

187
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS PRELIMINARES DEL EFECTO FUNGICIDA DEL CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens*) Y DE LA CANCERINA (*Hemiangium excelsum*) SOBRE *Saprolegnia* SP.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MAGALI DEL ROSARIO ZACARIAS SOTO



México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag.
Resumen.....	1
1.0 Introducción	2
1.1 Importancia de la piscicultura	2
1.2 Importancia de la trucha Arco-iris.....	2
1.2.1 Clasificación taxonómica de la trucha Arco-iris.....	3
1.2.2 Descripción morfológica de la especie.....	3
1.2.3 Distribución en México	4
1.3 Enfermedades de los Salmónidos	4
1.4 Saprolegniasis	5
1.4.1 Clasificación taxonómica del género <i>Saprolegnia</i>	6
1.4.2 Descripción del género	7
2.0 Objetivos	8
3.0 Antecedentes	9
3.1 Clasificación taxonómica del Cuachalalate	11
3.1.1 Descripción de la especie	12
3.1.2 Distribución en México	12
3.1.3 Composición química	14
3.1.4 Usos	15
3.2 Clasificación taxonómica de la Cancarina	17
3.2.1 Descripción de la especie	17

	Pag.
3.2.2 Distribución en México	19
3.2.3 Composición química	19
3.2.4 Usos	19
4.0 Material y método	22
4.1 Selección y marcaje de los organismos	22
4.2 Preparación de tratamientos	23
4.2.1 Elaboración de las dosis de Cuachalalate ...	23
4.2.2 Elaboración de las dosis de Cancerina	24
4.3 Obtención del porcentaje de tegumento parasitado por el hongo	24
4.4 Tratamiento	26
4.5 Parámetros físico-químicos	28
4.6 Ensayos <i>In Vitro</i>	28
4.6.1 Extracción selectiva	28
4.6.2 Aislamiento de <i>Saprolegnia</i> y aplicación de extractos experimentales	29
5.0 Resultados y discusión	31
5.1 Tratamientos <i>In Vivo</i>	31
5.2 Tratamientos <i>In Vitro</i>	34
5.2.1 Identificación de hongo	35
5.2.2 Extracción selectiva	35
5.2.3 Aplicación de los extractos	35
5.3 Tablas y gráficas	
Tabla 1	37

	Pag.
Gráfica 1	38
Tabla 2	39
Gráfica 2	40
Gráfica 3	41
Tabla 3	42
Tabla 4	43
Tabla 5	44
6.0 Conclusiones	45
7.0 Bibliografía	46

RESUMEN

Uno de los problemas que más preocupa a nuestro país es la escasez de alimentos la cual se ha tratado de subsanar con el empleo de la Piscicultura actividad que ocupa uno de los primeros lugares en la producción de proteína animal. En esta práctica pueden presentarse muchas enfermedades que afecten la producción, siendo la Saprolegniasis la que más estragos causa y la cual, en la mayoría de las piscifactorías se controla aplicando verde de malaquita libre de zinc, substancia que se ha comprobado es altamente mutágena y teratógena (Bailey, 1984). Debido a esto, se planteó la posibilidad de utilizar a la medicina tradicional como una alternativa para combatir este mal, empleando al Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y a la Cancerina (*Hemiangium excelsum*) como fungicidas. En los estudios *In Vivo* se obtuvieron resultados muy favorables a las dosis más bajas, 2.5 g/l de la infusión de la corteza del Cuachalalate y 25 ml de tintura de la corteza radical de Cancerina. En las pruebas *In Vitro* se emplearon cuatro extractos por planta obtenidos con disolventes de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo, etanol y agua; encontrándose al "Principio activo" con actividad fungicida en los extractos etanólicos, función que aumenta conforme se eleva la concentración del extracto.

1.0 INTRODUCCION

1.1 Importancia de la Piscicultura:

Uno de los problemas que más preocupa a la humanidad es su alimentación en el futuro mediano e inmediato. Debido a la sobreexplotación del suelo cultivable y de muchos de los recursos faunísticos y florísticos del planeta, se va acrecentando día con día la necesidad de desarrollar técnicas de producción de alimentos que subsanen este uso desmedido de recursos. Una de las muchas alternativas que han surgido para compensar esta deficiencia de alimentos es la Piscicultura, la cual permite un mejor uso del agua y del suelo que no puede ser utilizado para la agricultura. De entre los grupos de peces que más se han cultivado, ya sea por su valor nutritivo y/o por su alta demanda comercial se encuentran los Salmónidos, los cuales han sido cultivados en la mayor parte del mundo desde tiempos remotos (Bardach, et al 1986).

1.2 Importancia de la trucha Arco-iris:

Muchas especies de salmónidos han sido cultivadas principalmente por la importancia en la pesca deportiva, siendo la especie más cultivada, tanto por su demanda comercial como por su gran facilidad de adaptación a la domesticación (Huet, 1983) la trucha Arco-iris (*Salmo gairdneri* = *Oncorhynchus mykiss*).

1.2.1 Clasificación taxonómica de la trucha Arco-iris
(Mc. Farland, 1985).

REINO.....Animal
PHYLUM.....Chordata
SUBPHYLUM.....Vertebrata
SUPERCLASE.....Gnatostomata
CLASE.....Osteichthyes
SUBCLASE.....Actinopterygii
SUPERORDEN.....Teleostei
ORDEN.....Salmoniforme
SUBORDEN.....Salmonoidei
FAMILIA.....Salmonidae
GENERO.....*Salmo*
ESPECIE.....*S. gairdneri*, Richardson.

Sin. *Oncorhynchus mitchellii*.

1.2.2 Descripción morfológica de la especie:

La trucha Arco-iris tiene el cuerpo alargado de color verde olivo y numerosas manchas oscuras en la parte dorsal y presenta una franja iridiscente por ambos costados, de ahí su nombre. Sus escamas son muy pequeñas; Se distingue por poseer una segunda aleta dorsal adiposa. El macho presenta la mandíbula inferior más alargada que la hembra y en forma de gancho. El adulto en su ambiente natural llega a alcanzar una longitud promedio entre 40 y 60 centímetros (Srfa. Pesca, 1986).

1.2.3 Distribución en México:

La trucha Arco-iris es originaria de América del Norte. Su habitat natural son las corrientes de aguas frías, cristalinas y oxigenadas que no rebasen los 21°C en las zonas montañosas de los estados de Durango, Chihuahua, Baja California, Sinaloa y Sonora (Ramírez y Sevilla, 1962).

La trucha fué introducida en México en el año de 1884 en Chimaleapan, Edo. de México (Rosas, 1976). Actualmente existen piscifactorías encargadas de la reproducción de éstos organismos en los estados de Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Baja California, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Veracruz, Tamaulipas, Tlaxcala, Guerrero, Coahuila, Sonora, Guanajuato y Distrito Federal (Velázquez y Espinosa, 1989).

1.3 Enfermedades de los Salmónidos:

En cualquier cultivo trutícola pueden presentarse enfermedades, sobre todo en los cultivos intensivos. La frecuencia y el grado de importancia de las enfermedades que se presenten puede tener diferentes orígenes, entre los cuales se pueden mencionar: el manejo inadecuado de los organismos, la falta de higiene en la piscifactoría, etc.

Las enfermedades en la trucha se clasifican en:

1.- Enfermedades causadas por factores internos, tales como la degeneración del hígado, ceguera, anomalías en el desarrollo, etc..

2.- Enfermedades causadas por agentes externos:

- a) Micóticas
- b) Bacterianas
- c) Virales
- d) Parasitarias
- e) Atribuídas a otras causas (gusanos, crustáceos, etc.). (Lagler et al, 1990).

De entre todas éstas enfermedades la que más afecta a los cultivos trutícolas es la Saprolegniasis mencionándose como la más común, la más difundida y difícil de erradicar.

1.4 Saprolegniasis:

Saprolegniasis, enfermedad causada por el género *Saprolegnia* que se presenta sobre todo a bajas temperaturas. Este hongo se desarrolla principalmente en organismos heridos, débiles, enfermos o muertos, al igual que en huevos sanos o muertos (Huet, 1983 y Smith et al, 1985) y en organismos adultos en época de reproducción ya que la consistencia y la acción antimicrobiana del mucus de la piel se ve alterada (cambios hormonales) y se favorece la aparición de infecciones fúngicas. (Roberts, 1981; Jiménez et al 1986; Roberts y Shepherel, 1986).

SINTOMATOLOGIA: El hongo se presenta como una infección secundaria en lesiones de la superficie corporal. La infección se manifiesta en forma de manchas algodonosas de color blanco-grisáceo sobre el tegumento, aletas, ojos, boca o branquias

o cubriendo por completo a los huevos distribuyéndose de forma irregular. Una vez que destruye el tegumento, el hongo invade la musculatura formando zonas necróticas y puede seguir penetrando hasta las vísceras.

HISTOPATOLOGIA: El hongo invade la dermis extendiéndose lateralmente sobre la epidermis, al penetrar la dermis se infiltra hasta el músculo. Ocasionalmente se pueden observar trombosis en los vasos sanguíneos producida por la oclusión con las hifas (Roberts, 1981).

Se conoce mucho sobre las enfermedades que afectan a los salmónidos sin embargo todos los estudios e investigaciones relacionados con este tema se han enfocado principalmente a la cura y no a la prevención, por lo que se hace necesario investigar sobre tratamientos preventivos en las enfermedades de gran importancia en la piscicultura.

1.4.1 Clasificación taxonómica de género *Saprolegnia*:

(Ulloa y Hanlin, 1978).

REINO.....Fungi

DIVISION.....Eumycota

SUBDIVISION.....Phycomycotina

CLASE.....Oomycetes

ORDEN.....Saprolegniales

FAMILIA.....Saprolegniaceae

GENERO.....*Saprolegnia*

1.4.2 Descripción del género:

Alexopoulos (1979), describe al género *Saprolegnia* con un micelio muy ramificado, hifas aseptadas que contienen celulosa en sus paredes, con zoosporangios terminales, largos y cilíndricos. En su ciclo de vida pueden presentar dos tipos de reproducción: 1) Asexual.- Se presentan dos tipos de zoosporas, las primarias en forma de pera con dos flagelos en el ápice y las secundarias reniformes con dos flagelos en los lados cóncavos. Salen las esporas primarias, se enquistan y dan lugar a una espora secundaria la cual germina por medio de un tubo de germinación resultando una hifa que dará lugar a una nueva colonia. La reproducción asexual también puede llevarse a cabo por medio de yemas o clamidosporas que germinan por medio de tubos de germinación que forman hifas o desarrollan esporangios de pie corto; y 2) Sexual.- Esta reproducción se realiza por contacto gametálgico pasando las gametas masculinas al gametangio femenino a través de un tubo de fecundación, formándose así una oospora, la cual se libera y germina por medio de un tubo hifal que da lugar a un zoosporangio, completándose así el ciclo de vida.

2.0 OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar el efecto fungicida de la infusión de la corteza del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y de la tintura de la corteza radicular de la Cancerina (*Hemiantium excelsum*) sobre *Saprolegnia* sp infectando a la trucha Arco-iris (*Salmo gairdneri* = *Oncorhynchus mikiss*)

PARTICULARES:

1) Encontrar la dosis terapéutica óptima de la infusión de la corteza del Cuachalalate (*A. adstringens*) que actúe con mayor eficiencia sobre *Saprolegnia* sp que parasita a la trucha Arco-iris (*O. mikiss*).

2) Encontrar la dosis terapéutica óptima de la tintura de la corteza radical de la Cancerina (*H. excelsum*) que actúe con mayor eficiencia sobre *Saprolegnia* sp que parasita a la trucha Arco-iris (*O. mikiss*).

3) Verificar el efecto fungicida de los extractos: hexánico, acetato de etilo, etanólico y acuoso, de ambas plantas sobre cultivos *In vitro* de *Saprolegnia* sp.

3.0 ANTECEDENTES

La saprolegniasis representa un grave problema para todas las granjas trutícolas del mundo ya que es la causa de grandes pérdidas de organismos por la alta mortalidad y el retardo o cese del crecimiento que provoca en los salmónidos, motivo por el cual ha surgido el interés por investigar a cerca de sustancias que eliminen al hongo y que además no afecten a los animales.

De entre los tratamientos más recomendados por diferentes autores se encuentran el azul de metileno y el verde de malaquita libre de zinc, siendo el segundo el que más adeptos tiene. Este es aplicado a diferentes dosis y tiempos de exposición ya sea que se trate de organismos juveniles o adultos o de hueva en incubación (Huet, 1983; Alderman y Polglase, 1984; Aguilera y Noriega, 1986). Huet (1983) propone otros tratamientos en sustitución al verde de malaquita, tales como el permanganato potásico o sal común. Alderman y Polglase (1984) mencionan a la sal de oxalato como otra buena opción antifúngica.

Sin embargo, aunque la gran mayoría de los autores apoya el uso del verde de malaquita otros aseguran que el uso desmedido de esta sustancia puede ocasionar graves problemas. Lanzing (1965) muestra una relación directa entre la toxicidad del verde de malaquita y la temperatura ya que al incrementarse ésta se reduce drásticamente el tiempo de supervivencia de los peces en tratamiento. Huet (1983) hace referencia a Steffens et al (1961),

el cual indica que los huevos de trucha Arco-iris tratados con verde de malaquita pueden presentar alteraciones cromosómicas. Bailey (1984) en su revisión para aplicar diferentes tratamientos contra saprolegniales encuentra que el verde de malaquita es potencialmente teratógeno y mutagénico.

Al experimentar con otros compuestos con actividad antifúngica encuentra que: Du-ter*, sulfato oxiclórico de cobre, Lesan*, BAS-389-01F, Cuprimyxin* y Roccal* disminuyen en buena forma el crecimiento de los hongos. Finalmente Singhal et al (1986) proponen como tratamientos fungicidas al permanganato de potasio obteniendo una reducción de la infección del 90%; al aplicar el cloruro de sodio obtuvo el 96% de eficiencia y una solución de sulfato de cobre da al igual que el anterior el 96% de efectividad.

Como se puede observar falta mucho de investigar sobre tratamientos fungicidas que sean eficaces y que al mismo tiempo no pongan en peligro los cultivos piscícolas o puedan alterar la carne que será distribuida posteriormente a los consumidores.

Una alternativa que surge para tratar de controlar este tipo de problemas es la aplicación de la medicina tradicional o también llamada medicina herbolaria con fines terapéuticos, de la cual se tiene conocimientos en su mayoría empíricos pero que han surtido efecto y se han desarrollado por mucho tiempo en las comunidades rurales (Díaz, 1988). Actualmente uno de los usos que se le ha

* Marcas registradas.

dado a la herbolaria es la aplicación de los conocimientos que van surgiendo del análisis científico de las plantas como es el estudio de "Los principios activos" de las mismas sobre mecanismos patológicos, sobre todo en aplicaciones en el humano y recientemente en la medicina veterinaria.

En el caso de la saprolegniasis, dado que surge como una infección secundaria a una lesión en el tegumento del pez y la invasión de esta zona por bacterias que sensibilizan al animal a la invasión del hongo, surge la idea de aplicar extractos de plantas que presenten actividad cicatrizante y de las cuales se tengan conocimientos sobre su química que, por lo tanto, pudieran dar buenos resultados en el tratamiento de la Saprolegniasis que padece la trucha Arco-iris (*O. mikiss*), por lo que se eligieron como plantas medicinales experimentales al Cuachalalate (*A. adstringens*) y a la Cancerina (*H. excelsum*).

3.1 Clasificación taxonómica del Cuachalalate (Cronquist, 1988).

DIVISION.....Magnoliophyta
CLASE.....Magnoliopsida
SUBCLASE.....Rosidea
ORDEN.....Sapindales
FAMILIA.....Julianiaceae
GENERO.....*Amphipterygium*
ESPECIE.....*A. adstringens* (Schiede ex S).

Nombres comunes: Cuachalalate, cuachalalá, macerán (Guerrero), mapi cerán (Jalisco), maticerán (Michoacán), volador (Puebla), yala-guito (Oaxaca). (Martínez, 1979).

3.1.1 Descripción de la especie:

Arbol de aproximadamente 8 metros de altura. La corteza presenta una superficie lisa de color moreno con escamas grandes, engrosadas y suberizadas. Presenta numerosas lenticelas protuberantes, redondas y pálidas de color crema rosado. Las hojas son compuestas, alternas y dispuestas en espiral, aglomeradas en el ápice de las ramas, foliolos de 3 a 5, opuestos, sésiles de color verde opaco, ovados o elípticos; planta dioica: flores femeninas solitarias en las axilas de las hojas nuevas, perianto de 6 a 8 partes, un pistilo, ovario súpero. Flores masculinas: se aglomeran en panículas axilares de las hojas nuevas; perianto de 6 a 8 partes (Linares y Bye, 1988). Estas flores son sésiles o sobre pedicelos muy cortos; estambres de 5 a 7. El fruto es una sámara seca, fibrosa y llega a formar una especie de ala, de color café-rojizo, con 1 a 2 semillas aplanadas (Estrada, 1985). Ver fig. 1.

3.1.2 Distribución en México:

Es una especie nativa de México (Estrada, 1985). Martínez (1987) menciona que se localiza desde Michoacán hasta Morelos, pasando por el sureste y sur de Puebla, parte del Edo. de México y

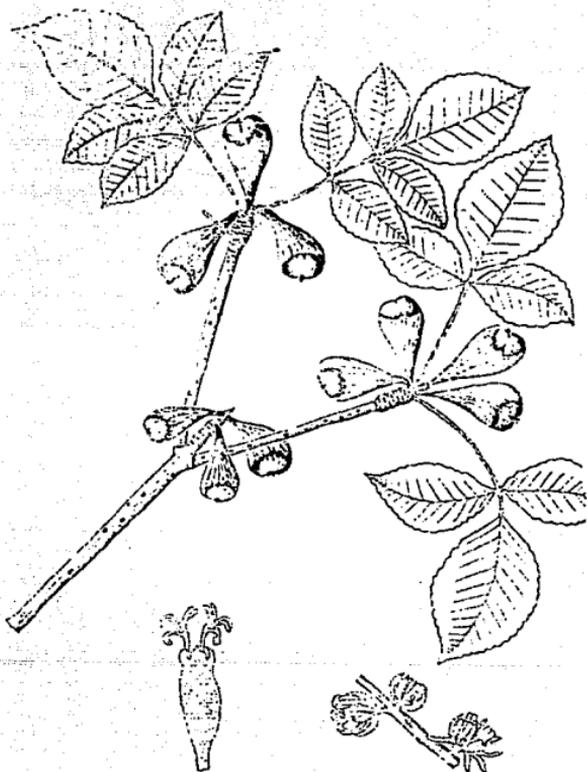


Figura 1: Amphiterygium adstringens.

Fuente: Pennington, T. y J. Sarukhán (1968).

Oaxaca y en general en toda la cuenca y depresión del río Balsas, además de que se puede localizar en algunas zonas de Nayarit, Sinaloa, Guerrero y en un mayor porcentaje en el Istmo de Tehuantepec. Rzedowski (1988) menciona la presencia de esta especie en la región Caribeña donde se presenta una flora rica sobre todo en especies arbóreas y arbustivas.

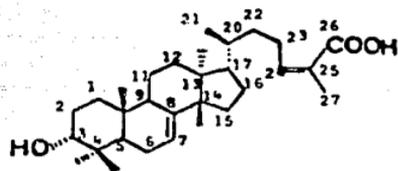
3.1.3 Composición química:

La composición química del Cuachalalate ha sido ampliamente estudiada. González y Delgado (1962), realizaron una investigación fitoquímica de la corteza resultando positivas las pruebas para fitoesteroles, glucósidos, taninos, saponinas y ácidos orgánicos. Estudios posteriores y utilizando técnicas más finas de extracción se encontraron esencias, aceites fijos, aceites esenciales, alcoholes, glicerina, peptonas y albúminas; hidratos de carbono, ác. cítrico, ác. málico, ác. succínico, ác. oxálico, celulosa, alcaloides, sapogeninas y compuestos inorgánicos (cloruros, sodio, carbonatos, sulfatos, sílice, hierro calcio y magnesio) (Cortéz, 1979). Navarrete (1982) menciona el alto contenido en ác. tánico por lo que resulta un excelente cicatrizante interno y externo ya que los derivados tánicos tienen la propiedad de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, creando una capa de coagulación aislante y protectora, reduciendo la irritación y deteniendo pequeñas hemorragias (Volák y Stodula, 1988); además de presentar el ác. 3 α -hidroximasticadienónico y el ác.

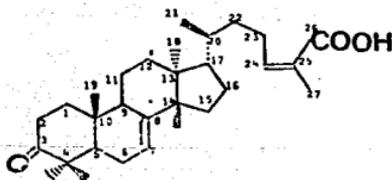
masticadienónico (fig. 2) el cual presenta efecto hipocolesterolemiente (Navarrete, 1982).

3.1.4 Usos:

De la planta del Cuachalalate la parte que se comercializa es la corteza. La corteza y raíces de esta especie han sido utilizadas en la medicina tradicional mexicana desde tiempos remotos (Pennington y Sarukhán, 1968). Martínez (1944) indica que el cocimiento de la corteza se utiliza para endurecer las encías y para lavar heridas antiguas; útil para combatir la fiebre tifoidea, antipalúdico y astringente; el polvo de la corteza se emplea como cicatrizante. Estrada (1985) hace mención de varios usos medicinales como en el caso de: gastritis, úlceras, heridas, nervios y para bajar los niveles de colesterol. González et al (1962) recomiendan cocimientos de la corteza como tratamiento contra la malaria, fiebre intermitente y cáncer gastrointestinal (actividad anticarcinogénica) y extractos metanólicos de la corteza demuestra actividad antitumoral. Soriano-García et al (1987) mencionan su eficiencia contra cálculos biliares y finalmente Navarrete et al (1990) evalúan la actividad antiulcerosa de la corteza de esta especie.



1



2

Figura 2: Estructura del ácido 3- α -hidroximasticadienónico 1 y del ácido masticadienónico 2.

3.2 Clasificación taxonómica de la Cancerina
(Cronquist, 1988).

DIVISION.....Magnoliophyta
CLASE.....Magnoliopsida
SUBCLASE.....Rosidae
ORDEN.....Celastrales
FAMILIA.....Hippocratacea
GENERO.....*Hippocratea*
ESPECIE.....*H. excelsa*, H.B.K.

sin. *Hemiangium excelsum*, H.B.K.

Nombres comunes: Cancerina, matapiojo, fruta de rosa (Smith, 1940).

3.2.1 Descripción de la especie:

La Cancerina es un arbusto, liana o árbol delgado de 10 m de altura. Sus ramas son café; hojas delgadas, coriosas generalmente de color oliváceo-pálido, oblongo-elípticas u ovaladas de 6 a 12 cm de long. borde crenado; inflorecencias alternas o pseudodicotómicas de 2 a 4 por rama; sépalos submembranosos; pétalos delgado-carnosos o submembranosos; ovario cuadrangular con 4 óvulos; semilla ovoide con ala ovalada-elíptica (Smith, 1940). Ver fig. 3.

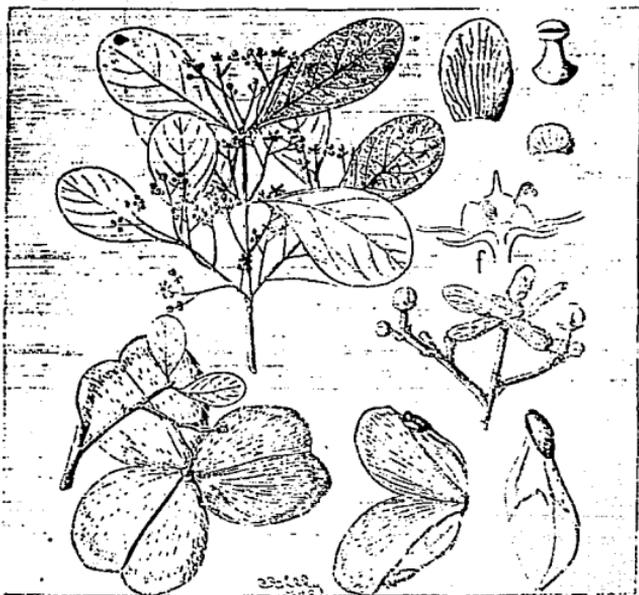


Figura 3: Hemisgenium excelsum.

Fuente: Smith, A.C. (1940).

3.2.2 Distribución en México:

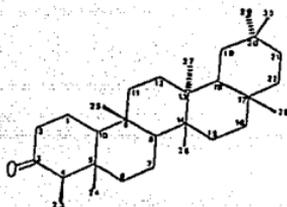
Smith (1940) reporta la presencia de esta especie en los estados de Durango, Guerrero, Oaxaca Chiapas y Yucatán. López (1987) agrega a esta lista los estados de Sinaloa y Tamaulipas. Finalmente Palacios (1987) reporta a la especie en Jolalpan, Puebla.

3.2.3 Composición química:

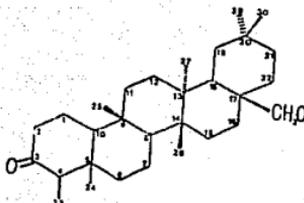
Existen realmente pocos trabajos fitoquímicos sobre esta especie, aunque existe bibliografía sobre otras especies del mismo género. De la corteza radical y del tallo se aisló la Friedelina, el canofilal (fig. 4), canofilol, ác. canofflico y β -sitosterol además de reportarse la presencia del trans-poli isopreno, del tipo de la guta (López, 1987; Palacios et al, 1987).

3.2.4 Usos:

Son muchos los usos que esta especie tiene en la medicina tradicional, por ejemplo: afecciones en la piel, úlcera gástrica, padecimientos renales, amenorrea e infecciones uterinas. También se considera un insecticida muy efectivo, de ahí el sobrenombre de "matapiojo", esto se ha tratado de explicar por el alto contenido de Friedelina, la cual tiene actividad antialimentaria. También la friedelina y los compuestos relacionados con ella se les considera los responsables de la eficiencia de ésta planta en el tratamiento del cáncer de uréter, convulsiones, inflamaciones, úlceras de la



3



4

Figura 4: Estructura de la Friedelina 3 y del Ganofilal 4.

piel, inflamaciones de origen reumático, fiebre y disenteria. Además se piensa que por su alto contenido de Trans-poliisopreno podría relacionarse con su uso como agente antiulcérico, actuando como una película protectora en el tracto gastrointestinal (López, 1989; Sánchez, 1991).

4.0 MATERIAL Y METODO

La experimentación fue realizada en las instalaciones de la piscifactoría "El Zarco", Edo. de México, de la Secretaría de Pesca.

Se utilizó como organismo experimental a la trucha Arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) y como tratamientos experimentales: la infusión de la corteza del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) Schiede ex Schlecht y la tintura de la corteza radicular de la Cancerina (*Hemiangium excelsum*) H.B.K.

4.1 Selección y marcaje de los organismos:

Se utilizaron organismos en edad reproductiva que previamente habían sido manipulados para el desove manual y los cuales presentaban *Saprolegnia* sp en cualquier zona de la superficie corporal, pero que ésta infección no sobrepasara el 50% del total del cuerpo del organismo. (se utilizaron estos organismos ya que al ser desovados manualmente son propensos a lesiones y por lo tanto a adquirir la enfermedad). A todos los organismos se les tomaron los siguientes datos merísticos: longitud total inicial (LTI) y final (LTF); altura máxima inicial (AMI) y final (AMF). El peso inicial (Pi) y final (Pf) fue obtenido con la ayuda de un dinamómetro. Se colocaba al organismo en una red cuchara y se pesaba, enseguida se regresaba a su estanque y el peso obtenido se le restaba al peso de la red

húmeda. Las otras medidas fueron tomadas una vez que se colocaba a los peces en las tinas en donde se llevarían a cabo los baños.

A cada pez medido y pesado se le ató en el pedúnculo caudal una cinta de diferente color según el tratamiento al que iba a ser sometido y cada cinta se marcó con 1 a 5 barras para poder identificar a cada uno de los organismos.

Cada uno de los lotes experimentales estuvo formado por 5 organismos con medidas merísticas similares, utilizándose en total 8 lotes para llevar a cabo toda la experimentación.

4.2 Preparación de los tratamientos:

4.2.1 Elaboración de las dosis de Cuachalalate:

De este tratamiento se utilizaron cuatro dosis experimentales: 2.5 g/l de agua; 5 g/l de agua; 10 g/l de agua y 20 g/l de agua.

En una olla de barro se colocó un litro de agua corriente y se dejó calentar, al momento en que comenzaba a hervir se le agregó la corteza (previamente molida) de acuerdo con la dosis a experimentar, se tapó la olla y se retiró del fuego dejándola reposar toda la noche (aprox. 10 hrs.). Después de esto la infusión se filtró con una red de acuario; repitiéndose éste mismo procedimiento durante todos los días que durara el tratamiento con cada una de las dosis experimentales.

4.2.2 Elaboración de las dosis de Cancerina:

De éste tratamiento también se utilizaron cuatro dosis experimentales: 25, 50, 75 y 100 ml. de tintura.

Con anterioridad se molió la corteza radical de la Cancerina; posteriormente en un frasco ámbar con capacidad de 2 litros se colocaron 200 g de Cancerina por 1000 ml de alcohol al 48%; se mezclaron perfectamente y se dejaron reposar por 7 días (Agitando vigorosamente la mezcla una vez al día). Una vez cumplido el tiempo de reposo con la ayuda de una red fina de acuario se fue filtrando poco a poco la mezcla procurando obtener la mayor cantidad posible de la tintura. Esta extracción se mantuvo en un frasco ámbar y en un lugar oscuro hasta que era utilizado. El total de tintura empleado durante la experimentación (de acuerdo con la dosis) se preparaba con una semana de anticipación para evitar que con el tiempo se evaporara el alcohol y se viera alterada la proporción 1:5 g/ml.

4.3 Obtención del porcentaje de tegumento parasitado por el hongo.

Cada organismo fue dividido por medio de dos líneas imaginarias en tres zonas, tanto para el lado izquierdo como para el derecho (fig. 5) de la siguiente manera:

Zona 1.- De la punta de la boca hasta la punta del último radio de la aleta pectoral.

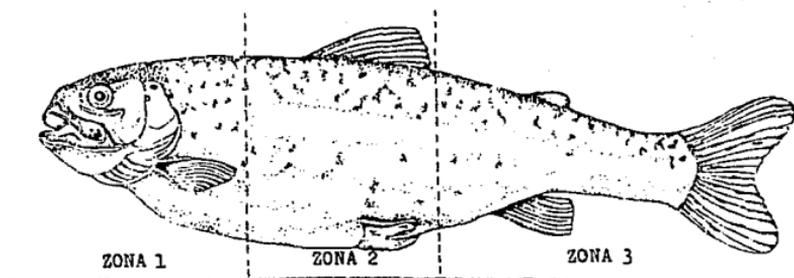


Figura 5: Esquema de la zonificación que se realizó en los organismos para evaluar el grado de infección.

Zona 2.- De la parte donde termina la zona 1 hasta el término de la 1a. dorsal.

Zona 3.- Abarca el pedúnculo y la aleta caudal.

Para obtener el porcentaje de tegumento invadido por el hongo se utilizó, con algunas modificaciones el método de Hawksworth (1977), el cual consiste en dividir al sujeto experimental en tres partes y cada parte es evaluada por separado según el grado de infección que presente. El modelo original fue modificado según las necesidades del proyecto quedando de la siguiente forma: Si se encuentra la zona totalmente infectada se le asignó el valor de 3; si se encuentra infectada solo la mitad de la zona se le da el valor de 2; de ser solo la cuarta parte la parasitada se dió el valor de 1; al encontrarse únicamente uno o dos puntos de infección se le dió el valor de 0.5 y si la zona no presentaba ningún signo de infección se le asignaba un cero. El porcentaje de superficie corporal infectado se evaluó diariamente durante cada baño.

4.4 Tratamiento:

El tratamiento consistió en someter a los organismos enfermos a baños utilizando cuatro diferentes dosis de la infusión de la corteza de Cuachalalate (2.5 g/l de agua; 5.0 g/l de agua; 10 g/l de agua y 20 g/l de agua) y cuatro dosis de la tintura de corteza radical de Cancerina (25, 50, 75 y 100 ml).

Los baños fueron realizados en tinas de lámina galvanizada

con capacidad de 100 litros de agua. Para mantener una buena aereación durante el baño se colocaron dentro de las tinas mangueras y piedras aereadoras las cuales surtian aire por medio de dos bombas para acuario (RENA 301 y una WHISPER 900 de cuatro salidas).

En cada tina se colocaron 100 litros de agua proveniente del estanque en donde se mantenían a los peces, se colocaba el lote experimental de 5 peces y a cada organismo se le tomaba el porcentaje de tegumento infectado; se agregaba la dosis a experimentar dejando a los organismos en el baño 20 minutos. Después de transcurrido el tiempo se pasaba a los peces a estanques rectangulares, los cuales contaban con condiciones físicas y químicas similares al resto de los estanques de la piscifactoría; manteniéndose siempre separados a los peces de acuerdo con las dosis experimentales. La separación de los animales dentro de los estanques se realizó por medio de bastidores de tela de mosquitero que permitían el movimiento del agua dentro del estanque y que facilitaban el manejo de los organismos.

Se manejó solamente un lote control general de organismos para todas las dosis ya que se trabajó con organismos reproductores que no iban a recibir ningún tratamiento fungicida, por lo que se tendrían que haber sacrificado aproximadamente 40 reproductores lo cual no fué aceptado por la piscifactoría, ya que ésta somete a sus peces enfermos a tratamientos con verde de

malaquita. Este control permaneció durante 10 días en revisión en uno de los estanques rectangulares de la piscifactoría y únicamente se manejaron para obtener su porcentaje de tegumento infectado.

Los baños se realizaron diariamente durante 9 días para cada una de las dosis llevándose un registro de variaciones de la temperatura durante cada tratamiento. El pH del baño fue tomado en una sola ocasión para cada una de las dosis de cada tratamiento (pH indicador, Técnica Química, S. A.).

Todos los organismos incluyendo a los del control fueron alimentados diariamente a saciedad, con alimento proporcionado por la misma piscifactoría.

4.5 Parámetros físico-químicos:

Estos parámetros fueron proporcionados por la piscifactoría. Los datos únicamente cubren los meses en que se llevó a cabo la experimentación, es decir de septiembre de 1991 a enero de 1992. (ver tabla 3).

4.6 Ensayos In Vitro:

4.6.1 Extracción selectiva:

Se realizó una extracción selectiva de cada una de las muestras por el método de Soxhlet, con cuatro diferentes disolventes de polaridad creciente: Hexano, acetato de etilo,

etanol y agua. Con cada uno de los disolventes se realizaron tres extracciones consecutivas cada una de 8 hrs de duración, utilizándose 20 gramos de cada muestra y 250 ml de cada disolvente para cada extracción.

Las tres extracciones obtenidas de la misma muestra y para cada uno de los disolventes se reunieron y concentraron casi a sequedad, eliminando el disolvente por destilación a presión reducida.

En el caso de los extractos acuosos las muestras fueron secadas utilizando una liofilizadora en forma de cruz de cuatro salidas.

Estos extractos se colocaron en un frasco de vidrio para su completo secado.

4.6.2 Aislamiento de *Saprolegnia* sp y aplicación de extractos experimentales.

La muestra de *Saprolegnia* sp fué extraída de peces de acuario infectados (Beta y Guppy) y se colocó en cajas de Petri con agua esterilizada. En cada caja se pusieron 5 semillas de arroz integral previamente lavadas con una solución al 2% de cloro durante un minuto y 2 enjuagues con agua estéril. Las cajas se mantuvieron a 25°C durante toda la experimentación.

De las semillas que fueron parasitadas por el hongo se realizaron nuevas resiembras tratando así de aislar el hongo lo más puro posible. El crecimiento del hongo en forma homogénea en

toda la semilla fué de aproximadamente 5 días.

Para realizar las pruebas con los extractos se colocó una de las semillas infectadas en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo agar-maíz, enseguida se colocaron a una distancia aproximada de 2 cm de la semilla discos de papel filtro de 1 cm de diámetro impregnados con cada uno de los extractos.

Las concentraciones experimentales de los extractos que se emplearon fueron: 1, 3, 5, 10 y 20 mg (para ambas plantas).

Después de éstas pruebas se trabajó únicamente con los extractos etanólicos de las dos plantas utilizándose las siguientes concentraciones: 10, 20 y 30 mg.

Para todos los casos se utilizó como testigo el verde de malaquita a una concentración de 0.05 mg.

La revisión de cajas se realizó siempre al quinto día de la siembra y aplicación de los discos.

La muestra del hongo fué enviado al Herbario de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. para ser identificado.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Este trabajo es uno de los primeros que se desarrolla empleando la medicina tradicional aplicada a la medicina veterinaria y en donde se obtuvieron resultados muy favorables tanto en las pruebas *In Vivo* como en las *In Vitro* al aplicar las dos plantas medicinales como tratamientos fungicidas sobre *Saprolegnia* sp.

5.1 Tratamientos *In Vivo*

Ambas plantas presentaron un efecto fungicida positivo en todas y cada una de las dosis aplicadas.

En el caso del Cuachalalate (*A. adstringens*) como se puede observar en la Tabla 1, tanto en la Dosis 1 (2.5 g/l) como en la Dosis 4 (20.0 g/l) se anula la infección al final del tratamiento. En la Dosis 4 en el octavo día de la aplicación de la dosis se observa un nuevo brote de la infección en los organismos en donde ya había desaparecido; esto puede atribuirse posiblemente a: 1) Que el hongo no se había desarrollado lo suficiente para poder ser apreciado a simple vista; 2) a que una espora reinició la infección, o bien 3) a que el micelio hubiera penetrado capas más profundas en donde la substancia con actividad antifúngica no pudo

penetrar por lo que las hifas pudieron desarrollarse nuevamente. Al noveno día de tratamiento se observó que el hongo se había desprendido por completo de la piel quedando todo el lote de organismos en 0% de tegumento parasitado. Para la Dosis 2 (5 g/l) el porcentaje de infección disminuyó con el tiempo hasta llegar al 0%, pero al igual que en la Dosis 4 se reinicia la infección (lo cual puede explicarse por las mismas causas que en la dosis 4), esta infección tiende a disminuir en el último baño pero no se logró eliminar por completo al hongo en el período de tiempo establecido para el tratamiento.

En el caso de la Dosis 3, se aprecia una tendencia a la disminución de la enfermedad desde el primer baño hasta el sexto, posteriormente se incrementa llegando a rebasar el porcentaje de infección inicial en ese lote experimental. Este marcado incremento se debió a que uno de los organismos del lote fue rápidamente invadido por el hongo esto posiblemente provocado por el estrés que sufre el organismo al ser manipulado facilitando con esto la invasión del tegumento por el hongo.

El comportamiento de cada una de las dosis aplicadas en los diferentes lotes de organismos puede apreciarse mejor en la Gráfica 1 en donde se observa la marcada diferencia que existe entre el control y los organismos que fueron sometidos a tratamiento con la infusión de la corteza del Cuachalalate; aquí se puede ver que todas las dosis presentan el mismo patrón de decremento en el porcentaje de saprolegniasis, resaltando la curva

de la Dosis 3 donde se aprecia el incremento en la infección, cuyas causas ya fueron explicadas.

Con respecto a los organismos tratados con la corteza radicular de la Cancerina (*H. excelsum*), el porcentaje de infección que se presentó en cada una de las dosis puede apreciarse en la Tabla 2. Aunque en ninguna de las dosis se alcanza la anulación total del parásito, en todas se puede apreciar que la infección disminuye en un buen porcentaje.

En todas las dosis se presentaron oscilaciones en el porcentaje de infección pero todas tienden a disminuir en los últimos días del tratamiento; ésto puede observarse con mayor claridad en la gráfica 2 en donde se aprecia que en el transcurso del tiempo la infección tiende a desaparecer, no concretándose ésta en el tiempo dispuesto para el tratamiento experimental.

Para ambos tratamientos (Cuachalalate y Cancerina) se utilizó un lote control, el cual muestra claramente como el hongo se desarrolla en los organismos en una forma extraordinariamente acelerada llegando a cubrir por completo a organismos reproductores (de aproximadamente 62 cm de long. total y 20 cm de altura máxima, con un peso próximo a los 6 kg) en únicamente 10 días.

En la gráfica 3 se comprobó la eficiencia de los dos tratamientos experimentales contra el lote control, apreciándose notablemente la eficiencia micotocida de los tratamientos sobre el crecimiento del hongo en las condiciones (físicas, químicas,

nutricionales y de manejo) en que se encuentran los organismos en la piscifactoría.

La Temperatura fue monitoreada durante toda la experimentación no mostrándose variaciones significativas. La temperatura promedio que se obtuvo fué de $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y el pH promedio que se midió en los baños se mantuvo entre 6 y 7.5 datos que no difieren con los parámetros físico-químicos proporcionados por la piscifactoría que fueron realizados durante los meses en que se llevó a cabo la experimentación (ver tabla 3).

Con respecto a las alteraciones que pudieran haber sufrido los organismos que estuvieron sometidos a los tratamientos, no se observó ningún cambio aparente en su peso, apetito o algún problema externo, además de que las zonas en donde había estado la infección se observó una buena y rápida cicatrización.

5.2 Tratamientos *In Vitro*

Una duda que impulsó a realizar las pruebas *In Vitro* fue si los tratamientos experimentales realmente estaban funcionando como fungicidas o realizaban únicamente una acción cicatrizante sobre las heridas de los peces infectadas por el hongo, ya que la acción más sobresaliente de ambas plantas es que son consideradas como cicatrizantes excelentes.

5.2.1 Identificación del hongo

El hongo con el que se realizaron los experimentos *In Vitro* fue identificado como la especie *Saprolegnia parasitica*, en el herbario de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M..

5.2.2 Extracción selectiva

Esta extracción se realizó con cuatro disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, etanol y agua) con objeto de hacer una primera separación de los componentes de las plantas y determinar en cual de los extractos se encontraba la actividad antifúngica

5.2.3 Aplicación de los extractos

Al realizar las pruebas *In Vitro* con cada uno de los extractos, únicamente se observó un efecto positivo en los extractos etanólicos de las dos plantas a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg, tomando como efecto positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento del hongo (tabla 4).

Al llevarse a cabo por segunda ocasión las pruebas únicamente con los extractos etanólicos, se observó que tanto el Cuachalalate como la Cancerina presentan un halo de inhibición mayor conforme se aumenta la concentración de extracto.

También se observó que el testigo (verde de malaquita) presentó un halo de inhibición mucho mayor que la concentración más alta empleada en los extractos, utilizando una concentración

muy pequeña de éste (tabla 5). Aunque esta substancia es el fungicida más empleado en el tratamiento contra la saprolegniasis y como se demostró tiene una eficiencia mucho mayor que los extractos propuestos como fungicidas, debemos tomar en cuenta que el verde de malaquita resulta altamente mutágeno y teratógeno como lo menciona Bailey (1984), además de ser sumamente caro; Si tomamos en cuenta los problemas que trae consigo el empleo del verde de malaquita, la utilización de los extractos etanólicos del Cuachalalate y de la Cancerina resultan una buena opción para el tratamiento de la saprolegniasis en la piscifactorías, ya que éstas plantas son de fácil adquisición, la preparación y aplicación de los extractos es muy sencilla y los costos son muy bajos en comparación con el empleo del verde de malaquita.

Es importante señalar que en las pruebas *In Vivo* en el tratamiento con Cuachalalate, se trabajó con el extracto acuoso mostrando un efecto positivo contra la saprolegniasis, en tanto que en las pruebas *In Vitro* sólo resultaron positivas en el extracto etanólico. Esto puede deberse a que "El principio activo" del Cuachalalate que actúa como fungicida es un compuesto polar que fué arrastrado en la extracción etanólica mostrando ahí su efecto.

Tabla 1
Porcentaje (%) de *Saprolegnia* sp en los peces tratados con Cuachalalate (*A. adstringens*).

Dosis (g/l)	Tiempo (días)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.5	100.00	100.00	105.68	73.53	11.03	11.03	7.35	7.35	3.68	0.00
5.0	100.00	83.33	50.00	66.67	50.00	33.33	16.67	0.00	33.33	16.67
10.0	100.00	87.50	56.25	56.25	75.00	31.25	23.44	31.25	62.50	109.37
20.0	100.00	75.00	56.25	75.00	12.50	0.00	0.00	0.00	12.50	0.00
Ctl.	100.00	105.88	141.18	139.71	213.23	227.94	286.76	301.47	345.59	375.00

Ctl. = Lote control

Tabla 2
Porcentaje (%) de *Saprolegnia* sp en los peces tratados con Cancerina (*H. excelsum*).

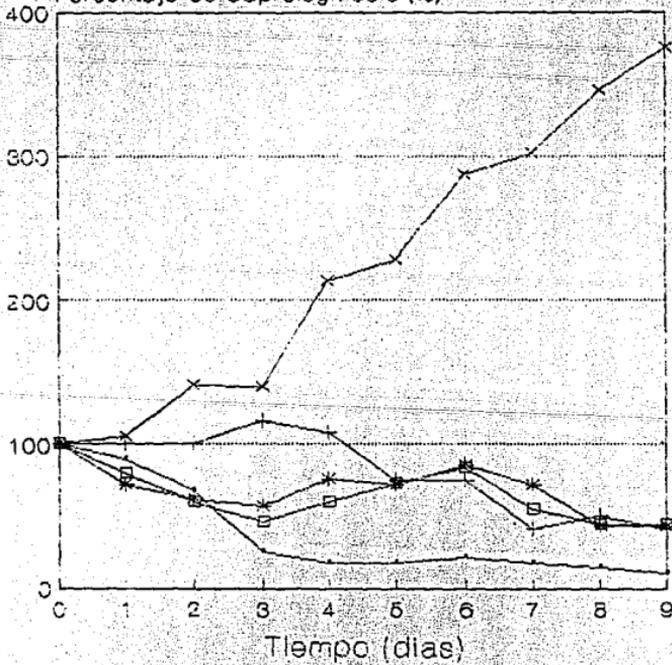
Dosis (ml)	Tiempo (días)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25	100.00	89.29	67.86	25.00	17.86	17.86	21.43	17.86	14.29	10.71
50	100.00	100.00	100.00	116.67	108.33	75.00	75.00	41.67	50.00	41.67
75	100.00	71.40	61.90	57.10	76.20	71.40	85.70	71.40	42.80	42.80
100	100.00	80.00	60.00	46.67	60.00	73.33	83.33	55.55	44.44	44.44
Ctl.	100.00	105.88	141.18	139.71	213.23	227.94	286.76	301.47	345.59	375.00

Ctl. = Lote control

Grafica 2

Porcentaje (%) de Saprolegniasis en los peces tratados con cancerina

Porcentaje de Saprolegniasis (%)



Grafica 3

Comparación de los incrementos del baciloferente
y con una ve control

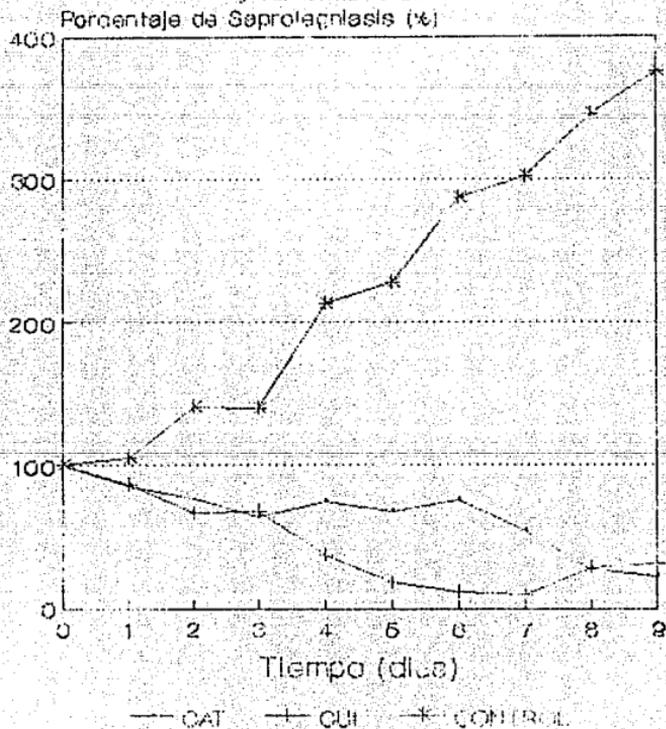


Tabla 3
Parámetros físico-químicos
Piscifactoría "El Zarco"

HORA	TEMP.	O ₂ DIS. p.p.m.	pH	ALCALINIDAD mg/l	DUREZA	FECHA
10:02	11.0	6.6	7.09	32.32	27.0	Oct. 91
9:44	10.5	7.2	7.03	34.34	28.0	Nov. 91
10:10	9.4	5.8	---	34.34	28.0	Dic. 91
9:50	9.3	5.4	6.53	34.34	30.0	Ene. 92

Tabla 4

Presencia de inhibición de los extractos

Muestra	Extracto (mg)	Hexano	ACDET	Etanol	Agua
Cuachalalate	1	---	---	---	---
	3	---	---	---	---
	5	---	---	+	---
	10	---	---	+	---
	20	---	---	+	---
Cancerina	1	---	---	---	---
	3	---	---	---	---
	5	---	---	+	---
	10	---	---	+	---
	20	---	---	+	---

Tabla 5
Halos de inhibición en ext. etanólico

Muestra	Extracto (mg)	Halo (mm)
Cuachalalate	5	1.8
	10	2.5
	20	4.0
verde de malaquita (testigo)	0.05	8.5
Cancerina	5	1.8
	10	3.5
	20	5.5
verde de malaquita (testigo)	0.05	10.0

5.0 CONCLUSIONES

1) Todas las dosis empleadas en el tratamiento *In Vivo* con Cuachalalate (*A. adstringens*) contra la Saprolegniasis que afecta a la Trucha Arco-iris, presentaron aproximadamente el mismo efecto inhibitorio, por lo que se recomienda como dosis terapéutica óptima a la Dosis 1 (2.5 g/l), ya que presenta una acción fungicida muy parecida a la de las otras dosis sin emplear gran cantidad de planta.

2) Todas las dosis utilizadas en el tratamiento *In Vivo* con Cancerina (*H. excelsum*) contra la Saprolegniasis de la Trucha Arco-iris, presentan aproximadamente el mismo efecto inhibitorio por lo que se recomienda como dosis terapéutica óptima a la Dosis 1 (25 ml), ya que su acción fungicida es muy parecida a la de las otras dosis sin utilizar gran cantidad de planta.

3) En pruebas *In Vitro* se demostró que el efecto de los extractos etanólicos de las plantas es realmente fungicida y no solo cicatrizante.

4) Se demostró que "El principio activo" que tiene función fungicida tanto en el Cuachalalate como en la Cancerina presentan una polaridad alta ya que fueron aislados en los extractos etanólicos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguilera, H.P. y C.P. Noriega. 1986. La trucha y su cultivo. FONDEPESCA; México.
- 2.- Alderman, J.A. and J.L. Polglase. 1984. A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Trans. Br. Mycol. Soc. 83 (2): 313-318.
- 3.- Alexopoulos, C.J.. 1979. Introducción a la micología. Ed. Universitaria de Buenos Aires, Argentina.
- 4.- Bailey, T.A.. 1984. Effects of twenty-five compounds on four species of aquatic fungi (Saprolegniales) pathogenic to fish. Aquaculture, 38: 97-104.
- 5.- Bardach, T.F. et al. 1986. Acuicultura, crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. AGT editor. México.
- 6.- Cortéz, R.P.. 1979. Estudio bibliográfico de la planta denominada cuachalalate desde el punto de vista de la toxicología. Tesis de lic.; Fac. de Química, U.N.A.M. México.
- 7.- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2a. ed. The New York Botanical Garden; N.Y., U.S.A.
- 8.- Díaz, J. L.. 1988. La entofarmacología como método de investigación de plantas medicinales. Algunas aplicaciones a la veterinaria. 1a. jornada sobre herbolaria medicinal en medicina veterinaria F.M.V.Z., U.N.A.M.. México, D.F..

- 9.- Estrada, L.E.. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales "Maximino Martínez" (1888-1964). Dpto. Fitotecnia, U.A.CH..
- 10.-González, E.E. and J.N. Delgado. 1962. Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. J. Pharm. Sci. Vol. 51, No. 8: 786-790.
- 11.- -----; et al. 1962. Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*. J. Pharm. Sci. Vol. 51, No. 9: 901-903.
- 12.- Hawksworth, F. G. 1977. The six class dwarf mistletoe rating. USDA Forest Service. Fort Collins, Colorado. General Technical Report RM. 48.
- 13.- Huet, M. 1983. Tratado de piscicultura. Ediciones Mundi-prensa; Madrid.
- 14.- Jiménez, G. F. et al. 1986. Parásitos y enfermedades del bagre. 2a. ed. Fac. de Ciencias Biol. U.A.N.L.. FONDEPESCA.
- 15.- Lagler, R.F. et al. 1990. Ictiología. AGT editor. México.
- 16.- Lanzing, W.J.R.. 1965. Observations on malachite green in relation to fish diseases. Hydrobiology, 25: 426-441.
- 17.- Linares, E.M. y R. Bye. 1988. Selección de plantas medicinales de México. Limusa; México.
- 18.- López, C.R.. 1989. Estudio fitoquímico preliminar de la Hippocratea excelsa. Tesis profesional, Químico-farmacéutico-biólogo. ENEP Zaragoza, U.N.A.M..
- 19.- Martínez, M.. 1944. Las plantas medicinales de México. 3a ed. Ediciones Botas; México.

- 20.- -----, 1987. Inventario de plantas mexicanas (Nombres comunes y científicos). México.
- 21.- -----, 1979. Catálogo de nombre vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México.
- 22.- Mc. Farland, W. N.. 1985. Vertebrate life. 2a. ed. Macmillan Publishing Co. Inc. Ney York, U.S.A.
- 23.- Navarrete, C.A.. 1982. Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliana adstringens* (Cuachalalate). Tesis profesional, Químico-farmacéutico-biólogo. ENEP Zaragoza. U.N.A.M..
- 24.- -----; et al. 1990. Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate). Rev. Mex. Cienc. Farm; Vol. 21, No. 3: 28-32.
- 25.- Palacios, J. et al. 1989. "*Hemiantium excelsum* (Hippocrataceae) a new source of trans-polyisoprene". Economy Botany. 43 (4): 508-509.
- 26.- Pennington, T.A. y J. Sarukhán. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. Common Wealth Forestry Institute; University of Oxford; England.
- 27.- Ramírez, G.R. y A.M.L. Sevilla. 1962. Instructivo para la cria de la trucha. Secretaría de industria y comercio. Inst. Nal. Inves. Biol. Pesqueras; México, D.F..

- 28.- Roberts, R.J.. 1981. Patología de los peces. Ediciones Mundi-prensa; Madrid, España.
- 29.- ----- and C.J. Shepherel. 1986. 2a. ed. Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Books, Ltd. Farnham; Surrey, England.
- 30.- Rosas, M. 1976. Peces dulceacuícolas que se explotan en México y datos sobre su cultivo. INP. CESTEM NO. 2. México.
- 31.- Rzedowski, J.. 1988. Vegetación de México. Limusa; México.
- 32.- Sánchez, S.R.. 1991. Evaluación de la actividad antiulcerosa de *Mentha pulegium* (Ticuiliche) y *Hemiangium excelsum* (Cancerina) en rata Wistar. Tesis de lic. ENEP Zaragoza, U.N.A.M. México, D.F..
- 33.- Secretaría de pesca. 1986. Piscicultura de agua dulce. Manual-recetario baque-carpa-tilapia-trucha; México.
- 34.- Singhal, R.N. et al. 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. Aquaculture; 54: 165-171.
- 35.- Smith, A.C.. 1940. The american species of Hippocrateacea. Britonia 3(3): 410-417.
- 36.- Smith, S.N. et al. 1985. Infection and colonization of trout eggs by Saprolegniaceae. Trans. Br. Mycol. Soc. 85(4): 719-764.
- 37.- Soriano-García, M. et al. 1987. Structure and stereochemistry of the Methyl Ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7, 24-dien-26-oic Acid (Masticadeniic acid). Acta Cryst. C43, 990-992.

- 38.- Ulloa, M. y R.T. Hanlin. 1978. Atlas de micología básica. Ed. Concepto; México.
- 39.- Velásquez, E.M.A. y H. Espinosa. 1989. Diagnosia del estado actual del cultivo de la trucha arco-iris de México. Secretaría de Pesca; México.
- 40.- Volak, J. y J. Stodula. 1988. Plantas medicinales. Susaet, S.A. Checoslovaquia.