<i>F. sp2</i>	544	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	0.0	100%
<i>F. oxysporum</i>	666	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radici lycopersici</i>	100%	0.0	100%

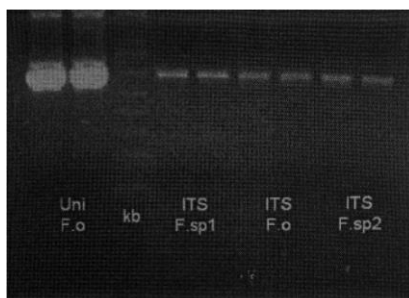


Figura 14. Patrón de amplificación de los productos de PCR de fragmentos de ADN de *F. oxysporum* y FORL. Los oligonucleótidos empleados fueron uni (670-672 pb) ITS1-ITS4 (620 pb).

Identificación de razas de *Fusarium* mediante cultivares diferenciales

Todos los genotipos evaluados fueron susceptibles para las razas 1, 2 y 3 (Tabla 17). Para *F. sp1* y *F. sp2* los resultados coincide con lo obtenido en la identificación molecular, de que no se trata de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tabla 17. Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Aislados	Variedades diferenciales			
	Bonny Best	N6394	Walter	I3R3
<i>F. sp1</i>	S	S	S	S
<i>F. sp2</i>	S	S	S	S
<i>F. oxysporum</i>	S	S	S	S

S: susceptible

Conclusión

A pesar de que no se llegó hasta la identificación de la forma especial de las cepas de *F. sp1* y *F. sp2*, el uso de cultivares diferenciales, acompañado de la identificación molecular hizo referencia a que no se trata de la forma especial *lycopersici* (Fol) sino de otra forma especial como *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* (Forl) ya que FoC1 proviene de un aislado de campo que presentaba sintomatologías propias de fusariosis.

A partir de este momento emplearemos las siguientes claves para las cepas identificadas:

Fusarium sp1 = FoC1

Fusarium sp 2 = FoC2

Fusarium oxysporum f. sp. *radices-lycopersici* = ForlC3

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*

Método de dilución en agar

Se empleó el método de dilución en agar (Márquez), que consistió en la adición de los extracto sobre el medio PDA esterilizado. Una vez solidificado el medio de cultivo se inocularon las placas con discos de las especies de FoC1, FoC2 y ForIC3. Por otro, lado se evaluaron los extractos polares (metanólico, metanólico total y acuoso) a concentraciones de 6, 4 y 2% las cuales fueron inoculadas con discos de la especie ForI 1045. El crecimiento radial del hongo se midió cada 24 horas y se reporta como porcentaje de inhibición.

Resultados

Se empleó como vehículo dimetilsulfoxido (DMSO) al 2%; debido a la baja solubilidad de los componentes de los estos extractos hexánicos y diclorometánicos estos se trabajaron a concentraciones de 0.5%, los extractos de mayor polaridad (metanólico, metanólico total y acuoso) se evaluaron a concentraciones del 2%. El porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial de las tres cepas se muestra en las Tablas 18 y 19. Por otro lado para evaluar la cepa ForI, los extractos se emplearon a concentraciones de 6, 4 y 2%.

Bouvardia ternifolia

La Tabla 18 muestra el porcentaje de inhibición de los extractos de hojas de *B. ternifolia* sobre las tres cepas de *Fusarium* spp., donde TrHhex y TrHdcm mostraron afectaciones en el crecimiento con valores menores a un 13%. En la misma concentración (0.5%) TrHa y TrHmt favorecieron el crecimiento con respecto al control en el caso de TrHa promovió el crecimiento radial de FoC2 un 32.5%. Cuando se incrementó la dosis a 2% este resultado se invirtió produciendo una inhibición de crecimiento 23.5%. TrHm redujo el crecimiento de manera significativa en las tres cepas alcanzando 30.9% para FoC1 a las 72 horas. Este resultado sugiere que al hacer extracciones sucesivas del material vegetal ayudo a concentrar el o los metabolitos con actividad antifúngica de polaridad media alta en el extracto metanólico, esto explica el comportamiento del extracto metanólico total el cual al incrementar la dosis invierte el efecto promotor del crecimiento a un efecto antagónico alcanzando un 19% de inhibición. Este mismo comportamiento fue observado en los extractos de tallos TrTa y TrTmt. TrThex no tiene efecto inhibitorio frente a las cepas de *Fusarium*, mientras que ForIC3 al estar en contacto con TrTdcm mostró una disminución en su crecimiento radial en un 20%. El extracto metanólico de TrT mostro la mejor actividad al con un 36% de inhibición de la especie FoC2, observándose una relación dosis respuesta frente a las tres cepas.

Hamelia patens

En cuanto a la inhibición del crecimiento micelial de las cepas de *Fusarium* frente a los extractos de hojas de *H. patens* (Tabla 19), BHhex y BHdcm presentaron porcentajes de inhibición del 38% y 39% respectivamente para FoC1, durante las primeras 24 horas, hasta alcanzar valores inferiores al 11% en 72 horas. Con respecto al extracto metanólico y el total se observa una marcada diferencia entre ambos, al parecer al enriquecer el extracto con componentes de mayor polaridad se favorecen la inhibición del crecimiento (ver Figuras 8 y 9), esto se confirma al evaluar a concentraciones de 2% frente a FoC1 el porcentaje de inhibición fue 53% para BHm, y BH total solo alcanzo inhibir solo el 18%. Los componentes polares de BH acuoso a concentraciones mínimas no favorecen la inhibición, sino que incluso estimulan el

crecimiento fúngico. Muy posiblemente los componentes inhibitorios presentes en este extracto se encuentran en mínimas cantidades puesto que al evaluar a una concentración mayor (2%) se observa un repunte en su actividad inhibitoria alcanzando un 15% para la especie FoC2. Estos resultados convierten BHm como potencial fuente de metabolitos antifúngicos, en base a estos resultados es imperante realizar los experimentos cromatográficos necesarios para tratar de aislar, identificar y elucidar estructuralmente el o los componentes que le pudieran conferir dicha actividad. En la evaluación de los tallos se observó que usando al 0.5% el extracto BThex, este presentaba una actividad inhibitoria prometedora frente a las tres cepas, ya que la actividad se mantiene estable o por arriba del 20% hasta las 72 horas, mientras que BTdcm mostró una actividad antagonica sobre ForIC3 (17.6%) y FoC2 (22%). BTm a la menor concentración (0.5%) no inhibió el crecimiento, sino al contrario lo aumento hasta en un 26% en el caso de ForIC3. Al incrementar la concentración a 2% se observó que BTm provoco una disminución del crecimiento del 44% a las 24 horas el cual decae hasta un 18% a las 72 horas para la misma especie, lo que nos hace suponer que el hongo tiene la capacidad de activar los mecanismos necesarios para degradar y/o desactivar los componentes antagonicos de su crecimiento.

Debido a que los extractos de mayor polaridad fueron los que mostraron el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de cepas de las cepas de *Fusarium*, se evaluaron únicamente los extractos metanólicos de la extracción consecutiva, los extractos metanólicos totales y los acuosos de ambas plantas frente a la cepa ForI 1045, empleando además concentraciones mayores (4 y 6%). Al evaluar los extractos de *B. ternifolia* (Tabla 21) se observó que a pesar de que se incrementaron las concentraciones de extracto hasta un 6%, estos no mostraron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de este hongo, por el contrario, estos promovieron su crecimiento.

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de extractos de hojas de *B. ternifolia* sobre el crecimiento de *Fusarium* spp.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> spp.						
<i>Fusarium</i>	Extracto	0.5%	2%	Extracto	0.5%	2%
FoC1	**TrHhex	12.4 ± 0.4*		**TrThex	4.40.4 ± 0.4*	
FoC2		7.7 ± 0.5*			-1.1 ± 0.5*	
ForIC3		9.9 ± 0.4*			2.1 ± 0.6*	
FoC1	**TrHdcm	-2.7 ± 0.4*		**TrTdcm	15.2 ± 0.5*	
FoC2		7.0 ± 0.3*			17.1 ± 0.6*	
ForIC3		1.6 ± 0.5*			19.6 ± 1.1*	
FoC1	TrHm	9.5 ± 1.1*	30.9 ± 0.6*	TrTm	3.1 ± 0.5*	38.5 ± 2.0*
FoC2		10.9 ± 0.7*	27.1 ± 1.5*		4.6 ± 0.6*	36.0 ± 1.4*
ForIC3		12.3 ± 1.1*	29.9 ± 0.7*		3.1 ± 1.2	33.2 ± 0.5*
FoC1	TrHmt	-1.5 ± 0.7*	19.0 ± 1.0*	TrTmt	-23.2 ± 0.6*	21.3 ± 1.3*
FoC2		-6.5 ± 0.9*	16.6 ± 0.7*		-30.2 ± 0.0	35.3 ± 1.0*
ForIC3		-2.3 ± 0.9*	13.6 ± 0.6*		-26.5 ± 0.0	25.7 ± 1.4*
FoC1	TrHa	-25.9 ± 0.7*	8.0 ± 0.6*	TrTa	-27.9 ± 0.4	17.6 ± 0.4*
FoC2		-32.5 ± 0.5*	23.5 ± 1.7*		-20.9 ± 1.3*	18.8 ± 1.0*
ForIC3		-25.7 ± 0.7*	20.3 ± 0.9*		-15.2 ± 1.6	13.9 ± 0.6*

**Vehículo DMSO 2%. ± Desviación estándar, Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT), hex (hexánico), dcm (dclorometánico), m (metanólico), mt (metanólico total), a (acuoso), *diferencia significativa, α=0.05, Tukey

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de extractos de hojas de *H. patens* sobre el crecimiento de *Fusarium* spp.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> spp.						
<i>Fusarium</i>	Extracto	0.5%	2%	Extracto	0.5%	2%
FoC1	**BHhex	8.2 ± 0.5*		**BTdex	20.0 ± 0.5*	
FoC2		3.7 ± 0.5*			21.8 ± 0.3*	
ForlC3		10.2 ± 0.4*			26.2 ± 0.5*	
FoC1	**BHdcm	8.6 ± 1.1*		**BTdcm	14.3 ± 0.4*	
FoC2		7.1 ± 0.6*			23.2 ± 1.6*	
ForlC3		9.6 ± 0.6*			21.0 ± 0.7*	
FoC1	BHm	15.4 ± 0.9*	53.0 ± 1.1*	BTm	-23.2 ± 0.0*	20.2 ± 0.4*
FoC2		14.6 ± 0.9*	42.4 ± 1.0*		-30.0 ± 0.0*	20.6 ± 0.7*
ForlC3		12.6 ± 1.5*	48.9 ± 0.9*		-26.5 ± 0.0*	18.2 ± 0.6*
FoC1	BHmt	1.2 ± 0.3*	18.0 ± 2.2*	BTmt	-23.2 ± 0.0*	10.6 ± 0.7*
FoC2		-0.2 ± 0.8	23.4 ± 0.9*		-3.2 ± 1.0*	7.5 ± 0.9*
ForlC3		0.8 ± 1.7	18.3 ± 0.7*		-3.3 ± 0.8*	1.4 ± 0.4*
FoC1	BHa	-24.1 ± 1.2*	-14.0 ± 0.0*	BTa	-20.2 ± 0.3**	4.0 ± 0.7*
FoC2		-10.4 ± 0.4*	22.3 ± 0.7*		-16.1 ± 0.6*	15.8 ± 1.2*
ForlC3		-11.0 ± 1.2*	16.9 ± 0.7*		-12.3 ± 1.2*	12.5 ± 1.1*

**Vehículo DMSO 2%. ± Desviación estándar, Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BT), hex (hexánico), dcm (diclorometánico), m (metanólico), mt (metanólico total), a (acuoso), *diferencia significativa, α=0.05, Tukey

Debido a que los extractos de mayor polaridad fueron los que mostraron el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de cepas de las cepas de *Fusarium*, se evaluaron únicamente los extractos metanólicos de la extracción consecutiva, los extractos metanólicos totales y los acuosos de ambas plantas frente a la cepa Forl 1045, empleando además concentraciones mayores 4 y 6%. Al evaluar los extractos de *B. ternifolia* (Tabla 20) se observó que a pesar de que se incrementaron las concentraciones de extracto hasta un 6%, estos no mostraron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial del hongo, por el contrario, estos promovieron su crecimiento.

Tabla 20. Porcentaje de inhibición de extractos *B. ternifolia* sobre el crecimiento de Forl 1045.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de Forl 1045				
Concentración (%)	Extracto	% de inhibición	Extracto	% de inhibición
6	TrHm	-12.7 ± 0.8	TrTm	-7.6 ± 1.3
	TrHmt	-35.6 ± 1.0	TrTmt	1.43 ± 0.7
	TrHa	-17.0 ± 1.1	TrTa	-
4	TrHm	-17.8 ± 0.9	TrTm	-16.7 ± 1.4
	TrHmt	-39.0 ± 1.4	TrTmt	-11.2 ± 1.3
	TrHa	-28.1 ± 0.7	TrTa	-
2	TrHm	-12.3 ± 1.8	TrTm	-12.8 ± 3.2
	TrHmt	-18.5 ± 1.5	TrTmt	-1.1 ± 1.0
	TrHa	-47.8 ± 0.0	TrTa	-17.5 ± 0.3

Trompetilla hojas (TrH), trompetilla tallos (TrT), m (metanólico), mt (metanólico total), a (acuoso), No evaluado (-)

En la Tabla 21 se muestran los resultados de la evaluación de *H. patens*. Donde BHm en una concentración de 6% incide sobre el crecimiento radial de Forl 1045, mostrando una tendencia de que a mayor tiempo mayor inhibición, este comportamiento también es observado a la concentración de 4% y 2%, aunque el porcentaje de inhibición es menor, lo que sugiere un efecto dosis-respuesta, los extractos metanólico total

y acuoso tienen un efecto antagónico a la mayor dosis evaluada, pero el efecto se va perdiendo conforme se disminuye la concentración del extracto hasta llegar a promover el crecimiento del hongo fitopatógeno. Los tallos de *B. ternifolia*, no se mostró ningún efecto adverso sobre el crecimiento de Forl 1045, sin embargo, lo que se pudo resaltar es que, a partir de las 48 h, hubo un crecimiento superior al mostrado por el control.

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de extractos *H. patens* sobre el crecimiento de Forl 1045.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de Forl 1045				
Concentración (%)	Extracto	% de inhibición	Extracto	% de inhibición
6	BHm	48.6 ± 3.9	BTm	5.8 ± 1.9
	BHmt	33.5 ± 1.3	BTmt	-7.1 ± 1.4
	BHa	8.9 ± 2.5	BTa	-13.3 ± 1.2
4	BHm	38.1 ± 4.5	BTm	-10.6 ± 2.4
	BHmt	17.1 ± 2.0	BTmt	-22.8 ± 1.4
	BHa	-8.5 ± 2.0	BTa	-33.8 ± 1.7
2	BHm	25.0 ± 1.0	BTm	-13.5 ± 1.0
	BHmt	-16.0 ± 1.2	BTmt	-10.8 ± 0.7
	BHa	-18.7 ± 2.7	BTa	-22.2 ± 0.4

Bayetilla hojas (BH). Bayetilla tallos (BT), m (metanólico), mt (metanólico total), a (acuoso).

Estos resultados sobre Forl1045, aunado a lo obtenido sobre las cepas de *Fusarium* hacen referencia a que el o los metabolitos presentes en el extracto metanólico consecutivo muestran un efecto más prometedor sobre el crecimiento y desarrollo de *Fusarium*, sin embargo, estos metabolitos posiblemente están en mínimas concentraciones lo que provoca que se pierda la inhibición conforme se disminuye la dosis.

Conclusión

Los resultados obtenidos sobre Forl1045, aunado a lo obtenido sobre las otras cepas de *Fusarium* hacen referencia a que el o los metabolitos presentes en el extracto metanólico consecutivo muestran un efecto prometedor sobre el crecimiento y desarrollo de *Fusarium*, sin embargo, estos metabolitos posiblemente están en mínimas concentraciones lo que provoca que se pierda la inhibición conforme se disminuye la dosis. Por lo que es conveniente evaluar si muestran el mismo efecto en un modelo *in vivo*.

Actividad fitotóxica de los extractos de *Bouvardia ternifolia* y *Hamelia patens* sobre la germinación de semillas de tomate

Metodología

Método 1. Se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) certificadas TORO F1 las cuales son de tipo Saladette y presenta alta resistencia a Fol raza 1 y 2. Las semillas fueron sumergidas en 1 ml de cada extracto a la concentración de 0.5% durante 2 min, y se colocaron en una caja Petri con papel filtro Whatman el cual fue previamente humedecido con 5 ml de agua destilada estéril, se incubarán a 30°C por 120 h.

Método 2. También se empleó la variedad N6394 la cual es susceptible a las razas 2 y 3 de FOL y FORL, las semillas fueron embebidas en el extracto por 15 min y posteriormente colocadas en agar-agua al 2% y se dejaron a una temperatura de 25°C. Esto se realizó por duplicado.

Las variables a evaluar para esta prueba fueron: número de semillas germinadas para ambas variedades. Longitud de raíz y tallo para TORO F1.

Resultados

Tabla 22. Efecto de los extractos sobre la germinación de la variedad de semillas de tomate TORO F1.

Extracto	% Germinación de semillas	Longitud de raíz (mm)	Longitud de tallo (mm)	Grosor del tallo (mm)
Control	100 ± 0.0	10.35 ± 2.5	60.32 ± 12.2	0.63 ± 0.08
BHm	85 ± 0.7	11.80 ± 2.7	67.29 ± 13.6	0.74 ± 0.09*
BHmt	100 ± 0.0	10.96 ± 1.6	67.24 ± 9.5	0.70 ± 0.10*
BHa	95 ± 0.7	10.77 ± 2.2	54.21 ± 18.1*	0.67 ± 0.08
BTm	100 ± 0.0	10.74 ± 2.8	66.71 ± 16.6	0.63 ± 0.11
BTmt	95 ± 0.7	10.50 ± 2.2	60.94 ± 12.2	0.64 ± 0.09
BTa	95 ± 0.7	9.81 ± 1.3	53.90 ± 6.9*	0.64 ± 0.06
TrHm	100 ± 0.0	10.61 ± 2.8	69.12 ± 12.3*	0.63 ± 0.07
TrHmt	95 ± 0.7	12.28 ± 3.0	71.85 ± 12.6*	0.66 ± 0.08
TrHa	100 ± 0.0	10.11 ± 2.3	59.46 ± 12.6	0.67 ± 0.07
TrTm	100 ± 0.0	9.81 ± 2.4	65.53 ± 12.5	0.64 ± 0.08
TrTmt	100 ± 0.0	9.91 ± 1.9	62.30 ± 8.6	0.64 ± 0.11
TrTa	95 ± 0.7	11.73 ± 2.2	70.95 ± 11.1*	0.63 ± 0.12

Promedio ± Desviación estándar. Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BT), Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT). m (metanólico), mt (metanólico total), a (acuoso). *diferencia significativa, $\alpha=0.05$, Tukey

En la Tabla 22 se observó que, al evaluar el efecto de los extractos sobre la germinación de las semillas certificadas TORO F1, estas emergieron en su totalidad (10 semillas por tratamiento) a los 6 días, en este tiempo todos los tratamientos de los extractos no mostraron diferencias significativas, lo que nos hace pensar que los metabolitos presentes en los extractos no son tóxicos para las semillas. Las plántulas fueron sacrificadas y se midieron algunas variables como es el tamaño de la raíz de las plántulas, donde nuevamente no se observaron diferencias significativas comparadas con el control; con respecto al tamaño del tallo, el extracto BT acuoso ocasionó una disminución en el desarrollo del tallo (53.9 mm), caso contrario con lo observado con TrHm y TrTa (69.12 y 70.95 mm) que mostraron un mejor desarrollo, comparado con el control (60.32 mm), por último se evaluó el efecto sobre el grosor del tallo donde BHm y BHmt (74, 70 mm respectivamente) presentaron un efecto favorecedor en el desarrollo del tallo. Estos resultados nos sugieren que los extractos al estar en contacto con semillas de tomate no tienen efecto negativo sobre la germinación y desarrollo de las semillas.

En la Tabla 23 se observó que al embeber las semillas de tomate variedad N6394 a un tiempo mayor de 2 minutos no hubo un efecto sobre la germinación de las semillas ya que en su mayoría el porcentaje de germinación es mayor al 95%, excepto para las embebidas en los extractos de tallos de BTmt y TrTm.

Tabla 23. Efecto de los extractos sobre la germinación de la variedad de semillas de tomate variedad N6394.

Extracto	% de Germinación
Control	100 ± 1.0
BHm	100 ± 1.2
BHmt	116 ± 0.5
BHa	97 ± 2.1
BTm	95 ± 1.1
BTmt	89 ± 1.7*
BTa	100 ± 1.4
TrHm	121 ± 0.5
TrHmt	100 ± 1.2
TrHa	97 ± 2.1
TrTm	84 ± 0.7*
TrTmt	116 ± 1.0
TrTa	103 ± 0.7

Promedio ± Desviación estándar, Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BT), Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT). m (metanólico), mt (metanólico total), a(acuoso), *diferencia significativa, $\alpha=0.05$, Tukey.

En este estudio los extractos de alta polaridad de *B. ternifolia* y *H. patens* no se mostraron efectos fitotóxicos sobre la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* de las variedades TORO F1 y N6394 en relación con el control.

Conclusión

Los extractos de *B. ternifolia* y *H. patens* no muestran un efecto negativo sobre la germinación de semillas de tomate.

Evaluación del efecto de B. ternifolia y H. patens en plantas de tomate confrontadas con Forl 1045 a nivel invernadero

El bioensayo se llevó a cabo en CIIDIR-Sinaloa-IPN, se emplearon semillas de tomate variedad N6394, y se empleó la siguiente metodología:

Metodología

Desinfección superficial de semillas de tomate variedad N6394

Debido a que no se observaron diferencias entre los extractos metanólicos y los totales, para la evaluación en invernadero solo se tomaron los extractos metanólicos (extracción consecutiva) y los acuosos para ambas plantas. Las semillas fueron colocadas en tubos Falcón, a los cuales se adicionó una solución de EtOH 70% y se agitaron suavemente durante 2 min, en seguida se adicionó una solución de NaClO 0.12% y se agitaron durante 10 min, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada durante 1 min cada uno. Las semillas se dejan secar para después colocarlas en una solución de extracto al 2% las cuales se agitan suavemente durante 15 min. Al final estas semillas se colocan en cajas Petri con agar-agua 2% para su germinación durante 96 h.

Obtención de conidios de Forl 1045

Como paso inicial la cepa Forl 1045 fue crecida en cajas Petri con medio CLA (Carnation Leaf Agar, siglas en inglés) durante 7 días, esto con el fin de reactivar la cepa, posteriormente a partir de las cajas de medio CLA con FORL 1045, estas fueron resembradas en medio PDA y se incubaron durante 11 días a 28°C. Para la obtención de la solución de conidios, se agregaron 15 ml de agua destilada sobre cada una de las cajas inoculadas y con ayuda de una espátula Drigalsky se froto suavemente sobre la superficie del medio para el desprendimiento únicamente de conidios y se recuperaron en un matraz estéril. Para determinar el número de conidios/ml se realizó el conteo en una cámara de Neubauer, para ajustar a una solución de 1×10^4 conidios/ml.

Siembra de las semillas de tomate embebidas en los extractos de B. ternifolia y H. patens

Pasadas las 96 h las semillas fueron embebidas nuevamente sobre los extractos 2% durante 15 min, para posteriormente colocar cada semilla en vasos de unicel que contenían aproximadamente 100 g de sustrato (arena/vermiculita, 1:2, v/v), estas se mantuvieron a una temperatura de 18°C. Una vez que apareció la primera hoja verdadera las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de conidios de Forl 1045 a una concentración de 1×10^4 conidios/ml. La fertilización y riego se realizó de acuerdo a las necesidades de este.

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 tratamientos y 6 repeticiones.

El efecto de los extractos en plántulas de tomate contra Forl 1045, se evaluó tomando en cuenta las siguientes variables: altura de la planta, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y la severidad (Tabla 26), la cual se estimó en base a la escala reportada por Estrada, 1989:

Tabla 24. Escala para la evaluación de severidad de Forl en plantas de tomate

Nivel de Severidad	Síntomas observados
0	Sin síntomas visibles
1	Pudrición de la raíz
2	Pudrición de la raíz 0.1-2 cm de necrosis interna del tallo
3	Pudrición de la raíz 2.1-6 cm de necrosis interna del tallo
4	Pudrición de la raíz 6.1-15 cm de necrosis interna del tallo
5	Planta muerta

El Índice de severidad se calculó empleando la siguiente formula:

$$S = \frac{(\sum nV)}{5N} \times 100$$

Donde:

S= Índice de severidad

n= Número de plantas por cada categoría

V= Valor numérico de cada categoría

N= Número de plantas en una unidad experimental

Resultados

El desarrollo de la plantas previamente tratadas con los extractos no se vieron afectadas en su altura con respecto al control absoluto, sin embargo, sin embargo especímenes inoculados con Forl, mostraron una disminución de su altura en un 22%, lo cual coincide con lo ya lo reportado previamente por Cakir en 2014 quien al evaluar el efecto de Forl sobre plantas de tomate, observó que una de las afectaciones más relevantes era en su crecimiento, el mismo efecto fue observado empleando Busan30W (2-(tiocianometiltio) benzotiazol) reduciendo su altura un 12.5%, al exponer las plántulas previamente tratadas con Forl 1045, la mayoría de los tratamiento mantuvieron una altura semejante o inclusive un poco mayor al control Forl como fue el caso de BHm, BTm, TrHa y TrTm. El extracto que menor efecto protector de las plántulas presento fue TrHm con una disminución del 23% de la altura, sin embargo, todos los tratamientos presentaron un desarrollo igual o superior al tratamiento Busan (Figura 15)

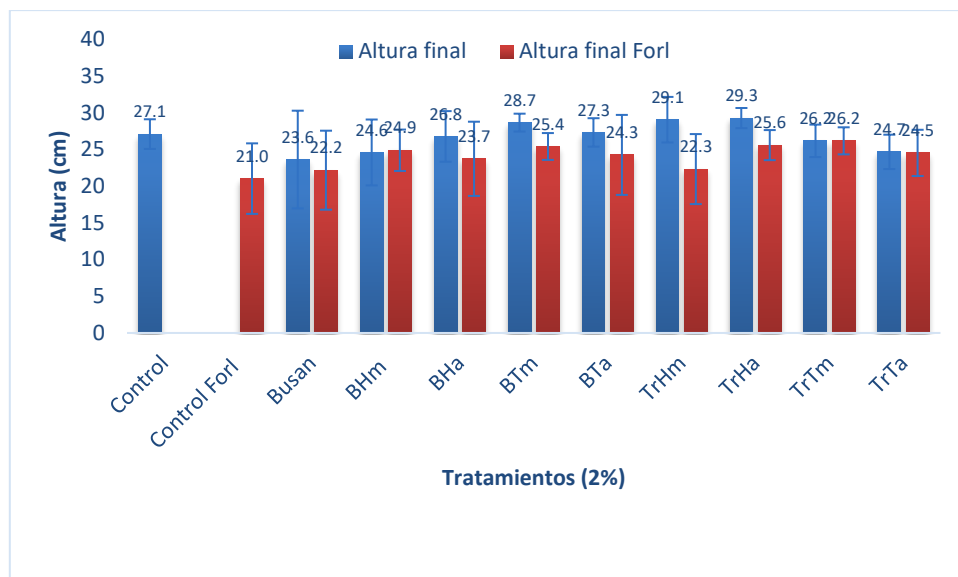


Figura 15. Altura de las plantas tratadas con extractos e inoculadas con Forl.

Al determinar el peso seco de las partes aéreas y raíz de las plantas tratadas únicamente con extracto y las inoculadas con Forl (Fig. 16 y 17), se pudo observar una marcada diferencia entre ellas, donde incluso las plantas tratadas con extractos presentaron resultados inferiores al control absoluto, no obstante, al estar en contacto las plantas con Forl estas presentaron un efecto favorable incluso superior al tratamiento convencional. Cabe recalcar que fue evidente el daño en la raíz de las plantas lo cual es conocido la vía en la cual *Fusarium* invade...

Estos resultados muestran que efectivamente el extracto metanólico de *H. patens* de hojas y tallo tiene un efecto antifúngico frente a Forl 1045, por lo que sería necesario evaluar estos extractos bajo las mismas condiciones a una concentración mayores y compararlo con estos resultados. Por otro lado, es importante resaltar que los extractos de *B. ternifolia* no mostraron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Forl, en los estudios en placa (*in vitro*), aparentemente estos extractos promovían su crecimiento fúngico, sin embargo, al llevar a cabo un modelo *in vivo*, se observó que los extractos de hojas y tallos tienen un efecto protector hacia la planta cuando es expuesta al patógeno.

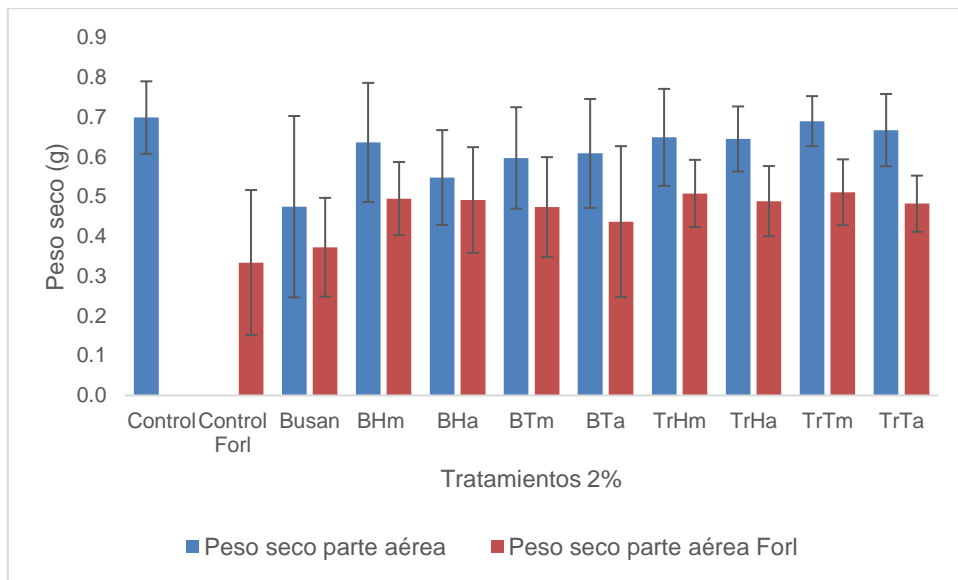


Figura 16. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en presencia de extractos e inoculadas con Forl.

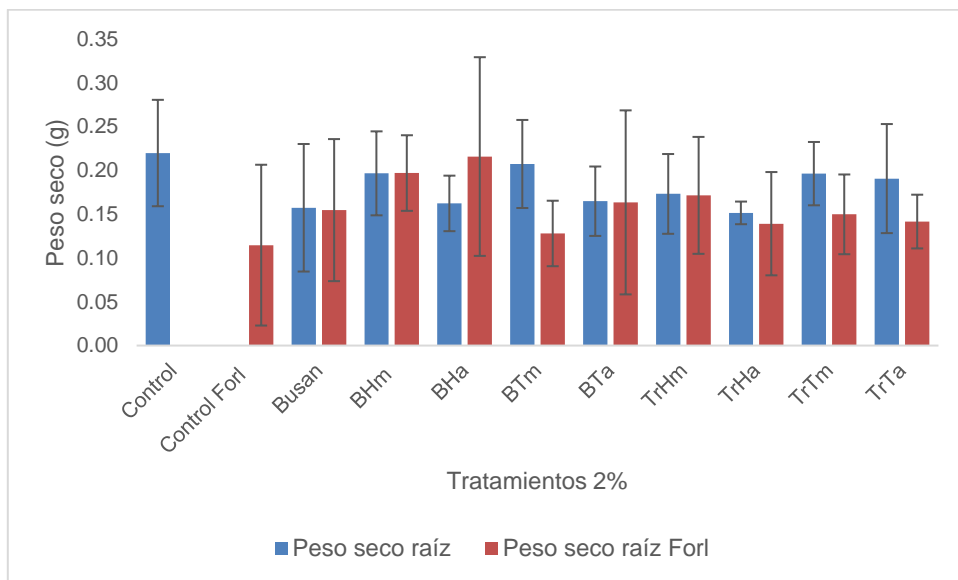


Figura 17. Peso seco de raíz de plantas de tomate en presencia de extractos e inoculadas con Forl.

En base a los resultados obtenido se calculó el índice de severidad que presentaron las plantas. Encontrando que los extractos producen un efecto protector en las plantas cuando son confrontadas a Forl 1045, los tratamientos metanólicos y acuoso *Bouvardia ternifolia* mostraron que a concentraciones del 2%, el índice de severidad era menor al mostrado por el antifúngico control, por su parte *Hamelia patens* (BHm y BRm) tienen un efecto protector similar al Busan 30w, estos resultados convierten a estas dos plantas en buenos candidatos como fuente de antifúngicos (Figura 18).



Figura 18. Índice de Severidad de los tratamientos con extractos de *B. ternifolia* y *H. patens* sobre plantas de tomate infestadas con Forl 1045.

Conclusión

Los extractos de alta polaridad presentaron un efecto en la protección de plántulas de tomate infestadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* (Forl1045), por lo que es necesario realizar más estudios que permitan esclarecer el posible mecanismo de acción ya que ambas plantas presentaron diferencias en cuanto a la forma de ejercer su efecto frente al hongo y la planta.

Actividad inhibitoria de enzimas hidrolíticas de *Fusarium spp* frente a *Bouvardia ternifolia* (cav.) Schlttl y *Hamelia patens* Jacq

Metodología

Una vez demostrado que las cepas empleadas tienen la capacidad de producir las enzimas de interés al ser capaces de crecer usando como única fuente de carbono los diferentes sustratos y observar que el crecimiento radial es similar al mostrado en un medio convencional como lo es agar papa-dextrosa, se procedió a evaluar de manera cuantitativa la capacidad celulolítica en medio líquido. Cabe recordar que en esta evaluación las variables a considerar fueron: número de conidios, biomasa, azúcares reductores (método DNS) y actividad enzimática mediante la cuantificación de azúcares reductores.

Evaluación de la actividad celulolítica de *Fusarium spp*.

FoC2 presentó el mayor número de conidios a las 96 horas con 2.7×10^7 conidios/ml, seguido de ForIC3 con 2.63×10^7 conidios/ml a las 72 horas, y FoC2 alcanzó el máximo de conidios a las 120 horas (1.60×10^7 conidios/ml). El análisis microscópico mostró la presencia de microconidios y macroconidios para ForIC3 y FoC2, mientras que FoC1 solo se observó la presencia de microconidios. En las tres cepas no se observaron evidencias de lisis celular durante los 6 días de evaluación. Una vez centrifugadas las muestras, se cuantificaron azúcares reductores por el método de DNS. Hubo evidencia de azúcares reductores a partir de las 48 horas sugiriendo que ForIC3 y FoC2 muy probablemente enfocan su mecanismo celulítico y los productos de degradación en su crecimiento y reproducción alcanzando un mayor número de conidios entre las 72 y 96 horas, mientras FoC1 mantiene un ritmo más lento en lo que respecta a la conidiación lo que confirma el origen de esta especie al mostrar un comportamiento distinto, teniendo dos máximos de conidiación uno a las 48 horas y el otro a 120 horas alcanzando la mayor producción en este tiempo, su producción de azúcares reductores se mantiene a la par con las otras dos especies. Podemos pensar que en esta especie la producción de conidios no influye en la actividad enzimática por lo que hace necesario repetir este experimento y cuantificar proteínas para obtener la actividad específica y poder confirmar o desechar esta teoría (Figura 19).

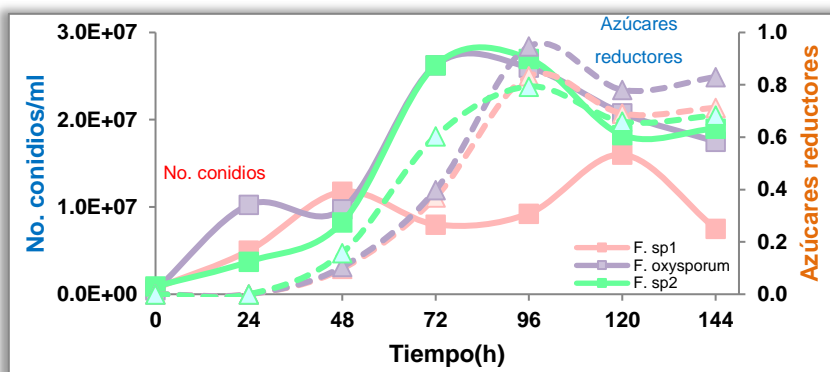


Figura 19. Número de conidios (líneas sólidas) y azúcares reductores (líneas punteadas) de *Fusarium spp*.

ForIC3 y FoC1 fueron los que presentaron la mejor actividad enzimática con valores de 0.45 y 0.38 gramos de glucosa por litro respectivamente, mostrando ambas cepas las mismas tendencias de actividad durante los 6 días, FoC2 mostró su mejor actividad hasta las 96 horas (Figura 20). Sin embargo, la actividad

enzimática no se pudo correlacionar con el número de conidios producidos, al parecer para el caso de FoC1 aislado mostró una mejor correlación con la biomasa producida (Figura 21) lo que puede ser indicativo de que sea el micelio el responsable de segregar la mayor cantidad de celulasas.

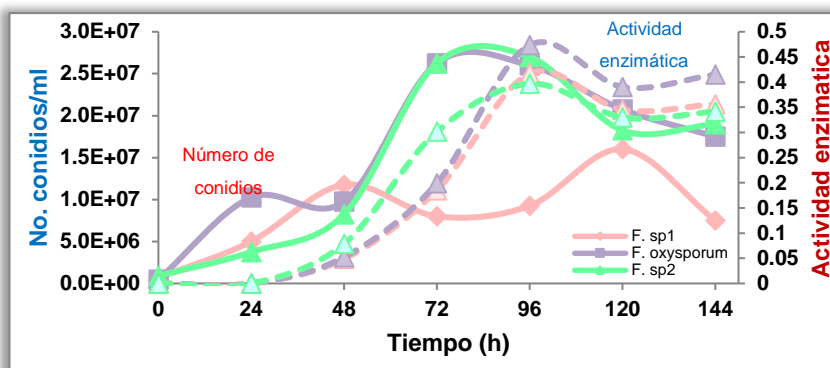


Figura 20. Número de conidios (líneas sólidas) y actividad enzimática (líneas punteadas) de *Fusarium* spp.

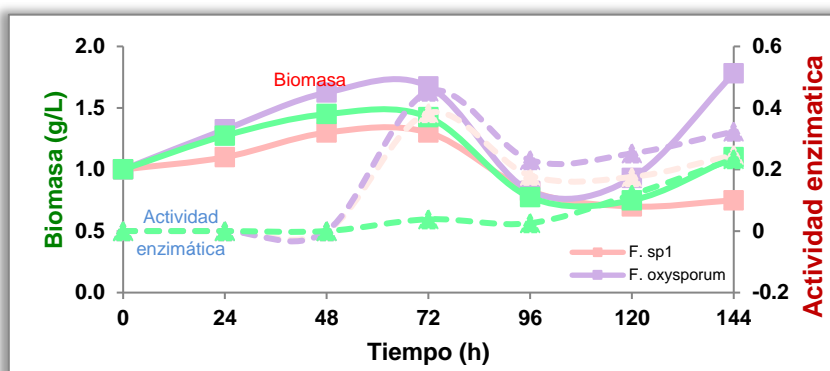


Figura 21. Actividad enzimática (líneas punteadas) y biomasa (líneas sólidas) de *Fusarium* spp.

Actividad celulolítica de *Fusarium oxysporum* frente a extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

Se empleó un medio mineral que contenía carboximetilcelulosa al 1% con extractos metanólicos y acuosos de *B. ternifolia* y *H. patens* a una concentración del 0.5%. El medio fue inoculado con una concentración de 1×10^4 conidios/ml de ForIC3. Los medios se mantuvieron a 30°C y 120 rpm. Cada 24 horas se realizó conteo de conidios, cuantificación de biomasa, azúcares reductores y proteína (método BCA); evaluación de la actividad enzimática (método DNS) y determinación de la actividad específica.

En la Tabla 27 se muestra el comportamiento de ForIC3 a lo largo de 10 días. A las 96 horas se pudo observar la mejor actividad enzimática y específica. Pasadas 24 horas se observó un marcado incremento en la producción de azúcares reductores producto de la actividad hidrolítica de las enzimas de interés en base a esto resultados se reportan el efecto de los extractos sobre ForIC3 a las 96 horas.

Tabla 25. Evaluación de la actividad celulolítica de ForIC3.

Tiempo (h)	No. Conidios	Biomasa (mg/ml)	Azúcares reductores ($\mu\text{mol/ml}$)	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
0	0.0E+00	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	0.5E+06	1.1	0.5	0.05	0.05	0.05
48	1.0E+06	1.3	0.5	0.05	0.05	0.05
72	0.8E+06	1.3	0.5	0.05	0.05	0.05
96	0.9E+06	0.8	0.5	0.05	0.05	0.05
120	1.6E+06	0.7	0.5	0.05	0.05	0.05
144	0.8E+06	0.8	0.5	0.05	0.05	0.05

0	5.00E+04 ± 2.11E+04	0.87	0.00 ± 0.00	0.00	0.03	0.00
24	5.00E+04 ± 2.11E+04	1.00	0.01 ± 0.00	0.01	0.45	0.01
48	3.18E+06 ± 1.76E+05	0.80	0.37 ± 0.04	0.78	1.28	0.61
72	5.75E+06 ± 4.74E+05	1.34	0.82 ± 0.01	0.44	1.09	0.41
96	4.50E+06 ± 6.15E+05	1.22	0.22 ± 0.01	1.74	1.07	1.63
120	2.00E+06 ± 5.16E+05	1.40	1.53 ± 0.02	0.01	1.52	0.005
144	7.50E+06 ± 6.67E+05	1.90	1.46 ± 0.03	1.71	1.90	0.90
168	8.00E+06 ± 9.94E+05	1.35	1.06 ± 0.01	1.53	1.73	0.88
192	7.00E+06 ± 1.02E+06	1.55	0.93 ± 0.01	1.92	1.14	1.68
216	7.50E+06 ± 1.08E+06	1.18	1.75 ± 0.00	0.06	2.08	0.03
240	6.00E+06 ± 6.75E+05	0.93	1.39 ± 0.02	2.16	3.20	0.68

± Desviación estándar.

En la Tabla 28, el extracto metanólico de los tallos de *B. ternifolia* (TrTm) ocasiono un aumento en la concentración de proteínas (3.35 mg/ml) y una mayor actividad enzimática (4.24 U/ml), provocada por los extractos, resultando en la mayor actividad específica (1.27 U/mg) al ser comparado con el control (1.63 U/mg). Los extractos de *H. patens* en particular hojas metanólico a pesar de tener un alto contenido de proteína (3.55 mg/ml) tiene un mejor efecto inhibitorio sobre la producción de celulasas, al reportar una baja actividad enzimática (1.32 U/ml) y la menor actividad específica (0.37 U/mg), esto sugiere que ForIC3 no solo enfoca su metabolismo enzimático a la producción de celulasas en presencia de los componentes de este extracto, sino que pueden estar implicadas la secreción de más enzimas. Estos resultados convierten a el extracto de tallos de *H. patens* en un candidato para la inhibición del metabolismo de las proteínas de interés

Tabla 26. Evaluación de la actividad celulolítica de *F. oxysporum* frente a extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

Extracto	96 h					
	No. Conidios	Biomasa (mg/ml)	Azúcares reductores (µmol/ml)	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
Control	4.50E+06 ± 6.15E+05	1.22	0.22 ± 0.01	1.74	1.07	1.63
BHm	7.00E+06 ± 9.07E+05*	2.06	1.34 ± 0.00	1.32	3.55	0.37
BHmt	4.50E+06 ± 6.58E+05	3.13	0.79 ± 0.03	1.36	2.65	0.51

BHa	2.08E+07 ± 9.44E+05*	2.26	1.86 ± 0.01	1.94	4.85	0.40
BTm	1.25E+07 ± 1.08E+06*	2.22	0.77 ± 0.00	1.12	1.49	0.76
BTmt	9.50E+06 ± 6.99E+05*	2.35	0.34 ± 0.00	1.16	1.91	0.61
BTa	4.00E+06 ± 7.15E+05	1.94	0.54 ± 0.00	1.35	2.36	0.57
TrHm	1.58E+07 ± 8.18E+05*	2.74	2.25 ± 0.01	3.99	7.51	0.53
TrHmt	1.25E+07 ± 1.15E+06*	3.00	2.26 ± 0.00	3.98	4.68	0.85
TrHa	7.00E+06 ± 1.02E+06*	2.41	2.17 ± 0.004	1.82	4.23	0.43
TrTm	1.28E+07 ± 9.26E+05*	2.86	1.05 ± 0.00	4.24	3.35	1.27
TrTmt	3.50E+06 ± 4.22E+05*	2.43	1.59 ± 0.00	1.72	4.34	0.40
TrTa	4.00E+06 ± 3.50E+05	1.79	1.18 ± 0.002	3.73	3.46	1.08

± Desviación estándar. Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BR), Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT). m (metanol), mt (metanol total), a (acuoso). *diferencia significativa, $\alpha=0.05$, Tukey

Actividad amilolítica de ForIC3 frente a extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

Nuevamente se empleó un medio mineral que contenía almidón soluble al 1% con los extractos metanólicos y acuosos de *B. ternifolia* y *H. patens* a la concentración de 0.5%. El medio fue inoculado con 1×10^4 conidios/ml de ForIC3 de 7 días de crecimiento. Se mantuvieron a 30°C y 120 rpm. Cada 24 horas se realizó un conteo del número de conidios, la cuantificación de biomasa, azúcares reductores y proteína (método BCA); también se evaluó la actividad enzimática (método DNS) y por último se determinó la actividad específica.

En la Tabla 29 se observa el comportamiento de ForIC3 a lo largo de 7 días. A las 72 horas se observó el mayor número de conidios y con esto una buena actividad enzimática y específica, por lo que, en base a estos resultados, se tomó la decisión de reportar el efecto de los extractos sobre ForIC3 en este tiempo.

Tabla 27. Evaluación de la actividad amilolítica de ForIC3 frente a extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

Tiempo (h)	No. Conidios	Biomasa (mg/ml)	Azúcares reductores ($\mu\text{mol/ml}$)	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
0	3.25E+05 ± 2.42E+04	0.01	0.17 ± 0.00	0.00	0.00	0.00
24	1.05E+06 ± 7.38E+04	0.03	0.15 ± 0.03	1.01	1.18	0.28
48	5.15E+06 ± 1.06E+05	0.03	0.82 ± 0.04	1.53	2.00	0.20
72	8.75E+06 ± 7.17E+05	0.01	0.57 ± 0.01	1.27	1.61	0.22

96	6.00E+06 ± 5.87E+05	0.01	4.76 ± 0.06	0.59	0.72	0.00
120	5.50E+06 ± 4.59E+05	0.01	6.04 ± 0.05	0.30	0.50	0.00
144	1.05E+07 ± 3.16E+05	0.01	0.11 ± 0.00	0.25	0.51	0.14

± Desviación estándar. Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BR), Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT). m (metanol), mt (metanol total), a (acuoso).

En la Tabla 30 se puede observar que los extractos de *H. patens* de hojas metanólicos (consecutivo y total) nuevamente muestra un efecto sobre la conidiación al presentar un menor número de estos (5.75×10^6 conidios/ml), mientras se observa una actividad enzimática superior al control, pero una baja actividad específica (0.14U/mg respectivamente), lo que nos indica que no son en su totalidad amilasas las que secreta ForIC3 al estar en contacto con estos extractos. Caso contrario a lo presentado por el extracto de *B. ternifolia* hojas acuoso que tiene un efecto contrario al caso anterior ya que mostró una alta actividad enzimática ($14.33 \mu\text{mol/ml}$) así como una mayor actividad enzimática 1.60 U/mg).

Tabla 28. Evaluación de la actividad amilolítica de ForIC3 frente a extractos de *B. ternifolia* y *H. patens*.

72 h						
Extracto	No. Conidios	Biomasa (mg/ml)	Azúcares reductores ($\mu\text{mol/ml}$)	Actividad enzimática (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
Control	8.75E+06 ± 7.17E+05	0.01	0.57 ± 0.01	1.27 ± 0.05	1.61 ± 0.00	0.22 ± 0.00
BHm	5.75E+06 ± 5.80E+05	0.0002	2.13 ± 0.00	3.21 ± 0.00	4.08 ± 0.06	0.14 ± 0.00
BHmt	2.33E+07 ± 1.81E+06	0.012	1.82 ± 0.01	1.86 ± 0.02	1.99 ± 0.02	0.17 ± 0.00
BHa	3.25E+07 ± 1.55E+06	0.015	2.88 ± 0.02	7.12 ± 0.03	5.39 ± 0.06	0.24 ± 0.00
BTm	4.18E+07 ± 2.10E+06	0.008	2.93 ± 0.00	6.57 ± 0.10	5.04 ± 0.16	0.23 ± 0.00
BTmt	2.93E+07 ± 1.53E+06	0.002	2.35 ± 0.00	3.95 ± 0.11	5.29 ± 0.001	0.13 ± 0.00
BTa	5.20E+07 ± 1.82E+06	0.003	3.10 ± 0.06	1.96 ± 0.00	2.12 ± 0.16	0.26 ± 0.00
TrHm	1.55E+07 ± 9.49E+05	0.008	3.42 ± 0.07	3.15 ± 0.01	5.27 ± 0.01	0.11 ± 0.00
TrHmt	1.05E+07 ± 6.77E+05	0.002	3.31 ± 0.01	3.54 ± 0.00	4.91 ± 0.03	0.13 ± 0.00
TrHa	3.27E+07 ± 1.08E+06	0.006	8.55 ± 0.12	14.33 ± 0.004	1.61 ± 0.00	1.60 ± 0.00
TrTm	1.48E+07 ± 9.66E+05	0.005	1.79 ± 0.13	2.93 ± 0.00	4.29 ± 0.00	0.12 ± 0.00
TrTmt	1.53E+07 ± 6.58E+05	0.010	2.17 ± 0.00	3.90 ± 0.00	4.71 ± 0.00	0.15 ± 0.00
TrTa	3.38E+07 ± 1.22E+06	0.010	4.10 ± 0.05	8.64 ± 0.002	5.51 ± 0.08	0.28 ± 0.00

± Desviación estándar. Bayetilla hojas (BH), Bayetilla tallos (BR), Trompetilla hojas (TrH), Trompetilla tallos (TrT). m (metanol), mt (metanol total), a (acuoso).

Estos resultados nos muestran que los extractos de hojas metanólicos de *H. patens* puede inhibir enzimas como celulasas y amilasas las cuales han sido relacionadas como paso importante durante el proceso de infección de *Fusarium*, esto puede ser debido a la presencia de compuestos de origen fenólico en el extracto, ya que de acuerdo a Srivastaba *et al* en 2013 reportó que compuestos fenólicos como el ácido benzoico inhiben el crecimiento radial de aislados de *Botryospheria* en un 100%, así como la inhibición de enzimas celulolíticas y pectinolíticas, caso similar a lo reportado por Senthil *et al.*, en 2013 que atribuyen la actividad inhibitoria de enzimas pectinolíticas y amilolíticas de *Colletotrichum gloesporoides* a los compuestos fenólicos presentes en las plantas evaluadas, sin embargo al evaluar la inhibición de las enzimas encontraron que mientras un extracto puede inhibir a dichas enzimas incluso mejor que un fungicida químico como el Dithan® M-45, otro puede influir en la producción de estas, caso que es observado en nuestros extractos. Lo que nos indica que son diferentes los posibles mecanismos de acción por los cuales actúan nuestros extractos.

Conclusión

Al emplear carboximetilcelulosa y almidón como sustrato y única fuente de carbono, los extractos de *H. patens* y *B. ternifolia* ocasionan un retraso en la secreción de enzimas celulolíticas y amilolíticas. Los extractos metanólicos de las hojas de *H. patens* presentan el mejor efecto inhibitorio de amilasas.

VI Análisis cromatográfico del extracto metanólico de hojas de *Hamelia Patens*.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, el extracto metanólico y el extracto metanólico de *H. patens* de la extracción presentaron el mejor efecto sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa, además de mostrar un efecto sobre la disminución de los niveles de glucosa en sangre de ratones diabéticos, así como presentaron el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de especies de *Fusarium*, seguido de un efecto inhibitorio sobre la secreción de las enzimas celulasas y amilasas, estos extractos fueron sometidos a un análisis cromatográfico por HPLC para conocer los metabolitos presentes en estos extractos y si alguno de ellos puede ser el responsable de dichas actividades.

Metodología

Análisis cualitativo de los extractos metanólico de *H. patens* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis fue llevado a cabo empleando un equipo Agilent serie 1100 con un detector de arreglo de diodos (DAD). Se utilizó una columna analítica XBD-C18 con un tamaño de partícula de 4.6 x 150 mm a una temperatura de 60°C. La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 1 mL/min con una fase móvil de ácido fórmico 0.2% (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B). Los extractos fueron eluidos mediante el siguiente sistema de elución a 253 290 y 349 nm.

Disolvente A	Disolvente B	Tiempo
100%	0%	3 min
90%	10%	3 min
85%	15%	3 min
80%	20%	3 min
70%	30%	3 min
60%	40%	3 min
50%	50%	15 min

Se emplearon algunos estándares comerciales: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido trans-cinámico, ácido trans-ferúlico, ácido siríngico, cafeína, (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, naringenina, quercetina and rutina. Los compuestos fueron detectados y comparados con estos estándares, basados en el tiempo de retención y su espectro de UV.

Fraccionamiento y elucidación estructural del extracto metanólico de *Hamelia patens* (BHm)

El siguiente paso fue realizar un fraccionamiento cromatográfico por columna abierta del extracto metanólico consecutivo. La columna fue empacada con gel de sílice (malla de 230-400) empleando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, de la cual se colectaron 63 eluatos, los cuales fueron seguidos por CCF y se reunieron en 19 fracciones (F1-F19).

A la fracción 10 (F-10) se le realizaron dos lavados uno con diclorometano y otro con metanol, y el lavado con metanol nuevamente se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna en gel de sílice con CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil de la cual se obtuvieron 33 eluatos y mediante CCF se reunieron en 9 fracciones de la cual se obtuvo un compuesto puro (sólido café claro), el cual se analizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H y ¹³C).

Resultados

En la Figura 22, se muestra el cromatograma obtenido de los extractos metanólicos de *H. patens* (BHm y BHmt), en los cuales se pudo observar como principal componente al ácido clorogénico con un 19.5% para BHm y 13.5% para BHmt, también se detectó la presencia de catequina y epicatequina, estos resultados coinciden con lo reportado por Wong Paz *et. al.*, en 2017 quienes realizaron un análisis cromatográfico por HPLC del extracto etanólico de hojas de *H. pates*. En este análisis también se observó una diferencia en cuanto a la concentración de los metabolitos para ambos extractos. Como siguiente punto se puede resaltar la presencia de un pico que sale a **los x min** y que está presente en el extracto de BHm pero no en el de BHmt, lo mismo sucede en BHmt se encuentra un pico **a x min** mientras que en BHm no se observa. Además, se observa una diferencia en cuanto a la concentración del compuesto que sale **a los x min**.

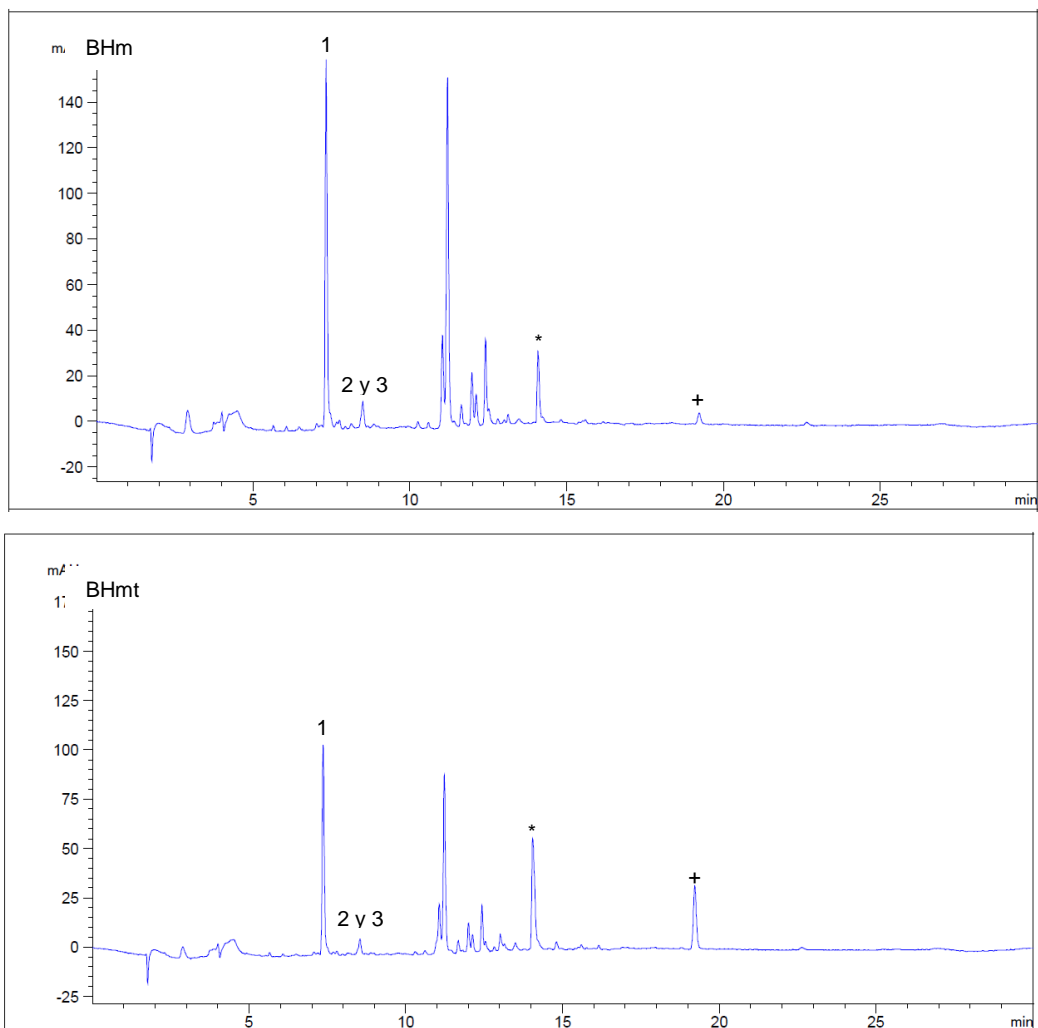


Figura 1. Cromatograma (HPLC) de los extractos metanólicos y metanólicos totales de *H. patens*. 1) Ácido clorogénico, 2) catequina, 3) epicatequina, * Diferente compuesto, + Diferente concentración.

En el espectro de RMN ^1H (400MHz, CD_3OD) (Figura 23) se muestran las señales δ : 4.816 (sl, $J=1.6$ y 8 Hz, H-2), 4.17 (ddd, $J=1.6$, 3.2, y 16.8 Hz, H-3), 2.86 (dd, $J=16.8$ y 4.4 Hz, H-4a), 2.73 (dd, $J=16.8$ y 2.8 Hz, H-4b), 5.94 (d, $J=2.4$ Hz, H-6), 5.92 (d, $J=2$ Hz, H-8), 6.97 (d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.75 (d, $J=8$ Hz, H-5'), 6.79 (dd, $J=2$ y 8.4 Hz, H-6').

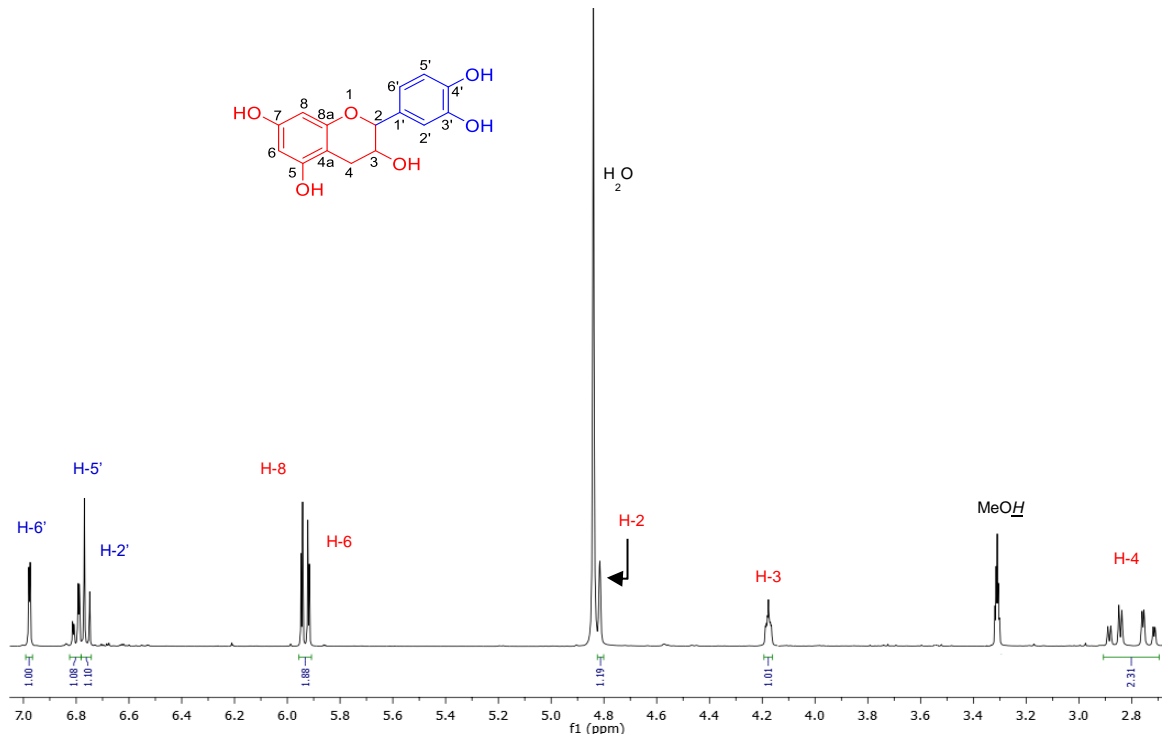


Figura 22. Espectro de RMN-1H de 1 (400 MHz, CD₃OD).

En el espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) (Figura 24) se indica la presencia de 15 señales δ: 80 (C-2), 67 (C-3), 29.5 (C-4), 100.5 (C-4a), 156 (C-5), 97 (C-6), 157 (C-7), 96 (C-8), 158 (C-8a), 132 (C-1'), 117 (C-2'), 145.5 (C-3'), 146 (C-4'), 115.5 (C-5') 119.5 (C-6').

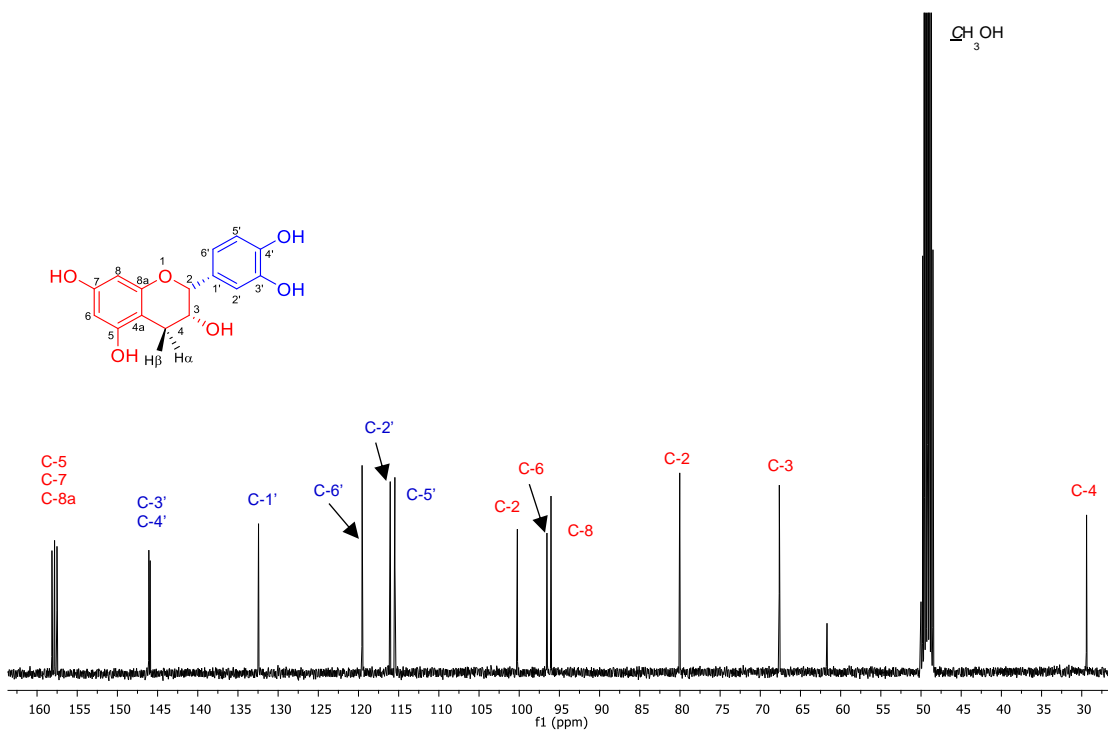


Figura 23. Espectro de RMN-13C de 1 (100 MHz, CD₃OD).

El análisis realizado a los espectros con ayuda de técnicas bidimensionales ayudó a identificar el metabolito como epicatequina, la cual ya ha sido aislada y reportada en *H. patens* por Suárez *et. al.*, en 2008 y que fue aislada del extracto de hojas de acetato de etilo (EtOAc).

A los flavan-3-ols como la epicatequina se le han atribuido un sin número de actividades, como antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que tiene la habilidad de regular enzimas antioxidantes, así como la de capturar especies reactivas de oxígeno, además de ser efectiva como anti-inflamatorio modulando la producción de óxido nítrico, mejorando la sensibilidad a la insulina, también se le atribuyen efectos anticancerígeno, antibacteriano sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas, antifúngico entre otros.

Por lo que la epicatequina podría estar implicada en los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, es necesario identificar el resto de metabolitos mayoritarios de los extractos metanólicos.

Literatura citada

- Anokwuru C P, Anyasor G N, Ajibaye O, Fakoya O, Okebugwu P. "Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three nigerian medicinal plants", *Nature and Science*, 9 (7), 53-61, 2011.
- Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza J A. "Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41 (4), 18-27, 2010.
- Esquivel-Gutiérrez E R, Noriega-Cisneros R, Bello-González M A, Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R. "Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas", *Biológicas*, 14 (1), 45-52, 2012.
- Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. "Medicinal Plants: Past history and future perspective", *J Herbmed Pharmacol*, 7 (1), 1-7, 2018.
- Gurib-Fakim A. "Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow", *Molecular Aspects of medicine*, 27, 1-93, 2006.
- Singh R. "Medicinal plants: A review", *Journal of Plant Sciences*, 3 (1-1), 50-55, 2015.
- García de Alba García J E, Ramírez-Hernández B C, Robles-Arellano G, Zañudo-Hernández J, Salcedo-Rocha A L, García de Alba Verduzco J E. "Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara", *Desacatos*, 39, 29-44, 2011.
- Muñeton Pérez P. "Dr. Erick Estrada Lugo: Plantas Medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos", *Revista Digital Universitaria UNAM*. 2017. Disponible en: https://www.oei.es/historico/divulgacioncientifica_024.htm.
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. "Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica", *CONABIO. Biodiversitas*. 62, 12-15, 2014.
- Karou S D, Tchacondo T, Ilboudo D P, Simpore J. "Sub-Saharan Rubiaceae: A review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14 (3), 149-169, (2011).
- Martins D and Nunez C V. "Secondary metabolites from Rubiaceae species". *Molecules*, 20, 13422-13495, 2015.
- Sirigiri C K. "A short review on Rubiaceae species", *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 5 (2), 179-181, 2015.
- Moreira V F, Vieira I J C, Braz-Filho R. "Chemistry and biological activity of condamineae tribe: a chemotaxonomic contribution of Rubiaceae family", *America Journal of Plant Sciences*, 6, 2612-2631, 2015.

- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/bouvardia-ternifolia/fichas/ficha.htm>, Heike Vibrans, 2009, Malezas de México, *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld., 2018.
- Bouvardia ternifolia*, *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana*. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7500>.
- Pérez-Gutiérrez R M, Pérez-González C, Zavala-Sánchez M A., Pérez-Gutiérrez S. "Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia ternifolia*, *Brickellia veronicaefolia*, y *Parmentiera edulis*", *Revista Salud Pública de México*, 40 (4), 354-358, (1998).
- Gamboa-Alvarado R, Hernández-Castillo F D, Guerrero-Rodríguez E, Sánchez-Arizpe A, Lira-Saldivar R H. "Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (de bary) con extractos vegetales metanólicos de hojaseén (*Flourensia cernua* D.C.), mejorna (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht)", *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (1), 13-18, 2003.
- ^aJiménez-Ferrer J E, Pérez-Terán Y Y, Román-Ramos R, Tortoriello J. "Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning", *Phytomedicine*, 12, 116-122, 2005.
- ^bJiménez-Ferrer E, Reynosa-Zapata I, Pérez-Torres Y, Tortoriello J. "The secretagogue effect on the poison from *Centruroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and the antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia* extract", *Phytomedicine*, 12, 65-71, 2005.
- Cornejo Garrido J, Chamorro Cevallos G A, Garduño Siciliano L, Hernández Pando R, Jimenez-Arellanes M A. "Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11 (1), 91-102, 2012.
- Herrera-Ruiz M, García-Morales G, Zamilpa A, González-Cortazar M, Tortoriello J, Aventura-Zapata E, Jiménez-Ferrer E. "Inhibition of acetylcholinesterase activity by hidroalcoholic extract and their fractions of *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Shltld (Rubiaceae)", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (6), 526-541, 2012.
- García-Morales G, Huerta-Reyes M, Gonzáles-Cortazar M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Silva-García R, Román-Ramos R, Aguilar-Rojas A. "Anti-inflammatory, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Bouvardia ternifolia*: potential implications in Alzheimer's disease", *Archives of Pharmacal Research*, 38, 1369-1379, 2015.
- Trejo-Torres J C. "El xcanaan (*Hamelia patens* Jacq., Rubiaceae) una maravilla para su jardín de casa", *Herbario CICY*, 2009. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/2009/junio/el-xcanaan-hamelia-patens-jacq-rubiaceae-una-maravilla-para-su-jardin-de-casa.

Heike Vibrans, 2009, Malezas de México, *Hamelia patens* Jacq., 2018. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/hamelia-patens/fichas/ficha.htm>.

Pérez S, Zavala M A, Vargas R, Hernández E. "Antidiarrhoeal activity of *Hamelia patens* methanol extracts in rats and mice", *Phytotherapy Research*, 10, 686-688, 1996.

Soto-Sobenis A, Castillo B, Delgado A, Gonzalez A, Montenegro R. "Alkaloid screening of herbarium samples of Rubiaceae from Panama", *Pharmaceutical Biology*, 39 (3), 161-169, 2001.

Sosa S, Balik M J, Arvigo R, Esposito R G, Pizza C, Altinier G, Tubaro A. "Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants", *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 211-215, 2002.

Camporese A, Balick M J, Arvigo R, Esposito R G, Morsellino N, De Simone F, Tubaro, A. "Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America)", *Journal of Ethnopharmacology*, 87 (1), 103-107, 2003.

Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez C A, Rivero R. "Screening of antimutagenicity via Antioxidant activity in Cuban medicinal plants", *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 241-246, 2003.

Gómez-Veloz A, Rucinski J C, Balik M J, Tipton C. "Double incision wound healing bioassay using *Hamelia patens* from El Salvador", *Journal of Ethnopharmacology*, 88 (1), 169-173, 2003.

Reyes-Chilpa R, Rivera J, Oropeza M, Mendoza P, Amekraz B, Jankowski J, Campos M. "Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium". *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27 (10), 1617-1620, 2004.

Ríos M Y, Aguilar-Guadarrama A B. "Alcaloides Indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 11 (1), 1-5, 2006.

Suárez A I, Diaz B, Tillet S, Valdivieso E, Compagnone R S. "Leishmanicidal activity of alkaloids from *Hamelia patens*", *Scientific Journal of the Experimental Faculty of Sciences*, at the Universidad del Zulia, 16 (2), 148-155, 2008.

Mena-Rejon G, Caamal Fuentes E, Cantillo-Ciau Z, Cedillo-Rivera R, Flores-Guido J, Moo-Puc R. "In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine", *Journal of Ethnopharmacology*, 121 (3), 462-465, 2009.

Khandelwal S, Sharma P, Singh T, Vijayvergia R. "Anthelmintic and antimicrobial activity of *Hamelia patens* Jacq. (Rubiaceae)". *International Journal of Natural Products Research*. 1 (3), 54-56, 2012.

Ramírez Aristizabal L S, Marín D, Jiménez González F J. "Actividad ictiotóxica y citotóxica de extractos de plantas Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Rutaceae, de la flora Colombiana", *Scientia et Technica*, 18 (3), 548-552, 2013.

Taylor P, Arsenak M, Abad M J, Fernández A, Milano B, Gonto R, Ruiz M C, Fraile S, Taylor S, Estrada O, Michelangeli F. "Screening of venezuelan medicinal plants extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines", *Phytotherapy Research*, 27 530-539, 2013.

Cornejo-Garrido J, Salinas-Sandoval M, Díaz-López A, Jácquez-Ríos P, Arriaga-Alba M, Ordaz-Pichardo C. "In vitro and in vivo antifungal activity, liver profile test, and mutagenic activity of five plants used in traditional Mexican medicine", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 2-28, 2015.

Alonso-Castro A J, Balleza-Ramos S, Hernández-Morales A, Zapata-Morales J R, González-Chávez M M, Carranza-Álvarez C. "Toxicity and antinociceptive effects of *Hamelia patens*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25 170-176, 2015.

Jiménez-Suárez V, Nieto-Camacho A, Jiménez-Estrada M, Alvarado Sánchez B. "Anti-inflammatory, free radical scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Hamelia patens* and its chemical constituents", *Pharmaceutical Biology*, 54 (9), 1822-1830, 2016.

Falta polyfenoles

Sampietro D A, Sgariglia M A, Soberón J R, Quiroga E N, Vattuone M A. "Colorimetric Reactions", Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products, Chapter 4, 78-82, 2009.

Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. "Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants", *Thai J. Pharm. Sci*, 32, 17-20, 2008.

Bello Gil D, Carrera Bocourt E, Díaz Maqueira Y. "Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico", *ICIDCA*, 40 (2), 45-50, 2006.

Cevallos-Casals B A, Cisneros-Zevallos L, "Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweetpotato", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11), 3313-3319, 2003.

Iloki-Assanga S B, Lewis-Lujan L M, Lara-Espinoza C L, Gil-Salido A A, Fernandez-Angulo D, Rubio-Pino J L, Haines D D. "Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*", *BMC Research Notes*, 8, 396, 2015.

Felhi S, Daoud A, Hajjaoui H, Mnafigui K, Gharsallah N, Kadri A. "Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits", *Food Science and Technology*, 37 (3), 483-492, 2017.

Carrillo-López L M, Soto-Hernández R M, Zavaleta-Mancera H A, Vilchis-Néstor A R. "Study of the performance of the organic extracts of *Chenopodium ambrosioides* for Ag nanoparticle synthesis", *Journal of Nanomaterials*, 2016.

Abarca Vargas R, Peña Malacara C F, Petricevich V L. "Characterization of chemical compounds with antioxidant and cytotoxic activities in *Bougainvillea x buttiana* Holttum and Standl, (var. Rose) extracts", *Antioxidants*, 5 (45), 2016.

Zazouli S, Chigr M, Jouaiti A. "Effect of polar and nonpolar solvent on total phenolic and antioxidant activity of roots extracts of *Caralluma europeae*", *Der Pharma Chemica*, 8 (11), 191-196, 2016.

Diem Do Q, Angkawijaya A E, Tran-Nguyen L T, Huong Huynh L, Edi Soetaredjo F, Ismadji S, Ju, Y-H. "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*", *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296-302, 2014.

Mendoza-Espinoza J A, Peña-Miranda I, Clarenc A R, Peralta-Gómez S, Sierra-Palacios E, García-Ocón B. "Pharmacological and phytochemical potential study of plants collected in Amecameca, state of Mexico, Mexico", *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 15 (1), 62-67, 2016.

Singh S, Vyas M. "Comparative *in vitro* biological study of aerial parts of plant *Hamelia patens*", *International Journal of pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (4), 1793-1808, 2016.

Jafrabano, Santra, S. and Menghani, E. "Screening of preliminary phytochemicals of *Hamelia patens* plant". *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2017, 8 (3), 1094-1099.

Ruiz-Terán F, Medrano-Martínez A, Navarro-Ocaña A. "Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico", *African Journal of Biotechnology*, 7 (12), 1886-1893, 2008.

Amorati R and Valgimigli L. "Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 3324-3329, 2018.

Maestro Duran R y Borja Padilla R. "Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 4 (2), 101-106, 1993.

Minatel I O, Vanz Borges C, Ferreira M I, Gomez Gomez H A, Chen C-H O, Pereira Lima G P. "Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability" Chapter 1, Phenolic compounds, 2017.

Organización Panamericana de Salud y Organización Mundial de la Salud, México, "Fundamental respuesta a enfermedades no transmisibles para en cumplimiento de la agenda 2030. https://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=article&id=1349:fundamental-respuesta-a-enfermedades-no-transmisibles-para-el-cumplimiento-de-la-agenda-2030&Itemid=499

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. 2017. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Islas Andrade S. A., Revilla Monsalve M. C. Diabetes mellitus, concepto y clasificación, Diabetes mellitus actualizaciones. Editorial Alfil, 2013, pp. 3-8.

Asumiendo el control de la diabetes México 2016, Tipos de diabetes y factores de riesgo, pp. 8-10.

Tundis R, Loizzo M R, Menichini F. "Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of Diabetes: an update", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 315-331, 2010.

Diabetes Atlas de la FID. International Diabetes Federation. Octava edición. 2017, pp. 9

García Luján C, Pérez Hernández B E, Martínez Romero A, Castro Barraza F. "Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes", *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 8, 229-239, 2009.

Barajas M, Príncipe R M, Escalada J, Prósper F, Salvador J. "Nuevas estrategias terapéuticas en diabetes mellitus tipo 1", *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31 (3), 219-234, 2008.

Salehi P, Asghari B, Esmaeili M. A, Dehghan H, Ghazi I. " α -Glucosidase and α -amylase inhibitory effect and antioxidant of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes", *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (6), 257-266, 2013.

OECD/OCDE 423, "OECD Guideline for testing of chemicals, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method", Environment Directorate Organisation for Economic Co-Operation and Development, Paris, Adopted: 17th December 2001.

Furman B L. "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats", *Curr. Prot. Pharmacol*, 70, 5.47.1-5.47.20, 2015.

Asgar A. "Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review", *International Journal of Food Properties*, 16, 91-103, 2013.

Rasouli H, Hosseini-Ghazvini S M-B, Adibi H, Khodarahmi R. "Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes", *Food and Function*, 8, 1942-1954, 2017.

Faltan de resultados

SIAP. "Atlas Agroalimentario 2016", Primera edición. 2016.

- SAGARPA. "Retos y oportunidades del sistema agroalimentario de México en los próximos 20 años", 126-135, 2010.
- Serrano Carreón L, Galindo Fentanes E. "Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario", *Ciencia*, 77-88, 2009.
- Juárez-Becerra G P, Sosa-Morales M E, López-Malo A. "Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control". *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4 (2), 14-23, 2010.
- Rodríguez M P. "Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México", *Acta Zoológica Mexicana*, 1, 53-78, 2001.
- Agrios G. Fitopatología. México: UTHEA, 2005.
- Arbeláez, G. "Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*", *Agronomía Colombiana*. 17, 11-22, 2000.
- Walter S, Nicholson P, Doohan F M. "Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease", *New phytologist*, 185, 54-66, 2010.
- Di Pietro A., González M I. "*Fusarium oxysporum* un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos", *Actualidad SEM*, 37, 6-13, 2004.
- Kistler H C. "Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*", *Symposium Population Genetics of soilborne fungal plant pathogens*, 87 (4), 475-479, 1997.
- Leslie J F, Summerell B A. "The *Fusarium* Laboratory Manual", Blackwell Publishing, 212-219, 2006.
- Boix-Ruiz A. Gálvez-Patón L, Cara-García M, Palmero-Llamas D, Camacho-Ferre F, Tello-Marquina J C. "Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*", *Phytoparasitica*, 43, 471-483 2015.
- Hayes B M E, Anderson M A, Traven A, Van der Weerden N L, Bleackley M R. "Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins", *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71, 2651-2666, 2014.
- Horbach R, Navarro-Quesada A R, Knogge W, Deising H B. "When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi", *Journal of Plant Physiology*, 168, 51-62, 2011.
- Kubicek C P, Starr T L, Glass N L. "Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi", *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427-451, 2014.
- Lagaert S, Beliën T, Volckaert G. "Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1064-1073, 2009.

- Wolf-Dieter R. "Biosynthesis and properties of the plant cell wall", *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 536-542, 2002.
- Martínez-Anaya C, Balcázar-López E, Dantán-González E, Folch-Mallol J L. "Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética", *Revista Latinoamericana de microbiología*, 50 (3 y 4), 119-131, 2008.
- Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D. "Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos", *Revista Iberoamericana de Micología*, 32 (1), 1-12, 2015.
- Singh S, Madlala A M, Prior B A. "*Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases", *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 3-16, 2003.
- Glass N L, Schmoll M, Cate J H D, Coradetti S. "Plant Cell Wall Decosntruction by Ascomycete Fungi". *Annual Review of Phytophatology*, 67, 477-498, 2013.
- Voragen A G J, Coenen G J, Verhoef R.P, Schols H A. "Pectin a versatile polysaccharide present in plant cell walls", *Structural Chemistry*. 20, 263-275, 2009.
- Meller Y. "Proteínas que defienden las plantas". *Mundo Científico*, 14 (7), 582-583.
- Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. "Secreted proteases from pathogenic fungi". *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 405-419, 2002.
- Feng J, Liu G, Selvaraj G, Hughes G y R, Wei Y. "A secreted lipase encoded by LIP1 is necessary for efficient use of saturated triglyceride lipids in *Fusarium graminearum*", *Microbiology*, 151, 3911-3921, 2005.
- Voigt C A, Schäfer W, Salomon S. "A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals", *The plant Journal*, 42, 364-375, 2005.
- Montes de Gomez V. "Aspectos del mecanismo de defensa de las plantas", *Revista de la academia colombiana de ciencias*, 17 (67), 741-747, 1990.
- Madriz Ordeñana K. "Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno", *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 22-32, 2002.
- Montes-Belmont R. "Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos", *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73-82, 2009.
- Salazar Iribe A, Gamboa de Buen A. "Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal", *Revista de Educación Bioquímica*, 32 (2), 67-75, 2013.
- Lagaert S, Beliën T, Volckaert G. "Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1064-1073, 2009.

Grepp V, Mondino P. "Apuntes sobre fungicidas". Universidad de la Republica Facultad de Agronomía. Departamento de Protección Vegetal. Unidad de Fitopatología. 1-7.

Marreno Ponce Y, Echeverría Díaz Y, Medina Marreno R., Casañola Martín G. "Aspectos actuales y revisión de los mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos". Unidad de Descubrimiento Molecular Biosilico Asistido por Ordenadores e Investigaciones Bio-informáticas (CAMD-BIR Unit), Facultad de Química-Farmacia, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Gregorí Valdés B S. "Estructura y actividad de los antifúngicos". *Revista Cubana de Farmacia*, 39 (2), 1-15, 2005.

Apodaca-Sánchez M A, Zavaleta-Mejia E, García-Espinoza R, Osada-Kawasoe S. "Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control", *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20 (1), 1-7, 2001.

Hirano Y, Arie T. "PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*", *J Gen Plant Pathol*, 72, 273-283, 2006.

Srivastava P, Andersen P C, Marois J J, Wright D L, Srivastava M, Harmon PF. "Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria* isolates", *Crop protection*, 43, 146-156, 2013.

Senthil R, Choi Y-K, Jin H, Hung H, Song G-G, Joo H. "In vitro antagonistic efficacy of plant extracts on the enzyme activity of *colletotrichum gloeosporoides*", *African Journal of Microbiology Research*, 7 (12), 1069-1076, 2013.

Wong Paz J E, Rubio Contreras C, Reyes Munguía A, Noé Aguilar C, Carrillo Inungaray M A. "Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods", *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017.

ANEXOS

ANÁLISIS CUALITATIVO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES

Para la presencia de metabolitos secundarios en extractos de plantas se empleó el siguiente sistema no paramétrico de cruces.

- Abundante: +++
- Moderado: ++
- Escaso: +
- Dudoso: ±
- Negativo: -

Alcaloides: A 25 mg de extracto se adicionaron 5 mL de HCl (10%), se llevaron a un baño de agua a 70°C por 10 min y se filtraron. Del filtrado se tomó 1 mL que se colocó en 3 tubos de ensayo y se agregaron 4 gotas de los siguientes reactivos: Dragendorff, Wagner y Hager. Fueron consideradas como pruebas positivas en las que aparece un precipitado.

Compuestos fenólicos

- a) **Taninos:** A 50 mg de extracto se adicionaron 10 mL de agua y fue filtrado. En seguida se tomaron alícuotas para las siguientes pruebas:

Tubo 1: 3 mL de extracto + 2 gotas de FeCl_3

Tubo 2: 1 mL de extracto + 8 gotas de una solución de gelatina

Tubo 3: 1 mL de extracto + 8 gotas de una solución de gelatina y sal

Tubo 4: 1 mL de extracto + 8 gotas de una solución salina

Taninos condensados e hidrolizables se diferencian por el color o precipitado con sales férricas. Taninos hidrolizables dan coloración y precipitados azul-negruzcos y taninos condensados dan precipitados pardo-verdosos.

- b) **Flavonoides:** 25 mg de extracto fueron disueltos en 5 mL de etanol y filtrados. Se tomaron alícuotas y se adicionaron los siguientes reactivos:

Tubo 1: 1 mL de extracto + trocito de viruta de magnesio + 3 gotas de HCl. Se considera positivo por la aparición de colores que van del rojo profundo a magenta, esto para flavononas o dihidroflavanoles; para dihidrochalconas y otros flavonoides no funciona.

Tubo 2: 1 mL de extracto + trocito de viruta de magnesio + 3 gotas de HCl diluido. La coloración será variable de acuerdo a las diferentes estructuras.

Tubo 3: 1 mL de extracto + polvo de zinc + 3 gotas de HCl. Se considera positivo para colores que van del rojo púrpura al rojo cereza, esto para dihidroflavonoides, mientras que para flavononas, dihidroclacanas y otros flavonoides la coloración es rosa o café.

Tubo 4: 1 mL de extracto + 3 gotas de NaOH diluido. Coloraciones amarillo o naranja se consideran positivas.

- c) **Cumarinas:** A 10 mg de extracto se adicionaron 2 mL de etanol y se filtraron. En un tubo se colocó 1 mL del filtrado el cual se tapó con papel filtro impregnado con una solución de NaOH diluido y se llevó a baño de agua a 100°C por unos minutos. El papel se observó bajo la luz UV, donde fluorescencia amarillo es indicativo de la presencia de cumarinas.
- d) **Derivados antracénicos libres:** 5 mg de extracto fueron disueltos en 5 mL de cloroformo y fue filtrado. En un tubo se colocó 1 ml del filtrado al cual se adicionaron 1 mL de NaOH diluido y se consideró positiva una coloración rojiza.

Terpenos

- a) **Saponinas:** A 10 mg de extracto se adicionaron 2 mL de agua el cual se llevó a un baño de agua caliente durante 15-30 min, luego se agito vigorosamente durante 3-5 min. Se consideró positiva por la formación de espuma con apariencia de panal de abeja, que fue estable por unos 30 minutos. Por otro lado 10 mg de extracto fueron disueltos en 2 mL de etanol y fue filtrado. A 1mL del filtrado se adicionó 1 gota del reactivo Rosenthaler y 1 gota de H₂SO₄. La aparición de una coloración violeta se consideró positiva para saponinas de triterpenos pentacíclicos.
- b) **Glucósidos cardiotónicos:** A 50 mg de extracto se agregaron 10 mL de etanol y fueron filtrados.
Tubo 1: 1 mL de extracto + 3 gotas del reactivo de Baljet. Se consideró positiva una coloración anaranjada o roja oscura.
Tubo 2: 1mL de extracto + 3 gotas de cloruro de antimonio. Una coloración violeta fue considerada como positiva.
- c) **Glucósidos cianogénicos:** De la solución de extracto anterior se colocó 1 mL en un tubo y se tapó con papel filtro impregnado con el reactivo de Grignard, y se calentó a 30-35°C. Una coloración roja o rosa en el papel se consideró como positiva.
- d) **Triterpenos:** De la solución del extracto etanólico se tomo 1 mL y se colocó en un tubo al cual se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se dejó reposar en un baño de hielo. Por último se añaden 2 gotas de H₂SO₄ concentrado. Se considera como positivo la aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase.

Anexo II. Evaluación de la actividad enzimática cualitativa

a. Evaluación de la actividad celulolítica

Se emplearán discos de 7 mm de diámetro de las distintas cepas de *Fusarium* de siete días, en medio de agar carboximetilcelulosa (CMC) al 0.1% y serán incubadas a 30°C. Para medir la actividad celulolítica se adicionarán 3 ml del revelador rojo Congo (0.5%) el cual se dejará actuar durante 15 minutos para posteriormente retirar el exceso del colorante y se adicionarán 3 ml de NaCl 1 M y se dejará actuar por 15 min se volverá a retirar el exceso de este y se llevará a refrigeración. Se determinará la presencia de zonas de aclaramiento debida a la hidrólisis de la CMC y se determinará el índice de actividad enzimática (IAE) el cual será calculado dividiendo el diámetro de la zona de aclaramiento sobre el diámetro del crecimiento del hongo.

b. Evaluación de la actividad pectinolítica

Se emplearán discos de 7 mm de diámetro de cepas de *Fusarium* de siete días, en medio de agar de pectina cítrica al 0.1% y serán incubadas a 30°C. Para medir la actividad pectinolítica se adicionarán 3 ml de lugol y se dejará actuar durante 15 minutos y posteriormente se retirará el exceso del colorante. Se determinará la presencia de zonas de aclaramiento y se determinará el índice de actividad enzimática (IAE).

c. Evaluación de la actividad amilolítica

Se emplearán discos de agar de 7 mm de diámetro de las cepas de *Fusarium* de siete días, en medio de agar de almidón al 0.1% y serán incubadas a 30°C. Para medir la actividad amilolítica se adicionarán 3 ml de lugol y se dejará incubar 15 minutos y se retirará el exceso del colorante. Se determinará la presencia de zonas de aclaramiento y se determinará el índice de actividad enzimática (IAE).

d. Evaluación de la actividad proteolítica

Los discos de agar de 7 mm de diámetro de las cepas de *Fusarium* de 7 días, se colocarán en el medio de agar de leche descremada al 0.1% y serán incubadas a 30°C. Para medir la actividad proteolítica se observará la presencia de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias y se determinará el índice de actividad enzimática (IAE).

Anexo III. Evaluación de la actividad enzimática cuantitativa

a. Evaluación de la actividad celulolítica

En un matraz con 100 ml de caldo almidón al 0.1% se inoculará con una concentración de 2×10^2 conidios/ml de cada una de las cepas de 7 A 10 días de crecimiento, se incubarán a 30 °C y con una agitación constante de 120 rpm. Muestras de 2 ml serán tomadas cada 24 h. Las muestras serán centrifugadas a 14,000 rpm y 21°C, se recuperará el sobrenadante para la cuantificación de la actividad

celulolítica. Al sobrenadante se le determinará la concentración de azúcares reductores por el método de DNS, para evaluar la actividad enzimática se tomarán 0.5 ml del sobrenadante con 0.5 ml de CMC (10 mg en buffer de acetato citrato) se dejará incubar a 50°C por 30 min y a esta mezcla se determinará la presencia de glucosa por DNS y se realizará una curva de calibración utilizando soluciones de 0.1 a 3 g/L de glucosa. Una unidad de celulosa fue definida como 1 mg de glucosa liberado de CMC al 1% h⁻¹. Con esa misma muestra se realizará un conteo de conidios en una cámara de Neubauer y se cuantificará biomasa.

b. Evaluación de la actividad pectinolítica

En un matraz con 100 ml de caldo pectina cítrica al 0.1% se inoculará con una concentración de 2x10² conidios/ml de cada una de las cepas de 7 días de crecimiento, se incubarán a 30 °C y con una agitación constante de 120 rpm. Muestras de 2 ml serán tomadas cada 24 h. Las muestras serán centrifugadas a 14,000 rpm y 21°C, se recuperará el sobrenadante para la cuantificación de la actividad pectinolítica. Al sobrenadante se le determinará la concentración de ácido galacturónico liberada en g/L, se realizará una curva de calibración utilizando soluciones de 0.1 a 3 g/L de ácido galacturónico. Con esa misma muestra se realizará un conteo de conidios en una cámara de Neubauer y se cuantificará biomasa.

c. Evaluación de la actividad amilolítica

En un matraz con 100 ml de caldo almidón al 0.1% se inoculará con una concentración de 2 x 10² conidios/ml de cada una de las cepas de 7 A 10 días de crecimiento, se incubarán a 30 °C y con una agitación constante de 120 rpm. Muestras de 2 ml serán tomadas cada 24 h. Las muestras serán centrifugadas a 14,000 rpm y 21°C, se trabajará con el sobrenadante para la cuantificación de la actividad amilolítica. Al sobrenadante se le determinará la concentración de glucosa liberada en g/L, se realizará una curva de calibración utilizando soluciones de 0.1 a 3 g/L de glucosa.

d. Evaluación de la actividad proteolítica

En un matraz con 100 ml de caldo de leche descremada al 0.1% se inoculará con una concentración de 2 x10² conidios/ml de cada una de las cepas, se incubarán a 30 °C y 120 rpm. Muestras de 2 ml serán tomadas cada 24 h. Las muestras serán centrifugadas a 14,000 rpm y 21°C, se recuperará el sobrenadante para la cuantificación de la actividad proteolítica. Para evaluar la actividad enzimática se tomarán 1 ml del sobrenadante con 1 ml de caseína al 1% (buffer de fosfato 0.1M, pH 7.0) se dejarán incubar a 30°C por 60 min y se adicionará 1 ml de ácido tricloroacético al 15% (p/v), posteriormente se centrifugará a 14,000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido se leerá a 280 nm. La actividad proteolítica se determinará en base a la cuantificación de tirosina liberada y se realizará una curva de calibración utilizando soluciones de 0.1 a 3 g/L de tirosina (buffer de fosfato 0.1M, pH 7.0). Una unidad proteolítica (UP) se definirá como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de tirosina por min. Con esa misma muestra se realizarán conteo de conidios en una cámara de Neubauer y se cuantificará biomasa.