



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO FUNGICIDA DE DIFERENTES
EXTRACTOS DE *Equisetum hyemale* L. EN HONGOS
DERMATOFITOS Y FITOPATÓGENOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

AURORA JIMENA ZUMAYA GONZÁLEZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA SOL ROBLEDO Y MONTEERRUBIO

2013

-A mis padres y hermanos-

AGRADECIMIENTOS

A la asesora de este trabajo la Dra. María Sol Robledo y Monterrubio por su tiempo y los conocimientos aportado para mi formación académica.

Gracias a la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Laboratorio de Agroecología donde se realizaron los experimentos para este trabajo a cargo de la Doctora María Sol Robledo y Monterrubio junto con su equipo de trabajo: Higinio Arias y Mario Venegas.

Al equipo que colabora en el Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Universidad Autónoma Chapingo: la Doctora Diana Guerra Ramírez y el Doctor Benito Reyes Trejo por su apoyo incondicional, amistad y palabras alentadoras. Por la amistad de Benita.

Al Dr. Rubén López Martínez y Elva Bazán Mora de la Facultad de Medicina, UNAM, por la donación de cepas de dermatofitos para poder realizar una parte de este trabajo.

Para el asesoramiento de la estadística se agradece al M. en C. Iván Israel Castellanos Vargas y a la M. en C. Sonia María Juárez Orozco de la Facultad de Ciencias, UNAM, gracias por el tiempo brindado.

A los sinodales Lilia Pérez y Elva Bazán por su tiempo y dedicación para que se concluyera el trabajo.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer por su apoyo, comprensión, palabras y paciencia, siendo de gran aporte al trabajo por el conocimiento compartido conmigo.

A la Dra. Josefina Herrera Santoyo por las duras lecciones e imponerme grandes retos, gracias a ello pude percibir de diferentes puntos de vista este trabajo.

Al compañero de trabajo y amigo Juan Manuel Pérez por su paciencia y enseñanza en la parte final de la estadística de este trabajo.

Este trabajo no pudo haber sido posible sin el apoyo de cada uno de ustedes.

DEDICATORIA

A la persona que siempre nos ha apoyado y dado la vida: mi abuelita Anita González.

A mis padres, Estela y Román por el esfuerzo y cariño de toda la vida. A Estela por el apoyo y amor infinito que me has brindado, a Román por darnos lo principal: estudio y apoyo. Los amo.

A mis hermanos: Omar y Luis por estar conmigo cuando más lo necesite, caídas, salud, escuela, gracias por su amor. Fanny, Sam y Tochi gracias por su cariño y risas.

Cris Oropeza por llegar a mi vida e influenciarme a terminar metas y cerrar círculos, gracias por el apoyo inimaginable, amor y comprensión, sabes que es mutuo.

Dianita Guerra gracias por el hospedaje, las pláticas, tu amistad, tu comprensión, tu conocimiento, fuiste y eres una persona muy importante en mi vida.

Magda gracias por ser mi hermana desde hace 14 años. Te quiero mucho.

Saúl "el padrino" por tu amistad que por nada la cambiaría, eres como un hermano.

Alfredo Linares la distancia no importa, jamás dejaré de estar agradecida, te quiero mucho.

A mis amigos de la facultad: Lucía, Yobas, Aurelio y Felipe por ser parte importante en lo académico, amistad, fiestas, debrayes, tristezas y logros. A Jeanette Rosas por compartir tu amistad sincera. Memo con tu sarcasmo y consejos te convertiste en un buen amigo. Ana Lilia agradecida por nuestras pláticas divertidas.

Citla las palabras sobran, sabes toda la conexión que existe en nuestra amistad.

A Erandi gracias por tu comprensión y apoyo fiel cuando más lo necesite.

Alejandra Barrios por todos los momentos padres que pasamos en escuela, prácticas de campo, viajes, fiestas, familia, eres genial. A Itzuri por tener siempre una buena vibra y ser una amiga única. Las quiero.

A mis tíos: Silvia, Jorge, Arturo, Olga y Rosio por estar siempre al pendiente. Tania, Yorch, Negro, Car, Pistol, Olaf sé que siempre contaré con ustedes. Consejos sabios y divertidos de mi abuelito Luis Zumaya. Kari, Norma, Fabi, Susi, Lore y Pepe simplemente gracias por todo. A los compañeros de CIMA: Omar, Cecilia y Julio.

ÍNDICE

APARTADOS	PÁGINAS
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Productos Naturales	2
2.1.1 Plantas utilizadas como fungicidas naturales y antimicóticos	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Generalidades de <i>Equisetum hyemale</i> L., Pl. 1062 (1753). Neotipo designado por Hauke, 1995	4
3.1.1 Usos tradicionales y antecedentes farmacológicos del género <i>Equisetum</i>	5
3.2 Generalidades de los hongos dermatofitos	6
3.2.1 Características biológicas, distribución e importancia de <i>Trichophyton rubrum</i>	8
3.2.2 Características biológicas, distribución e importancia de <i>Epidermophyton floccosum</i>	10
3.3 Generalidades de los hongos Fitopatógenos	11
3.3.1 Características biológicas, distribución e importancia de <i>Alternaria solani</i>	12
3.3.2 Características biológicas, distribución e importancia de <i>Penicillium italicum</i>	14
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVO GENERAL	18
7. OBJETIVOS PARTICULARES	18
8. MATERIAL Y MÉTODO	19
8.1 Recolecta y herborización del material vegetal	19
8.2 Obtención de extractos de <i>Equisetum hyemale</i>	21
8.3 Obtención de las cepas	24
8.3.1 Dermatofitos.	24
8.3.2 Fitopatógenos	24

8.4 Pruebas de extractos en Dermatofitos	24
8.5 Prueba de extractos en hongos fitopatógenos	28
8.6 “Prueba de germinación” de esporas en dermatofitos y fitopatógenos	31
8.6.1 Método para la preparación de la solución valorada de esporas	31
8.6.2 Realización de la cámara húmeda en los hongos dermatofitos y fitopatógenos	32
8.7 Análisis de datos	33
9. RESULTADOS	34
9.1 Prueba de extractos en el crecimiento radial de dermatofitos	34
9.2 Prueba de extractos en el crecimiento radial de fitopatógenos	44
9.3 Germinación de esporas en dermatofitos	50
9.4 Germinación de esporas en fitopatógenos	55
10. DISCUSIÓN	60
10.1 Análisis del crecimiento radial de dermatofitos	60
10.2 Análisis del crecimiento radial de fitopatógenos	62
10.3 Análisis de germinación de esporas de dermatofitos	63
10.4 Análisis de germinación de esporas de fitopatógenos	63
11. CONCLUSIONES	65
12. LITERATURA CITADA	67
13. ANEXO	75

EFFECTO FUNGICIDA DE DIFERENTES EXTRACTOS DE *Equisetum hyemale*

L. EN HONGOS DERMATOFITOS Y FITOPATÓGENOS

1. Resumen

Las infecciones causadas por hongos dermatofitos ocasionan problemas de salud en todo el mundo. Asimismo existen hongos fitopatógenos que afectan enormemente algunos cultivos (jitomate, tomate, cítricos) a nivel mundial, provocando pérdidas económicas a gran escala.

En algunas investigaciones se menciona que el género *Equisetum* “cola de caballo” contiene compuestos activos utilizados medicinalmente convirtiéndolo en un modelo biológico a estudiar. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto que tienen diferentes extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* en el crecimiento radial y germinación de esporas en cuatro especies de hongos: dos dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* y dos fitopatógenos *Alternaria solani* y *Penicillium italicum*, además de determinar que especie es la más susceptible a los diferentes extractos y diferentes concentraciones de éstos.

Los resultados obtenidos indican que el extracto hexánico de *E. hyemale* provoca en los hongos dermatofitos una reducción en el crecimiento radial y en la germinación de esporas en concentraciones de 75 ppm y 100 ppm. En los extractos (cloruro de metileno y metanol) no se encontraron resultados significativos.

En fitopatógenos se observó que el hongo *Alternaria solani* es más susceptible al extracto metanólico ya que reduce su crecimiento radial a partir de la concentración de 1000 ppm, en extractos hexánico y cloruro de metileno no presenta alguna susceptibilidad. El hongo *P. italicum* tiene un efecto de disminución de crecimiento radial y germinación de esporas con el extracto hexánico en concentración 1000 ppm.

El extracto hexánico fue el tratamiento que más reduce el crecimiento radial y germinación de esporas, siendo los hongos más susceptibles a dicho extracto: *T. rubrum*, *E. floccosum* y *P. italicum*. Es necesario continuar con investigaciones posteriores ya que no se realizó una experimentación de fitoquímica de cada extracto, además los resultados obtenidos en el trabajo inducen a que los hongos dermatofitos son un modelo biológico poco estudiado.

2. Introducción

2.1 Productos Naturales

Los productos naturales son compuestos químicos o sustancias que producen algunos seres vivos provenientes de animales, plantas, hongos, etc., que generalmente tienen una actividad farmacológica y/o biológica (Mesa, *et al.* 2004).

El uso de productos naturales de origen vegetal es objeto de interés por diversas ramas de investigación principalmente químicas, biológicas y médicas, gran cantidad de medicamentos o productos patentados de control biológico (plagas, infecciones por hongos, bacterias, etc.) cuya base lo constituye un metabolito secundario de origen vegetal o alguna sustancia aislada (Agrios, 2010).

Los productos naturales están relacionados estrechamente en los estudios etnobotánicos (plantas medicinales específicamente), éstos permiten tener el conocimiento para seleccionar la planta para su estudio químico, a partir de experiencias y aprendizaje empírico del humano.

2.1.1 Plantas utilizadas como fungicidas y antimicóticos

El uso de plantas medicinales tiene un origen de hace miles de años, dicho uso es principalmente para combatir o contrarrestar a ciertos organismos que atacan al humano provocándole enfermedades. Algunas de las familias de plantas utilizadas medicinalmente en América Latina, por la producción de metabolitos secundarios son: Asteraceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae y Equisetaceae (Portillo, *et al.*, 2001). Otro ejemplo importante pertenece a las especies del género *Platymiscium* (leguminosa), ricas en cumarinas, isoflavonoides y flavonoides dándole una importancia farmacobiológica a dicho género (Reyes, *et al.*, 1998)

Pocas investigaciones muestran gran interés e importancia sobre *Equisetum*, género descrito por Hauke R.L. (1969) conocido como “cola de caballo”, ya que

posee diferentes propiedades curativas para el ser humano (inflamación de vías urinarias, problemas gastrointestinales, dermatitis, etc.) (Large *et al.* 2006).

Existen productos naturales con un efecto antifúngico. Los fungicidas naturales son un grupo de sustancias provenientes de plantas (aceites esenciales principalmente) que pueden controlar enfermedades provocadas por hongos patógenos (Arauz, 1998). Entre los fungicidas naturales más conocidos se encuentran los extractos de semillas de cítricos, orégano, eucalipto, propóleo, aloe y ajo (Sato, *et al.*, 2000), sólo en algunos casos se ha mencionado la “cola de caballo”. En el 2010 Guerra *et al.* mencionan que existen tres tipos de *Equisetum* (*Equisetum* sp, *E. hyemale* y *E. myrochaetum*) cuyos extractos derivados de dicha planta, presentan una actividad fungicida contra *Phytium aphanidermatum* proponiendo una nueva alternativa para un control de dicho hongo que afecta los cultivos de jitomate.

Bhuwan y Vinod (2011) mencionan que el área agraria tiene un problema en relación a la producción y control salubre del alimento. Las pérdidas pueden ser de millones de hectáreas a casi toda la producción de los cultivos, provocando un aumento de precios en este recurso alimenticio, escases de éstos, descontrol sanitario (contaminación por plaguicidas, pesticidas, fungicidas).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de *Equisetum hyemale* L., Pl. 1062 (1753). Neotipo designado por Hauke, 1995.

La palabra *Equisetum* tiene una etimología latina *equisetum* = equiseto; los tallos aéreos de algunas especies semejan una cola (lat. *seta* = cerda) de caballo (lat. *equus*). En la figura 1 se desglosa la clasificación según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Usos de la Biodiversidad (CONABIO) de *Equisetum hyemale*.

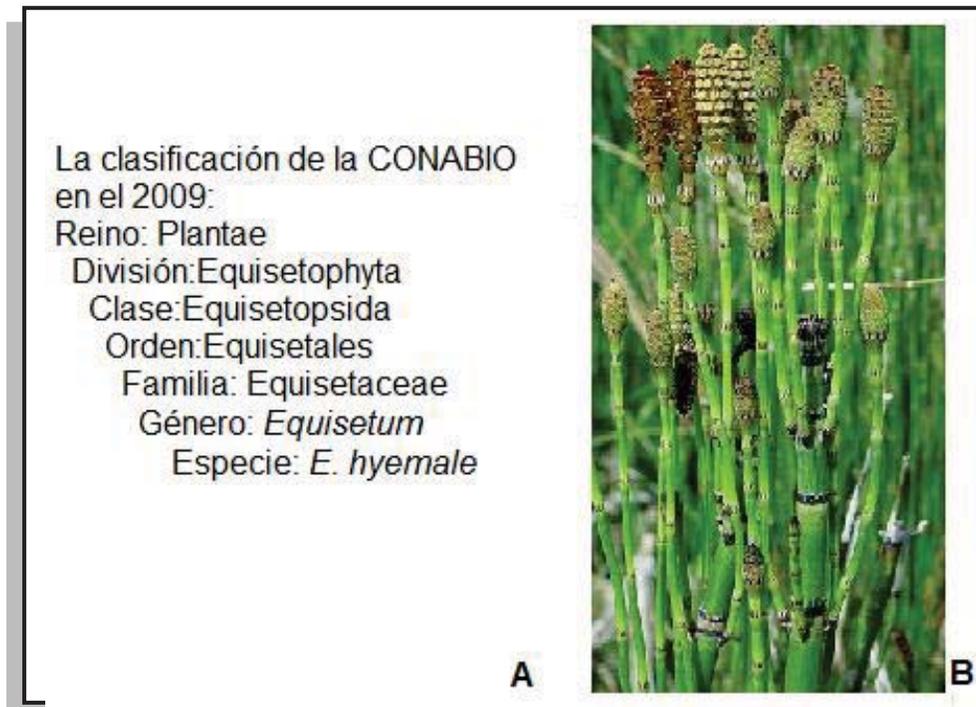


Figura 1. Generalidades de *Equisetum hyemale*. A. clasificación B. Planta en su hábitat

El género *Equisetum* es una planta vascular sin semilla, herbácea, de tallos articulados, hojas verticiladas, y contiene un estróbilo en la parte terminal (Moran *et al.*, 1995). Es único género de la división Equisetophyta, su hábitat y crecimiento está asociado a cuerpos o suelos con gran cantidad de agua poco profundas, en donde emerge el tallo (Rzedowski, 1978).

La distribución de la especie es subcosmopolita, ubicada particularmente en todo el hemisferio norte: Círculo Ártico, Alaska, Canadá, Estados Unidos, México hasta Centroamérica Europa, zona templada de Asia, (McVaugh, 1992; Mickel y Smith, 2004). En México (Tejero *et al.* 1998), el género *Equisetum* está representado por cinco especies y una variedad: *E. laevigtum*, *E. xferrissii*, *E. hyemale*, *E. myriochaetum*, *E. xschaffneri* y *E. hyemale* var. *myriochaetum*.

La CONABIO en el año 2009, menciona que la especie *Equisetum hyemale* tiene una distribución en gran parte de la República Mexicana: Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, D.F., Durango, Estado de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz.

3.1.1 Usos tradicionales y antecedentes farmacológicos del género *Equisetum*

El género por sus propiedades medicinales tiene un valor importante, algunas son: ayudar en problemas gastrointestinales, úlceras gástricas, utilizado como diurético (Gurbuz, *et al.*, 2008), astringente, evita inflamación de las vías urinarias, controla hemorragias externas e internas. (Jaric, *et al.* 2007), cálculos urinarios, dermatitis, evita algunos efectos a nivel celular como la absorción del calcio y la regeneración del tejido conjuntivo (Mandelker y Wynn, 2004), agente antioxidante, tuberculosis, reumatismo, (Brunet M., 2009), en algunas zonas de Italia, Roma y Noruega llega a ser culinario, por el tallado de madera, limpieza de dientes, pulido de algunos metales por su gran contenido de sílice (Gallardo *et al.* 2006).

Park y Tomohiko (2011) mencionan la presencia de compuestos tipo fenólicos y flavonoides en *E. hyemale*, con efectos antiinflamatorios y antioxidantes.

Dogan *et al.* (2010) al realizar el estudio para detectar antioxidantes en diferentes plantas incluida *E. hyemale* determinaron que ésta contiene mayor número de

antioxidantes y éstos están en relación con el alfa-tocoferol, el beta-caroteno, el ácido ferúlico y el ácido gálico.

Singh *et al.*, (2001) analizaron diferentes extractos (éter de petróleo, cloroformo y etanol) de *Equisetum arvense* indicando la presencia de flavonoides en el extracto etanólico.

Otro estudio menciona que en extractos de *E. giganteum* indican un efecto hipoglucemiante en la diabetes tipo II y en pruebas en ratones comprobaron la existencia de una actividad diurética proveniente de extractos metanólicos de las partes aéreas de la planta (Pérez y Anesini, 1994).

A pesar de la importancia medicinal que tiene este género (Large *et al.*, 2006), es limitado el número de estudios químicos realizados enfocados a la especie *Equisetum hyemale* por ello con este trabajo se aspira a un estudio químico, biológico y medicinal detallado de dicha especie para poder determinar los compuestos y efectos que presenta y así poder justificar su importancia aplicada medicinalmente.

3.2 Generalidades de los hongos dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo especial de hongos ascomicetos filamentosos que afectan tejidos queratinizados, provocando infecciones superficiales en humanos y algunos animales, ya sea a nivel de piel, pelo y uñas, este tipo de enfermedades es conocido como dermatofitosis (Díaz, *et al.*, 2002). Este grupo contempla tres géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*.

Las enfermedades provocadas por dermatofitos no provocan patología severa pero sí un gran problema de salud pública a nivel mundial. Se ha observado una diferencia entre la gravedad de la infección, en distintas zonas geográficas, socioeconómicas y políticas (López, *et al.*, 2009).

La forma de infección de los dermatofitos es a través de células resistentes (artróconidios), pueden resistir condiciones muy estresantes, estas células se adhieren a las membranas de los artróconidios, provocando la formación de hifas y la invasión del tejido queratinizado (piel, uñas, cabello, etc.), la queratina es el sustrato principal de los dermatofitos puesto que pueden asimilar proteínas y metabolizar enzimas pudiendo penetrar así el tejido e invadirlo por completo. Se estima que entre un 15-20% de la población mundial está infectada por este tipo de hongos a lo largo de su vida (Ballesté *et al.*, 2006). La dermatofitosis representa un problema grande en salud pública, con repercusión económica, la Organización Mundial de la Salud considera que el incremento mundial de la dermatofitosis varía dependiendo del país, por ejemplo, en el registro total de las enfermedades de España el 20.8% equivale a pacientes con algún tipo de micosis, en Brasil el 26.3%, en Irán 24% y en México se encuentra entre 70 y 80% (López *et al.*, 2009).

El papel de los hongos dermatofitos dentro de las enfermedades infecciosas humanas más comunes ha provocado una fuerte demanda en su investigación para desarrollar nuevos y específicos fármacos cuya finalidad es aumentar el espectro de acción, es decir, que tenga una mayor amplitud de acción de la sustancia activa de un medicamento para combatir a una serie de especies de microorganismos, hongos, bacterias, parásitos y virus, con un bajo precio económico. En México no se tienen antecedentes de investigaciones específicas de *E. hyemale* aplicadas a dermatofitos, por ello este trabajo es el inicio de nuevas investigaciones en esta área de conocimiento en la Universidad Autónoma Chapingo. La elección de los hongos está basado por el grave problema de salud en México provocado por la dermatofitosis, las especies más comunes son *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum*, constituyendo entre el 70 y 80% de todas las micosis registradas (Méndez *et al.*, 2004).

3.2.1 Características biológicas, distribución e importancia de *Trichophyton rubrum*

La descripción propuesta por Mycobank (2008) de *Trichophyton rubrum* es:

Phylum: Ascomycota

Clase: Eufungi

Orden: Onygenales

Familia: Arthrodermataceae

Género: *Trichophyton*

Especie: *T. rubrum*

De acuerdo con Hernández *et al.* (2007) es un hongo filamentoso, presenta microconidios con una forma de lágrima de entre 3-4 micras-hialinos con pared delgada; los macroconidios suelen ser escasos pero tienen una forma claviforme de 8-20 micras con pared delgada y fina, tienen forma de lápiz, pueden o no tener apéndices. (Adejumo y Bamidele, 2009). Crece en la mayoría de los medios de cultivo sus colonias son rojizas con blanco con un crecimiento de aproximadamente 14 días, cuando la cepa ya es vieja la superficie toma un aspecto algodonoso (Pyun y Shin, 2006) (Figura 2).

La infección conocida como tiña provocada por *T. rubrum* afecta muy rápido y superficialmente, perturba a humanos y otros animales, principalmente ataca piel, pelo y uñas (Graser *et al.*, 2000). Es la especie más común a nivel mundial.

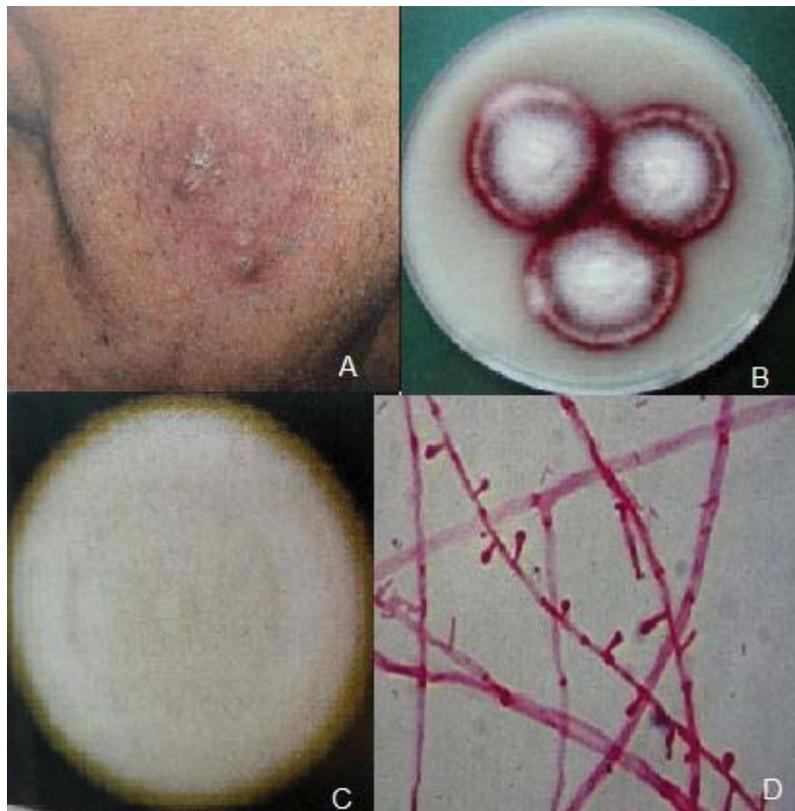


Figura 2. Características de *Trichophyton rubrum*. A. Paciente con tiña de barba (Tomado de Bologna, *et al.* 2004); B y C. *T. rubrum* en medio de cultivo (Tomado de Freedber, *et al.*, 2009); D. Microconidios vistos en 60X (Tomado de López, *et al.* 2009)

El medicamento ketoconazol es muy usado para el tratamiento causado por *Trichophyton rubrum*, Bonifaz (2010) menciona que contiene un amplio espectro, cuyo mecanismo de acción es fungistático y a concentraciones muy altas fungicida; pero el uso del medicamento provoca contraindicaciones como son náuseas, dolor abdominal, etc. Existen otros medicamentos utilizados para inhibir el crecimiento del hongo: itraconazol, terbinafina, clotrimazol y derivados de azoles, cuya desventaja consta de un tratamiento prolongado de 15 a 40 días dependiendo la zona atacada por el hongo y que tan grave sea la micosis, además de que el medicamento es costoso su precio aproximado va de los 250 a 400 pesos por 200 mg/día.

3.2.2 Características biológicas, distribución e importancia de *Epidermophyton floccosum*

La clasificación taxonómica de este hongo según Bologna, *et al* (2004) es:

Phylum: Ascomycota

Clase: Eueascomycetes

Orden: Onygenales

Familia: Arthrodermataceae

Género: *Epidermophyton*

Especie: *E. floccosum*

Es un hongo filamentoso, desarrolla macroconidios multicelulares ubicados encima de los conidióforos multicelulares, puede distinguirse de otros dermatofitos (*Trichophyton* y *Microsporum*) por la ausencia de microconidios; la pared de *Epidermophytum* es gruesa y lisa, sus hifas son espiriladas (forma de raqueta). Los macroconidios suelen ser abundantes de entre 3-5 células (López, *et al.*, 2009).

Las colonias crecen con lentitud y tienen aspecto plumoso, en un comienzo son blanco grisáceo (Figura 3), al madurar adquieren una pigmentación verdosa, la superficie de la colonia es algodonosa.

Epidermophyton floccosum tiene una distribución cosmopolita. La infección en humanos es conocida como tiñas, su crecimiento se da en la piel, rara vez en uñas; nunca en pelo. Es controlado principalmente con ketoconazol e itraconazol, pudiendo tener efectos secundarios (náuseas, mareos, depresión, dolor de estómago, daños al riñón) en la persona que lo consuma (Wolff, *et al.* 2009).



Figura 3. A. Paciente con tiña en los pies (Tomado de López, *et al.* 2009); B. *Epidermophyton floccosum* crecido en medio de cultivo Borelli; C. y D. Vista de macroconidios a 10X y 40X (Modificado de Bonifaz, A. 2010)

3.3 Generalidades de los Hongos Fitopatógenos

La fitopatología estudia los organismos y las condiciones del ambiente, interacciones, procesos y ciertos factores que pueden producir enfermedades en las plantas además la fitopatología puede establecer métodos para prevenir dichas enfermedades. Existen diversos microorganismos fitopatógenos que atacan enfermedades en las plantas causadas por hongos, bacterias, nemátodos, virus, protozoarios; de los anteriores los que atacan con mayor frecuencia a las plantas son los hongos. Existen 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas. La supervivencia y la función de un gran número de hongos fitopatógenos dependen de las condiciones como la temperatura y humedad principalmente (Agrios, 2010).

Los géneros de hongos fitopatógenos más investigados debido a su distribución y a sus hospedantes son *Fusarium*, *Pythium*, *Phymatotrichum* y *Alternaria* (Rodríguez, 2001).

Los organismos (bacterias, hongos, virus, insectos, nematodos) que causan enfermedades a las plantas provocan tanto pérdidas de cultivo alimenticio como económicas. Agrios (2010) señala que las pérdidas debidas a las enfermedades de postcosecha se estiman en un 10 a 30% de la pudrición total de los cultivos, y en algunos cultivos las pérdidas son superiores al 30% sobre todo en los países en vías de desarrollo; se pueden incrementar las pérdidas hasta un 50% en regiones con clima tropical (Kinay *et al.*, 2007). El uso de fungicidas ha tenido en la mayoría de los casos una respuesta positiva con el control del hongo, pero el gasto económico para aplicar los fungicidas es aproximadamente de 30 millones M.N. (Pimienta, *et al.* 2008); no se descartan los efectos negativos por el uso de fungicidas ya que para su elaboración son necesarios ciertos tipos de compuestos químicos, por ejemplo: compuestos de cobre, azufre, aromáticos, etc. (Agrios, 2010 y Muscheetti *et al.*, 2005).

La elección en los hongos fitopatógenos (*Alternaria solani* y *Penicillium italicum*) se dio por ser de las especies de hongos que mayor pérdida económica y alimenticia provocan en México (Agrios, 2010) y por la escasa investigación del género *Equisetum* con una aplicación agronómica.

3.3.1 Características biológicas, distribución e importancia de *Alternaria solani*

La clasificación de *Alternaria solani* (Cook) Wint según Global Biodiversity Information Facility (2010):

Phylum: Ascomycota
Clase: Dothideomycetes
Orden: Pleosporales
Familia: Pleosporaceae
Género: *Alternaria*
Especie: *A. solani*

Los conidios de *Alternaria* tienen forma parecida a una pera, son multicelulares, presentan septos transversales y longitudinales de color pardo. *Alternaria solani* tiene el micelio de color oscuro, en cultivos viejos produce conidióforos erectos, cortos y simples dando origen a cadenas simples o ramificadas de conidios, estos conidios tienen un color oscuro y pueden presentar septos longitudinales o transversales, que se pueden desprender fácilmente provocando un mayor grado de contaminación (Chaerani *et al.*, 2007)

Alternaria puede identificarse por su color en las colonias que va de café oscuro a negro (Figura 4), cuando se extiende el hongo pocas veces son las que no forman anillos concéntricos de color blanquizco.

El género *Alternaria* tiene una distribución cosmopolita. Las especies de *Alternaria* se encuentran en segundo lugar en cuanto a su presencia en el aire. En el medio de cultivo adecuado (Papa Dextrosa Agar PDA) la presencia de esporas es óptima a 27°C pero se inhibe a los 15°C en condiciones de laboratorio (Carrillo, 2003)

Las especies fitopatógenas de *Alternaria* hibernan como micelio en los restos de plantas infectadas, en las semillas en forma de esporas o micelios (Bottalico y Logrieco, 1993); la mayor infección de *A. solani* se presenta principalmente en las hojas, el tallo, flores y frutos (Agrios, 2010), por ejemplo, la infección en plántulas forma lesiones circulares o alargadas con anillos concéntricos.

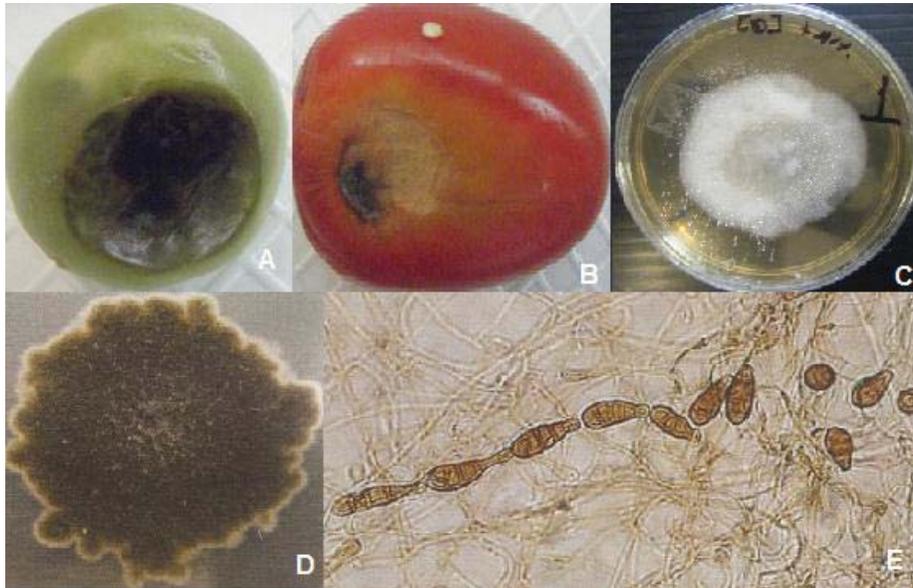


Figura 4. A. y B .Pudrición de tomate y jitomate por *Alternaria solani*; C. *A. solani* crecido en medio PDA; D. Micelio oscuro característico de *Alternaria* sp; E. Esporas de *Alternaria* sp. (D y E, modificado de Bonifaz, A. 2010)

3.3.2 Características biológicas, distribución e importancia de *Penicillium italicum*

La clasificación de *Penicillium italicum* mencionada por Global Biodiversity Information Facility en el 2010 es: Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Especie: *P. italicum*

Penicillium italicum se caracteriza por que produce típicamente cabezas en forma de cepillos, los conidióforos tienen paredes lisas y hialinas, sus fiálides son cilíndricas con cuellos cortos, los conidios son globosos o semiglobosos (Arias y Piñeros, 2008). En medio de cultivo el crecimiento micelial de *P. italicum* tiene un

aspecto que va de un color verde oscuro a verde pálido grisáceo, al reverso de la caja de Petri va de blanquizco a gris (Rundberget *et al*, 2004).

Este hongo es causante de la putrefacción de las frutas cítricas, en especial durante la post-cosecha. Crece bastante bien en carbohidratos y compuestos nitrogenados, en bajas concentraciones de iones de calcio inducen a una producción de conidios en algunas especies. En particular *Penicillium italicum* es característico de la naranja (Figura 5).

Agrios (2010) menciona que el género *Penicillium* puede producir ciertas toxinas benéficas y perjudiciales, algunos ejemplos son la patulina y ácido penicílico principalmente provocando algunas enfermedades a plantas, ganado y al humano, un ejemplo de toxina benéfica es la penicilina. En países en desarrollo el deterioro de la comida por hongos provocan pérdidas económicas que van desde el 5% al 20% de la cosecha por causa de *P. italicum* (Pimienta, *et al.*, 2008).

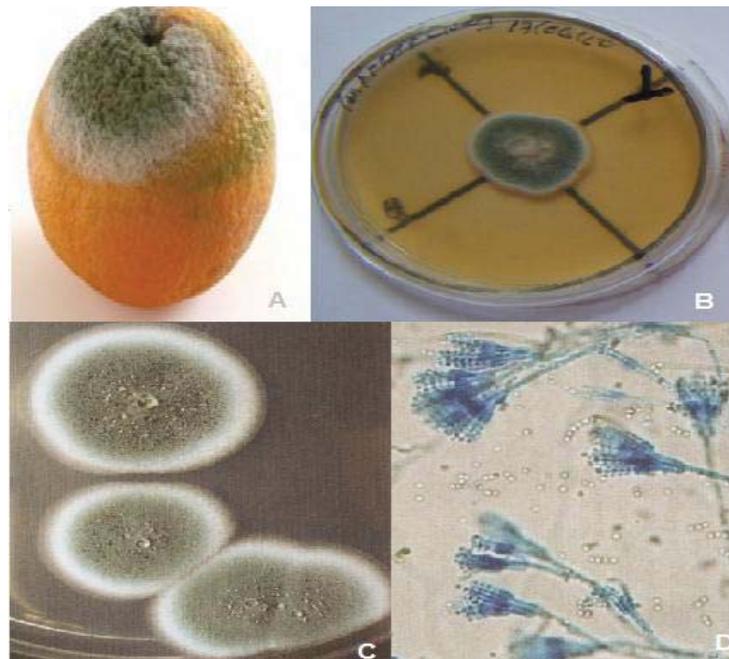


Figura 5. Naranja atacada por *Penicillium italicum*; B. Crecimiento de *P. italicum* en medio PDA; C. Forma y color característico de la colonia; D. Conidióforos y esporas de *P. italicum* (C y D modificado de Bonifaz, A. 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

El género *Equisetum* es importante en México por su uso tradicional, en algunas investigaciones de las especies: *E. hyemale* y *E. arvense* se ha reportado la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos con actividad principalmente antiinflamatoria (Park y Tomohiko, 2011); otros compuestos de interés son también el alfa-tocoferol, el beta-caroteno, el ácido ferúlico y el ácido gálico que están relacionados con actividad antioxidante (Singh *et al*, 2001).

Equisetum hyemale es una planta utilizada en la medicina tradicional para tratamientos relacionados con problemas gastrointestinales, astringentes, inflamación de las vías urinarias y dermatitis, ésta última es un síntoma estrechamente relacionado a los diferentes tipos de micosis. En México es frecuente la presencia de hongos patógenos que afectan de manera importante al ser humano y a diferentes cultivos, por otro lado, la información recopilada de la medicina tradicional nos indica que existe una gran cantidad de especies vegetales que pudieran ser utilizadas para contrarrestar el efecto de estos patógenos para dermatofitos; por lo tanto en este trabajo se utilizaron como modelo a los hongos: *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* (dermatofitos) *Alternaria solani* y *Penicillium italicum* (fitopatógenos) para evaluar el efecto de extractos orgánicos de *E. hyemale* en el crecimiento radial y germinación de esporas.

En México es frecuente la presencia de hongos patógenos que afectan a gran escala al humano y a cultivos, por lo tanto en este trabajo se utilizaron como modelo a los hongos: *Alternaria solani* y *Penicillium italicum* (fitopatógenos); *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* (dermatofitos) para evaluar el efecto de extractos orgánicos en el crecimiento radial y germinación de esporas.

5. Hipótesis

Si el uso medicinal atribuido a *E. hyemale* se relaciona a alguna enfermedad micótica en humanos y en cultivos, entonces los extractos orgánicos obtenidos de la especie vegetal provocarán una disminución o una inhibición en el crecimiento radial y germinación de esporas de los hongos: *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* (dermatofitos); *Alternaria solani* y *Penicillium italicum* (fitopatógenos).

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* sobre el crecimiento radial y la germinación de esporas de cuatro especies de hongos: dos fitopatógenos (*Alternaria solani* y *Penicillium italicum*) y dos dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*).

7. OBJETIVO PARTICULAR

- a) Determinar la especie más susceptible en el crecimiento radial y la germinación de esporas en las diferentes concentraciones de los extractos.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 Recolecta del material vegetal.

La recolección de *Equisetum hyemale* se realizó el día 10 de junio del 2010, en el Municipio de Tenancingo, lugar conocido como el Ahuehuate, Edo. de México, colindando con los Municipios de Gualupita y Chalchihuapan, con un intervalo altitudinal que va de los 2,060 a 2,490 msnm, ubicándose a 40 km de la ciudad de Toluca. Se recolectaron aproximadamente 3 kilogramos de *Equisetum hyemale* ya que era escaso (Figura 6); un espécimen se herborizó e identificó, se depositó una muestra con el número de registro 23474 en el Herbario de la Universidad Autónoma de Chapingo. La identificación de la especie del *Equisetum* fue hecha por la Dra. María Sol Robledo y Moterrubio utilizando las claves de Tejero, (1998) y Davidse, *et al.* (1995).

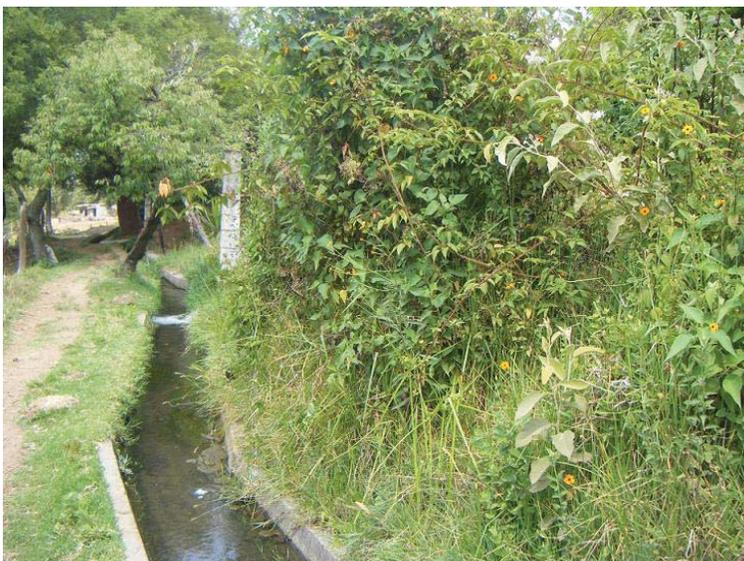


Figura 6. Localidad del *Equisetum hyemale*, Municipio de Tenancingo, Edo. de México.

Según Davidse, *et al.* (1995) las características generales de *E. hyemale* es una hierba hasta de dos metros de altura, presenta un tallo delgado con huecos, quebradizos, erecto, teniendo de 20-24 crestas, sus vainas nodales miden 5.5-10

X 5.5-7.5 mm, basalmente con un anillo oscuro, los estróbilos miden 35 X 16 mm y apiculados (Figura 7), naciendo en los tallos jóvenes entre septiembre y noviembre, las esporas son grandes (45-59 μ m), brillantes y presentan eláteres y los estomas están distribuidos en líneas simples. (Tejero, *et al.* 1998).

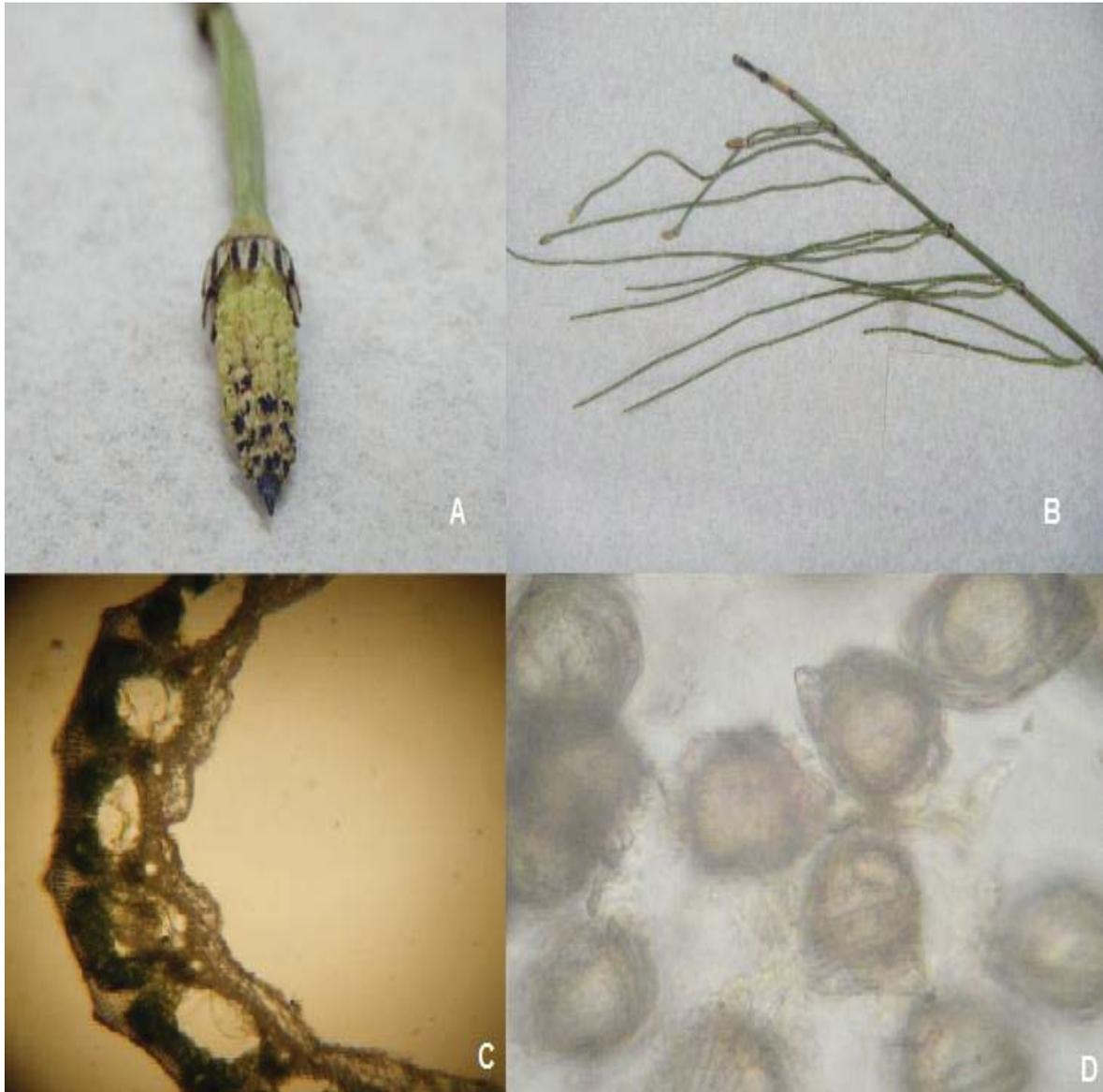


Figura 7. Características de *E. hyemale*: A. Estróbilo apiculado de 36 X16 mm; B. Se muestra el material herborizado; C. Las crestas van de 20 a 24 y D. las esporas son grandes.

8.2 Obtención de extractos de *Equisetum hyemale*

Se realizó la extracción selectiva en frío de las partes aéreas de la planta con tres disolventes de diferente polaridad: hexano, cloruro de metileno y metanol.

La parte aérea de la planta fue secada a la sombra durante tres días posteriormente se cortó en trozos aproximados de 1 cm y se extrajo con 8 L de disolvente (con el siguiente orden: hexano, cloruro de metileno y metanol) a temperatura ambiente durante tres días por disolvente (técnica conocida como maceración) (Figura 8). Transcurrido dicho tiempo el material vegetal se separó por filtración. El filtrado se evaporó al vacío en un Rotavapor (Modelo BUCHI Switzerland R-210 y Heating Bath B-491) (Figura 9), el residuo vegetal se sometió a dos extracciones más con el mismo disolvente correspondiente. Posteriormente el residuo del material vegetal fue macerado 72 horas (tres veces) con cloruro de metileno y después con el metanol, siguiendo el mismo procedimiento que con el primer disolvente hexano.



Figura 8. Técnica de maceración de *Equisetum hyemale*

Finalmente el residuo vegetal obtenido de la extracción con cloruro de metileno se extrajo con metanol y el material vegetal de *E. hyemale* fue desechado. Las extracciones con los tres disolventes se realizaron en el Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Universidad Autónoma Chapingo. En el diagrama 1 se resume la técnica de obtención de extractos de los diferentes disolventes.



Figura 9. Evaporación a presión reducida

Los pesos finales de la obtención de cada extracto fueron: para el extracto hexánico 12 g, para el extracto de cloruro de metileno 7 g y para el extracto metanólico 45 g (Figura 10).



Figura 10. Extracto metanólico, cloruro de metileno y hexánico

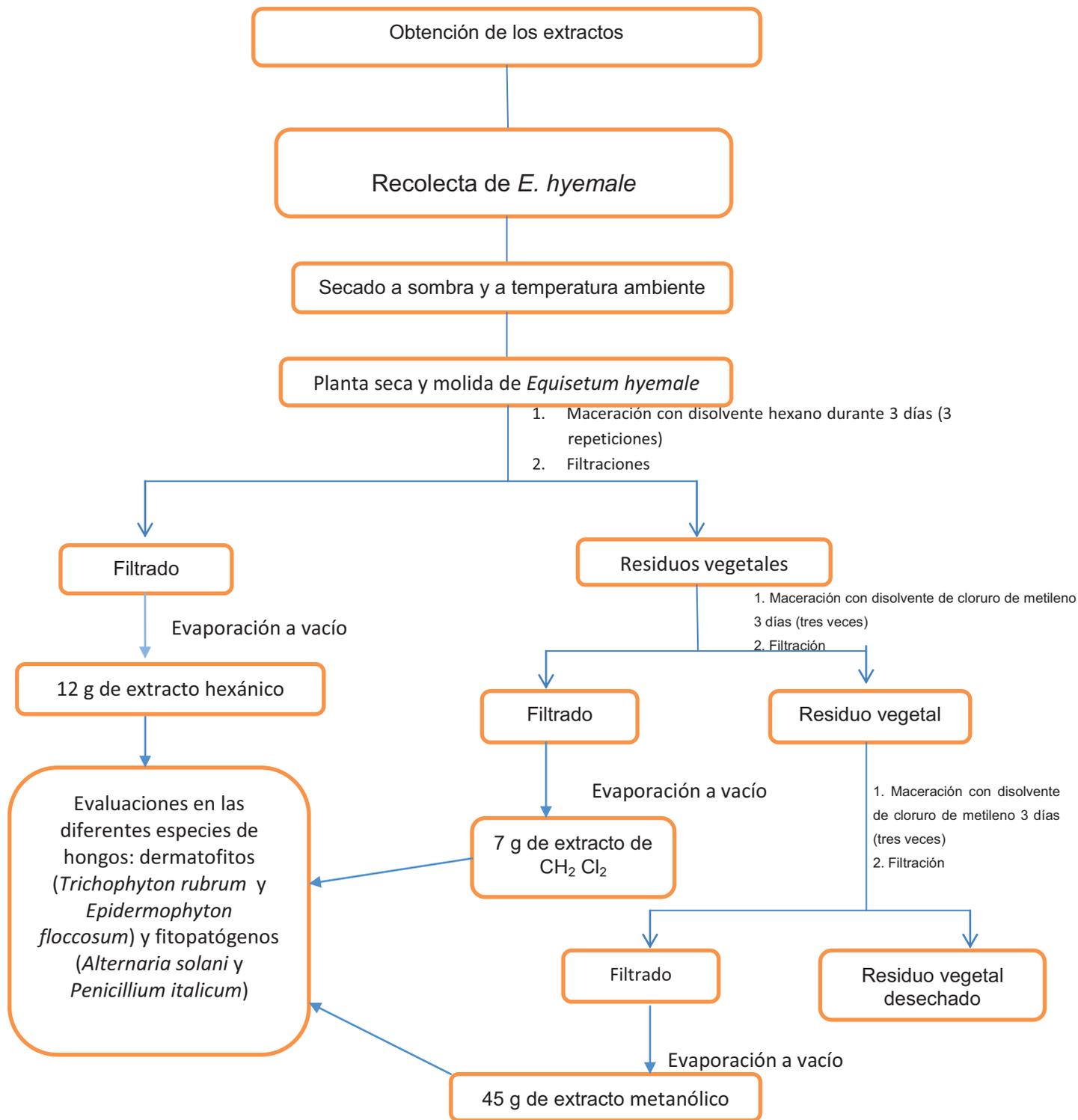


Diagrama 1. Proceso general para la obtención de extractos de *E. hyemale* con tres disolventes: hexano, cloruro de metileno y metanol

8.3 Obtención de las cepas

8.3.1 Dermatofitos

Los hongos a evaluar con los diferentes extractos de *E. hyemale* fueron donados por el Dr. Rubén López Martínez, Jefe de Laboratorio de Micología Médica y por la Bióloga Elva Bazán Mora del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, siendo las cepas: *Epidermophyton floccosum* con clave FM651 y *Trichophyton rubrum* con clave FM881. Se vigorizaron las cepas FM651 y FM881 en medio Borelli, inoculado un total de 6 cajas de Petri, con tres repeticiones para cada hongo.

8.3.2 Fitopatógenos

Se adquirieron naranjas (*Citrus sinensis*) en el mercado con sintomatología en estado de pudrición y aspecto con presencia de hongos, aislándose directamente de la cáscara de naranja el fitopatógeno *Penicillium italicum*; mientras que el hongo *Alternaria solani* se aisló del tomate (*Physalis ixocarpa*), dichos tomates se seleccionaron por la presencia de manchas circulares negras. Ambos hongos fueron identificados por la Dra. María Sol Robledo y Monterrubio. Para el cultivo de cada hongo se utilizó medio Papa Dextrosa Agar (PDA), inoculando tres cajas de Petri por hongo por método de estría, se incubaron a 29°C durante 7 días. Al tener ya el hongo puro se inoculó en varias cajas de Petri, tapando, sellando y fechando colocándolas en la incubadora a 29°C. Teniendo un total de seis cajas de Petri, es decir, 3 inoculaciones para *A. solani* y *P. italicum*.

8.4 Pruebas de extractos en Dermatofitos

Teniendo las cepas ya vigorizadas, se dividió en cuatro partes el experimento: a) elaboración de la solución madre del extracto, b) preparación del medio de cultivo, c) obtención del Itraconazol a partir de un producto comercial y d) siembra del hongo con los diferentes extractos y producto antimicótico comercial.

a) Elaboración de la solución madre del extracto hexánico

Se esterilizó un litro de agua destilada entre 15 y 20 lb/pulg² en la autoclave Modelo Metron Kg/cm lb/pulg² (0-55). En condición de asepsia en un vaso de precipitados de 15 ml, se pesaron en la balanza granataria 0.2 g de extracto hexánico dentro de la Campana de Flujo Laminar se agregaron al extracto 6 gotas de Tween 80 y 0,5 ml de acetona (Chattapadhyay y Dureja, 2006), con un agitador se disolvió el extracto, se agregó agua estéril al vaso de precipitados, al tener el extracto se vació la solución madre aforando la solución a 400 ml de disolución, se sonicó (Sonicador modelo Cole-Parmer 8890) durante 15 minutos.

La solución madre del extracto hexánico utilizada correspondió a 0.2 g, los cálculos se tomaron a partir de anteriores experimentos de prueba realizados en el Laboratorio de Agroecología (UACH), donde se determinaron las concentraciones para el experimento: [50], [75] y [100] ppm, además de hacer una prueba negativa (control) y pruebas con disolvente correspondiente al extracto (1 ml) y Tween (6 gotas) ambos actuando como testigos, además de existir un control positivo, antimicótico itraconazol, disuelto en medio de cultivo Borelli utilizando las mismas concentraciones que el extracto.

En la tabla 1 se muestran las cantidades correspondientes a la disolución del extracto hexánico en partes por millón (ppm) y de agua destilada para complementar la elaboración del medio de cultivo.

Tabla 1. Cantidades para la realización de los medios de cultivo con las diferentes concentraciones a partir de la solución madre del extracto hexánico

Tratamiento	Medio	ml de H ₂ O destilada	ml disolución de la solución madre	[ppm]
1	Borelli	160	40	[100]
2	Borelli	170	30	[75]
3	Borelli	180	20	[50]
4	Borelli	200	0	[0] control negativo
5	Borelli	200	0	Disolvente 1 ml (testigo)
6	Borelli	200	0	Tween 6 gotas (testigo)

b) Preparación del medio de cultivo Borelli

Para hacer el medio de cultivo Borelli, se necesitaron matraces correspondientes al número de tratamientos (concentraciones) se le agregó la cantidad correspondiente a la tabla 1 de agua destilada, se esterilizó por 30 minutos a una presión de 15-20 lb/pulg².

Al estar tibio el medio de cultivo, se adicionaron los mililitros de la disolución madre del extracto para completar los 200 mililitros. En el tratamiento testigo Tween se le agregaron 6 gotas al medio de cultivo y al tratamiento testigo Disolvente se le agregó 1 ml. Se movieron los matraces por tres minutos en el sonicador, se vertió el medio en las cajas de Petri. Al tener medio de cultivo solidificado se etiquetaron y sellaron con Parafilm para evitar alguna deshidratación.

c) Obtención de Itraconazol a partir de un producto comercial

Al no contar con una muestra de Itraconazol en el laboratorio, se decidió extraerlo de las cápsulas de un producto comercial (Isox®) cuyo contenido es de 100 mg por cápsula. Considerando que Itraconazol está combinado con un excipiente que es carboximetil celulosa (CMC). Fue necesario sacar el contenido de 3 cápsulas y deshacer dicho contenido con ayuda de un mortero y 10 ml de CH₂Cl₂, agitándose magnéticamente por 30 minutos. Se filtró. Lo filtrado se pasó al Rotavapor a una temperatura de 20°C. Obteniéndose la sustancia activa.

El uso de Itraconazol es necesario para los experimentos, siendo el control positivo, para las cepas FM881 y FM651 (De Baule, 1996), fue necesario hacer medios de cultivo con concentraciones, 50 ppm, 75ppm, 100 ppm y el control negativo, para comparar con las mismas concentraciones de los extractos.

d) Siembra del hongo

Se llevó a cabo la técnica de Robledo *et al.* (2009), una vez vigorizadas las cepas (30 días antes de sembrar los hongos) FM651 y FM881, con un sacabocados estéril, se tomaron discos de micelio de 6 mm de diámetro, el cual fue inoculado al centro de cada caja de Petri. Se hicieron tres repeticiones por concentración y por testigos (Tween y disolvente), dando un total de 36 cajas de Petri sembradas por ambas cepas (FM651 y FM881). Se incubaron a una temperatura de 36°C durante un mes hasta alcanzar el crecimiento total (diámetro total 80 mm) de la caja de Petri.

La medición del crecimiento radial del hongo consistió en dibujar dos ejes perpendiculares en la parte del revés de la caja de Petri quedando un eje "X" que se le asignó la letra B y un eje "Y" correspondiente a la letra A. (Figura 11). El registro del crecimiento radial se realizó diariamente por la medición el eje A y el B.

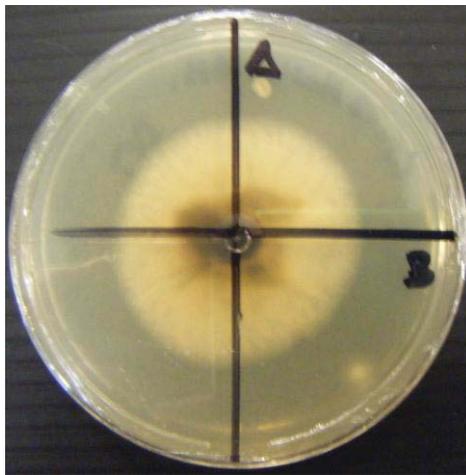


Figura 11. Medición con ejes del crecimiento radial del hongo.

Para la elaboración de la solución madre, preparación del medio de cultivo y sus respectivas concentraciones de solución madre y la siembra del hongo de los extractos cloruro de metileno y metanólico se usó el mismo procedimiento utilizado

en el extracto hexánico. Quedando un total de 108 cajas inoculadas con los extractos correspondientes, concentraciones por triplicado y hongo (*E. floccosum* y *T. rubrum*).

8.5 Prueba de extractos en hongos fitopatógenos

La prueba de extractos hexánico, cloruro de metileno y metanólico en *Penicillium italicum* y en *Alternaria solani*, para observar el crecimiento de los hongos consistió en: a) elaboración de la solución madre del extracto hexánico, b) preparación del medio de cultivo y c) siembra de los hongos.

Los cálculos para realizar la solución madre se realizaron a partir de las concentraciones seleccionadas basadas en pruebas realizadas con anterioridad en el Laboratorio de Agroecología (UACH) a la experimentación final, eligiendo las concentraciones 250, 500, 1000, 1250 y 1500 ppm (Tabla 2.)

Tabla 2. Cantidades de tratamiento para la realización de los medios de cultivo con las diferentes concentraciones a partir de la solución madre del extracto hexánico

Tratamiento	Medio	ml de H ₂ O destilada	ml disolución del extracto	[ppm]
1	PDA	140	60	[1500]
2	PDA	150	50	[1250]
3	PDA	160	40	[1000]
4	PDA	180	20	[500]
5	PDA	190	10	[250]
6	PDA	200	0	[0] (control negativo)
7	PDA	200	0	Disolvente 1 ml (testigo)
8	PDA	200	0	Tween 6 gotas (testigo)

a) Elaboración de la solución madre del extracto hexánico

Se esterilizó un litro de agua destilada entre 15 y 20 lb/pulg² en la autoclave. En condición de asepsia en un vaso de precipitados de 15 ml, se pesaron en la balanza granataria 1.25 g de extracto hexánico dentro de la campana de flujo laminar se agregaron al extracto 6 gotas de Tween 80 y 0,5 ml de acetona (Chattapadhyay y Dureja, 2006), con un agitador se disolvió el extracto, se agregó en un matraz de 200 ml aforando la solución con agua destilada estéril, se sonicó durante 15 minutos.

Para cada extracto (hexano, cloruro de metileno y metanol) se realizó el procedimiento anteriormente mencionado.

b) Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar de BIOXON®) se basó en la tabla 2, se utilizaron un total de 8 matraces para tener los diferentes tratamientos (concentraciones, control y testigos).

Se preparó el medio de cultivo. Al estar tibio éste se agregaron los mililitros restantes de la solución madre del extracto.

c) Siembra de los hongos

Las cepas anteriormente vigorizadas de *P. italicum* y de *A. solani*, se utilizaron para la técnica de Diámetro conocido con la concentración y extracto correspondiente. Este procedimiento es igual al de los hongos dermatofitos.

En el diagrama 2, se indica la técnica de la elaboración del medio de cultivo con la solución madre de los tres extractos, quedando un total de 144 cajas inoculadas con los extractos, concentraciones, hongos y por triplicado.

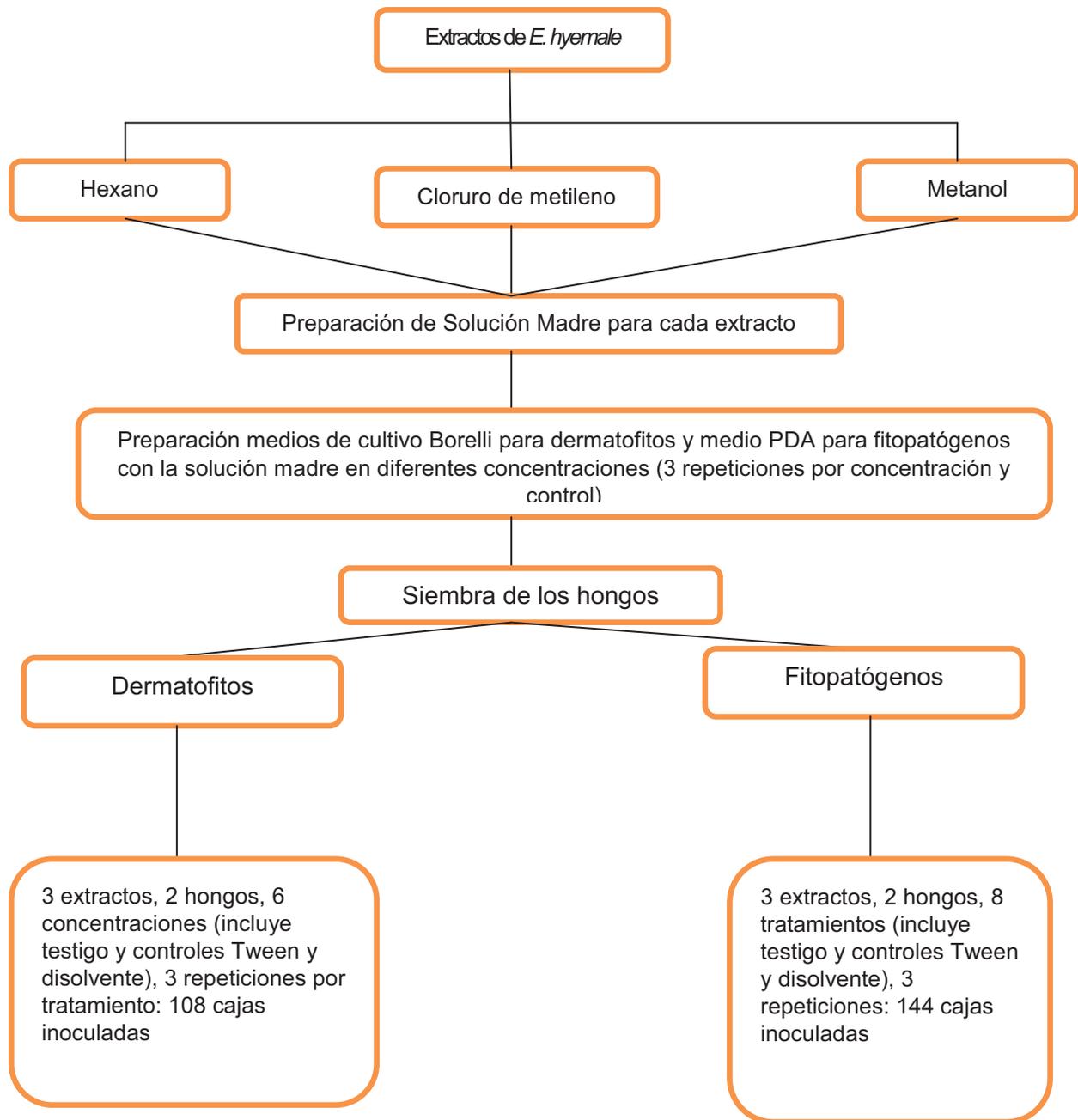


Diagrama 2. Proceso general para la elaboración de la solución madre en los diferentes medios de cultivo e inoculación de hongos dermatofitos y fitopatógenos.

8.6 “Prueba de germinación de esporas” en dermatofitos y fitopatógenos.

8.6.1 Método para preparación de la solución valorada de esporas

El cultivo de hongos (dermatofitos y fitopatógenos) al presentar esporas se realizó la solución valorada de esporas. Cuidadosamente con una espátula se tomó la parte aérea de los hongos, al tener las esporas se pusieron en un vaso de precipitados de 15 ml, agregándole agua destilada estéril y 1ml de Tween.

De acuerdo con Robledo *et al.* (2009), se preparó una solución valorada de esporas 1×10^6 esp/ml, para ello fue necesario utilizar una cámara de Neubauer para obtener el número de la solución valorada de esporas, el conteo se realizó en un cuadrante subdividido en nueve cuadrados de la cámara de Neubauer (Figura 12).

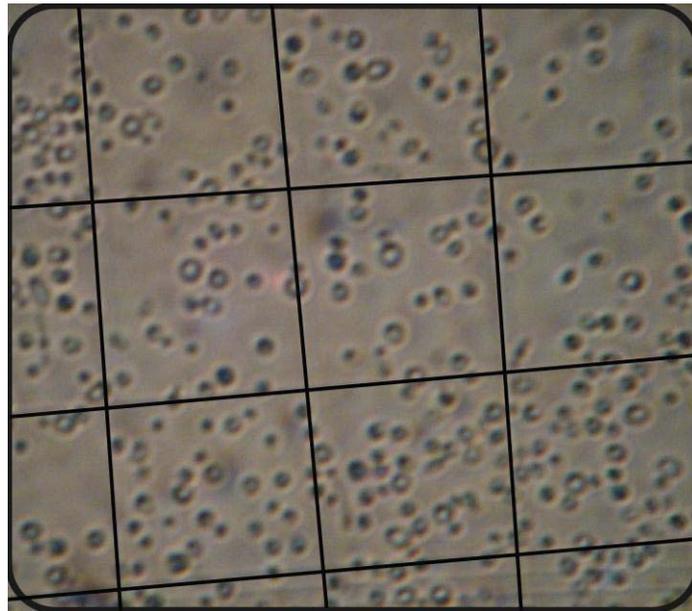


Figura 12. Conteo de esporas de *P. italicum* en 9 campos diferentes en la cámara de Neubauer

8.7.2 Realización de la Cámara húmeda para los hongos: dermatofitos y fitopatógenos

Las rejillas de acrílico utilizadas para la cámara húmeda se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 10% con agua destilada estéril, enjuagándolas con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron por dos horas en la campana de flujo laminar con luz UV.

Para preparar las cámaras húmedas fue necesario cortar papel filtro del diámetro de las cajas de Petri de vidrio, encima del papel se colocó la rejilla estéril agregando 5 ml de agua destilada. Sobre un portaobjetos se colocaron tres círculos de medio de cultivo (Borelli y PDA) con las diferentes concentraciones cuyo diámetro corresponde a 20 mm teniendo una separación de 7 mm entre cada círculo. Se colocaron con la micropipeta 100 μ l de solución valorada de esporas al centro de cada círculo cubriéndolos con un cubreobjetos (Figura 13).

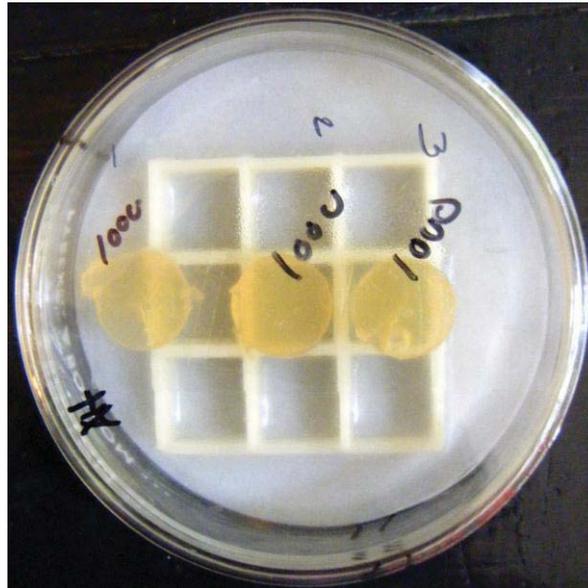


Figura 13. Cámara húmeda para el conteo de germinación de esporas

Para cada especie se realizaron tres repeticiones, es decir, poniendo tres círculos de medio de cultivo por cada cámara húmeda, con su respectiva concentración y

testigos. Se obtuvieron 6 cajas para cada dermatofito y 8 cajas para los fitopatógenos. El conteo de esporas germinadas se realizó cada 12 horas durante 2 días, este conteo se llevó a cabo en los círculos de medio de cultivo correspondientes a los hongos, tomando al azar 10 campos diferentes y registrando así las esporas germinadas. Se consideró una espora germinada, cuando la longitud del tubo de germinación fue mayor que el de la espora (Cole, 1994).

8.8 Análisis de datos

Se tomaron medidas cada 24 horas del crecimiento radial (micelial) de los hongos dermatofitos y fitopatógenos se obtuvieron los promedios de crecimiento (mm), la velocidad de crecimiento radial (mm/hr), se analizaron y graficaron mediante los programas OriginPro 8 SRO v8.0724(B724) y Microsoft Excel 2010.

Para los resultados obtenidos del conteo de germinación acumulada de esporas se calculó por conteo azaroso por disco en diez campos diferentes en el medio de cultivo, graficándose dicho promedio dependiendo del extracto, concentración y especie de hongo.

9. RESULTADOS

9.1 Prueba de extractos en el crecimiento radial en dermatofitos

Los dermatofitos *Epidermophyton floccosum* y el *Trichophyton rubrum* presentan diferentes crecimientos significativos en las diferentes concentraciones 50, 75 y 100 ppm dependiendo del extracto en que crezcan y en comparación al control. Ambos hongos en el tratamiento testigo Tween presentaron una disminución en el crecimiento radial

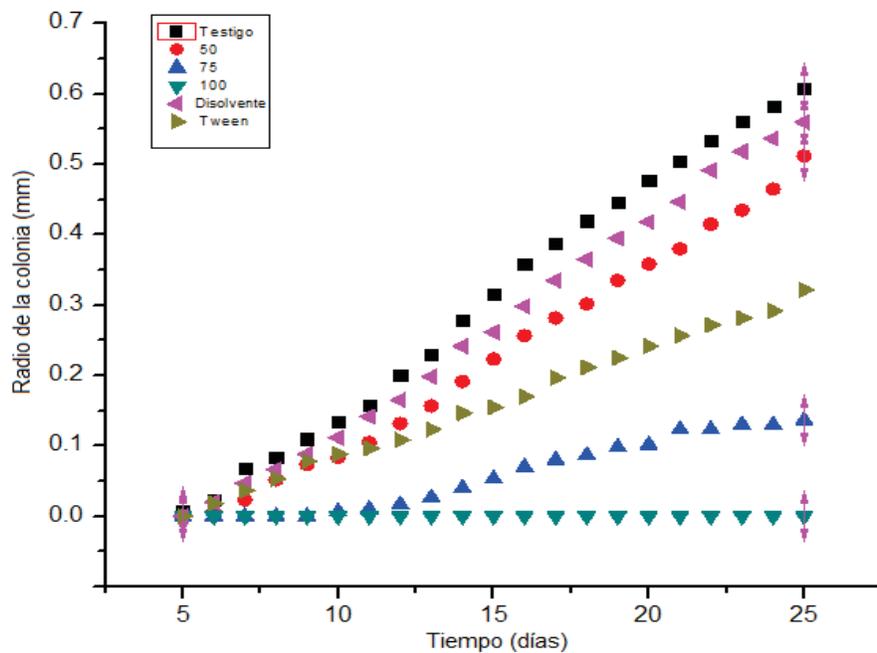
Cabe señalar que en los diferentes extractos (hexánico, cloruro de metileno y metanólico) al realizar la prueba de crecimiento con el tratamiento testigo Tween el hongo *Epidermophyton floccosum* presenta un crecimiento similar de 0.01558 mm correspondientemente y el *Trichophyton rubrum* un crecimiento de 0.01486 mm respectivamente. Al compararse con las diferentes concentraciones de los extractos orgánicos, el control y el testigo disolvente, indican que el testigo Tween presenta un efecto significativo en el hongo provocando una disminución en el crecimiento radial del hongo, por ello en las gráficas correspondientes a los hongos dermatofitos no se evaluará a detalle el crecimiento radial del testigo Tween. El Tween no debería de afectar dicho crecimiento ya que es un emulsificador y surfactante no tóxico del hongo por lo que es necesario reajustar la cantidad de Tween a utilizar en posteriores experimentos.

En el apéndice/anexo de este trabajo se presentan diferentes gráficas de la velocidad (mm/hrs) del crecimiento radial de los hongos dematofitos y fitopatógenos para tener un complemento de las gráficas del crecimiento radial con los diferentes extractos.

***Epidermophyton floccosum* con el extracto hexánico**

En la gráfica 1 indica que el extracto hexánico afecta significativamente el crecimiento radial de *Epidermophyton floccosum* en las concentraciones 75 ppm y

100 ppm, cuyo crecimiento en la primer concentración corresponde a 0.00825 y la segunda a 0 mm, esta última evita el crecimiento radial (Figura 14). El testigo Tween es el tercer tratamiento que reduce el crecimiento radial. La velocidad de crecimiento es muy variable en las diferentes concentraciones; el control, concentración 50 ppm y testigo disolvente tienen una velocidad de crecimiento radial similar (ver Apéndice, gráfica 1.1)



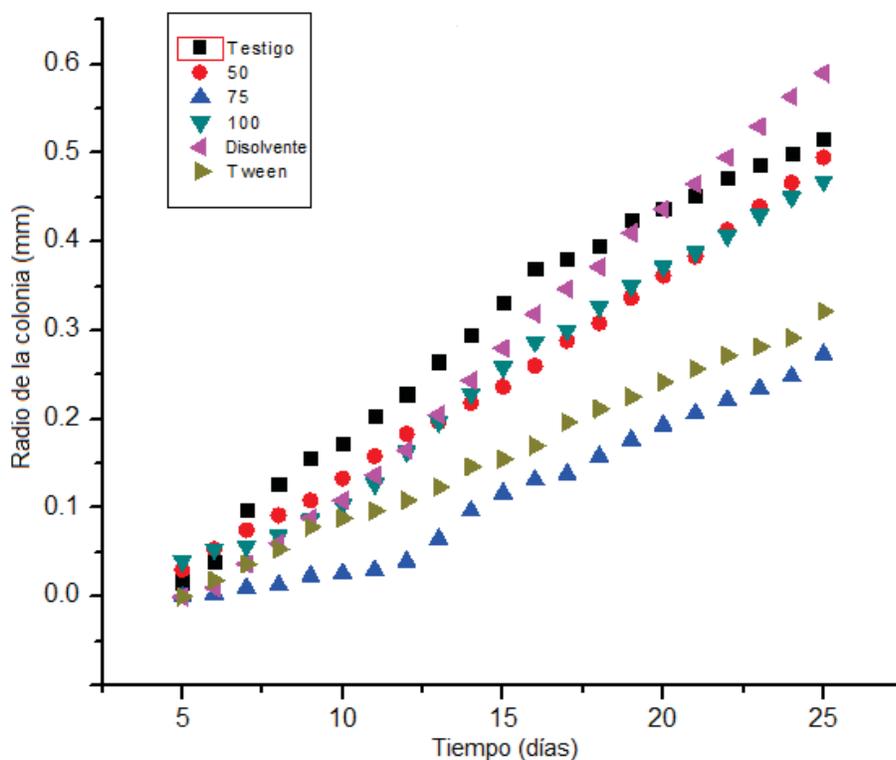
Gráfica 1. Crecimiento radial de *Epidermophyton floccosum* con extracto hexánico



Figura 14. Hongo *Epidermophyton floccosum* inhibido por el extracto hexánico en concentración de 100 ppm

***Epidermophyton floccosum* con extracto de cloruro de metileno**

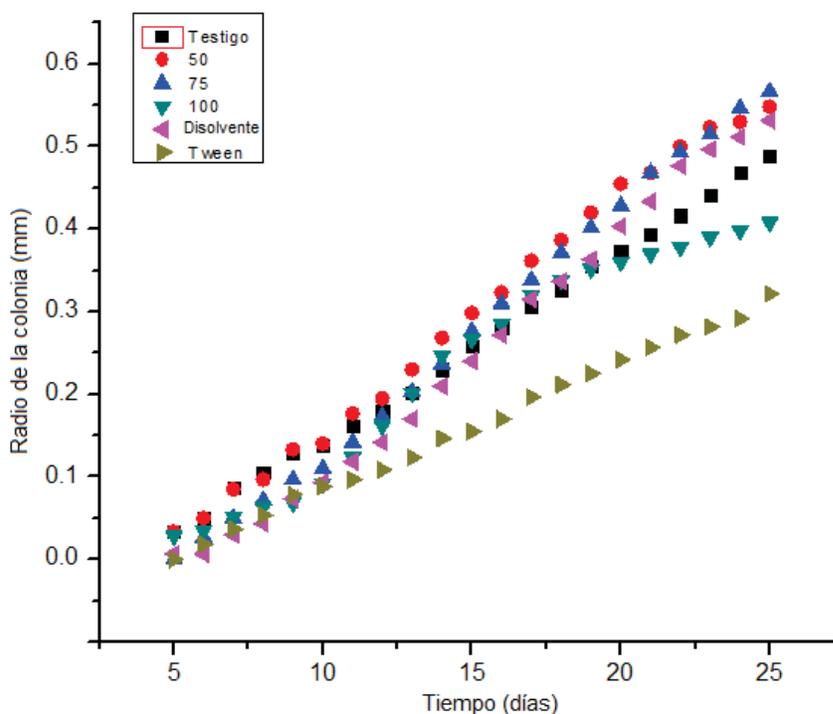
El extracto de CH_2Cl_2 en la concentración 75 ppm (gráfica 2) muestra una disminución del crecimiento radial (0.01461 mm) de *E. floccosum*, dicho crecimiento puede ser afectado por la polaridad del extracto, ya que el cloruro de metileno presenta una polaridad media al compararse con los extractos hexánico y metanólico, el control Tween de nuevo reduce significativamente el crecimiento radial, mientras que el testigo, concentración 50 y 100 ppm no afecta el crecimiento radial del hongo.



Gráfica 2. Crecimiento radial de *E. floccosum* con extracto de cloruro de metileno

***Epidermophyton floccosum* con el extracto metanólico**

El crecimiento radial de *E. floccosum* es constante en los tratamientos: testigo, control disolvente, concentraciones 50 y 75 ppm. El hongo en la concentración 100 ppm a partir del día 20 indica una disminución en el crecimiento radial (Gráfica 3)

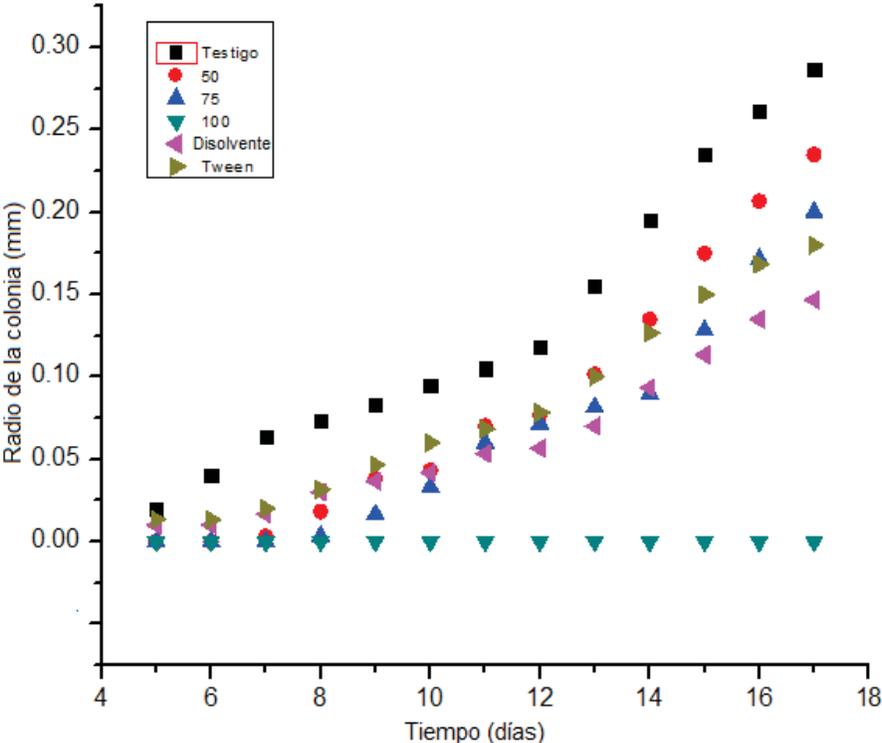


Gráfica 3. Crecimiento radial de *Epidermophyton floccosum* con extracto metanólico

***Trichophyton rubrum* con extracto hexánico**

En la gráfica 4 se puede observar que el crecimiento radial de *Trichophyton rubrum* es variable dependiendo de las concentraciones del extracto. En concentración 50 ppm presenta un crecimiento de 0.02 mm que al compararse con la concentración 75 ppm (0.01648 mm) y 100 ppm (0 mm) el crecimiento va disminuyendo hasta detenerse en la máxima concentración utilizada (Figura 15).

El control disolvente provoca una disminución (0.01156 mm) en el crecimiento radial incluso reduce más el crecimiento que el testigo Tween (0.01486 mm) .



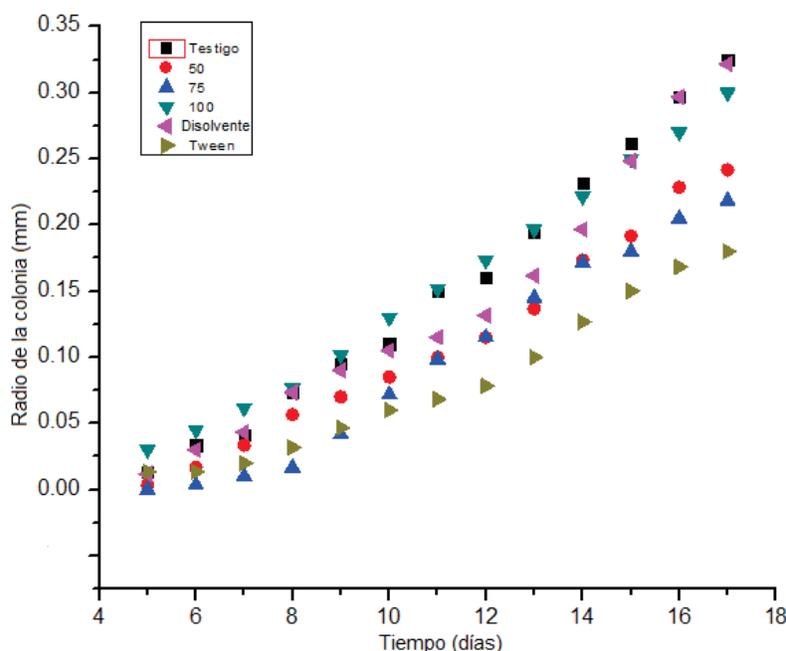
Gráfica 4. Crecimiento radial de *T. rubrum* con extracto hexánico



Figura 15. Inhibición total del hongo *Trichophyton rubrum* en presencia de extracto hexánico

***Trichophyton rubrum* con extracto de cloruro de metileno**

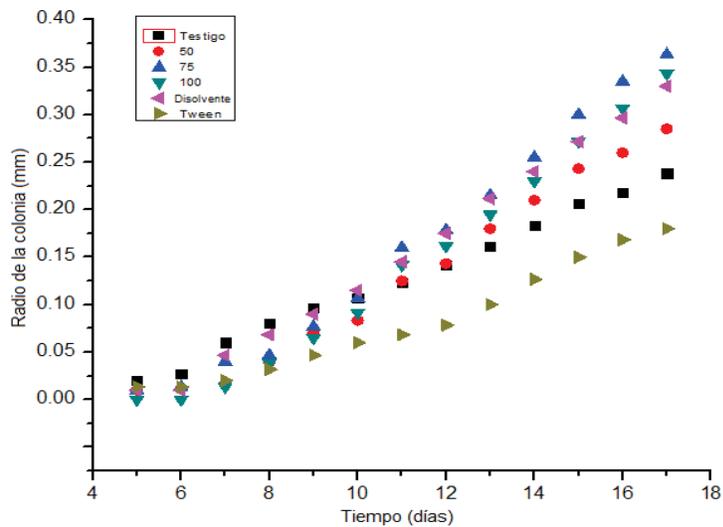
El extracto orgánico cloruro de metileno y las diferentes concentraciones donde crece el hongo *T. rubrum* indican que no afectan significativamente el crecimiento del hongo debido a la polaridad del extracto (Gráfica 5). El crecimiento del hongo en el testigo Tween se ve afectado ya que disminuye el crecimiento radial (0.01486 mm).



Gráfica 5. Crecimiento radial de *T. rubrum* con extracto de cloruro de metileno

***Trichophyton rubrum* con el extracto metanólico**

En la gráfica 6 el hongo *T. rubrum* al crecer en las diferentes concentraciones del extracto metanólico presenta un crecimiento variable, es decir, al compararse el control (0.0183 mm) con las concentraciones 50 ppm cuyo crecimiento es 0.02521 mm, 75 ppm es 0.03155 mm y 100 ppm es 0.03039 mm indica que el extracto metanólico promueve el crecimiento radial del hongo significativamente que el testigo. El testigo Tween reduce el crecimiento radial del hongo



Gráfica 6. Crecimiento radial de *T. rubrum* con extracto metanólico

Tabla 3. Velocidad de crecimiento radial (mm/hr) de dermatofitos en diferentes extractos y concentraciones.

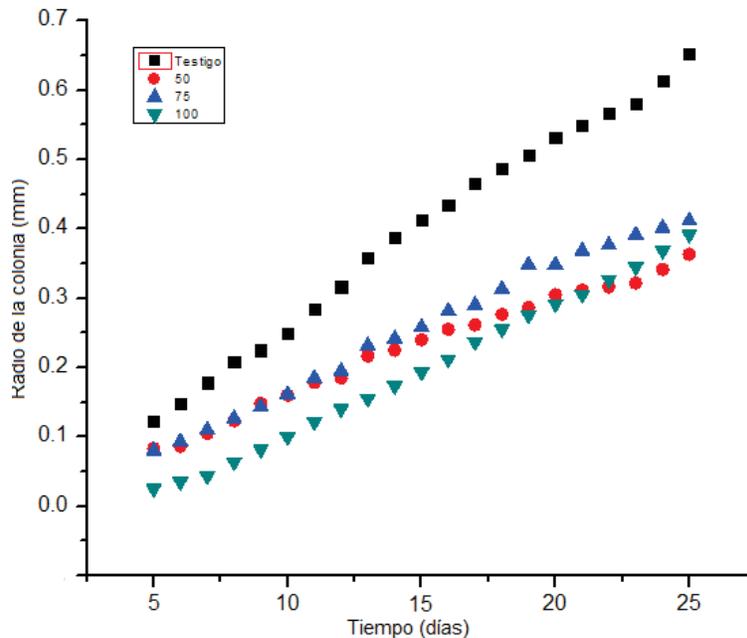
Cepa	Extracto	Control	50 ppm	75 ppm	100 ppm	Testigo Tween	Testigo Disolvente ¹
<i>Epidermophyton floccosum</i>	C ₆ H ₁₄	0.03174±0.00047	0.02602±0.0004	0.00825±0.0004	0±0	0.01558±0.00018	0.02938±0.00039
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₂ Cl ₂	0.02526±0.00082	0.02292±0.0003	0.01461±0.00053	0.02339±0.00053	0.01558±0.00018	0.03097±0.00041
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₃ OH	0.02281±0.0002	0.0276±0.00044	0.02963±0.0004	0.02189±0.00099	0.01558±0.00018	0.02882±0.00059
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Itraconazol ²	0.02626±0.00048	0.01392±0.00036	0.01759±0.00033	0.01868±0.00018	-----	-----
<i>Trichophyton rubrum</i>	C ₆ H ₁₄	0.02158±0.0015	0.02±0.0016	0.01648±0.00157	0±0	0.01486±0.00087	0.01156±0.00086
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₂ Cl ₂	0.02633±0.00091	0.01997±0.00079	0.0204±0.00089	0.02289±0.00047	0.01486±0.00087	0.02502±0.00171
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₃ OH	0.0183±0.00084	0.02521±0.00107	0.03155±0.00138	0.03039±0.00129	0.01486±0.00087	0.02787±0.00071
<i>Trichophyton rubrum</i>	Itraconazol ²	0.03185±0.00082	0.00665±0.00065	0.00775±0.00034	0.01343±0.00067	-----	-----

1. Corresponde al testigo, es decir,, se agregó 1 ml de disolvente correspondiente al que se utilizó para el extracto que se está probando.
2. Itraconazol corresponde al control positivo para una comparación del crecimiento radial con las concentraciones que se utilizaron en los diferentes extractos.

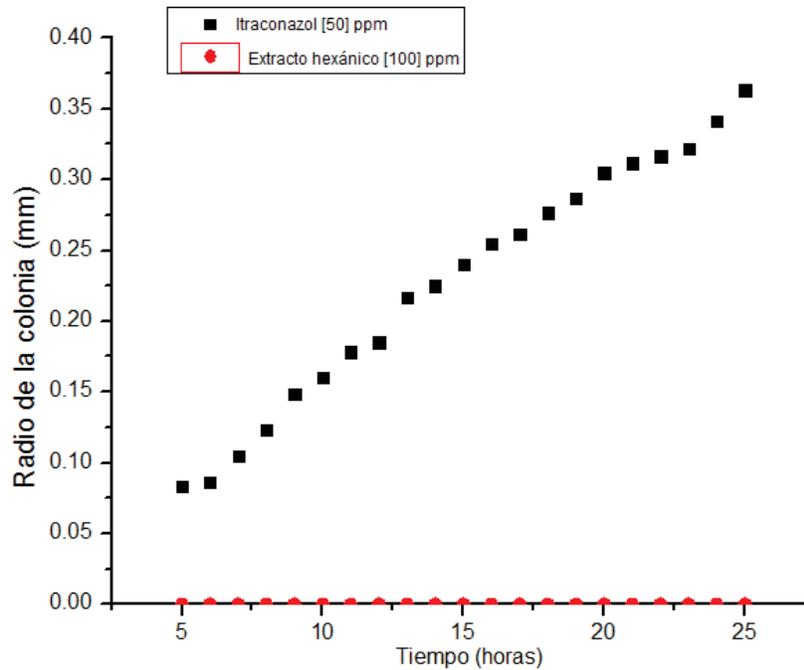
***Epidermophyton floccosum* con antimicótico (Itraconazol)**

El antimicótico utilizado como control positivo en este trabajo, presentó resultados significativos en el crecimiento radial de *E. floccosum* en diferentes concentraciones de dicho antimicótico. La concentración 50 ppm tuvo un crecimiento radial de 0.001392 mm resultando la concentración donde hubo menor crecimiento (Gráfica 7), las concentraciones 75 ppm (0.01759 mm) y 100 ppm (0.01868 mm) no tienen un efecto en reducir el crecimiento del hongo,

En la gráfica 8 se observa la comparación entre concentración 100 ppm (0 mm) del extracto hexánico con la concentración 50 ppm (0.1392 mm) del antimicótico, el crecimiento del hongo tiene efectos de inhibición (extracto hexánico) y de disminución de crecimiento lento (antimicótico), en la tabla 3 se aprecian los diferentes crecimientos de *E. floccosum* y *T. rubrum* entre el extracto hexánico y antimicótico.



Gráfica 7. Crecimiento radial de *E. floccosum* con antimicótico

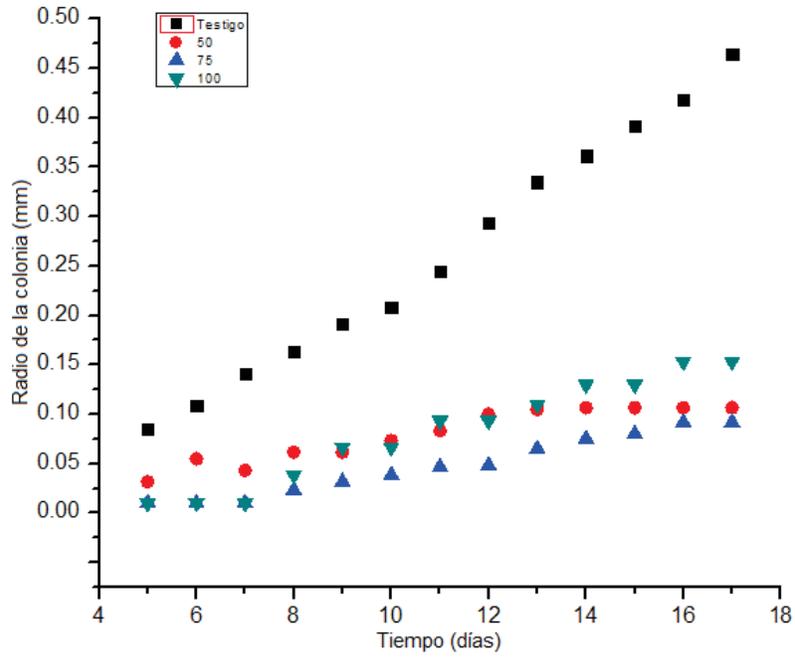


Gráfica 8. Comparación entre *Epidermophyton floccosum* en las concentraciones más significativas del tratamiento extracto hexánico y antimicótico comercial

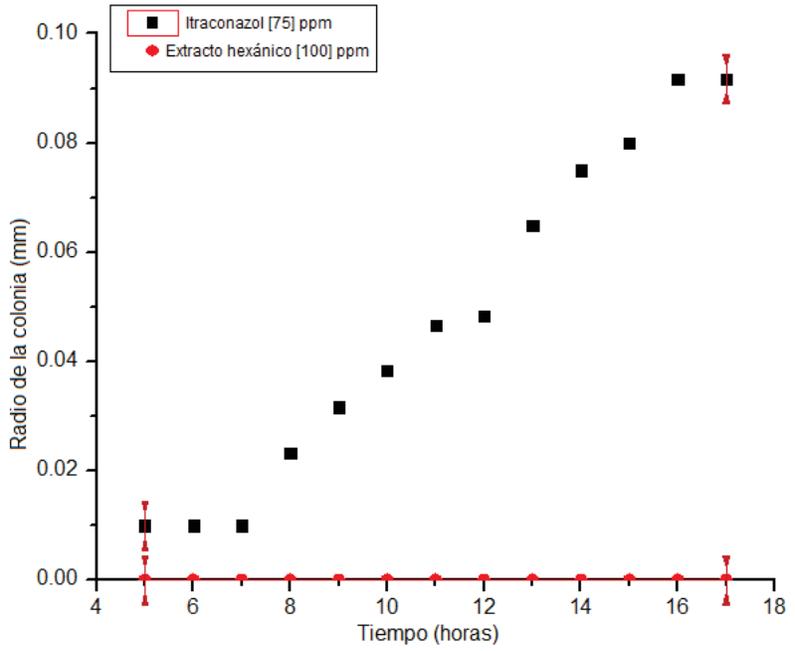
***Trichophyton rubrum* con antimicótico (Itraconazol)**

El hongo *Trichophyton rubrum* muestra una disminución en el crecimiento radial dependiendo de la concentración, donde la concentración que controla más el crecimiento del hongo corresponde a 75 ppm 0.00775 mm, la concentración menos efectiva es 100 ppm 0.01343 mm (Gráfica 9). El control indica que el antimicótico sí afecta el crecimiento del hongo pero sin llegar a evitar el el crecimiento radial de *T. rubrum*.

En la gráfica 10 se observa la comparación de crecimiento radial de *T. rubrum* de la concentración 100 ppm del extracto hexánico y la concentración 75 ppm de antimicótico notándose que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.



Gráfica 9. Crecimiento radial de *T. rubrum* con antimicótico

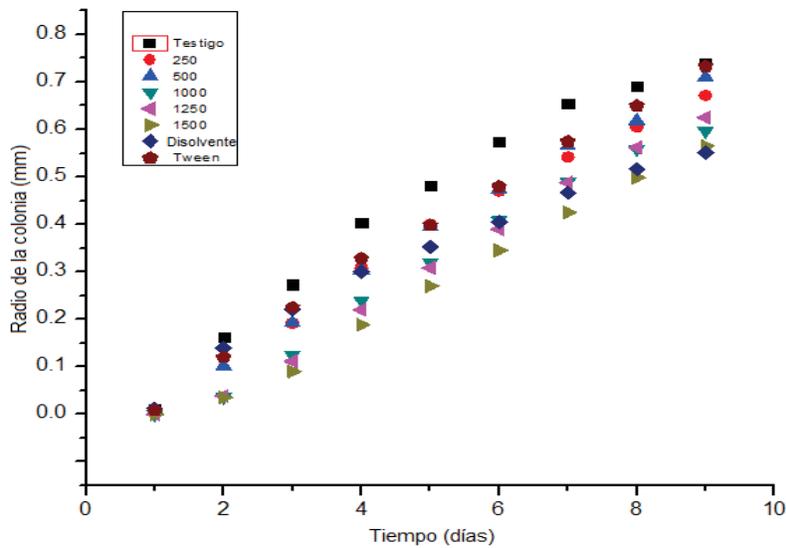


Gráfica 10. Comparación entre *Trichophyton rubrum* en las concentraciones más significativas del tratamiento extracto hexánico y antimicótico comercial

9.2 Prueba de extractos en el crecimiento radial de fitopatógenos

Alternaria solani con extracto hexánico

El testigo tuvo un crecimiento radial de 0.09064 mm siendo más rápido al compararse con las concentraciones 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, control solvente y control Tween) todos los datos representados en la gráfica 11 no tienen diferencia significativa, es decir, que *Alternaria solani* al crecer lentamente en extracto hexánico no sufre algún efecto que disminuya o controle dicho crecimiento radial (Figura 16).



Gráfica 11. Crecimiento radial de *A. solani* con extracto hexánico

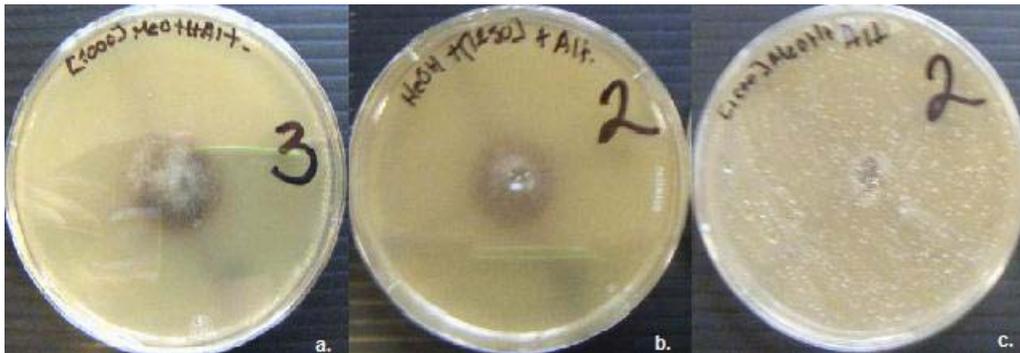
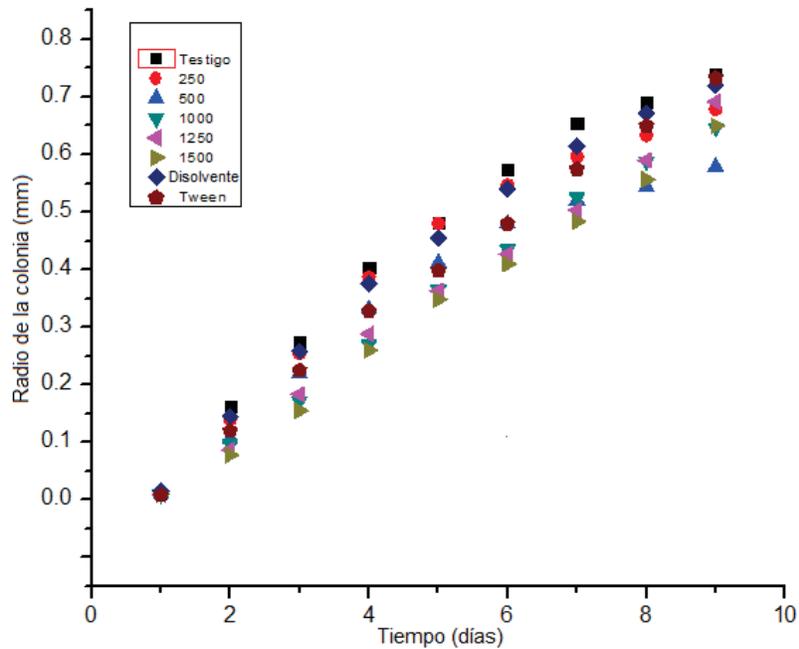


Figura 16. Comparación del crecimiento micelial de *A. solani* en extracto hexánico: a. Concentración 1000 ppm, b. Concentración 1250 ppm y c. Concentración 1500 ppm.

***Alternaria solani* con extracto de cloruro de metileno**

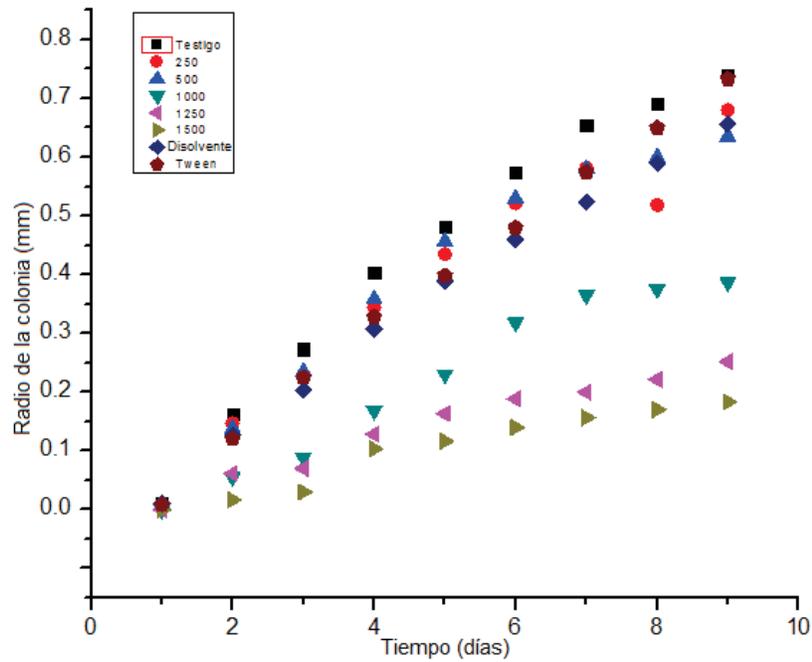
El extracto de cloruro de metileno no tiene algún efecto significativo para disminuir el crecimiento radial del hongo, las concentraciones 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm y 1500 ppm crecen constantemente (Gráfica 12).



Gráfica 12. Crecimiento radial de *A. solani* con extracto de cloruro de metileno

***Alternaria solani* con extracto metanólico**

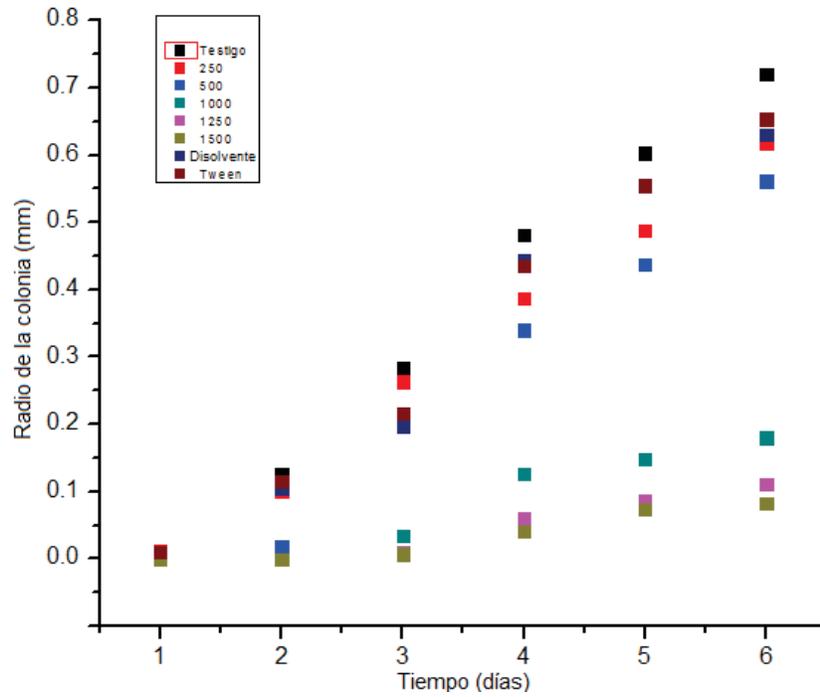
En la gráfica 13 se observan diferencias en el crecimiento radial de *A. solani* al comparar las concentraciones, la disminución del crecimiento se da a partir de la concentración 1000 ppm (0.0535 mm) hasta la concentración 1500 ppm (0.02472 mm).



Gráfica 13. Crecimiento radial de *A. solani* con extracto metanólico

***Penicillium italicum* con extracto hexánico**

El fitopatógeno *Penicillium italicum* sí presenta un efecto en el extracto hexánico, provocando que al aumentar las concentraciones de extracto se disminuya el crecimiento radial del hongo (Gráfica 17). El testigo tiene un crecimiento radial rápido de 0.1479 mm que al compararse con la mayor concentración del extracto (1500 ppm) cuyo crecimiento es 0.01919 mm resulta que *P. italicum* es susceptible a dicho extracto (Gráfica 13.)



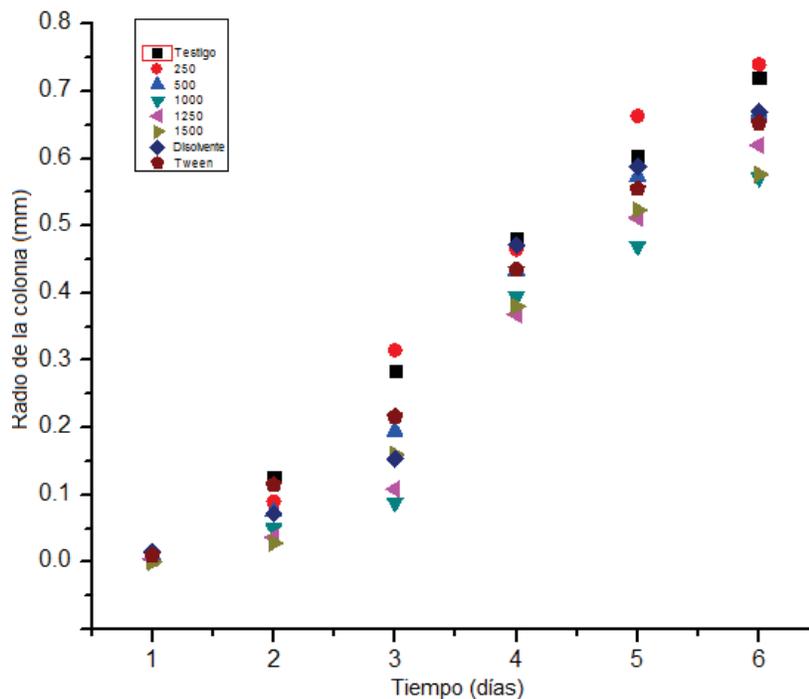
Gráfica 14. Crecimiento radial de *P. italicum* con extracto hexánico



Figura 17. Extracto hexánico en donde se compara el crecimiento de *P. italicum* en diferentes concentraciones: a. concentración 1000 ppm, b. 1250 ppm y c. 1500 ppm

***Penicillium italicum* con extracto de cloruro de metileno**

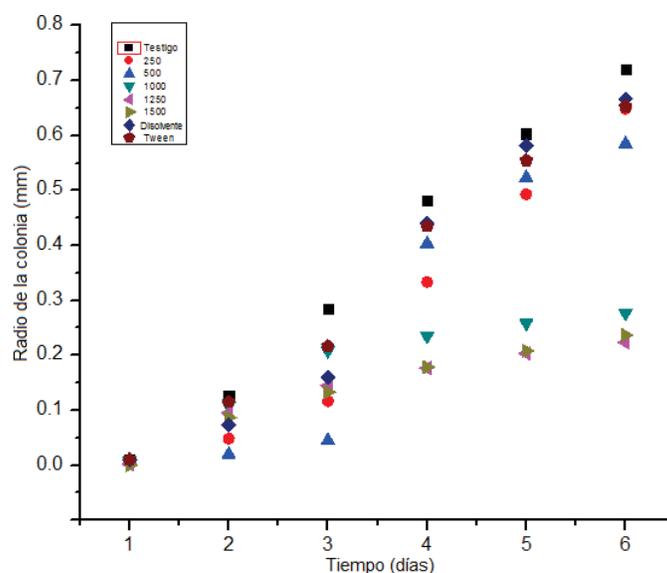
El crecimiento radial de *P. italicum* en el extracto de cloruro de metileno en las diferentes concentraciones no muestra que afecte el crecimiento del hongo (Gráfica 15).



Gráfica 15. Crecimiento radial de *P. italicum* con extracto de cloruro de metileno

***Penicillium italicum* con extracto metanólico**

El crecimiento radial de *P. italicum* a partir del tercer día es afectado por el extracto metanólico en las concentraciones 1250 ppm (0.02473 mm) y 1500 ppm (0.01921 mm). Las concentraciones 250 ppm, 500 ppm, testigo disolvente, testigo Tween y testigo no muestran datos relevantes (Gráfica 16).



Gráfica 16. Crecimiento radial de *P. italicum* con extracto metanólico

Tabla 4. Velocidad de crecimiento radial (mm/hr) de fitopatógenos en diferentes extractos y concentraciones.

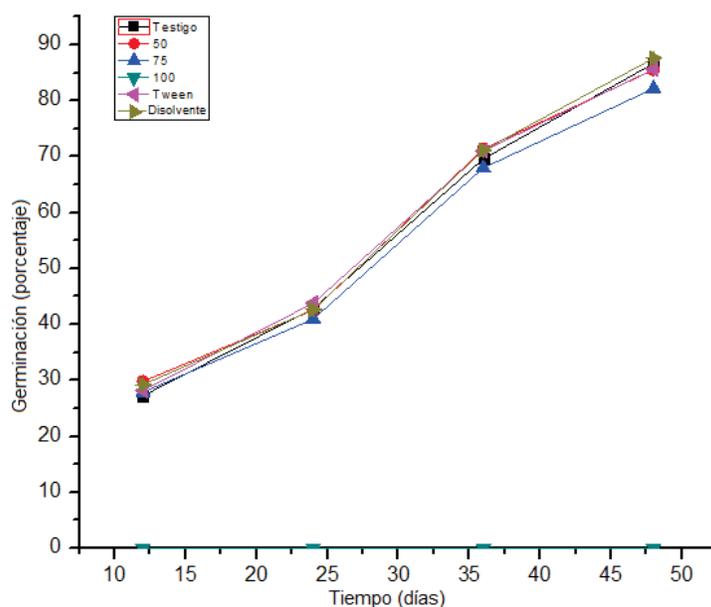
Cepa	Extracto	Control	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	1250 ppm	1500 ppm	Testigo Tween	Testigo Disolvente ¹
<i>Alternaria solani</i>	C ₆ H ₁₄	0.09064±	0.08328±	0.08783±	0.08083±	0.08322±	0.07461±	0.08903±	0.06475±
		0.00627	0.00317	0.00219	0.00304	0.00234	0.00217	0.00213	0.00418
<i>Alternaria solani</i>	CH ₂ Cl ₂	0.09064±	0.08328±	0.07219±	0.08156±	0.08358±	0.08003±	0.08903±	0.08794±
		0.00627	0.00716	0.00657	0.00195	0.00173	0.00153	0.00213	0.00502
<i>Alternaria solani</i>	CH ₃ OH	0.08903±	0.09064±	0.07803±	0.07911±	0.0535±	0.03011±	0.02472±	0.07947±
		0.00213	0.00627	0.00751	0.00714	0.00393	0.00214	0.00223	0.00293
<i>Penicillium italicum</i>	C ₆ H ₁₄	0.1479±	0.12348±	0.11924±	0.04105±	0.02481±	0.01919±	0.13586±	0.13419±
		0.00611	0.00415	0.00948	0.00557	0.0036	0.00306	0.00816	0.01126
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₂ Cl ₂	0.1479±	0.15771±	0.14357±	0.12524±	0.136±	0.1311±	0.13586±	0.14695±
		0.00611	0.01002	0.01145	0.01765	0.01583	0.01341	0.00816	0.01759
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₃ OH	0.1479±	0.13552±	0.13552±	0.05195±	0.04186±	0.04552±	0.13586±	0.14538±
		0.00611	0.01498	0.02399	0.00974	0.00635	0.00493	0.00816	0.01497

1. Corresponde al testigo, es decir, se agregó 1 ml de disolvente correspondiente al que se utilizó para el extracto que se está probando.

9.3 Germinación de esporas en dermatofitos

***Epidermophyton floccosum* con extracto hexánico**

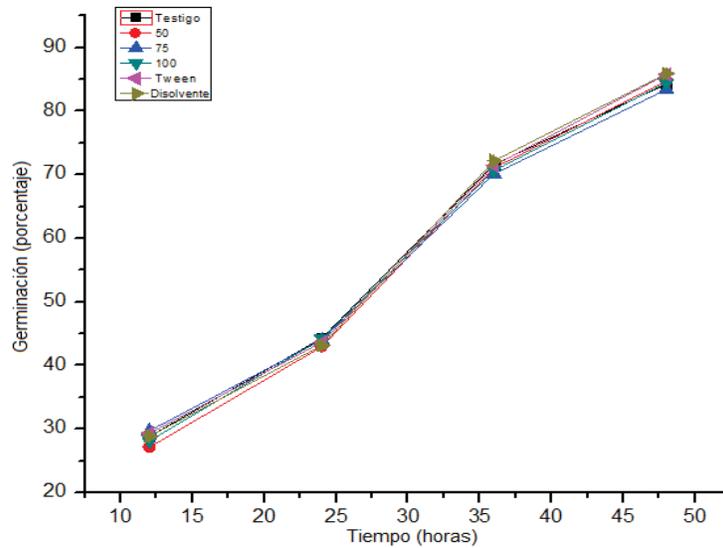
La germinación de esporas de *Epidermophyton floccosum* en el extracto hexánico tiene efectos significativos, es decir, en la concentración 100 ppm evita la germinación de esporas (0%), aún en la concentración 75 ppm (82% de germinación) existió un gran número de esporas germinadas (Gráfica 17).



Gráfica 17. Germinación de esporas de *E. floccosum* en sus diferentes concentraciones

***Epidermophyton floccosum* con extracto de cloruro de metileno**

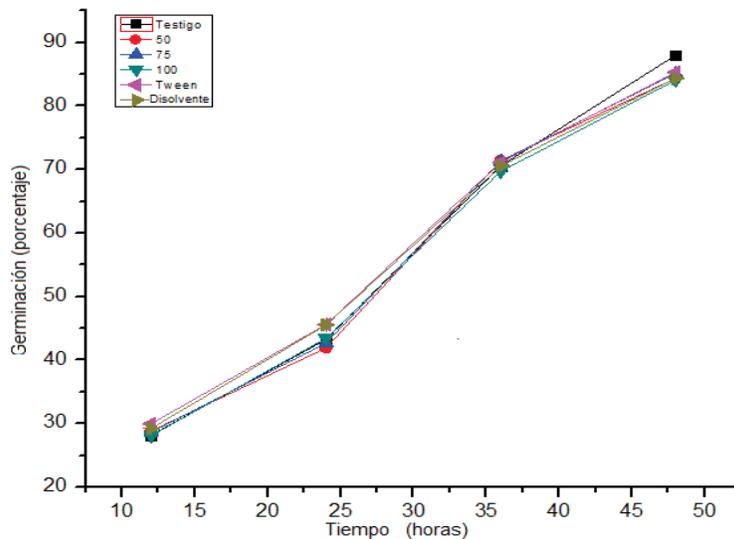
E. floccosum tiene una germinación de esporas poco variable al crecer en el extracto cloruro de metileno (Gráfica 18). La germinación a las 36 h se encuentran entre los valores 85.9 % (testigo disolvente), 85.8% (testigo Tween), 84.2 % (Control), 84.7 (50 ppm), 83.4% (75 ppm) y 84.4 % (100 ppm).



Gráfica 18. Germinación de esporas de *E. floccosum* en sus diferentes concentraciones

***Epidermophyton floccosum* con extracto metanólico**

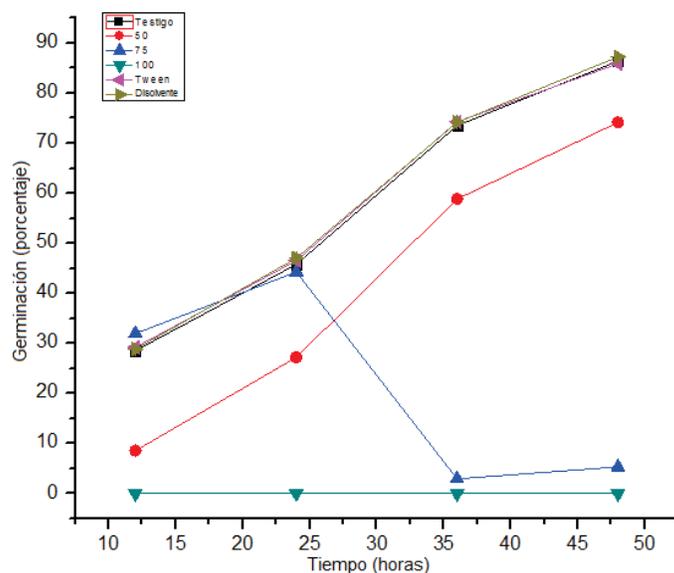
La gráfica 19 indica una germinación constante, es decir, se va incremento la germinación de esporas, esta germinación final en el control corresponde al 88.8% que al compararse con las demás concentraciones no representan datos significativos.



Gráfica 19. Germinación de esporas de *E. floccosum* en sus diferentes concentraciones

***Trichophyton rubrum* con extracto hexánico**

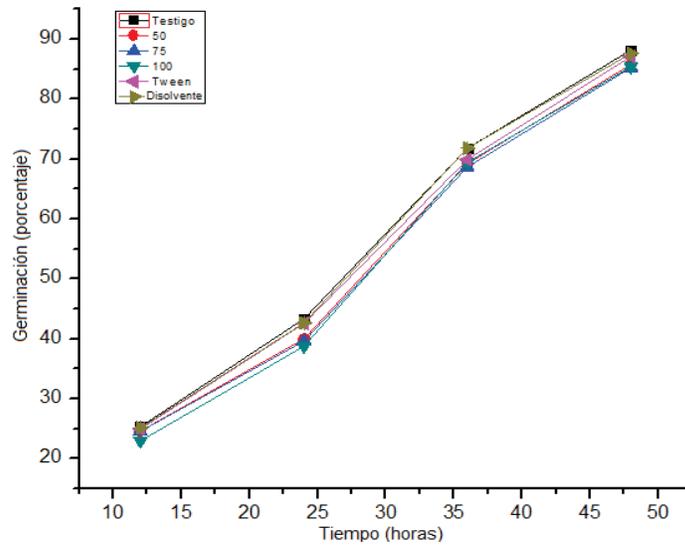
En la gráfica 20 el hongo *Trichophyton rubrum* presentó datos significativos en la inhibición de la germinación de esporas, el testigo tuvo una germinación final de 86.3% que al compararse con la concentración 100 ppm que tuvo una germinación de esporas de 0%. La concentración 75 ppm tiene una germinación variable a las 12 y 24 horas, pero a las 24 y 36 horas disminuye drásticamente la germinación debido al efecto del extracto hexánico sobre *T. rubrum*.



Gráfica 20. Germinación de esporas de *T. rubrum* en sus diferentes concentraciones.

***Trichophyton rubrum* con extracto de cloruro de metileno**

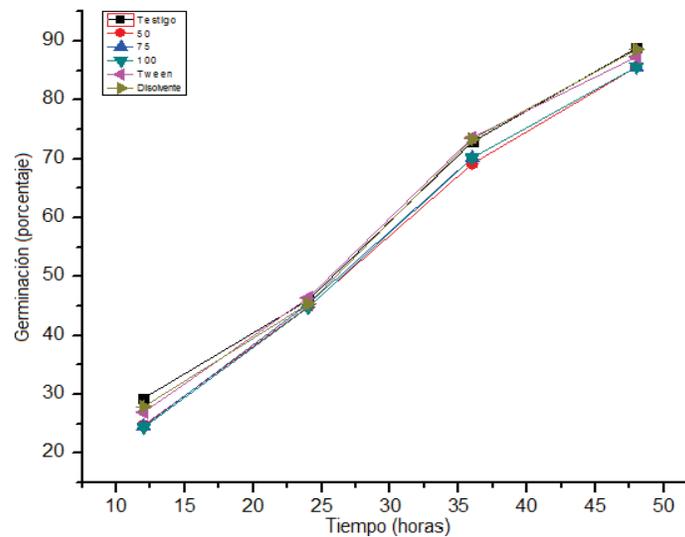
La gráfica 21 indica que el extracto de cloruro de metileno no afecta en la inhibición de la germinación de esporas de *T. rubrum* en ninguna de las concentraciones. En la tabla 5 es posible ver el porcentaje de germinación de las diferentes concentraciones y la especie de hongo.



Gráfica 21. Germinación de esporas de *T. rubrum* en sus diferentes concentraciones

***Trichophyton rubrum* con extracto metanólico**

Al igual que la gráfica 22 se puede observar que el extracto metanólico en las diferentes concentraciones utilizadas no afecta la germinación de esporas de *T. rubrum*. En la tabla 5 se resumen los porcentajes de germinación entre los diferentes extractos y hongos.



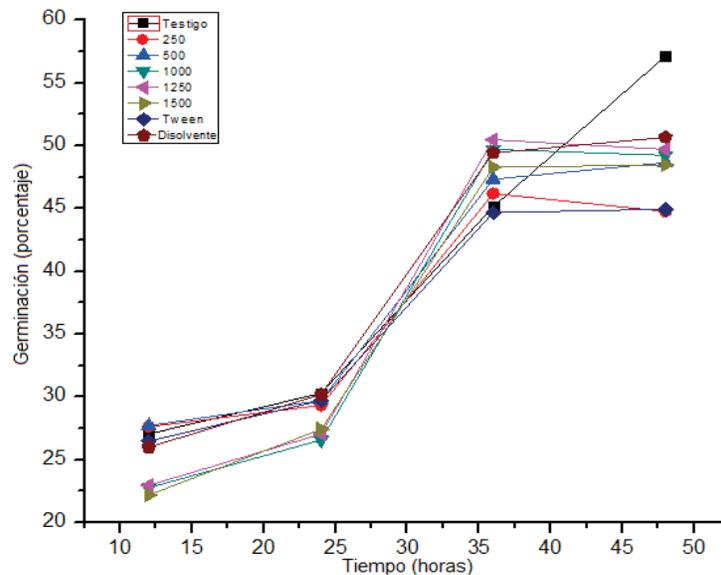
Gráfica 22. Germinación de esporas de *T. rubrum* en sus diferentes concentraciones

Tabla 5. Porcentaje de germinación de esporas de dermatofitos en diferentes extractos y concentraciones (ppm).

Dermatofitos	Extracto	Tiempo	Control	50 ppm	75 ppm	100 ppm	Testigo Tween	Testigo Disolvente
<i>Epidermophyton floccosum</i>	C ₆ H ₁₄	12	27.2	29.8	27.9	0	28.1	29.2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	C ₆ H ₁₄	24	42.8	42.5	40.9	0	43.8	42.6
<i>Epidermophyton floccosum</i>	C ₆ H ₁₄	36	69.6	71.4	68	0	71.0	71.1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	C ₆ H ₁₄	48	86.6	85.5	82.1	0	85.6	87.6
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₂ Cl ₂	12	28.8	27.1	29.7	28.1	29.3	28.8
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₂ Cl ₂	24	44.2	42.9	44	44.1	43.6	43.1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₂ Cl ₂	36	71.6	71	70.1	70.6	71.4	72.1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₂ Cl ₂	48	84.2	84.7	83.4	84.4	85.8	85.9
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₃ OH	12	28.1	28.8	28.6	28.1	30.0	29.2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₃ OH	24	43.2	41.9	42.6	43.4	45.6	45.5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₃ OH	36	70.5	71.4	71.3	69.7	71.1	70.5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CH ₃ OH	48	88	84.3	85.1	84.1	85.3	84.3
<i>Trichophyton rubrum</i>	C ₆ H ₁₄	12	28.5	8.5	32	0	29.2	28.8
<i>Trichophyton rubrum</i>	C ₆ H ₁₄	24	45.8	27.2	44.2	0	46.5	47
<i>Trichophyton rubrum</i>	C ₆ H ₁₄	36	73.5	58.8	2.9	0	74.2	74.1
<i>Trichophyton rubrum</i>	C ₆ H ₁₄	48	86.3	74.1	5.3	0	85.9	87.2
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₂ Cl ₂	12	25.3	24.5	24.5	22.9	24.9	25.1
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₂ Cl ₂	24	43.3	40	39.6	38.7	42.5	42.6
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₂ Cl ₂	36	71.8	69.2	68.6	69.4	69.9	71.8
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₂ Cl ₂	48	88.1	85.8	85.2	85.4	87.1	87.6
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₃ OH	12	29.3	24.7	24.5	24.3	26.9	27.9
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₃ OH	24	46	44.8	45.3	44.7	46.3	45.3
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₃ OH	36	72.8	69.1	70.1	70.1	73.6	73.3
<i>Trichophyton rubrum</i>	CH ₃ OH	48	88.8	85.6	85.6	85.6	87.3	88.5

9.4 Germinación de esporas en fitopatógenos

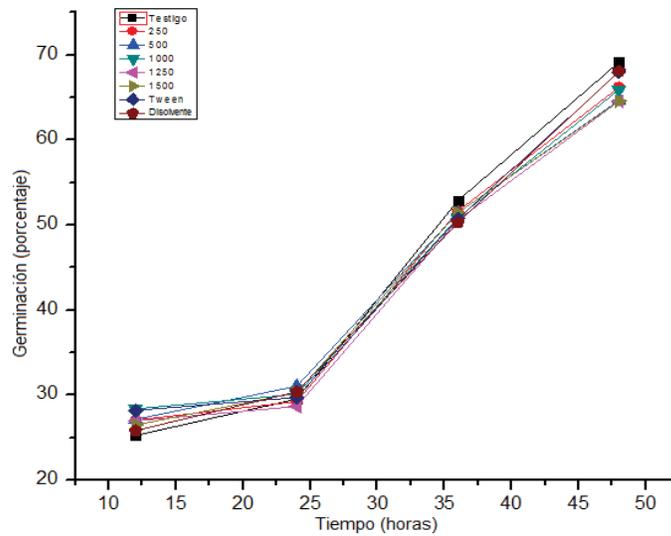
La gráfica 23 muestra que la germinación de esporas de *Alternaria solani* en sus diferentes concentraciones de extracto hexánico no representa datos significativos; el testigo tiene una germinación final de 57.1% (germinación constante), las concentraciones 1000 ppm, 1250 ppm y 1500 ppm de extracto hexánico en un tiempo de 12 horas la germinación es menor al compararse con el testigo. Las concentraciones del control Tween y control disolvente a las 36 horas la germinación se estabiliza.



Gráfica 23. Germinación de esporas de *A. solani* en sus diferentes concentraciones

***Alternaria solani* con extracto de cloruro de metileno**

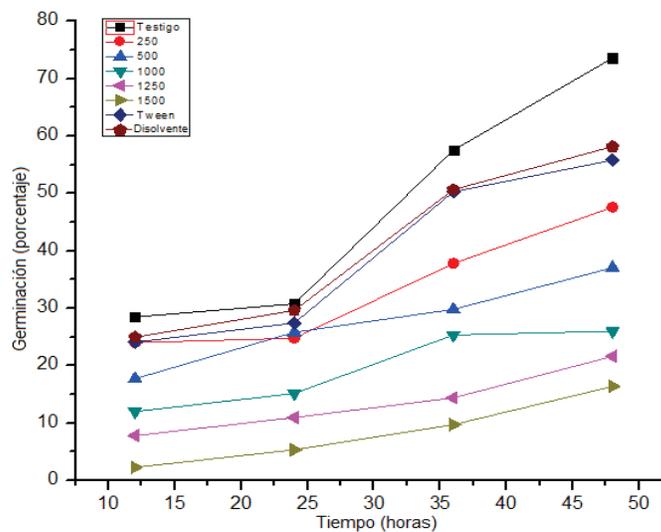
El extracto de cloruro de metileno no reduce el porcentaje de germinación de *A. solani*. El testigo indica una germinación final de 69.1%, comparada con las demás concentraciones del extracto cloruro de metileno se aprecia que no existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación (Gráfica 24).



Gráfica 24. Germinación de esporas de *A. solani* en sus diferentes concentraciones

***Alternaria solani* con extracto metanólico**

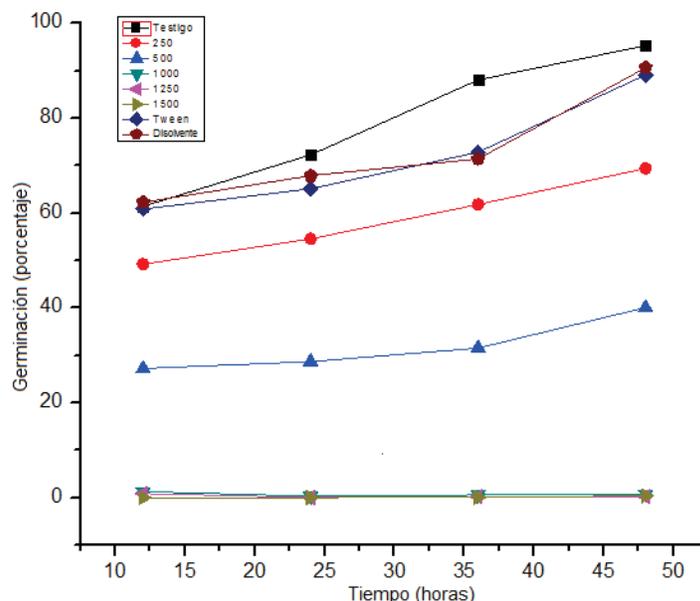
Alternaria solani presenta una disminución en la germinación de sus esporas al aumentar las concentraciones del extracto metanólico. El porcentaje del testigo a las 48 h. corresponde a 73.6%, la germinación de la concentración 250 ppm es 47,6%; 500 ppm es 37%; 1000 ppm es 26%; 1250 ppm es 21.6% y 1500 ppm es 16% (Gráfica 25).



Gráfica 25. Germinación de esporas de *A. solani* en sus diferentes concentraciones

***Penicillium italicum* con extracto hexánico**

En la gráfica 26 el extracto hexánico provoca en *Penicillium italicum* variaciones en el porcentaje de germinación, el mayor porcentaje de germinación (48 horas) registrado corresponde al testigo 95.3%, control Tween 89.1% y control disolvente 90.6%, al aumentar las concentraciones provoca una disminución en el porcentaje de germinación; las concentraciones 1000 ppm, 1250 ppm y 1500 ppm indican resultados significativos para reducir dicha germinación de esporas (Tabla 6.)

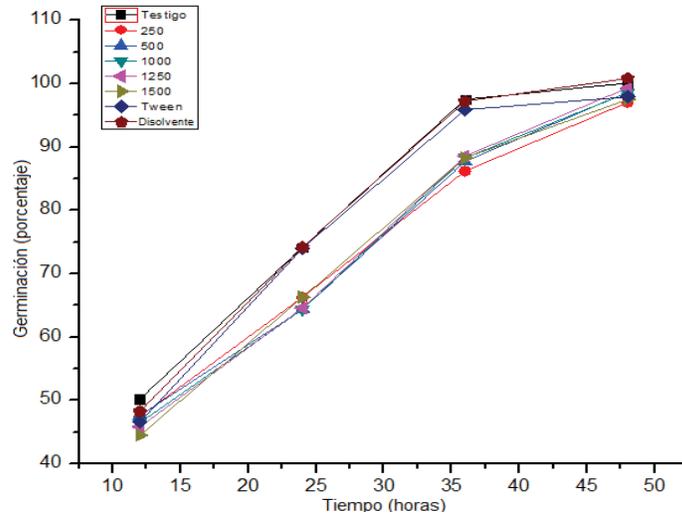


Gráfica 26. Germinación de esporas de *P. italicum* en sus diferentes concentraciones

***Penicillium italicum* con extracto de cloruro de metileno**

El extracto de cloruro de metileno muestra a las 24 horas poca disminución en la germinación de esporas de *P. italicum*. El testigo a las 24 h. tiene una germinación de 74%, no varía el porcentaje de germinación entre el testigo Tween (74%) y control solvente (74%). Al comparar las concentraciones 250 ppm (66.2%), 500 ppm (64.3%), 1000 ppm (64.3%), 1250 ppm (64.5%) y 1500 ppm (66.2%) se nota un poca disminución en germinación de esporas de *P. italicum*. La germinación a las 48 horas se muestra en la gráfica 27 que el testigo y control

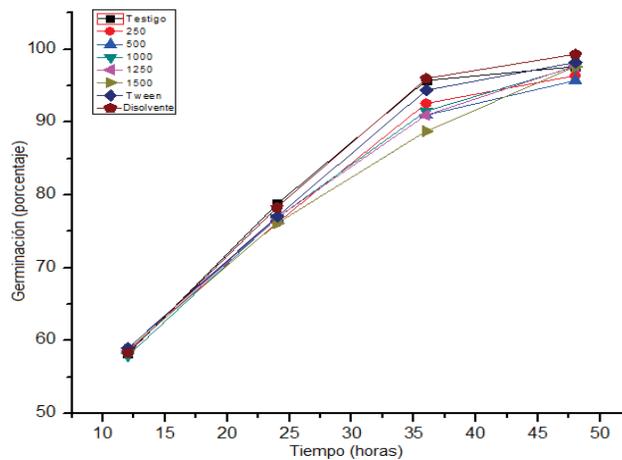
disolvente tuvieron 100% de germinación, mientras que las concentraciones del extracto de cloruro de metileno: 250 ppm (97%), 500 ppm (98.6%), 1000 ppm (98.5%), 1250 ppm (99.3%) y 1500 ppm (97.5%).



Gráfica 27. Germinación de esporas de *P. italicum* en sus diferentes concentraciones

***Penicillium italicum* con extracto metanólico**

La gráfica 28 muestra que el extracto metanólico no afecta en la germinación de esporas, al comparar el control con las diferentes concentraciones del extracto no se presentan datos significativos como se indica en la tabla 6.



Gráfica 28. Germinación de esporas de *P. italicum* en sus diferentes concentraciones

Tabla 6. Porcentaje de germinación de esporas de fitopatógenos en diferentes extractos y concentraciones

Fitopatógenos	Extracto	Tiempo	Control	250ppm	500ppm	1000ppm	1250ppm	1500ppm	Testigo Tween	Testigo Disolvente
<i>Alternaria solani</i>	C ₆ H ₁₄	12	27	27.6	27.7	22.7	22.9	22.1	26.4	26
<i>Alternaria solani</i>	C ₆ H ₁₄	24	30.2	29.3	29.7	26.7	27	27.4	29.7	30.1
<i>Alternaria solani</i>	C ₆ H ₁₄	36	45.1	46.1	47.3	49.7	50.4	48.2	44.6	49.4
<i>Alternaria solani</i>	C ₆ H ₁₄	48	57.1	44.7	48.6	49.2	49.7	48.4	44.9	50.6
<i>Alternaria solani</i>	CH ₂ Cl ₂	12	25.2	27	27.1	28.3	26.9	26.4	28.1	25.8
<i>Alternaria solani</i>	CH ₂ Cl ₂	24	29.5	29.2	31	30.1	28.6	30.2	29.7	30.3
<i>Alternaria solani</i>	CH ₂ Cl ₂	36	52.8	51.6	51.4	50.8	50.5	51.4	50.7	50.2
<i>Alternaria solani</i>	CH ₂ Cl ₂	48	69.1	66.1	64.6	65.9	64.5	64.5	68	68.1
<i>Alternaria solani</i>	CH ₃ OH	12	28.4	24	17.7	12	7.8	2.2	24.1	24.9
<i>Alternaria solani</i>	CH ₃ OH	24	30.7	24.7	25.8	15.1	10.9	5.3	27.4	29.6
<i>Alternaria solani</i>	CH ₃ OH	36	57.5	37.8	29.8	25.3	14.3	9.7	50.2	50.6
<i>Alternaria solani</i>	CH ₃ OH	48	73.6	47.6	37	26	21.6	16.3	55.8	58.1
<i>Penicillium italicum</i>	C ₆ H ₁₄	12	61.4	49.2	27.2	1.2	0.8	0	60.8	62.2
<i>Penicillium italicum</i>	C ₆ H ₁₄	24	72.2	54.5	28.6	0.2	0	0	65.1	67.9
<i>Penicillium italicum</i>	C ₆ H ₁₄	36	88.1	61.8	31.5	0.5	0.1	0.1	72.8	71.4
<i>Penicillium italicum</i>	C ₆ H ₁₄	48	95.3	69.4	40.1	0.6	0.1	0.3	89.1	90.6
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₂ Cl ₂	12	50.1	47.4	47.6	46.4	45.8	44.4	46.5	48.2
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₂ Cl ₂	24	74.1	66.2	64.3	64.3	64.5	66.2	74	74.1
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₂ Cl ₂	36	97.5	86.1	87.7	88.2	88.5	88.2	95.9	97.2
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₂ Cl ₂	48	100	97	98.6	98.5	99.3	97.5	97.9	100.8
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₃ OH	12	58.1	58.7	58.9	57.9	58.5	58.7	58.9	58.2
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₃ OH	24	78.7	76.1	76.8	76.8	76.8	76.1	77	78.2
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₃ OH	36	95.7	92.5	90.9	91.5	90.9	88.7	94.3	96
<i>Penicillium italicum</i>	CH ₃ OH	48	97.6	96.3	95.7	97.6	97.7	97.6	98.1	99.3

10. Discusión

10.1 Análisis del crecimiento radial de dermatofitos

En los experimentos realizados en este trabajo con los diferentes extractos orgánicos de *Equisetum hyemale* (hexánico, de cloruro de metileno y metanólico) al evaluarlos con los hongos dermatofitos: *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum*, se encontró que algunos extractos pueden afectar el crecimiento radial de estos hongos.

Para eliminar la posibilidad de diferencias de tiempo de crecimiento de los hongos, se retomaron en los datos registrados para dermatofitos a partir el quinto día puesto que es la muestra real en donde inicia el crecimiento de los hongos, por ello en algunas gráficas como la 1,2 y 3 correspondientes al crecimiento radial no muestran un crecimiento máximo de 0.8 mm

Las gráficas 2 y 3, muestran que el extracto de *E. hyemale* con metanol y de cloruro de metileno, no inhiben o reduce el crecimiento radial de los dermatofitos, mientras que el extracto hexánico muestra en la concentración de 100 ppm un crecimiento radial en ambos hongos (gráfica 1 y 4) esto significa que por la no polaridad del extracto hexánico de la planta *E. hyemale* contiene sustancias que provocan en el hongo un control (disminución) en el crecimiento radial. Al ir aumentando la concentración de extracto hexánico disminuye el crecimiento radial. La inhibición del crecimiento del hongo tiene resultados contrastantes entre la concentración 75 ppm y 100 ppm, en donde en la concentración 100 ppm los hongos dejan de crecer.

Los resultados mostrados en las gráficas 7 y 8 señalan que el control positivo (antimicótico) en la especie *E. floccosum* en concentración 50 ppm presenta el mayor efecto de inhibición del hongo. En la gráfica 8 se compara la concentración que inhibe más del extracto hexánico (100 ppm) y de la concentración del antimicótico que controla más el crecimiento radial (50 ppm) de *E. floccosum*.

En la gráfica 10 se puede comparar que tanto afecta el extracto hexánico en el crecimiento radial del hongo *Trichophyton rubrum*, en la concentración 100 ppm del extracto presenta una inhibición el crecimiento radial, el antimicótico en concentración 75 ppm es la más efectiva para reducir el crecimiento radial del hongo. Por lo tanto, la no polaridad del extracto hexánico provoca que contenga ciertas sustancias que modifiquen algún ciclo de crecimiento del hongo. Según Zacchino y Gupta, (2007) los mecanismos de acción de los antimicóticos actúan en la membrana fúngica, ya sea por daño a la misma, por la unión de proteínas o la inhibición de su biosíntesis o la pared celular es afectada. Bonifaz en el 2010 menciona los diferentes efectos que puede sufrir un dermatofito para tener un control sobre ellos, algunos ejemplos: inhibir la síntesis de proteínas, síntesis del ergosterol, ruptura de membrana celular principalmente.

Se puede observar en las gráficas de crecimiento radial de los dermatofitos que el testigo Tween tiene un efecto significativo en el crecimiento radial, es decir, que disminuye drásticamente el crecimiento en las diferentes concentraciones de los extractos (C_6H_{14} , CH_2Cl_2 y CH_3OH) puede deberse como se mencionó en la parte inicial de resultados en reajustar la cantidad de Tween a utilizar o hacer previos experimentos para registrar los diferentes controles (disolvente y Tween) y estandarizar el número de repeticiones. No se descarta la posibilidad de la composición química del Tween 80 (Polisorbato 80) ya que al presentar un compuesto por un tipo de lipasa quizá afecte biológicamente de alguna manera el crecimiento del hongo, pero Windholz (1976) menciona que el Tween no es tóxico mencionado en el código NFPA 704, cuya función sólo es emulsificar y surfactante.

La importancia de los resultados radica en proponer nuevas investigaciones y estudio fitoquímico a profundidad para encontrar en los diferentes extractos que es lo que está afectando realmente a los hongos para que tengan en ciertas concentraciones y en extracto una disminución en el crecimiento radial del hongo, además de concluir realmente si sirve como controlador de dermatofitosis.

Este trabajo aporta datos importantes tanto para las especies de dermatofitos como las sustancias aún no identificadas que atraen las diferentes polaridades de los extractos orgánicos de *E. hyemale*.

10.2 Análisis del crecimiento radial de fitopatógenos

Alternaria solani muestra una resistencia a los extractos hexánico y de cloruro de metileno en sus diferentes concentraciones (Gráfica 11 y 12) en comparación con el extracto metanólico (Gráfica 13). En el extracto metanólico *Alternaria solani* a mayor concentración menor crecimiento y velocidad de crecimiento radial (Gráfica 13 y apéndice), el hongo no crece radialmente pero existió un crecimiento aéreo durante la medición de los resultados del experimento, este crecimiento alterno de *A. solani* es común cuando no se tienen las condiciones controladas en las especies de *Alternaria* al crecer en medio de cultivo rico en nutrientes y en condiciones oscuras, se forma un exceso de micelio aéreo (Castell y Escalon, 2009).

Penicillium italicum sufre efectos de inhibición en su crecimiento radial con el extracto hexánico, al aumentar las concentraciones (Gráfica 19) y como se muestra en la Figura 18 a partir de la concentración 1000 ppm se observa notablemente una disminución en el crecimiento radial hasta llegar a la concentración 1500 ppm que no hay una inhibición total del hongo pero sí indica resultados significativos de crecimiento; para los extractos de cloruro de metileno y metanólico no afecta en forma significativa el crecimiento radial de *P. italicum*. Con el extracto hexánico de *E. hyemale* se pueden iniciar nuevos estudios más detallados de la química del extracto, para ser enfocado como una herramienta de control fitosanitario.

10.3 Análisis de germinación de esporas de dermatofitos

La germinación de esporas es importante para detectar si existe una resistencia de las esporas a ciertas condiciones. Los extractos que disminuyen más el crecimiento radial de los dermatofitos (*E. floccosum* y *T. rubrum*) corresponden al extracto hexánico, ya que en la concentración 100 ppm evita la germinación de esporas (Gráficas 17 y 20), en las concentraciones 50 ppm y 75 ppm disminuye drásticamente dicha germinación, donde la concentración 75 ppm tiene mayor efecto significativo, cabe mencionar que existe un cambio drástico (Gráfica 20), una explicación a este hecho puede ser debido a que las esporas tienen mecanismos de resistencia, quizá entren en periodo de latencia por el estrés encontrado en extracto orgánico. Ciertos compuestos activos pueden alterar la pared celular de los hongos alterando su ciclo de vida. (Wolff, et al., 2009) además Tapia (2005) menciona la existencia de compuestos activos de ciertos organismos pueden actuar en la membrana citoplasmática del hongo afectando su propagación.

10.4 Análisis de germinación de esporas de fitopatógenos

Alternaria solani no presenta algún resultado significativo en el extracto hexánico y de cloruro de metileno (gráficas 21 y 22). Puede observarse en la gráfica 23 el extracto metanólico presenta una diferencia significativa en la germinación de esporas ya que el testigo, control disolvente y control Tween presentan una germinación similar, mientras tanto en las diferentes concentraciones (250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm y 1500 ppm), entre más concentración de extracto contenga el medio de cultivo, se reduce el porcentaje de germinación de esporas, pero sin llegar a inhibir, esto se relaciona con el crecimiento radial aéreo mencionado anteriormente como ciclo de adaptación (Gráfica 12), donde el hongo es afectado por el extracto metanólico pero *A. solani* crece en presencia de extracto, provocando un cambio en su forma de crecimiento, es decir, deja de tener un crecimiento radial para convertirse en un crecimiento aéreo, lo cual

disminuye la cantidad de micelio provocando la disminución en la formación de esporas.

Mientras que el extracto hexánico presenta un efecto significativo en la disminución del porcentaje de germinación de esporas de *P. italicum*, de tal forma que al incrementar la concentración de extracto disminuye el porcentaje de germinación, no se inhibe completamente la germinación de esporas pero sí lo controla. *Penicillium italicum* en los extractos cloruro de metileno y metanólico no presenta datos significativos para disminuir o inhibir el porcentaje de germinación de esporas

11. Conclusiones

El extracto hexánico de *E. hyemale* provoca que exista una disminución en el crecimiento radial y germinación de esporas de los hongos *Epidermophyton floccosum* y de *Trichophyton rubrum*.

Los hongos dermatofitos muestran una susceptibilidad a altas concentraciones (75 ppm y 100 ppm) de extracto hexánico, provocando una velocidad de crecimiento lenta o una inhibición total de germinación de esporas y de crecimiento radial (en concentración 100 ppm).

El extracto hexánico tiene mayor efecto en reducir el crecimiento micelial que el antimicótico comercial (itraconazol) en las diferentes concentraciones, pero es necesario hacer investigaciones detalladas para detectar el mecanismo de acción tanto de la planta *E. hyemale* composición química como de los diferentes hongos utilizados.

Los hongos fitopatógenos muestran una adaptación de crecimiento en los diferentes extractos (hexánico, de cloruro de metileno y metanólico) con respecto al testigo.

El efecto de los extractos orgánicos en los hongos fitopatógenos es variable, *Alternaria solani* presentó menos susceptibilidad a los diferentes extractos de *E. hyemale* en el crecimiento radial y germinación de esporas; mientras que *Penicillium italicum* mostró principalmente en el extracto hexánico mayor susceptibilidad, a mayor concentración existe una disminución en el crecimiento radial y germinación de esporas en comparación con los demás extractos.

Equisetum hyemale y los diferentes extractos que se evaluaron arrojaron un nuevo modelo biológico para posteriores investigaciones, puesto que indica la existencia de sustancias aún no definidas ni identificadas.

Finalmente el extracto hexánico de *E. hyemale* es candidato para realizar estudios químicos y biológicos para determinar específicamente la causa del porque tiene un efecto en el crecimiento y germinación de esporas en hongos dermatofitos, en las investigaciones fitoquímicas anteriores sobre el género *Equisetum* indican posibles sustancias que ayudan a evitar enfermedades, pero la especie *E. hyemale* en México no cuenta con ningún tipo de antecedente sobre el efecto en el crecimiento de hongos dermatofitos.

12. Literatura citada

Adejumo, T. y Bamidele, B. 2009. Control of dermatophyte-causing agents (*Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*) using six medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:906-913.

Agrios, G. 2010. Fitopatología. 2° edición, Limusa. México, 838 pp.

Arauz, L. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica, 461 pp.

Arias, E. y Piñeros, P. 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de grado para título Microbiológicas Industriales. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 204 pp.

Ballesté, R., Barloco, A., Petrucci, S., Perelló, G., Mier, C., Combol, A. y Gezuele, E. 2006. Dermatofitosis diagnosticadas en el hospital de Clinicas DR: Manuel Quintela. *Revista Uruguaya de Patología Clínica* 40:10-24.

Bhuwan, M. y Vinod, T. 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46:4769-4807.

Bolognia, L., Jorizzo, J. y Rupini, R. 2004. Dermatología Vol. I, 6° edición. Elsevier. Barcelona, 1349 pp.

Bonifaz, A. 2010. Micología médica básica, 3° edición. Mc Graw Hill. China, 540 pp.

Bottalico, A. y Logrieco, A. 1993. Mycotoxins in *Alternaria alternata* infected olive fruits and their possible transfer into oil. *Bulletin OEPP* 23:473-479.

Brunet, J., Cetkovic, G., Djilas, S., Tumbas, V., Saratovic, S., Mandic, A., Morkov, S. y Cvetovic, D. 2009. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International Journal of Food Science and Technology* 44:269-278.

Castell, M. y Escallón, M. 2009. Evaluación *in vitro* del efecto biocontrolador de levaduras aisladas de filoplano de *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (UCHUVA) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria* sp. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, 63 pp.

Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Editorial ISBN Universidad Nacional de Salta, 81-86 pp.

Chaerani, R., Groenwold, R., Stam, P. y Voorrips, R. 2007. Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. *The Phytopathological Society of Japan and Springer* 73:96-103.

Chattapadhyay, K. y Dureja, P. 2006. Antifungal Activity of 4-Methyl-6-alkyl-2H-pyran-2-ones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2129-2133.

Cole, M. 1994. Key Antifungal, antibacterial and Anti-insect Assays a Critical Review. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:837-856.

Davidse, G., Sousa, M., Diane, S., Chiang, F. y Oliver, A. 1995. Flora Mesoamericana, Psilotaceas a Salviniceae. Volumen 1. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum (London), México, 470 pp.

De Baule, K. 1996. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* 6:175-181.

Díaz, C., Roessler, P., Fich, F., Gómez, O., Ostornol, P. y Pérez, L. 2002. Dermatofitosis. Etiología y susceptibilidad antifúngica “*in vitro*” en tres centros hospitalarios de Santiago (Chile). *Boletín Micológico* 17:101-107.

Dogan, S., Diken, M. y Dogan, M. 2010. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Reserch* 23:2566-2573.

Freedber, I., Ersen, Al., Wolff, K., Austen, F., Goldsmith, L. and Katz, S. 2009. Fitzpatrick’s Dermatology in General Medicine Vol. II. Mc Graw-Hill, EUA. 2594 pp.

Gallardo, C., Aguilar, E. y Gómez, A. 2006. Importancia Etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*. *Polibotánica*, Instituto Politécnico Nacional 21:61-74.

Guerra, D., Hernández, L. y Reyes, B. 2010. Actividad Fungicida de tres especies de *Equisetum* sobre *Phytium aphanidermatum*. Resumen del Congreso Mexicano de Química, México.

Goun, E., Cunningham, G., Chu, D., Nguyen, C. y Miles, F. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* 76:592-596.

Graser, Y., Kuijpers, A., Presber, W. y Hoog, G. 2000. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3329-3336.

Gurbuz, I., Yesiladab, E. y Itoc, S. 2009. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* 121:360–365.

Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, R. y Arenas R. 2007. Dermartofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1196-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana Micología* 24:122-124.

Jaric, S., Popovic, Z., Macukanovic, M., Djurdjevic, L., Mijatovic, M., Karadzic, B., Mitrovic, M. y Pavlovic, P. 2007. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology* 111: 160–175.

Kinay, P., Mansour, M., Mlikota, F., Margosan, D. y Smilanick, J. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection* 26:647-656.

Large, M., Blanchon, D. y Angus, M. 2006. Devitalisation of imported horsetail (*Equisetum hyemale*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:151-153.

López, R., Méndez, J., Manzano, P. y Hernández, F. 2009. Principios de Micología Médica. Clínica, diagnóstico y terapéutica. Méndez Editores. México 21-29 pp.

Mandelker, L. y Wynn, S. 2004. Cellular effects of various herbs and botanicals. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 34:355–368.

McVaugh, R. 1992. Gymnosperms and Pteridophytes. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 17. Anderson, The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, 467 pp.

Mesa, A., Bueno, J. y Bentacur, L. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia* 17:325-331.

Méndez, L., López, R. y Hernández. 2004. Micosis superficiales. Dermatofitos. En: Actualidades en Micología Médica, 2º edición, Facultad de Medicina UNAM, México, 1009-138 pp.

Mickel, J. y Smith, A. 2004. The Pteridiophytes of Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden NY* 88: 1-1054.

Moran R., Moran, R. and R. Riba. 1995. Flora Mesoamericana Vol. 1: Psilotaceae a Salviniaceae. Universidad Nacional Autónoma de México & Misuri Bot. Garden, Museo de Historia Natural (Londres), México, 339-340 pp.

Muscheetti, L., Derita, M., Sülsen, V., Muñoz, J., Ferraro, G., Zacchino, S. y Martino, V. 2005. In vitro antifungals assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 102:233-238.

Park, B. y Tomohiko, M. 2011. Feruloyl, Caffeoyl, and flavonol glucosides from *Equisetum hyemale*. *Chemestry of Natural Compounds* 47:363-365

Pérez, C y Anesini, C. 1994. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by argentinean medicinal plants. *Fitoterapia* 65(2): 169-172.

Pimienta, R., Silva, F., Silva, J., Morais, P., Braga, D., Rosa, C. y Corrêa, A. 2008. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 85-90.

Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:78-82.

Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T. y Cañigueral, S. 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 76:93-98.

Pyun, M. y Shin, S. 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13:394-400

Reyes, R., Gómez, F., Moreno, G., Jiménez, M. y Quiroz, R. 1998. Flavonoids and Isoflavonoids with Antifungal Properties from *Platymiscium yucatanum* Heartwood. *Holzforschung* 52:459-462

Robledo, M., Alatorre, R. Viniegra, G. y Loera, O. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 101:222-227.

Rodríguez, M.P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana. Instituto de Biología* 1:53-78.

Rundberget, T., Skaar, I. y Flaoyen, A. 2004. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food Microbiology* 90:181-188.

Rzedowski, J., 1978. Vegetación de México. Limusa. México, 432 pp.

Sato, J., Goto, K., Nanjo, F., Kawai, S. y Murata, K. 2000. Antifungal Activity of Plant Extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90: 442-446.

Singh, N., Kaur, S., Bedi, P. y Kaur, D. 2011. Anxiolytic effects of *Equisetum arvense* Linn. extracts in mice. *Indian Journal of Experimental Biology* 49:352-256

Tejero, D., Aguilar, S. y Flores, S. 1998. El género *Equisetum* L. en el occidente del estado de México, México. *Acta Botánica Mexicana* 44:7-23

Windholz, M. 1976. The Merck Index, 9° edición, Merck & Co.Inc. USA, 2364 pp.

Wolff, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A. y Leffell, D. 2009. Fitzpatrick Dermatología en Medicina General, 7° edición, tomo III Editorial Médica Panamericana, México, 180 pp.

Zacchino, S. y Gupta, M. 2007. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. Editorial Corpus. Argentina 233-240 pp.

Fuentes de Internet

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)

<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/subagri.aspx>

Organización Mundial de la Salud (OMS)

<http://www.who.int/research/es/>

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/equisetaceae/equisetum-hyemale/fichas/ficha.htm>

Global Biodiversity Information Facilit (GBIF)

<http://data.gbif.org/species/2597864/>

MYCOBANK

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=27864&Fields>

MUSHROOM OBSERVER

http://mushroomobserver.org/name/show_name_description?_js=on&_new=true&id=1368

Unidad de Informática para la Biodiversidad del Instituto de Biología (UNIBIO)

<http://unibio.unam.mx/>

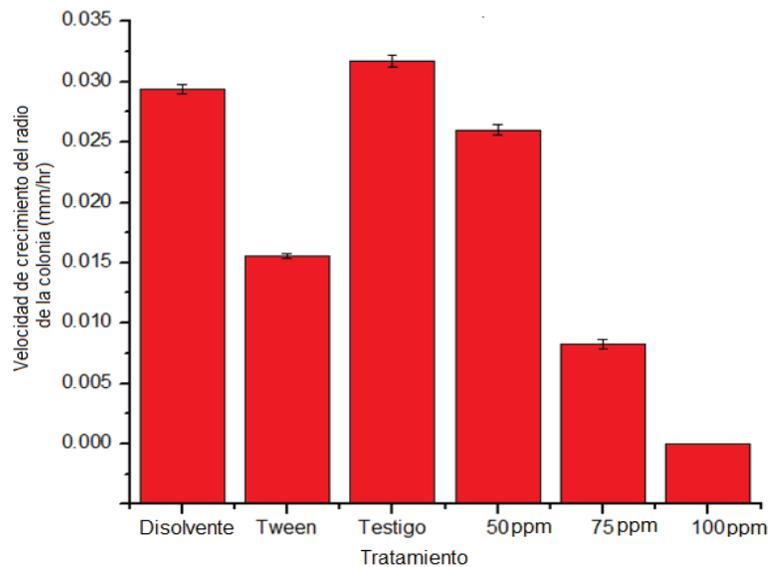
13. Anexo

13.1 Gráficas de la velocidad de crecimiento radial de dermatofitos y fitopatógenos.

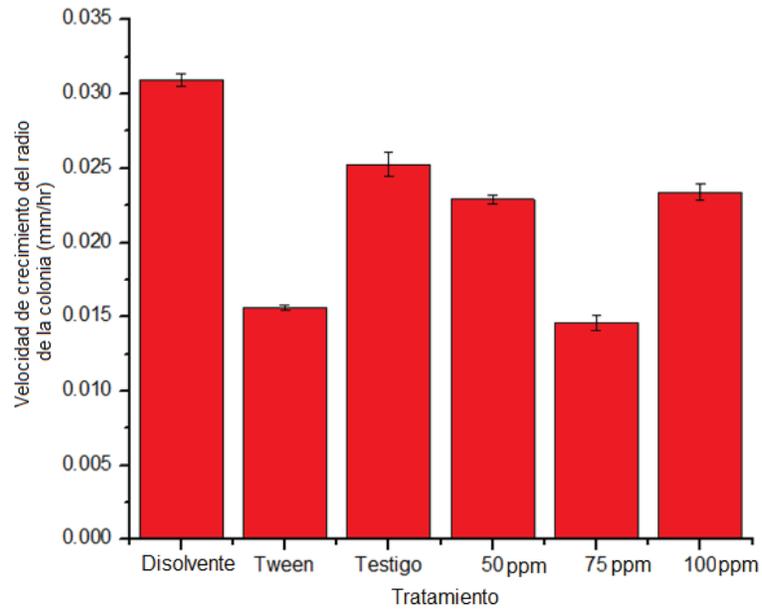
Las gráficas incluidas en este apéndice corresponden a la parte del crecimiento radial, se graficaron las velocidades (mm/hr) y las diferentes concentraciones de los extractos orgánicos (hexano, cloruro de metileno, metanol) que en la gráfica están denominados los extractos como tratamiento.

Para poder identificar las gráficas y su relación con los resultados presentados en el trabajo, fue necesario colocar una clave, es decir, en la primer gráfica mostrada aquí corresponde a 1.1 en los resultados corresponde a la gráfica 1, si se analiza la gráfica 2 de los resultados y se quiere ver la relación con la velocidad de crecimiento del hongo es necesario buscar en el apéndice la gráfica 2.1 en donde el número antes del punto equivale a la gráfica correspondiente al apartado de los resultados (página 34), siendo así para todas las gráficas.

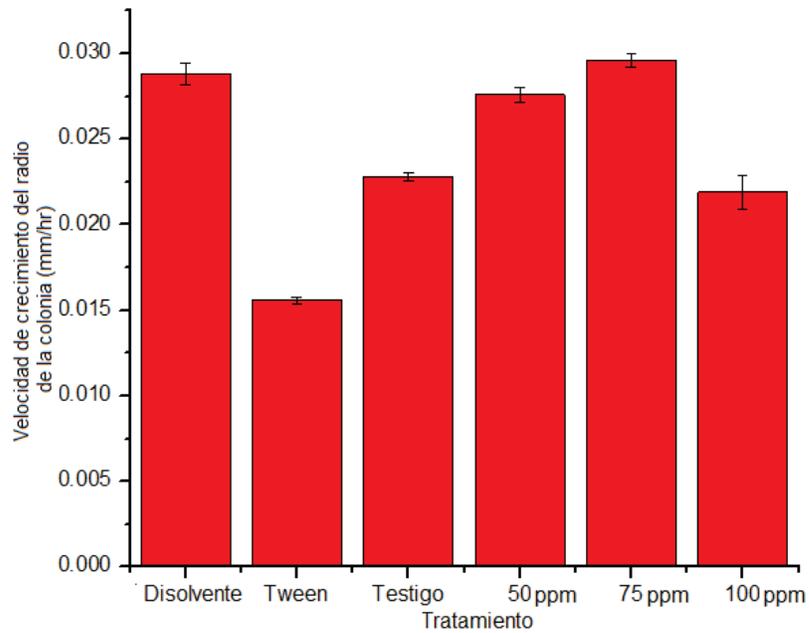
Dermatofitos



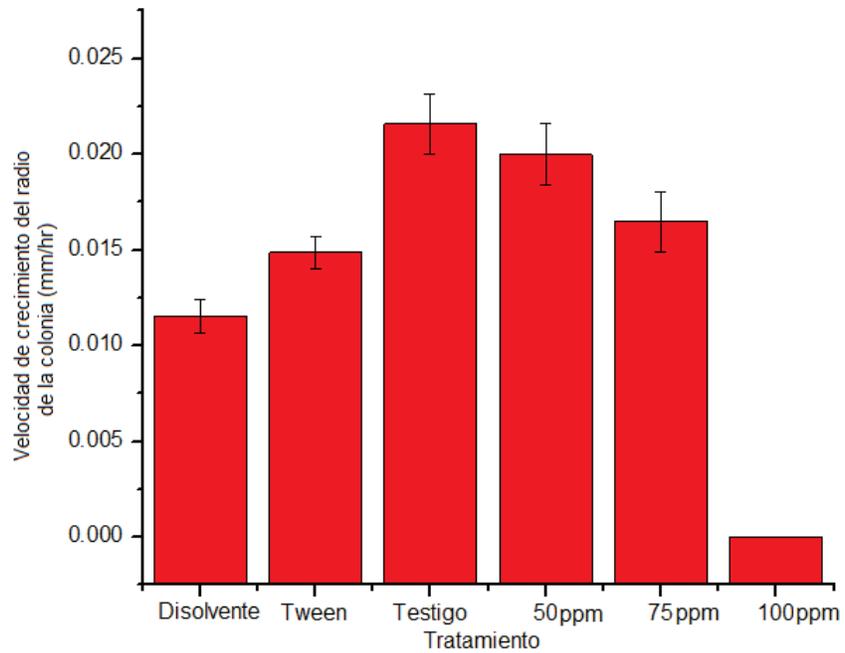
Gráfica 1.1. Velocidad del crecimiento radial de *E. floccosum* en extracto hexánico a través de tiempo en diferentes concentraciones



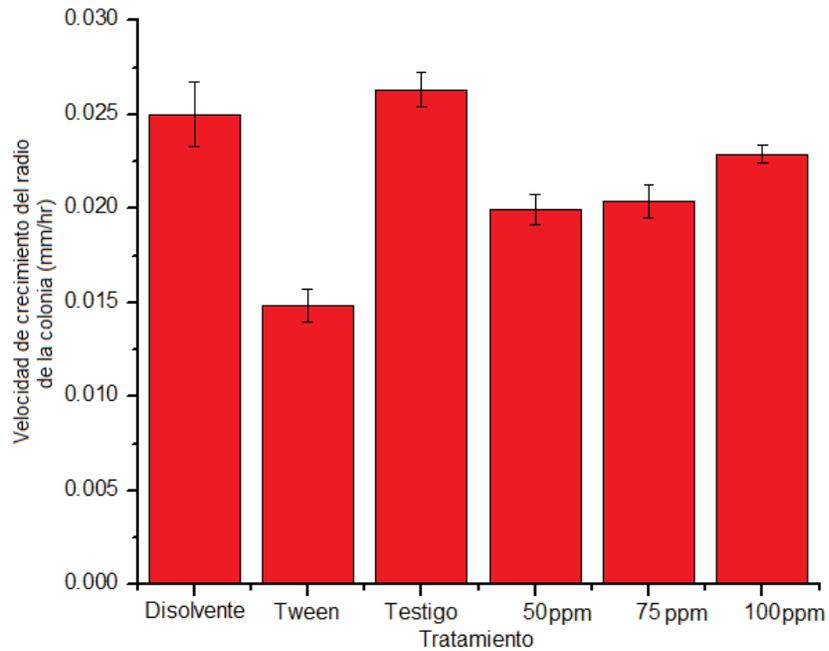
Gráfica 2.1. Velocidad del crecimiento radial de *E. floccosum* en cloruro de metileno a través de tiempo en diferentes concentraciones



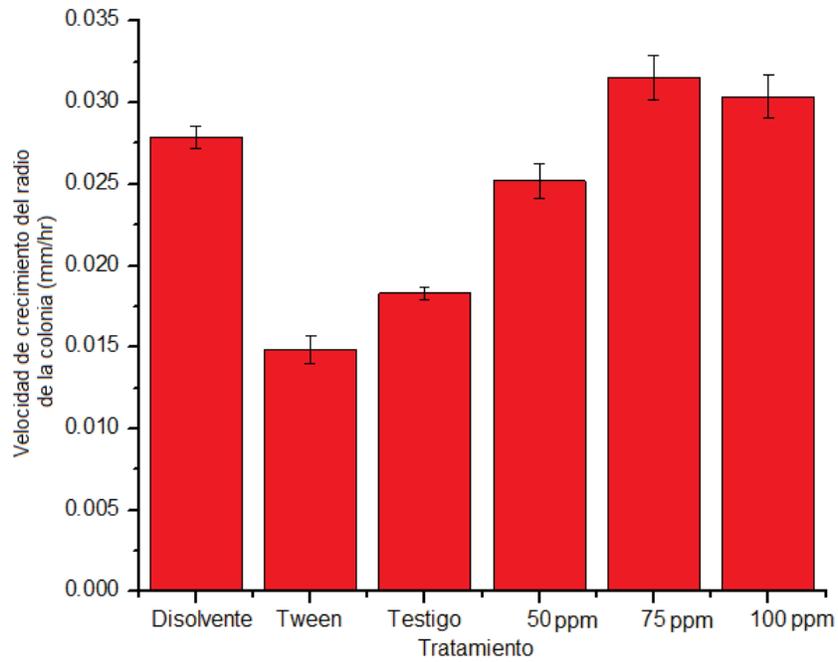
Gráfica 3.1. Velocidad del crecimiento radial de *E. floccosum* en metanol a través de tiempo en diferentes concentraciones



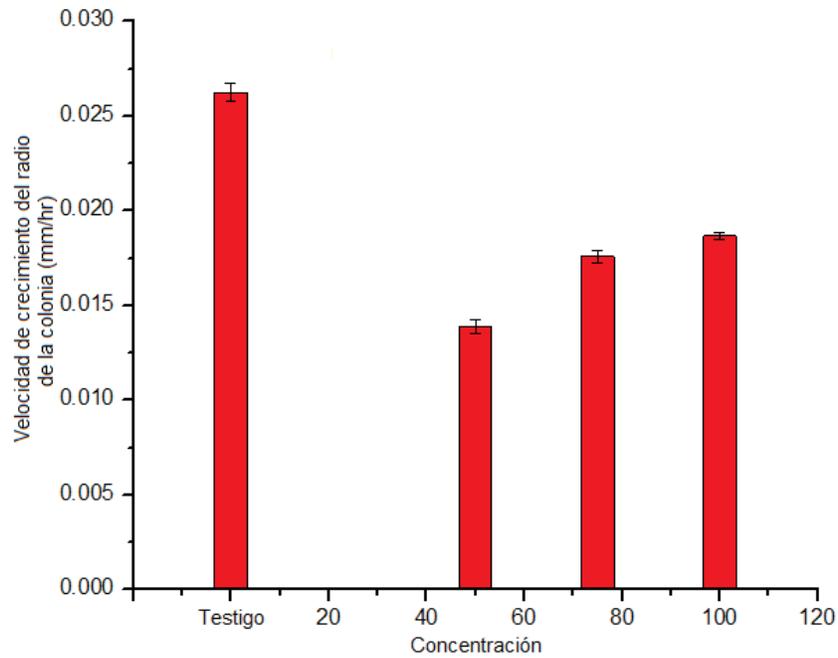
Gráfica 4.1. Velocidad del crecimiento radial de *T. rubrum* en hexano a través de tiempo en diferentes concentraciones



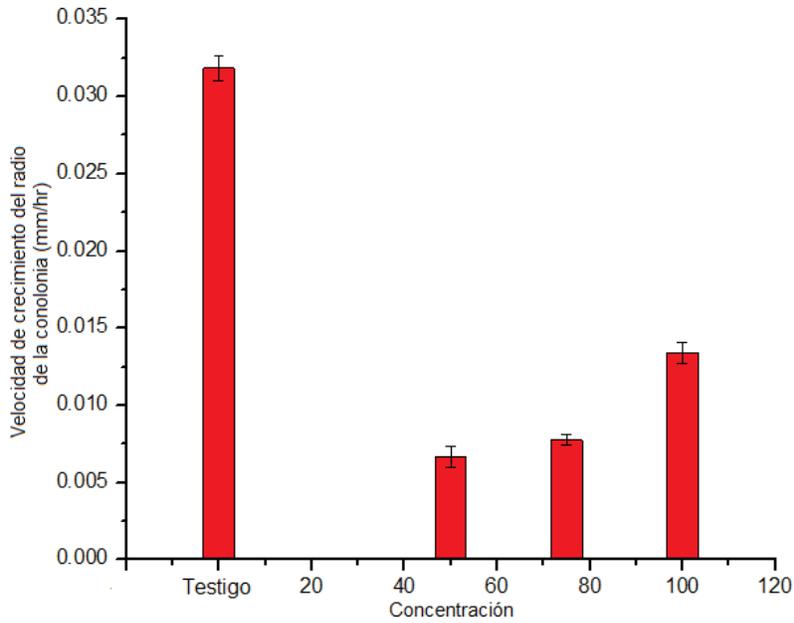
Gráfica 5.1. Velocidad del crecimiento radial de *T. rubrum* en cloruro de metileno a través de tiempo en diferentes concentraciones



Gráfica 6.1. Velocidad del crecimiento radial de *T. rubrum* en metanol a través de tiempo en diferentes concentraciones.

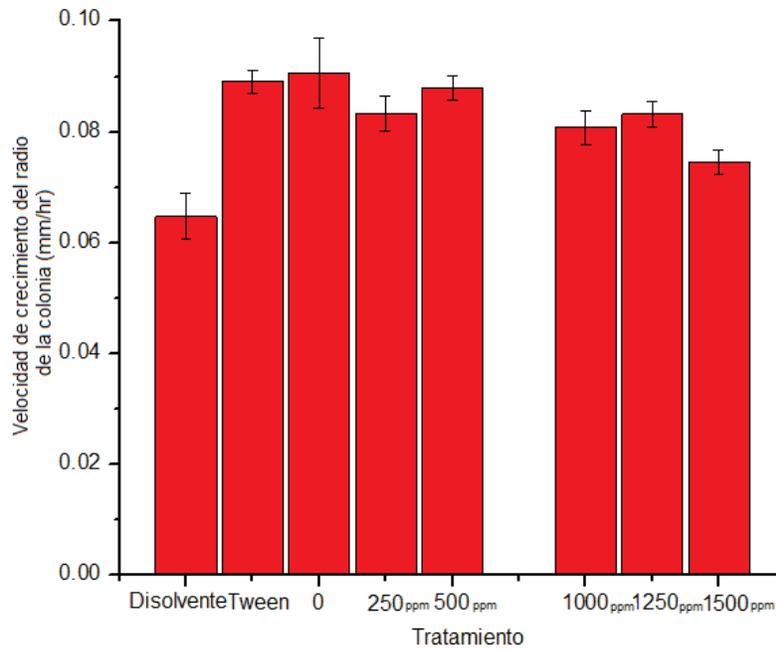


Gráfica 7.1. Velocidad del crecimiento radial de *E. floccosum* con antimicótico a través de tiempo en diferentes concentraciones

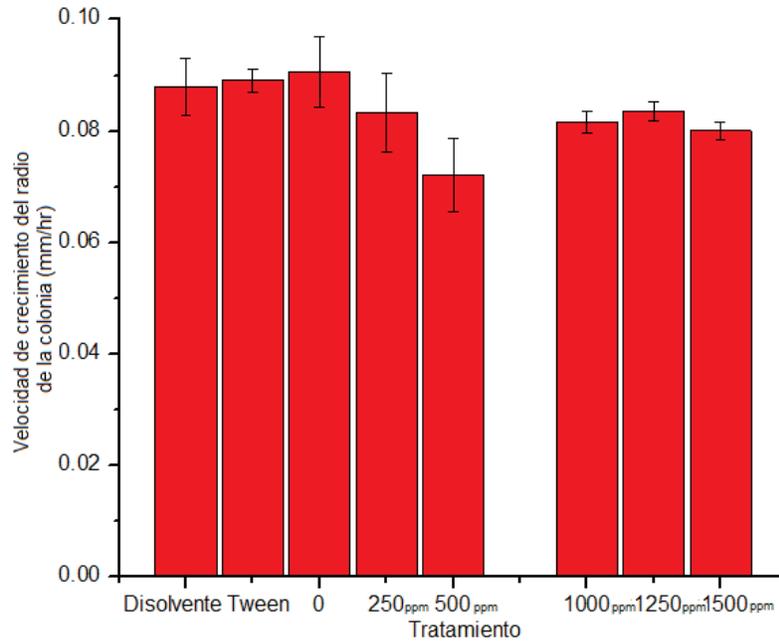


Gráfica 9.2. Velocidad del crecimiento radial de *T. rubrum* con antimicótico a través de tiempo en diferentes concentraciones

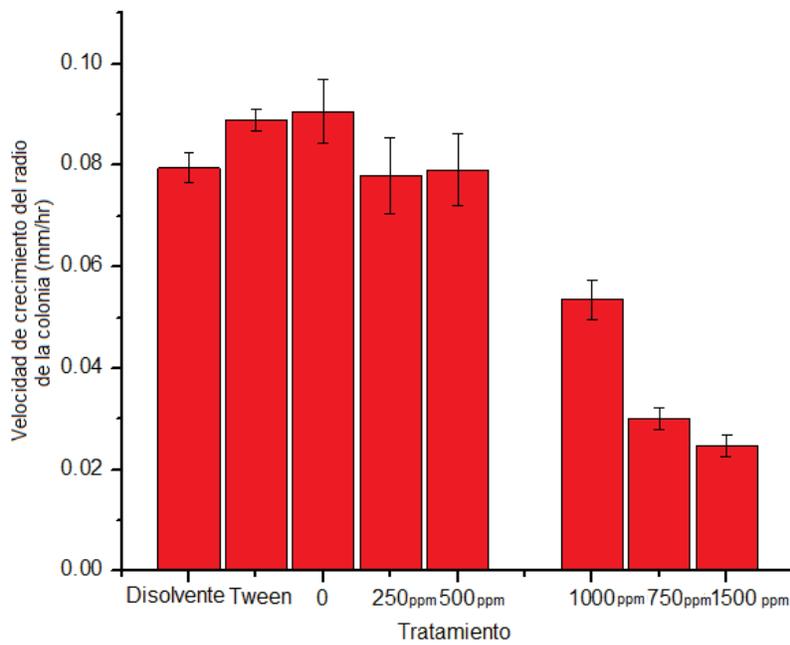
Fitopatógenos



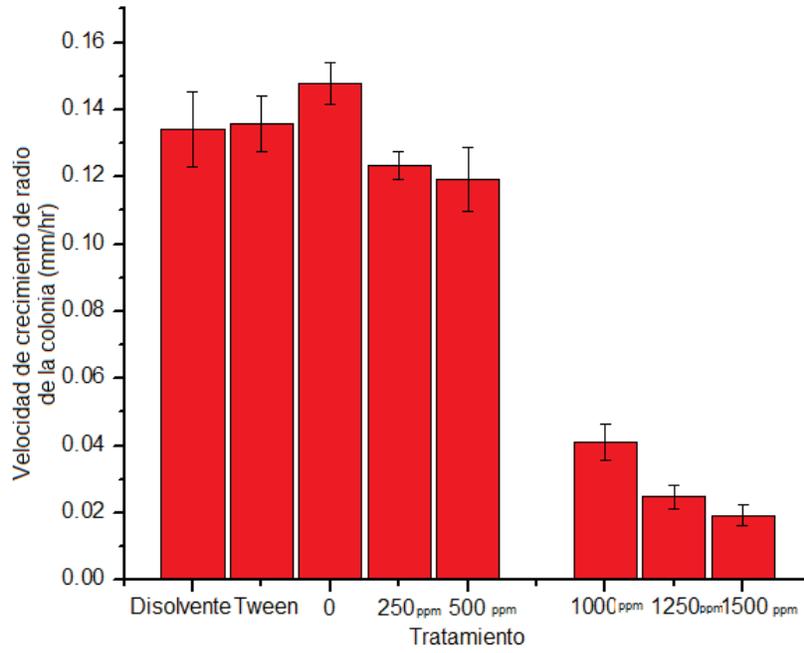
Gráfica 11.1. Velocidad del crecimiento radial de *A. solani* en hexano a través de tiempo en diferentes concentraciones.



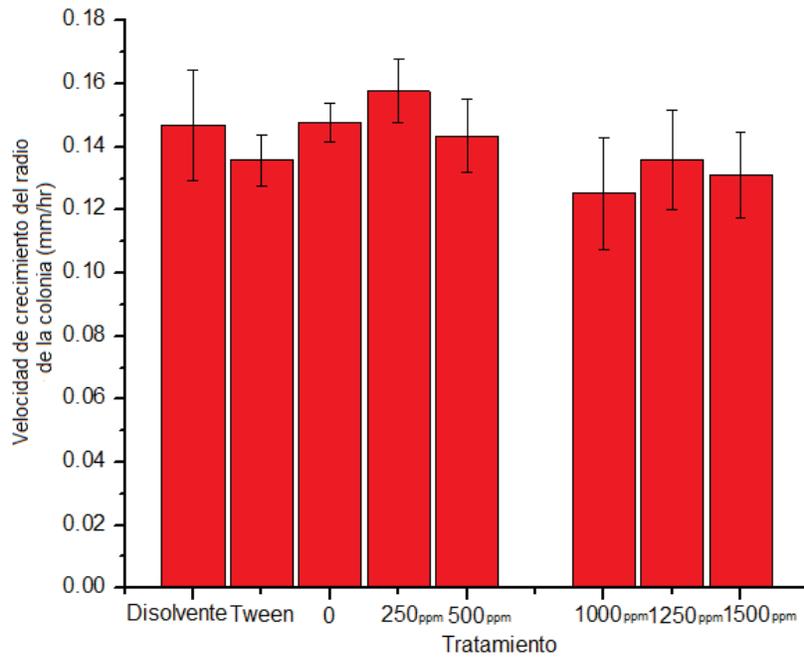
Gráfica 12.1. Velocidad del crecimiento radial de *A. solani* en cloruro de metileno a través de tiempo en diferentes concentraciones



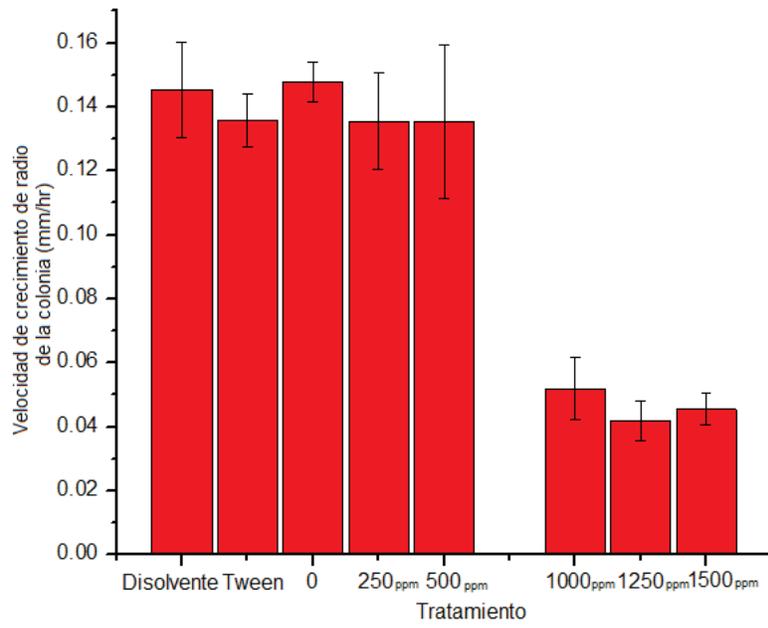
Gráfica 13.1. Velocidad del crecimiento radial de *A. solani* en metanol a través de tiempo en diferentes concentraciones



Gráfica 14.1. Velocidad del crecimiento radial de *P. italicum* en hexano a través de tiempo en diferentes concentraciones



Gráfica 15.1. Velocidad del crecimiento radial de *P. italicum* en cloruro de metileno a través de tiempo en diferentes concentraciones



Gráfica 16.1. Velocidad del crecimiento radial de *P. italicum* en metanol a través de tiempo en diferentes concentraciones.