



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE *Salvia sessei*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

GABRIELA VIANEY RÍOS GUZMÁN



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

Ríos
Guzmán
Gabriela Vianey
25 94 10 51
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311219384

Datos del tutor

M. en C.
Baldomero
Esquivel
Rodriguez

Datos del sinodal 1

Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa

Datos del sinodal 2

Dra.
Martha Juana
Martínez
Gordillo

Datos del sinodal 3

M. en C.
Itzi
Fragoso
Martínez

Datos del sinodal 4

Dr.
Leonardo Osvaldo
Alvarado
Cárdenas

Datos del trabajo escrito

Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de los extractos de *Salvia sessei*
85pp.
2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Argelia y Felipe, así como a familia por ser mi principal apoyo en lo que va de mi vida. Por ellos es que he llegado hasta aquí y no sé dónde estaría sin ustedes. ¡Gracias!

A mi asesor el M. en C. Baldomero Esquivel, en primera estancia por abrirme las puertas, por compartir su valioso conocimiento y guiarme a lo largo del proyecto. También a la Dra. Martha Macías Rubalcava por su gran apoyo, conocimiento y guía a lo largo de este trabajo.

A los integrantes del jurado Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Martha Martínez Gordillo, Dr. Leonardo Alvarado Cárdenas y M. en C. Itzi Fragoso Martínez por el tiempo invertido en leer esta tesis, por sus comentarios, ayuda y conocimientos que fueron de gran valor.

A la UNAM, Facultad de Ciencias e Instituto de Química sin los cuales no hubiera podida llegar hasta este punto.

A los técnicos académicos del Instituto de Química por las pruebas realizadas. A mis profesores de la carrera por hacer de la biología la mejor experiencia de la vida; en especial a la Dra. Martha Martínez por adentrarme al mundo de las plantas, a la Dra. Nathalie Cabirol y el Dr. Marcelo Rojas por apoyar mi decisión y preocuparse por mí.

A mis compañeros del IQ por su valiosa ayuda y los momentos que pase a su lado, especialmente a Victoria (*Suricata rex*). A todos mis amigos de la FC, a mis compañeros del taller, Fa, Jime, Jam, Ale, Gina y Mau, uno de los mejores amigos que pude hacer. A Fersita, Fab, Andy y Sandy porque con ustedes viví grandes momentos en la carrera. A Loreli, Sivia e Itzel, aunque las vea una vez al año son mis mejores amigas, siempre. Y a Juan Carlos por siempre ayudarme a seguir adelante, no sé qué hubiera hecho sin todo tu apoyo. Los quiero.

Por último, agradezco a todas aquellas personas que olvido mencionar, pero que sin ellas no podría haber llegado a este punto. Gracias a todos.

Contenido

Listado de figuras.....	VI
Listado de tablas.....	VIII
Listado de gráficas.....	IX
Abreviaturas.....	X
Resumen.....	XII
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Familia Lamiaceae.....	1
1.2. Género <i>Salvia</i>	2
1.3. <i>Salvia sessei</i>	3
1.4. Hongos fitopatógenos.....	5
1.4.1. <i>Alternaria alternata</i>	8
1.4.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	9
1.5. Oomicetos fitopatógenos.....	11
1.5.1. <i>Phytophthora capsici</i>	12
1.5.2. <i>Pythium aphanidermatum</i>	14
1.6. Productos naturales: Terpenos.....	16
1.7. Diterpenos.....	17
1.8. Mecanismo de acción de los extractos vegetales con actividad antifúngica.....	18
Capítulo 2. Antecedentes.....	20

Capítulo 3. Justificación.....	22
Capítulo 4. Objetivos.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos particulares.....	25
Capítulo 5. Método.....	26
5.1. Colecta.....	26
5.2. Obtención de los extractos.....	27
5.3. Bioensayo uno. Utilización de los extractos.....	28
5.4. Obtención de IC50 de los extractos.....	30
5.5. Cromatografía en columna del extracto de hojas.....	31
5.6. Bioensayo dos. Utilización de las fracciones de la columna.....	31
5.7. Cromatografía en columna flash de la fracción uno del extracto de hojas.....	32
5.8. Obtención y elucidación de sesseina.....	32
5.9. Bioensayo tres. Utilización de sesseina.....	33
Capítulo 6. Análisis de resultados.....	34
6.1. Obtención y cromatografía en capa delgada de los extractos.....	34
6.2. Bioensayo uno. Utilización de los extractos.....	36
6.3. Obtención de IC50 de los extractos.....	41
6.4. Cromatografía en columna del extracto de hojas.....	44
6.5. Bioensayo dos. Utilización de las fracciones de la cromatografía en columna.....	44
6.6. Cromatografía en columna flash de la fracción uno del extracto de hojas.....	54
6.7. Obtención y elucidación de sesseina.....	55
6.8. Bioensayo tres. Utilización de sesseina.....	57
Capítulo 7. Conclusiones.....	66

Capítulo 8. Referencias.....	69
Anexos.....	78
A.1. Espectro de IR de extracto de tallos.....	79
A.2. Espectro de IR de extracto de hojas.....	80
A.3. Espectro de IR de extracto de flores.....	81
A.4. Espectro de IR de sesseina.....	82
A.5. Espectro de RMN- ¹ H de sesseina.....	83
A.6. Espectro de RMN- ¹³ C de sesseina.....	84
A.7. Espectro de HSQC de sesseina.....	85

Listado de figuras

Figura 1. <i>Salvia sessei</i>	4
Figura 2. Estructura de la sesseina.....	5
Figura 3. Naranja con micelio de un hongo del género <i>Penicillium</i>	6
Figura 4. <i>Alternaria alternata</i>	8
Figura 5. <i>Fusarium oxysporum</i>	9
Figura 6. <i>Phytophthora capsici</i>	12
Figura 7. <i>Pythium aphanidermatum</i>	14
Figura 8. Sitio de colecta de <i>S. sessei</i>	26
Figura 9. Herborizado depositado en el herbario FCME.....	27
Figura 10. Extractos de <i>S. sessei</i> ; a) tallos, b) hojas y c) flores.....	34
Figura 11. Crecimiento de <i>A. alternata</i> a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor.....	39
Figura 12. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor.....	39
Figura 13. Crecimiento de <i>P. capsici</i> a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor.....	40

Figura 14. Crecimiento de <i>P. aphanidermatum</i> a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor.....	41
Figura 15. Controles de <i>A. alternata</i> (a-PDA y b-DMSO), <i>F. oxysporum</i> (c-PDA y d-DMSO), <i>P. capsici</i> (e-PDA y f-DMSO) y <i>P. aphanidermatum</i> (g-PDA y h-DMSO).....	42
Figura 16. Crecimiento de <i>A. alternata</i> a diferentes concentraciones de los tres extractos....	43
Figura 17. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> a diferentes concentraciones de los tres extractos.	44
Figura 18. Crecimiento de <i>P. capsici</i> a diferentes concentraciones de los tres extractos.....	45
Figura 19. Crecimiento de <i>P. aphanidermatum</i> a diferentes concentraciones de los tres extractos.....	47
Figura 20. Crecimiento de <i>A. alternata</i> en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas.....	50
Figura 21. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas.....	52
Figura 22. Crecimiento de <i>P. capsici</i> en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas.....	53
Figura 23. Crecimiento de <i>P. aphanidermatum</i> en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas.....	53
Figura 24. Sesseina obtenida en polvo y cristales.....	55
Figura 25. Crecimiento de los fitopatógenos en los controles y el medio con sesseina.....	59

Listado de tablas

Tabla 1. Cantidad de extracto obtenida por peso inicial de la planta.....	34
Tabla 2. Resultado del bioensayo uno. Porcentajes de crecimiento e inhibición de cada fitopatógeno en cada tratamiento.....	38
Tabla 3. Porcentaje de crecimiento e inhibición de <i>A. alternata</i> por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.....	43
Tabla 4. Porcentaje de crecimiento e inhibición de <i>F. oxysporum</i> por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.....	44
Tabla 5. Porcentaje de crecimiento e inhibición de <i>P. capsici</i> por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.....	45
Tabla 6. Porcentaje de crecimiento e inhibición de <i>P. aphanidermatum</i> por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.....	47
Tabla 7. Peso de las fracciones de la cromatografía de columna del extracto de hoja.....	49
Tabla 8. Porcentaje de crecimiento e inhibición de los fitopatógenos con las fracciones utilizadas.....	51
Tabla 9. Peso de las fracciones utilizadas para la comparación con la sesseina.....	54
Tabla 10. Asignaciones de los carbonos de la sesseina aislada.....	56
Tabla 11. Asignaciones de los hidrógenos de la sesseina aislada.....	56
Tabla 12. Porcentaje de crecimiento e inhibición de los fitopatógenos en el medio adicionado con sesseina.....	58

Listado de gráficas

Gráfica 1. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para <i>A. alternata</i>	39
Gráfica 2. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para <i>F. oxysporum</i>	39
Gráfica 3. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para <i>P. capsici</i>	40
Gráfica 4. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para <i>P. aphanidermatum</i>	41
Gráfica 5. Curva de inhibición de los tres extractos sobre <i>A. alternata</i>	43
Gráfica 6. Curva de inhibición de los tres extractos sobre <i>F. oxysporum</i>	44
Gráfica 7. Curva de inhibición de los tres extractos sobre <i>P. capsici</i>	45
Gráfica 8. Curva de inhibición de los tres extractos sobre <i>P. aphanidermatum</i>	47
Gráfica 9. Porcentaje de inhibición para <i>A. alternata</i> con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.....	50
Gráfica 10. Porcentaje de inhibición para <i>F. oxysporum</i> con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.....	52
Gráfica 11. Porcentaje de inhibición para <i>P. capsici</i> con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.....	53
Gráfica 12. Porcentaje de inhibición para <i>P. aphanidermatum</i> con la fracción uno y dos a las 48 horas.....	53
Gráfica 13. Comparación del porcentaje de inhibición de los fitopatógenos a las 48 horas y una vez que los controles negativos estuvieron llenos.....	58

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (Reflexión total atenuada)
C	Carbono
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCF	Cromatografía en columna flash
cm	centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAB ⁽⁺⁾	<i>Fast Atom Bombardment positive mode</i> (Bombardeo Rápido de Átomos en modo positivo)
HSQC	<i>Heteronuclear Simple-Quantum Correlation</i> (Correlación Heteronuclear Cuántica Simple)
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (Concentración inhibitoria máxima media)
IR	Infrarrojo
L	Litro
mg	miligramos
MHz	Megahertz
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> (Concentración inhibitoria media)

mL	mililitros
mmHg	milímetros de mercurio
msnm	metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa carga
PDA	Medio papa dextrosa agar
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

Resumen

El género *Salvia*, perteneciente a la familia Lamiaceae, ha sido utilizado desde la antigüedad, destacando sus propiedades medicinales gracias a la diversidad de metabolitos secundarios que se encuentran en las especies de este género. *Salvia sessei* se encuentra en 10 estados del país, en los cuales sólo tiene un uso ornamental; en una de las áreas de distribución, localizada en Valle de Bravo, Estado de México, la especie no presenta signos de infecciones o herbivoría, como algunas de las plantas de su entorno, lo que sugeriría su capacidad de resistencia a estas presiones.

La búsqueda de sustancias, como los extractos vegetales, para tratar infecciones en la plantas por hongos fitopatógenos ha ido en aumento porque, actualmente, los fungicidas tienen un impacto grave en el ambiente y en la salud de las personas. Es por ello que se probaron, mediante la realización de un bioensayo en placas de medio PDA, los extractos acetónicos de tallos, hojas y flores de *S. sessei* contra cuatro especies de fitopatógenos: dos hongos, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*; y dos oomicetos, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*. Basado en los resultados del bioensayo, se buscaron, mediante técnicas cromatográficas, los compuestos responsables de la actividad inhibitoria contra los fitopatógenos del extracto de hojas, identificando a la sesseina como el principal compuesto responsable de la inhibición.

Con los resultados obtenidos, se concluyó que el extracto de hojas de *S. sessei* y la sesseina son una opción viable para el tratamiento de infecciones causadas por estos fungoides, presentando una mejor inhibición contra *P. aphanidermatum*. Para los otros fitopatógenos, los resultados son óptimos y están dentro del rango de los obtenidos en otros estudios publicados. Finalmente, este trabajo es uno de los pocos reportes donde se prueba la capacidad antifúngica de una especie del género *Salvia* contra este tipo de patógenos.

Capítulo 1. Introducción

Desde la aparición del ser humano, las plantas tienen una gran importancia vital, gracias a éstas pueden satisfacer y completar distintas funciones en su desarrollo (Márquez *et al.*, 2013), destacando su utilidad como alimento, material para construir herramientas y refugios, así como el tratamiento y prevención de enfermedades o parásitos.

Actualmente, sólo alrededor de 1000 especies en el mundo son de importancia económica (Márquez *et al.*, 2013). Es por ello que en los últimos años se ha incrementado el estudio de éstas y en general de la flora vascular, desde el punto de vista taxonómico, fisiológico, de caracterización química y de sus propiedades, contribuyendo al conocimiento científico.

1.1. Familia Lamiaceae

México posee una gran riqueza florística, la cual es considerada como una de las más variadas y complejas del planeta, siendo Lamiaceae una de las familias más diversas e importantes (Villaseñor, 2016), en la cual se pueden encontrar una gran variedad de plantas perennes y hierbas anuales, que han sido ampliamente utilizadas desde hace cientos de años, como condimentos, ornamentales y para la obtención de aceites esenciales, útiles en

la industria cosmética y de perfumes. También tienen un gran interés farmacéutico, por su amplia utilización en la medicina tradicional debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Waller *et al.*, 2017).

La familia Lamiaceae está posicionada en el octavo lugar de diversidad en el país y posee un endemismo del 65.82%; los géneros mejor representados son: *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis* (Martínez *et al.*, 2013).

1.2. Género *Salvia*

El género *Salvia* se encuentra distribuido en el Mediterráneo, el sur de Asia, Sudáfrica, América Central y Sudamérica (Topçu, 2006; Pool y Knapp, 2012), crece desde el nivel del mar hasta una altura de 3,400 msnm y se encuentra adaptado a climas templados, aunque algunas especies se han encontrado en hábitats con temperaturas hasta de 38°C (Clebsch, 2008). La mayoría de las especies americanas pertenecen al subgénero *Calosphace* que es el más diverso del país, representado con 306 especies, de las cuales 236 son endémicas (Martínez *et al.*, 2017).

Su nombre proviene del latín *salvus* cuyo significado es salvo, intacto o seguro (Martínez *et al.*, 2013) y de *salvare* que significa sanar (Clebsch, 2008). Ambos significados hacen alusión al uso medicinal que se le ha dado a este género durante cientos de años.

Este género además de su uso alimenticio y cosmético, tiene un amplio rango de actividades biológicas, destacando como antibacterial (Bisio *et al.*, 2015), antioxidante, antiviral, citotóxica, antitumoral, antifúngica y como tratamiento para enfermedades cardiovasculares, cerebrales, artritis, diabetes (Medjahed *et al.*, 2016), tuberculosis, bronquitis y desordenes menstruales (Topçu, 2006).

Topçu (2006) reporta que los principales metabolitos secundarios del género son terpenoides y flavonoides. En las partes aéreas, sobretodo hojas y flores, se encuentran flavonoides, monoterpenos, diterpenos y triterpenos, los cuales también pueden ser encontrados en las raíces.

1.3. *Salvia sessei*

Comúnmente conocida como *Ocotillo*, esta especie pertenece a la sección *Erythrostachys* del subgénero *Calosphace*, se caracteriza por ser un arbusto perenne con tallo leñoso y con floración anual entre verano y otoño (Clebsch, 2008) (Figura 1).

Basado en la descripción de Epling (1939) y Ahlenslager (1984), posee un tamaño de 4 a 5 metros de altura con tallos recubiertos de tricomas. Las hojas son de color verde claro, pubescentes, con forma ovada-acuminada, poseen un margen aserrado y tienen un tamaño de 4 a 13 cm de largo por 2 a 7 cm de ancho y. Las inflorescencias son panículas, de 12.7 cm de largo, compuestas de flores con un cáliz de color rojo, de 1 a 2 cm de largo, por 1 a 1.7 cm de ancho y presenta tricomas que son más finos que los del tallo y de las hojas; la flor es

bilabiada, del mismo color que el cáliz, y tiene un tamaño de 3.9 a 8.2 cm, incluyendo el tubo de la corola, el labio superior y el inferior.

Esta especie encuentra distribuida en Colima, Ciudad de México, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Tamaulipas (Villaseñor, 2016), también se ha colectado en Guatemala (Ahlenlager, 1984). Crece desde los 200 hasta los 2100 msnm, en bosques de pino y mesófilo de montaña (Clebsch, 2008; López-Pérez *et al.*, 2011).

Salvia sessei fue colectada por primera vez por Don Martin de Sessé en 1777, en la Real Expedición Botánica del Rey Carlos III de España y fue descrita por George Bentham en *Labiatarum Genera et Species* 228, en el año de 1833 (Clebsch, 2008). En la actualidad, además del nombre de *Ocotillo*, en ciertas partes de Guerrero se le conoce como *Sangre de Toro* y en algunas localidades de Michoacán como *San Miguel* (Ahlenlager, 1984). A pesar de esto, sólo se encuentra reportado su uso como planta ornamental.



Figura 1. *Salvia sessei*. (Izquierda) parte de la planta y (derecha) ampliación de la flor (© Cornejo e Ibarra, 2011).

En cuanto al estudio fitoquímico de esta especie, se ha aislado la sesseina ($C_{22}H_{26}O_7$), un diterpeno de tipo abietano en forma de cristales amarillos, caracterizados por tener un

punto de fusión de 210°C y un peso molecular de 342 (Jiménez *et al.*, 1988). La molécula de sesseina (Figura 2) está conformada por tres anillos de carbono, donde el anillo A está sustituido por una lactona entre el carbono 4 y 10, el anillo B lo sustituye un grupo acetato en el carbono 7, mientras que el anillo C es una benzoquinona sustituida en el carbono 12 por un grupo hidroxilo y en el carbono 13 por un grupo isopropilo.

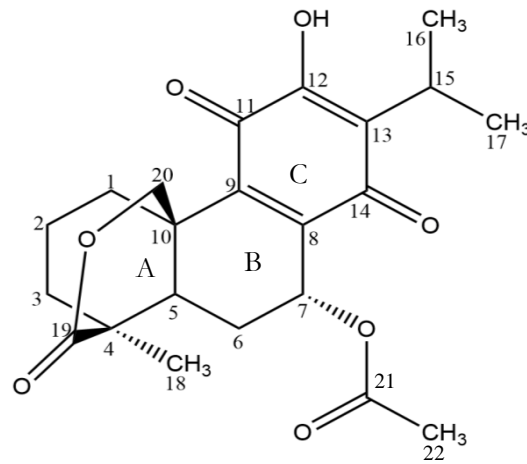


Figura 2. Estructura de la sesseina.

1.4. Hongos fitopatógenos

Los hongos son organismos eucariontes, unicelulares o multicelulares, poseen una pared celular que contiene quitina y glucanos, que está embebida en una matriz de polisacáridos y glicoproteínas; el cuerpo vegetativo es llamado micelio y por lo regular es filamentoso (Figura 3), cada rama de éste se denomina hifa (Campbell y Reece, 2008).

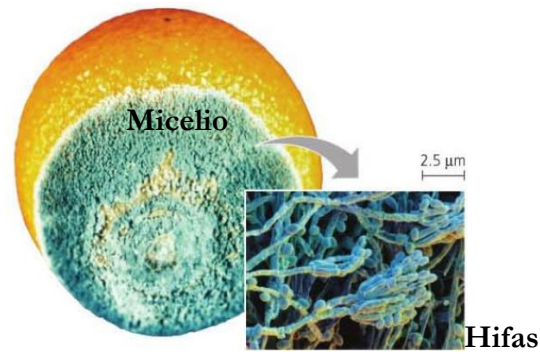


Figura 3. Naranja (*Citrus* sp.) con micelio de un hongo del género *Penicillium*; en la ampliación se aprecian las hifas (© 2008 Campbell, N. y Reece, J. en *Biology* 8th edition Pearson).

Su reproducción está a cargo de esporas, que consisten en una o algunas células, que pueden formarse asexualmente o ser producto de reproducción sexual. Las esporas son resistentes a un amplio rango de temperatura aunque necesitan de las condiciones adecuadas para germinar; algunas son llamadas zoosporas, ya que tienen un flagelo que les permite moverse en el agua (Agrios, 2005).

Los hongos fitopatógenos son los principales agentes infecciosos de las plantas, causando problemas durante distintas etapas de su desarrollo y, para el caso de los cultivos comestibles, sobre las cosechas (frutos y semillas). Además afectan el aspecto, las propiedades organolépticas y el contenido de nutrientes de los alimentos vegetales (Dellavalle *et al.*, 2011). Actualmente se conocen alrededor de 8 mil especies de hongos fitopatógenos (Ellis *et al.*, 2008), cada una de éstas puede infectar a más de una especie de planta y una especie de planta puede ser infectada por más de una especie de hongo (Rodríguez, 2001).

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan una parte de su vida en la planta y otra parte en el suelo. Pueden ser: a) biótrofos, los cuales pasan toda su vida en la planta y solo las

esporas se depositan en el suelo. B) saprófitos facultativos que viven en el hospedero o en sus restos, pero también pueden sobrevivir varios años en ausencia de éste y generalmente tienen un amplio rango de hospederos. C) parásitos facultativos, éstos sobreviven perfectamente en el suelo como saprófitos; sin embargo, cuando están en contacto con alguna planta y bajo las condiciones adecuadas tienen la capacidad para parasitar y causar enfermedades en las plantas (Agrios, 2005).

Estos hongos pueden causar una gran cantidad de enfermedades, como moho pulverulento (oídio), tizón, roya, antracnosis y septoriosis (Mdee *et al.*, 2009), en plantas de interés económico como chile, frijol, aguacate, mango, entre otras (Rodríguez, 2001), y también plantas silvestres y ornamentales, aunque los estudios sobre éstas son más escasos. Entre los síntomas más comunes que causan están las manchas en las hojas, picaduras, agallas, marchitez, podredumbre y necrosis (Leonberger *et al.*, 2016). En algunos casos, estos hongos también pueden ser los causantes de enfermedades en el humano y otros animales, como alergias o intoxicaciones, debido a las micotoxinas y alérgenos que producen, los cuales comúnmente se encuentran en productos contaminados (Dellavalle *et al.*, 2011) o presentes en el ambiente.

Existe una diversidad de tratamientos para el control de este tipo de hongos, como el uso de variedades de plantas resistentes a los organismos, el uso de semillas libres de patógenos, la destrucción de plantas o partes infectadas de ellas, la aplicación de fungicidas en la planta, la semillas o en el suelo, y el control de insectos que puedan ser vectores de infección (Agrios, 2005). A pesar de esto, la tasa de mutación de los hongos es muy rápida lo que requiere que se esté innovando en sus formas de control.

Correia *et al.* (2016) destacan a *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia* como los géneros más importantes, causantes de enfermedades en las plantas a, debido al impacto ecológico, económico y a la salud.

1.4.1. *Alternaria alternata*

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Loculoascomycetes
Orden: Pleosporales
Familia: Pleosporaceae
Género: *Alternaria*



Figura 4. *Alternaria alternata*. (Izquierda) Micelio e (derecha) infección en *Capsicum annuum* (pimiento) (©Gerard Holmes).

Las especies del género *Alternaria* son causantes muy comunes de enfermedades en varios tipos de plantas, afectando tallos, hojas, flores y frutos en plantas anuales y en algunos árboles como manzanos y cítricos (Agrios, 2005).

Alternaria alternata, es un fitopatógeno saprófito, de distribución cosmopolita, caracterizado por un micelio colorido que varía del gris al negro verdoso y tiene crecimiento rápido (Figura 4); conocido como el principal causante del tizón temprano de la papa (Medjahed *et al.*, 2016), también afecta a cultivos de olivo, tomate, zanahoria, espárragos, crisantemos, plantas maderables (Aristegui, 2002), por mencionar algunos. Su crecimiento

óptimo se da en un intervalo de 22 a 28°C, pero se ha visto su crecimiento a -3°C con concentraciones menores del 0.25% de oxígeno (Patriarca *et al.*, 2014).

Este hongo también está asociado con enfermedades respiratorias como asma, rinosinusitis alérgica y neumonitis hipersensitiva, además de oculomicosis, onicomycosis, infecciones de la piel (Gabriel *et al.*, 2016) e infecciones invasoras sistémicas en pacientes con SIDA (Aristegui, 2002) por su producción de alérgenos y micotoxinas. Sus micotoxinas han sido reportadas en muchos frutos como pimiento, melón, mango, frambuesas, peras, tomates, manzanas, aceitunas, semillas de girasol, trigo, sorgo, en jugos y néctares de ciruela, uva y arándano e incluso en vino tinto (Patriarca *et al.*, 2014).

1.4.2. *Fusarium oxysporum*

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Pyrenomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Nectriaceae
Género: *Fusarium*



Figura 5. *Fusarium oxysporum*. (Izquierda) micelio (©Teresa Cutuli) y (derecha) planta de *Solanum lycopersicum* (jitomate) infectada (©Florida Division of Plant Industry).

Fusarium es un género donde se reconocen 90 especies de parásitos y saprófitos, son patógenos de la mayoría de los cultivos agrícolas y plantas silvestres; entre los síntomas que presentan las plantas se encuentran marchitez y pudrición vascular y agallas (Rodríguez, 2001). En particular,

la especie *F. oxysporum* (Figura 5) ocasiona marchitez vascular donde el tejido se vuelve café, mientras que la planta se va volviendo amarilla, pasando por la pérdida de hojas y finalmente la muerte (Michielse y Rep, 2009; Lecomte *et al.*, 2016). Esta especie es caracterizada por tener un micelio que al principio es blanco y conforme crece puede adquirir una coloración que va desde rosa a morado oscuro, dependiendo de la cepa (Agrios, 2005); Además de ser cosmopolita, por su condición saprófita tiene la habilidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo sin ningún hospedero (Sharma *et al.*, 2017).

Fusarium oxysporum ocupa el quinto lugar de las 10 especies más importantes de fitopatógenos, basado en su importancia económica y científica (Medjahed *et al.*, 2016), afecta a más de 120 géneros de plantas como: crisantemo, gerbera, gladiola, clavel, tulipán, lirio, jitomate, melón, frijol, garbanzo, algodón, plátano, datilera, palma de aceite y *Arabidopsis thaliana* (Lecomte *et al.*, 2016; Michielse y Rep, 2009; Rodríguez, 2001), esta última de gran importancia, ya que es el modelo utilizado para diversos estudios, sobretodo en el ámbito molecular y de ingeniería genética.

Además de su importancia en el ámbito agrícola, este hongo ha sido registrado por Dananjaya *et al.* (2017) como un patógeno oportunista de varios animales como anfibios, reptiles, aves, peces y mamíferos, incluyendo al humano y al pez cebra, que es un modelo biológico ampliamente utilizado para la comprensión del desarrollo animal.

1.5. Oomicetos fitopatógenos

A menudo los oomicetos se agrupan con los hongos verdaderos, es decir miembros del reino Fungi. Sin embargo los oomicetos se encuentran dentro del reino Chromista (Stramenopila), el cuál comparten con las algas cafés, algas doradas, algas verde-amarillas y diatomeas. Los oomicetos se clasifican en este reino por su similitud genómica, a pesar de que los demás integrantes del reino son fotosintéticos y estos organismos son heterotróficos, lo cual sugiere que los oomicetos perdieron esta capacidad (Tyler, 2007).

Estos organismos también tienen células llamadas hifas que se organizan en un micelio, la principal diferencia con los hongos verdaderos es que su pared celular no contiene quitina, sino que está compuesta por glucanos y pequeñas cantidades de celulosa, y el micelio no tienen una separación entre hifas (Agrios, 2005), es decir, se ve como una célula muy larga multinucleada. El agua es esencial para su reproducción, infección y dispersión de sus esporas, porque éstas son motiles (zoosporas) y se desplazan por medio de sus dos flagelos. Las esporas también pueden enquistarse permaneciendo en un estado de dormancia en el agua y en el suelo por varios años (Leonberger *et al.*, 2016).

De acuerdo con Agrios (2005), las enfermedades causadas por los oomicetos pueden ser de dos tipos: las primeras afectan sólo a las partes de las plantas que están en contacto con el suelo,

como raíces, tubérculos, semillas y frutos que caen al suelo; este tipo de afecciones son causadas por organismos de los géneros *Aphanomyces* y *Pythium* y por algunas especies de *Phytophthora*. El segundo tipo afecta a las partes aéreas de la plantas, aunque la infección se dé desde el suelo; son causadas por algunas especies de *Phytophthora* y del género *Albugo*. Las enfermedades más comunes causadas por oomicetos son el moho y el tizón tardío, entre los síntomas que se pueden encontrar son manchas en las hojas, agallas, polvillo, pudrición de raíz y marchitez (Leonberger *et al.*, 2016). El control y tratamiento es muy difícil porque no son afectados por la mayoría de los fungicidas (Tyler, 2007) y por su modo de infección en algunos casos resulta muy complicada la detección de la enfermedad.

Autores como Agrios (2005), Correia *et al.* (2016) y Rodríguez (2001) resaltan a los géneros *Phytophthora* y *Pythium* por su importancia como fitopatógenos y sus implicaciones ecológicas y económicas.

1.5.1. *Phytophthora capsici*

Clasificación taxonómica

Reino: Chromista
Phylum: Oomycota
Clase: Oomycetes
Orden: Peronosporales
Familia: Pythiaceae
Género: *Phytophthora*



Figura 6. *Phytophthora capsici*. (Izquierda) micelio (©Mohammad Babadoost) y (derecha) fruto de *Citrullus lanatus* (sandía) infectado (©Jason Brock).

Este género fue nombrado en 1876 por Anton de Bary, siendo el significado de *Phytophthora* “el destructor de plantas” (Ellis *et al.*, 2008). Está representado por 40 especies, las cuales pueden atacar en conjunto a un solo hospedante, como en el caso del cacao o del manzano (Rodríguez, 2001) y de otras plantas anuales y perennes. Causan pudrición de raíces, frutos, tallos y agallas en plantas con crecimiento herbáceo y abóreo, donde se pueden encontrar a hortalizas, plantas ornamentales, gramíneas, árboles frutales y forestales. Por ejemplo *P. cinnamomi* está reportado como la principal causa de mortalidad de robles en Europa, Chile, Argentina, algunos estados de Estados Unidos y de tres especies nativas de Colima (Agrios, 2005; Rodríguez, 2001).

Phytophthora capsici (Figura 6) es caracterizado por un micelio color blanco esponjoso que crece en un rango de temperatura entre 10° a 35°C y ha sido reportado en algunas fuentes de riego. Las infecciones por *P. capsici* pueden ocurrir en áreas de siembra donde se acumula el agua, haciendo que la planta adquiera un color que va del café al negro conforme va marchitándose, cubriéndola de micelio en un lapso de dos a tres días (Hausbeck y Lamour, 2004). Tiene una distribución cosmopolita, en México se encuentra reportado en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Estado de México y Zacatecas (Castro-Rocha *et al.*, 2014). Este oomiceto afecta a más de 45 especies de plantas y semillas de importancia económica (Agrios, 2005), principalmente de la familias Cucurbitaceae, Solanaceae y Fabaceae. Es uno de los causantes del tizón tardío de la papa y entre los frutos afectados se encuentran melón, pepino, calabaza, calabacín, sandía, berenjena y frijol, además de sus principales hospederos que son el tomate y el chile (Hausbeck y Lamour, 2004).

English *et al.* (1999) reportaron que este fitopatógeno tiene la capacidad de formar híbridos dentro de un hospedero con especies de su género, concretamente con *P. infestans* y *P. nicotianae*, por medio de hibridación somática. Esto puede contribuir a la diversidad genética del género, la resistencia a fungicidas (Castro-Rocha *et al.*, 2014) y la variación en el grado de infección y en el tipo de tratamiento. Muy pocos fungicidas son eficaces contra este fitopatógeno, ya que es resistente al mefenozam, un compuesto activo utilizado en muchos fungicidas comerciales para tratamientos contra especies de este género (Hu *et al.*, 2008). Otros de los fungicidas utilizados contienen compuestos cancerígenos o, debido al intervalo de aplicación y a la germinación asincrónica de las esporas, pueden quedar trazas de compuestos tóxicos en los frutos (Hausbeck y Lamour, 2004), lo cual arriesga la calidad y sanidad de estos.

1.5.2. *Pythium aphanidermatum*

Clasificación taxonómica

Reino: Chromista
Phylum: Oomycota
Clase: Oomycetes
Orden: Peronosporales
Familia: Pythiaceae
Género: *Pythium*



Figura 7. *Pythium aphanidermatum*; (izquierda) micelio (©Samuel Glucksman) y (derecha) fruto de *Phaseolus* sp. (frijol) infectado (©Brian Olson).

El género *Pythium* cuenta con 80 especies, de las cuales algunas son saprofitas, que necesitan agua como vector de infección y pueden infectar a un amplio rango de plantas, sobretodo en el estadio de semilla y plántula, como hortalizas, frutales, gramíneas, ornamentales y forestales, causando marchitez y necrosis en raíces y ápices de raíces (Agrios, 2005; Rodríguez, 2001). Las lesiones ocasionadas por estos fitopatógenos también pueden ser un vector de entrada para otros microorganismos (Martín y Loper, 1999), acelerando la muerte de los hospederos.

Pythium aphanidermatum (Figura 7) es cosmopolita; sin embargo, se desarrolla mejor en regiones cálidas, causando un mayor daño a temperaturas superiores a 27° C; afecta a más de 60 especies (Martín y Loper, 1999; Rodríguez, 2001). Se caracteriza por tener un micelio que es color blanco y tienen un crecimiento rápido. La capacidad de resistencia y supervivencia es muy alta, se puede encontrar hasta cinco meses después en un suelo infectado y las oosporas pueden ser recuperadas en el suelo después de 11 meses sin tener hospedero (Martín y Loper, 1999). Entre las plantas que pueden ser infectadas se encuentran las pertenecientes a la familias Cucurbitaceae, Brassicaceae y Fabaceae, como pepino, melón, papaya, tabaco, tomate, chile, lechuga, caña de azúcar, maíz, cítricos, algodón, crisantemo, vinca, por mencionar algunos (Al-Sheikh, 2010). Del Castillo y Swett (2017) también han reportado la infección en flor de nochebuena.

Aunque *P. aphanidermatum* sólo había sido reportado como fitopatógeno, Calvano *et al.* (2011) publicaron el primer reporte de esta especie como un patógeno humano, siendo aislado en una herida de un soldado. Este patógeno, al no poseer una membrana con ergosterol no puede ser atacado con los tratamientos comunes, ya que estos actúan sobre este compuesto y por lo tanto el

único tratamiento fue la remoción de los tejidos infectados. Además *P. aphanidermatum* no ha sido encontrado como contaminante en laboratorios clínicos, con lo cual queda descartado que las muestras en donde se encontró pudieran haber estado comprometidas.

1.6. Productos naturales: Terpenos

Los productos naturales son cualquier sustancia generada por un ser vivo, dentro de estos se encuentran a los metabolitos secundarios, que según Croteau *et al.* (2000), son las sustancias producidas por las plantas que, generalmente, no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta. Los metabolitos secundarios ayudan a la planta a establecer ciertas relaciones ecológicas en su ambiente (Bernards, 2010), entre éstas se encuentran su capacidad atrayente, antibiótica, insecticida, herbicida, neurotóxica, alucinógena y protección contra rayos UV (Bernards, 2010; Croteau *et al.*, 2010); cumpliendo las funciones de defensa contra patógenos, atrayente de polinizadores y establecimiento de simbiosis con otros organismos (Taiz *et al.*, 2015). Además en la industria son importantes porque son la base para la creación de polímeros, fibras, pegamentos, aceites, medicinas, saborizantes, esencias y colorantes (Croteau *et al.*, 2010).

Estas sustancias se clasifican de acuerdo a su biosíntesis en tres grupos: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos; Springob y Kutchan (2009) mencionan un cuarto grupo que son los policétidos, los cuales separan del último grupo. Los terpenos (también denominados

isoprenoides) son el grupo más grande de metabolitos secundarios, comprendiendo más de 40 mil estructuras (Springob y Kutchan, 2009) con diferentes funciones. En general son insolubles en agua y se forman por una unidad básica de 5 carbonos llamada pirofosfato de isopentilo (IPP) (Taiz *et al.*, 2015) referida como unidad C₅. El número de unidades que tienen éstos se utiliza para clasificarlos en: hemiterpenos (una unidad C₅), monoterpenos (dos unidades C₅), sesquiterpenos (tres unidades C₅), diterpenos (cuatro unidades C₅), triterpenos (seis unidades C₅), tetraterpenos (ocho unidades) y politerpenoides (más de 8 unidades C₅).

La síntesis de los terpenos se da por dos vías, la primera es denominada vía del ácido mevalónico (MVA), que se da en el citosol y da origen a los sesquiterpenos y a los triterpenos. La otra ruta es llamada metileritrol fosfato (MEP), que se desarrolla en los cloroplastos y plastidios (Taiz *et al.*, 2015) y da origen a monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Bernards, 2010).

1.7. Diterpenos

Los diterpenos son compuestos de 20 carbonos, cuya estructura básica es el difosfato de geranylgeranilo (GGPP), su forma de anillación y transposición pueden dar origen a diferentes estructuras (Springob y Kutchan, 2009), son muy diversos en las plantas y también pueden ser encontrados en algunos animales (Wu *et al.*, 2012). En este grupo están las resinas de las coníferas y las giberelinas que son las reguladoras del crecimiento, así

como compuestos con actividad de defensa y de importancia farmacológica, por su actividad anticancerígena y anticancerosa (Croteau *et al.*, 2010; Springob y Kutchan, 2009).

Entre los diterpenos más conocidos se encuentran el *fitol* que da lugar a la parte lipofílica de la clorofila; el *taxol* obtenido de *Taxus brevifolia*, que es un importante agente anticancerígeno que tiene un amplio espectro de actividad incluso en ciertos tipos de cáncer donde otros agentes no tienen respuesta, además es un compuesto que se sigue obteniendo a partir de las plantas, ya que no ha podido ser sintetizado; el *casbeno* que fue aislado en *Ricinus communis* y es un agente antifúngico; el *esteviósido* conocido por su utilización como endulzante y obtenido de *Stevia rebaudiana* y la *salvinorina*, un alucinógeno aislado de *Salvia divinorum* (Dewick, 2009).

1.8. Mecanismo de acción de los extractos vegetales con actividad antifúngica

Los mecanismos con los cuales los extractos y sus componentes actúan contra los microorganismos patógenos todavía no son claramente conocidos (Lecomte *et al.*, 2016), de manera general se deben a varias respuestas ocasionadas en el organismo blanco o en la planta.

La actividad antifúngica de los extractos no se basa en un solo mecanismo, sino que se han reportado como los principales la inhibición de la formación de la pared celular, la ruptura

de la pared y membrana celular, quelación por metales, inhibición de la división celular por polimerización de microtúbulos o impidiendo la formación del huso mitótico, interacción con el DNA y la inducción de respuestas de defensa en las plantas (Lagrouh *et al.*, 2017; Lecomte *et al.*, 2016), este último sólo es posible visualizarlo cuando se hace un estudio *in vivo*.

La inducción de respuestas de defensa ha sido recientemente investigada, donde un estudio hecho por Ben-Jabeur *et al.* (2015) se observa que después de agregar aceite de tomillo en las raíces de tomate, hay una acumulación de peroxidasa, la cual es conocida por ser parte de los mecanismos de defensa en las plantas. Motjaba *et al.* (2011), concluyen en su estudio sobre la actividad antifúngica y antibacterial de *Salvia. multicaulis*, que el mecanismo de acción de los terpenos todavía no está bien detallado, pero que estos pueden causar este efecto por la ruptura de la membrana mediante reacciones lipofílicas.

Los daños a la pared y a la membrana celular inducen cambios en la cadena de transporte de electrones, lo que a su vez conlleva a la formación de radicales libres que oxidan y dañan los lípidos, proteínas y el DNA del patógeno. También pueden afectar los canales iónicos, como el de Ca^{2+} , afectando el pH intracelular y comprometiendo la reserva de ATP; pueden ocasionar la salida de los componentes del citoplasma, afectar la rigidez y estructura de la pared celular, ocasionando así el colapso del micelio y la muerte celular por apoptosis y necrosis (Lecomte *et al.*, 2016).

Capítulo 2. Antecedentes

Después de la caracterización de la sesseína no se realizaron trabajos acerca de *Salvia sessei*, ni de la actividad biológica del compuesto, exceptuando los listados florísticos. En cuanto al género *Salvia*, hay más publicaciones donde evalúan diferentes aplicaciones de los aceites esenciales y los extractos; sin embargo, existen pocos estudios que evalúen la actividad antifúngica de las especies. A continuación se presentan algunos de los trabajos publicados donde se describen las actividades de varias especies del género siendo la mayoría de los metabolitos a los que se les atribuye la actividad terpenos.

En una revisión de las plantas utilizadas en Uruguay, se menciona que las semillas de *Salvia sclarea* son utilizadas como tratamiento antiséptico, sedativo, antidepresivo e hipotensivo. Por su parte las hojas de *Salvia officinalis* tienen propiedades antisépticas, antiinflamatorias y facilitan la digestión (Dellavalle *et al.*, 2011). *Salvia mexicana* es otra planta con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Topçu, 2006). De estas especies no se mencionan los componentes activos, aunque en el último estudio se hace referencia a que los responsables de la actividad son triterpenos y diterpenos.

Bisio *et al.* (2015), evaluaron el efecto del extracto de *Salvia adenophora* contra bacterias de importancia clínica del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, de donde aislaron cinco

diterpenos de tipo clerodano, además mencionan la capacidad antibacteriana y *anti-biofilm* de las artes aéreas frescas de *Salvia corrugata*. Córdoba *et al.* (2016) probaron el efecto inhibitorio del extracto hexánico de *Salvia apiana* sobre *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, pero no determinaron algún compuesto responsable de esta actividad.

Salvia texana es una de las plantas utilizadas en el norte de México para el tratamiento de micosis pulmonarias por lo cual Alanís *et al.* (2007) usaron extractos de las partes aéreas obtenidos con diferentes disolventes, demostrando su capacidad antifúngica sobre *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *C. albicans*. Waller *et al.* (2017) informan sobre la capacidad antifúngica del extracto de metanol y del extracto de agua de las hojas de *Salvia plebeia* contra *C. albicans*, y del aceite esencial de las partes aéreas de *Salvia ringens* contra especies de los géneros *Aspergillus*, *Candida* y *Trichophyton*, todos ellos de importancia médica.

Respecto a la inhibición de fitopatógenos, Pansera *et al.* (2013) reportan la actividad del aceite esencial y de los extractos de *Salvia officinalis* contra el fitopatógeno de la lechuga *Sclerotinia sclerotiorum* y hace mención de otro estudio donde se reporta la inhibición del hongo *Colletotrichum gloesporioides*. *Salvia officinalis* también es utilizada eficazmente por Medjahed *et al.* (2016) sobre los hongos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, mientras que en su estudio el aceite esencial de *Salvia algeriensis* mostró actividad contra los dos primeros fitopatógenos y en su composición se encontraban monoterpenos y sesquiterpenos, entre otros metabolitos.

Capítulo 3. Justificación

Se estima que a escala mundial un 50% de las cosechas se pierden a causa de infecciones fúngicas y bacterianas (Leadbeater, 2014), por ello los fungicidas son ampliamente utilizados para maximizar la producción de los cultivos al protegerlos de infecciones, siendo utilizados por más de 200 años y actualmente los componentes más recurrentes son el cobre y el azufre, generalmente considerados de bajo riesgo para el ambiente. Sin embargo, los fungicidas convencionales tienen un potencial perjudicial para organismos que no son su objetivo y debido a las prácticas agrícolas se pueden encontrar trazas de éstos en el suelo o en los alimentos, incluso después de ser procesados (Regueiro *et al.*, 2015).

Los residuos de fungicidas en el suelo pueden ocasionar un desequilibrio en las comunidades y la estructura de la microbiota y macrobiota, por ejemplo, Al-Assiuty *et al.* (2014) trabajaron con oribátidos, un grupo de artrópodos del suelo que se encargan de la descomposición de materia y que son seriamente afectados por los fungicidas, demostrando que los biofungicidas tienen un menor efecto sobre estos animales. Además los principios activos de los fungicidas comunes pueden ser los detonantes de diversos padecimientos, por exposición prolongada o consumo interfieren en procesos de metabolismo, causan daño hepático, tienen potencial tóxico y venenoso, son responsables de trastornos

reproductivos, endocrinos y en el desarrollo neuronal y tienen gran potencial carcinógeno (Correia *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de sustancias de origen vegetal que posean actividad antifúngica en estudios *in vitro* e *in vivo*, para su uso como biofungicidas, porque éstas proveen una solución contra las plagas, tienen un menor impacto en el ambiente y al ser biodegradables, su degradación es más rápida, por lo cual no dejan residuos en la comida (Leadbeater, 2014; Sharma *et al.*, 2017).

Con las desventajas y riesgos que presentan los fungicidas sintéticos, aunado con la rápida degeneración de los ecosistemas, se necesita encontrar alternativas que tengan un menor impacto en el medio ambiente y representen una solución para un problema común en la agricultura. Como resultado, existe un auge en el estudio de plantas por su potencial antifúngico, por ser una buena fuente de recursos y tener una mejor relación costo-beneficio. Por lo cual, el uso de extractos y aceites esenciales de plantas mexicanas, para encontrar compuestos previamente elucidados o nuevos, que posean esta actividad representa una nueva línea de conocimiento e investigación, con un importante potencial de desarrollo y crecimiento, sobre la utilización de los metabolitos secundarios. También con este tipo de investigaciones se contribuye el conocimiento general sobre la flora nativa de México.

Por la gran diversidad de la familia Lamiaceae y del género *Salvia* en el país, estas plantas pueden ser utilizadas como modelos en una gran variedad de estudios (Martínez *et al.*, 2017); además el tipo y la velocidad de crecimiento, así como los metabolitos secundarios

que pueden ser encontrados, hacen que las especies de este género, o de esta familia, puedan ser utilizados en la investigación de productos antifúngicos.

Por su parte, en su área de distribución, se puede observar que *Salvia sessei* crece de gran tamaño; además, en la población no se ven marcas de mordeduras de insectos, ni algún síntoma de infección bacteriana o fúngica, por lo cual esta especie se convirtió en una opción viable y prometedora para la realización de este estudio.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Salvia sessei* sobre cuatro fitopatógenos, identificando el o los metabolitos secundarios responsables del efecto.

4.2. Objetivos particulares

- Seleccionar el extracto más efectivo con respecto al porcentaje de inhibición fúngica y a la cantidad de extracto obtenido.
- Determinar la principal sustancia activa del extracto más eficaz.
- Determinar sobre cual grupo de fitopatógenos es más eficiente el extracto seleccionado.
- Sugerir con base en la literatura publicada un posible mecanismo de acción del extracto sobre los fitopatógenos.

Capítulo 5. Método

5.1. Colecta

La colecta de las partes aéreas de *S. sessei* se realizó el día 23 de Septiembre del 2013, en las coordenadas 19° 12' 22.0" N; 100° 6' 37.6" O localizadas entre Valle de Bravo y Amanalco (Figura 8). La especie se localizaba en una barranca, dentro de una gran población; el material colectado se tomó de un arbusto de una altura de 5 metros aproximadamente. Este material se separó en tallos, hojas y flores, se puso a secar y se almacenó.



Figura 8. Sitio de colecta de *S. sessei* (© Google Earth).

El ejemplar fue depositado en el herbario FCME de la Facultad de Ciencias de la UNAM con un número de registro 161422 (Figura 9) y fue determinado por la Dra. Martha Martínez Gordillo.



Figura 9. Herborizado depositado en el herbario FCME.

5.2. Obtención de los extractos

El material seco se pesó, separándolo en hojas, tallos y flores en matraces Erlenmeyer de 4L y se llenaron con acetona destilada. Se dejaron reposar cinco días y se procedió a la concentración del extracto por medio de destilación a presión reducida, a 45 °C.

El extracto resultante fue almacenado en un matraz bola, mientras que la acetona recuperada fue vertida nuevamente en los matraces para repetir el procedimiento anterior. Este procedimiento se repitió tres veces, con un intervalo de cuatro días de reposo. Los extractos obtenidos después de la tercera destilación, se pusieron a secar en una bomba de vacío con una presión de 1.4 mm Hg para quitar las trazas de disolvente; luego se pesaron para obtener la cantidad final de extracto de cada una de las partes aéreas.

Posteriormente, se tomó una pequeña fracción de los extractos (aproximadamente 2 mg), que se diluyó con unas gotas de acetona, con lo cual se realizó una cromatografía en capa delgada utilizando cromatofolios de sílice, soportados en alúmina, con una altura de 5 cm. La placa cromatográfica se eluyó en una disolución de hexano/acetato de etilo 2:1, revelada con luz UV (longitud de onda 254-365 nm) y con sulfato cérico amoniacal. Además se tomaron 3 mg de extracto, que se mandaron a analizar por la técnica de IR. Esto se hizo para determinar el tipo de compuestos que conformaban el extracto.

5.3. Bioensayo uno. Utilización de los extractos

Para este bioensayo se empleó medio PDA con agua en una disolución 1:1 para un total de 80 mL, con el cual se llenaron 16 cajas de Petri (60x15 mm), correspondientes a uno de los controles y tratamientos, los cuales eran:

- Control negativo: PDA.
- Control positivo: PDA+20 mg de Captan 50.
- Control negativo de disolvente: PDA+DMSO.

-
- Tratamiento 1. Extracto de Tallos: PDA+ 20 mg de extracto.
 - Tratamiento 2. Extracto de Hojas: PDA+ 20 mg de extracto.
 - Tratamiento 3. Extracto de Flores: PDA+ 20 mg de extracto.

Se midió el volumen mínimo de DMSO necesario para disolver 20 mg de cada extracto, con la finalidad de tomar ese volumen como concentración para el control de disolvente. Los 20 mg utilizados en el control positivo y en los tratamientos son la cantidad necesaria para que hubiera una concentración de 250 ppm.

Para cada fitopatógeno (*A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*) se sembraron 4 cajas de cada uno de los controles y tratamientos, utilizando un inóculo circular obtenido con un sacabocado (diámetro 5 mm) proveniente de un cultivo del organismo que crecía en medio PDA. Este inóculo se colocó en el centro de cada caja de Petri.

Las cajas sembradas, se sellaron con plástico adherente y se colocaron en una incubadora con un fotoperiodo de fluorescencia/oscuridad 12h/12h a una temperatura de 28°C. Se realizó la medición de 2 diámetros de crecimiento de las cepas, cuyo crecimiento era circular, en cada caja a las 48 horas y 72 horas después de que éstas fueron sembradas.

Se hizo un promedio de los diámetros medidos de cada tratamiento y cada control para cada fitopatógeno, al haber 4 repeticiones fueron 8 diámetros en total; con este promedio se determinó el porcentaje de crecimiento para cada caso, el porcentaje de inhibición calculado a partir del crecimiento de los controles negativos, que fueron tomados como el 100%. También se analizaron las diferencias significativas en el crecimiento entre los

controles y los tratamientos mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y con prueba de contrastes de Tukey y un intervalo de confianza del 95% ($P \leq 0.05$), realizado en el programa GraphPad Prism 6.01.

5.4. Obtención de IC50 de los extractos

De acuerdo con los resultados obtenidos en el primer bioensayo, se diseñó una curva de crecimiento para determinar la IC50 de cada uno de los extractos utilizando las siguientes concentraciones disueltas en 20 mL, para cada uno de los fitopatógenos:

- *A. alternata*
 - Tallos, hojas y flores: 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm y 1000 ppm.
- *F. oxysporum*
 - Tallos y hojas: 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm y 1000 ppm.
 - Flores: 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm y 750 ppm.
- *P. capsici*
 - Tallos: 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm y 1000 ppm.
 - Hojas: 50 ppm, 75 ppm, 125 ppm y 250 ppm.
 - Flores: 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm y 750 ppm.
- *P. aphanidermatum*
 - Tallos: 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm y 1000 ppm.
 - Hojas y flores: 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm y 750 ppm.

Los bioensayos se realizaron conforme al procedimiento del bioensayo 1 (sección 5.3), pero los diámetros se midieron sólo una vez a las 48 horas después de la siembra, con excepción de *P. aphanidermatum*, cuya medición se realizó a las 24 horas por la velocidad de crecimiento del oomiceto.

5.5. Cromatografía en columna del extracto de hojas

Con base en los resultados de los bioensayos anteriores, se hizo una CC de 53 cm de altura por 4 cm de ancho, utilizando como fase estacionaria Sephadex, en la cual se colocaron 10 g del extracto de hojas. Se utilizó como disolvente en la fase móvil acetato de etilo. Las fracciones fueron colectadas conforme al color y con un volumen de 250 mL a 300 mL. Éstas se concentraron en un rotavapor a una temperatura de 60 °C y se les realizó una CCD para juntar las fracciones similares. Las fracciones resultantes se secaron en bomba de vacío (Presión 1.4 mm Hg) y se pesaron.

5.6. Bioensayo dos. Utilización de las fracciones de la cromatografía en columna.

Se seleccionaron las fracciones de la CC que iban a ser utilizadas para el bioensayo de acuerdo a la cantidad de muestra que se tenía. Las fracciones se probaron conforme a la IC50 obtenida para cada fitopatógeno y se utilizaron 20 mL de medio de cultivo por cada prueba. El bioensayo se realizó conforme al procedimiento de la sección 5.3, con una

medición a las 48 y 72 horas después de sembrados, excepto en *P. aphanidermatum* que sólo se midió a las 24 horas.

5.7. Cromatografía en columna flash de la fracción 1 del extracto de hojas

Se tomó 1 g de la primera fracción de la CC del extracto de hojas con el cual se realizó una CCF de 35 cm de altura por 4 cm de ancho, con una fase estacionaria de silica gel 230-400; La fase móvil estuvo compuesta por una disolución de hexano/acetona 9:1 más 10 mL de tolueno, y conforme se avanzó en la obtención de fracciones se aumentó la polaridad a acetona/hexano 2:1, acetona/hexano 10%, acetona /metanol 20%, acetona/metanol 2:1 y acetona/metanol 1:1. Se tomaron fracciones de 50 mL y 125 mL. Se concentraron y se juntaron las similares con base en la realización de una CCD de cada una y posteriormente se secaron en una bomba de vacío (presión de 1.4 mmHg).

5.8. Obtención y elucidación de sesseina

Se comparó una muestra de sesseina con algunas de las fracciones obtenidas en la CCF por medio de CCD; éstas se eligieron por sus características físicas: color y textura. Las fracciones similares se mandaron a analizar mediante IR (técnica ATR) y RMN. Se utilizó cloroformo deuterado con el que se disolvió la muestra y se realizaron los experimentos de RMN-¹H, RMN-¹³C y HSQC a una frecuencia de 500 MHz; los espectros resultantes de la RMN se analizaron con el programa MestReNova versión 8.1. Para la determinación del

peso molecular se hizo un análisis de masas utilizando la técnica FAB⁺, cuyo resultado se expresa en unidades de relación masa/carga (m/z).

5.9. Bioensayo tres. Utilización de sesseina

Se realizó conforme al protocolo de la sección 5.3, para probar la actividad del compuesto aislado en la sección 5.8, en el cual se utilizaron las concentraciones de la IC₅₀ de cada fitopatógeno para 20 mL de medio de cultivo. La medición de los diámetros de crecimiento, se realizó a las 48 horas, excepto para *P. aphanidermatum* cuya medición se hizo en las 24 horas; la segunda medición se realizó una vez que las cajas de los controles negativos estuvieron llenas.

Capítulo 6. Análisis de resultados

6.1. Obtención y cromatografía en capa delgada de los extractos

La cantidad de extracto obtenida de cada parte aérea varió conforme a la cantidad de material vegetal seco inicial (Tabla 1); excepto en el caso del extracto de tallos, el cual se obtuvo una cantidad proporcionalmente pequeña comparada con la cantidad de material que se utilizó en la extracción. Los extractos fueron sólidos, polvosos, de color verde para el caso de las hojas, café el de tallos y un polvo más fino color naranja en el caso de las flores (Figura 10).

Tabla 1. Cantidad de extracto obtenida por peso inicial de la planta.

Parte aérea	Peso inicial (g)	Peso del extracto (g)
Tallos	635	18.3
Hojas	535	37.9
Flores	65	9.1



Figura 10. Extractos de *S. sessel*; a) tallos, b) hojas y c) flores.

Se escogió acetona como disolvente para la extracción, debido a que es volátil y miscible con otros disolventes, no provoca cambios a los compuestos de los extractos y se puede obtener una gran cantidad de extracto (Mahlo *et al.*, 2010; Mdee *et al.*, 2009).

La CCD de los extractos mostró seis bandas en el extracto de tallos, para el extracto de hojas se visualizaron cinco bandas y para el extracto de flores se observaron cinco; cada una de estas bandas se correlaciona con alguno de los componentes que tiene el extracto.

Para el análisis de los espectros de IR, se utilizaron las tablas de Prestch *et al.* (2009) donde se buscó la relación de la bandas con los grupos funcionales. En el espectro del extracto de tallos (Anexo A. 1) se observa una banda en 3356.13 cm^{-1} , que pertenece a un grupo hidroxilo y dos bandas en 2919.27 cm^{-1} y 2851.07 cm^{-1} que indican la presencia carbonos saturados; la banda en 1690.38 cm^{-1} de un grupo carbonilo, además las bandas en 1456.93 cm^{-1} y 1370.73 cm^{-1} corresponden a grupos metilenos y metilos.

De igual manera, en el espectro de IR del extracto de hojas (Anexo A.2) se puede observar una banda en 3363.64 cm^{-1} y dos en 2921.57 cm^{-1} y 2852.76 cm^{-1} , que confirman la presencia de un grupo hidroxilo y carbonos saturados, respectivamente. En 1729.89 cm^{-1} , 1689.15 cm^{-1} y 1642.01 cm^{-1} se ven bandas de grupos carbonilos. Las bandas en 1454.82 cm^{-1} y 1369.31 cm^{-1} representan a los grupos metilenos y metilos.

El espectro de IR del extracto de flores (Anexo A.3) muestra bandas similares a los dos espectros anteriores, en 3350.47 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo, 2920.63 cm^{-1} y 2852.33 cm^{-1} de los carbonos saturados, 1712.83 cm^{-1} de ácido carboxílico, 1639.17 cm^{-1} y 1610.46 cm^{-1} de carbonilos y en 1449.15 cm^{-1} y 1369.68 cm^{-1} los grupos metilenos y metilos.

La CCD y el IR permiten dar una noción del tipo de compuestos y de la complejidad de la composición de cada extracto. Los extractos están conformados por una mezcla de triterpenos, diterpenos y flavonas, aunque con los resultados anteriores no se pueden asegurar los compuestos exactos, ni la abundancia en la que se encuentran. También, se observa que la composición de los extractos de hojas y de flores es más parecida y posee una menor cantidad de compuestos.

Wu *et al.* (2012), mencionan que dentro los metabolitos secundarios más comunes hallados en el género *Salvia* se encuentran los terpenos (sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos), compuestos esteroideos y polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos), concordando con el tipo de compuestos que se considera que los extractos tienen.

6.2. Bioensayo uno. Utilización de los extractos

Los extractos, al no ser solubles en agua, se disolvieron en 60 μL de DMSO, que fue el mismo volumen que se utilizó en el control de disolvente. Rekha *et al.* (2006), reportaron el DMSO como el disolvente orgánico más adecuado para la realización de bioensayos, utilizando organismos fúngicos, debido a que presenta una toxicidad menor en comparación con otros. De cualquier manera, se analizó el crecimiento en los controles y se determinó que no había diferencia significativa entre ambos, por lo cual se demostró que este disolvente no interfiere con el crecimiento.

El porcentaje de crecimiento y de inhibición para cada fitopatógeno y por cada extracto se muestra en la Tabla 2. Como se puede apreciar en una concentración de 250 ppm, el extracto de hojas y el extracto de flores resulta ser más efectivo en la inhibición de los cuatro fitopatógenos.

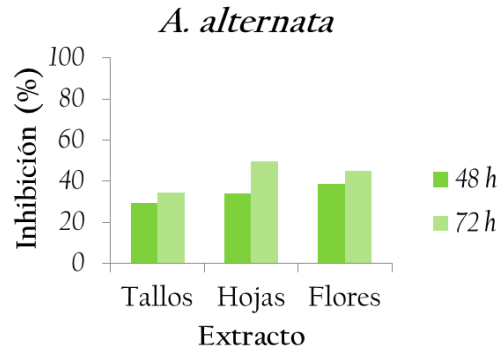
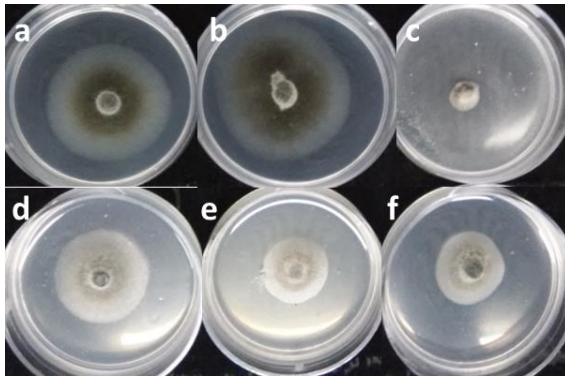
Para *A. alternata*, a las 48 horas, se presentó una inhibición por debajo del 50%, que se mantuvo e incluso se incrementó a las 72 horas (Gráfica 1), excepto en el control positivo realizado con Captan 50, donde el fitopatógeno creció un 31.37%. En los controles negativos se puede apreciar que el micelio del centro crece en un tono verdoso, mientras que morfológicamente el micelio en los tres tratamientos y el control positivo tienen una coloración blanca (Figura 11).

Los resultados obtenidos para *F. oxysporum* mostraron que es el hongo donde se presenta una mayor inhibición. A las 48 horas el extracto de flor casi alcanza el 50% de inhibición; sin embargo, este baja hasta el 33.53% a las 72 horas. El extracto de hojas aumenta su nivel de inhibición a las 72 horas, estando cerca del 50% (Gráfica 2).

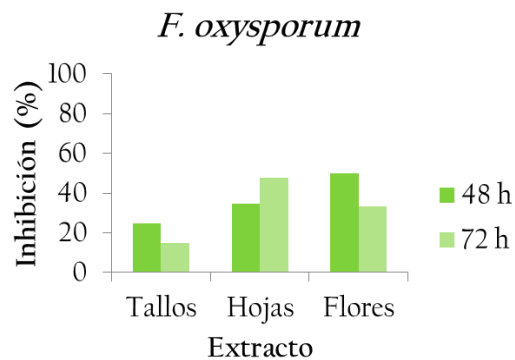
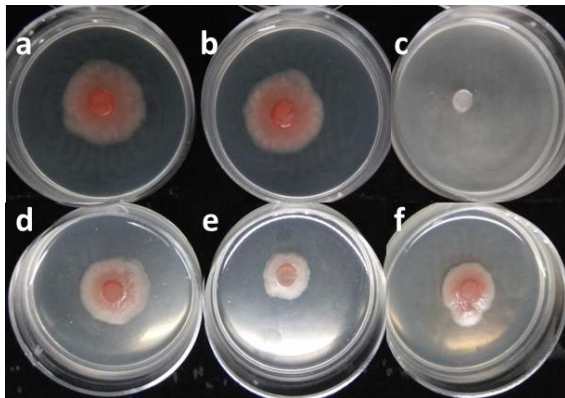
El extracto de tallos no presenta una gran actividad, aunque el crecimiento en este tratamiento es significativamente diferente al de los controles. En cuanto a las características morfológicas de los hongos anteriores, no existieron diferencias morfológicas del micelio en los controles y en los tratamientos (Figura 12).

Tabla 2. Resultado del bioensayo uno. Porcentajes de crecimiento e inhibición de cada fitopatógeno en cada tratamiento. El diámetro promedio del control negativo de disolvente fue tomado como el 100% de crecimiento y con base en ese dato se obtuvieron los porcentajes de los tratamientos.

Tratamiento	Crecimiento (%) 48h	Inhibición (%) 48h	Crecimiento (%) 72h	Inhibición (%) 72h
<i>Alternaria alternata</i>				
Captan	0	100	31.37	68.63
Tallos	70.66	29.34	65.31	34.60
Hojas	66.10	33.90	59.41	40.59
Flores	61.54	38.46	54.98	45.02
<i>Fusarium oxysporum</i>				
Captan	0	100	0	100
Tallos	75.27	24.73	85.13	14.87
Hojas	65.23	34.77	66.47	33.53
Flores	50.18	49.82	52.48	47.52
<i>Phytophthora capsici</i>				
Captan	0	100	0	100
Tallos	89.23	10.77	118.05	/
Hojas	0	100	69.17	30.83
Flores	56.41	43.59	55.64	44.36
<i>Pythium aphanidermatum</i>				
Captan	0	100	0	100
Tallos	82.46	17.54	87.76	12.24
Hojas	46.64	53.36	40.05	59.95
Flores	36.06	63.94	45.92	54.08



(Izquierda) Figura 11. Crecimiento de *A. alternata* a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor. (Derecha) Gráfica 1. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para *A. alternata*.

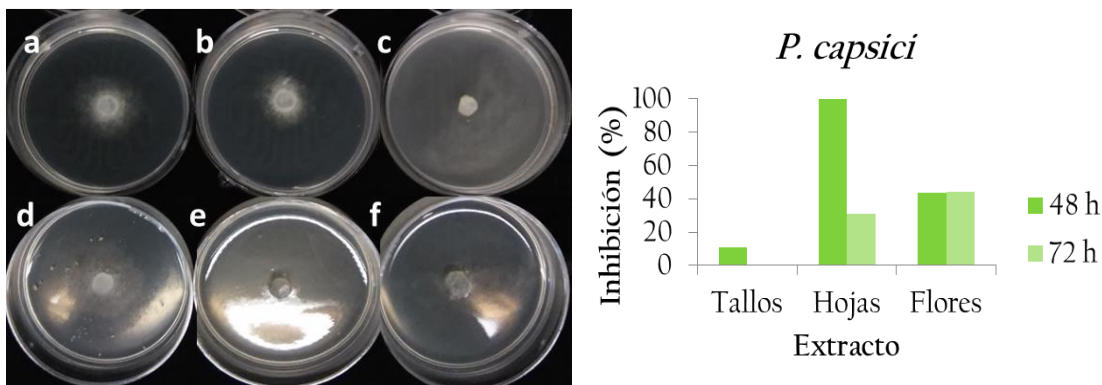


(Izquierda) Figura 12. Crecimiento de *F. oxysporum* a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor. (Derecha) Gráfica 2. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para *F. oxysporum*.

La inhibición de los oomicetos fue más efectiva con los extractos de hoja y flor, obteniendo valores más altos en comparación con los ascomicetos. Solamente el extracto de tallo mostró valores muy bajos a las 48 horas, que disminuyeron a las 72 horas y para el caso de *P. capsici*, en la segunda medición, registró un crecimiento más alto que en los controles negativos (Tabla 2).

La acción del extracto de hojas sobre *P. capsici*, a las 48 horas fue muy eficaz, ya que no permitió el crecimiento del micelio; a las 72 horas el efecto disminuyó y hubo una inhibición menor al 50%. El extracto de flores mantuvo un porcentaje de inhibición similar a las 48 y 72 horas. En la Gráfica 3, se puede observar la comparación el porcentaje de inhibición de cada extracto.

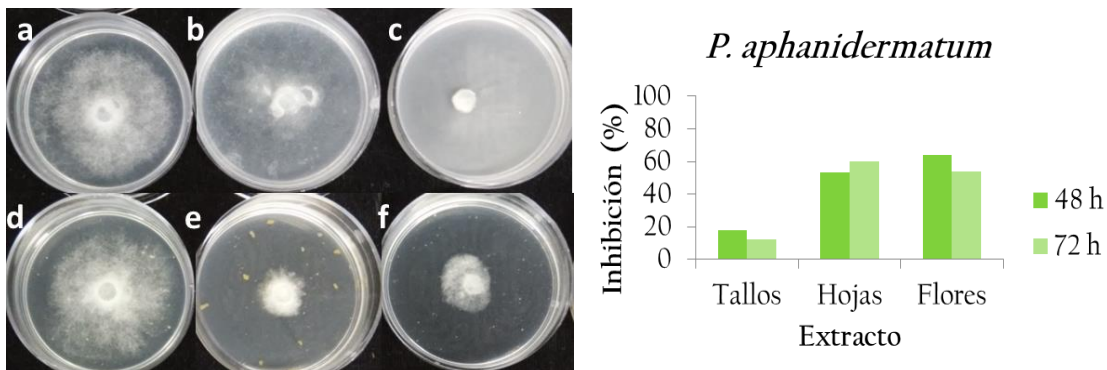
En los controles y tratamientos de *P. capsici* no hubo diferencias en las características del micelio (Figura 13); comparando con la descripción de este fitopatógeno hecha por Babadoost (2005), se vio que el micelio no tenía una apariencia esponjosa, con lo cual se puede inferir que la cepa utilizada podría ser más sensible y no desarrollarse correctamente en el medio.



(Izquierda) Figura 13. Crecimiento de *P. capsici* a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor. (Derecha) Gráfica 3. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para *P. capsici*; para el caso del extracto de tallos a las 72 horas hubo un crecimiento mayor al 100% por lo cual el la gráfica no se reporta.

Para *P. aphanidermatum*, los extractos de hojas y flores tuvieron un porcentaje de inhibición superior al 50% en ambas mediciones (Gráfica 4). En este caso, tampoco

hubo diferencia en la apariencia del micelio entre tratamientos y controles negativos (Figura 14).



(Izquierda) Figura 14. Crecimiento de *P. aphanidermatum* a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, c) control positivo, d) extracto de tallo, e) extracto de hoja y f) extracto de flor. (Derecha) Gráfica 4. Comparación del porcentaje de inhibición de cada extracto a las 48 y 72 horas para *P. aphanidermatum*.

6.3. Obtención de IC50 de los extractos

Los resultados de la curva diseñada para obtener la IC50 se presentan por fitopatógeno para poder comparar las concentraciones utilizadas de los extractos (sección 5.4) y su porcentaje de inhibición. Se analizó si había diferencia significativa en el crecimiento de los controles negativos y al no encontrarla, se utilizó el crecimiento del control negativo de disolvente como el 100% de crecimiento del bioensayo (Figura 15).

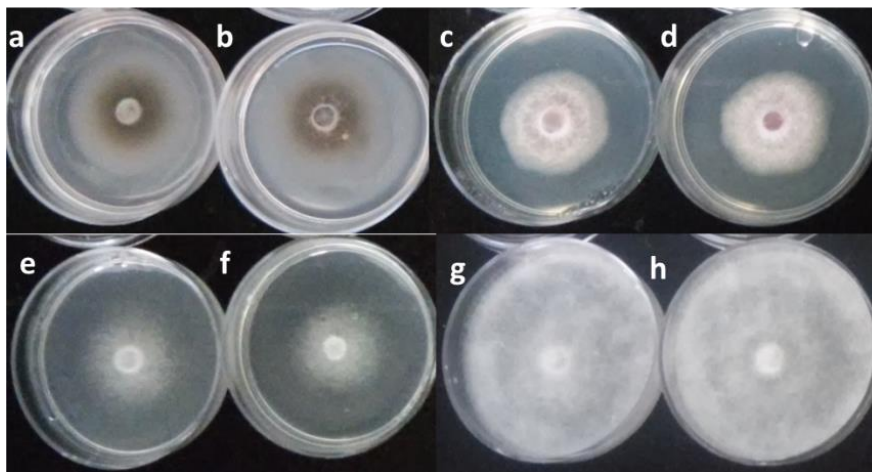
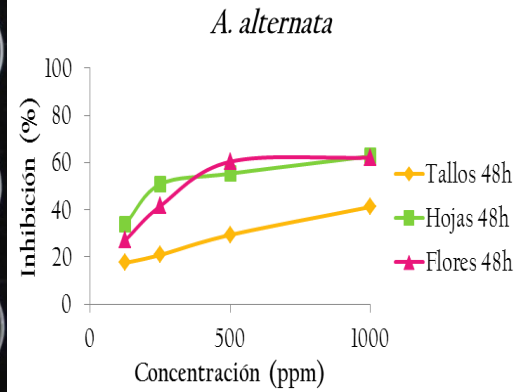
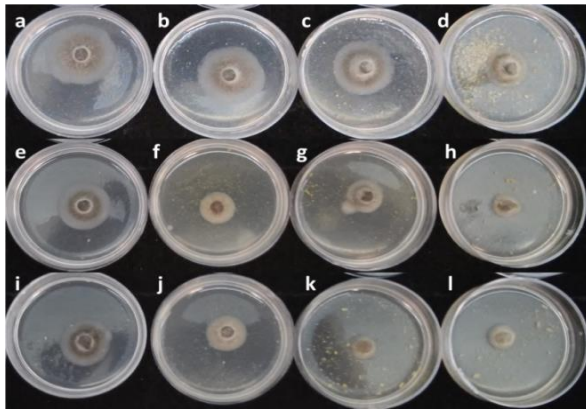


Figura 15. Controles negativos de *A. alternata* (a-PDA y b-DMSO), *F. oxysporum* (c-PDA y d-DMSO), *P. capsici* (e-PDA y f-DMSO) y *P. aphanidermatum* (g-PDA y h-DMSO).

Para *A. alternata* (Tabla 3; Figura 16) se utilizaron las mismas concentraciones para cada extracto; sin embargo el extracto de tallos tuvo una inhibición menor al 50% por lo cual para este no se obtuvo la IC₅₀, ya que era mayor a 1000 ppm. El extracto de hojas y flores tienen un comportamiento parecido (Gráfica 5), pero en el extracto de hojas la IC₅₀ es inferior a las 250 ppm.

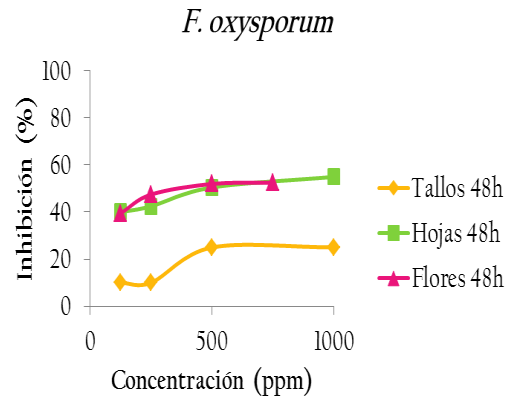
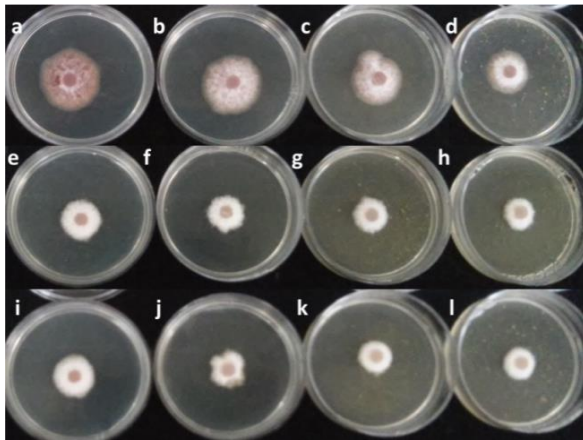
Fusarium oxysporum (Tabla 4; Figura 17) es el fitopatógeno que presenta la IC₅₀ más alta para cada extracto, acercándose a 500 ppm para el caso de hojas y flores y superando las 1000 ppm para tallos. La curva de inhibición es parecida para hojas y flores, pero el primero es ligeramente más activo (Gráfica 6).



(Izquierda). Figura 16. Crecimiento de *A. alternata* a diferentes concentraciones de los tres extractos. Tallos: a) 125 ppm, b) 250 ppm, c) 500 ppm y d) 1000 ppm; hojas: e) 125 ppm, f) 250 ppm, g) 500 ppm y h) 1000 ppm; flores: i) 125 ppm, j) 250 ppm, k) 500 ppm y l) 1000 ppm. (Derecha) Gráfica 5. Curva de inhibición de los tres extractos sobre *A. alternata*.

Tabla 3. Porcentaje de crecimiento e inhibición de *A. alternata* por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.

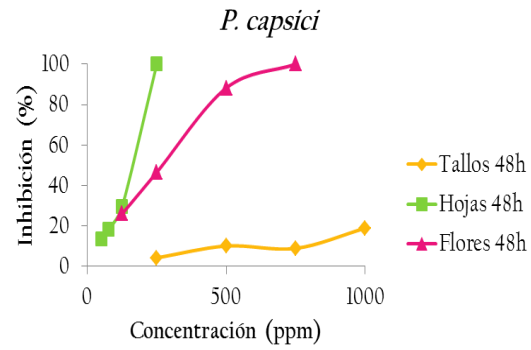
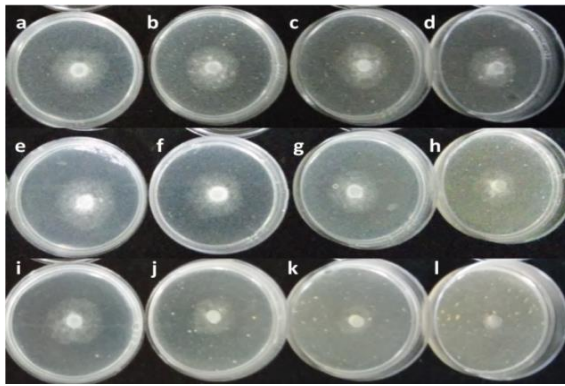
Concentración (ppm)	Crecimiento (%)	Inhibición (%)	IC50 (ppm)
Tallos			
1000	58.76	41.24	>1000
750	70.62	29.38	
500	79.10	20.90	
250	82.49	17.51	
Hojas			
1000	37.29	62.71	239.9
500	44.63	55.37	
250	49.15	50.85	
125	66.10	33.90	
Flores			
1000	37.85	62.15	265.5
500	39.59	60.41	
250	52.54	47.46	
125	65.54	34.46	



(Izquierda) Figura 17. Crecimiento de *F. oxysporum* a diferentes concentraciones de los tres extractos. Tallos: a) 125 ppm, b) 250 ppm, c) 500 ppm y d) 1000 ppm; hojas: e) 125 ppm, f) 250 ppm, g) 500 ppm y h) 1000 ppm; flores: i) 125 ppm, j) 250 ppm, k) 500 ppm y l) 750 ppm. (Derecha) Gráfica 6. Curva de inhibición de los tres extractos sobre *F. oxysporum*.

Tabla 4. Porcentaje de crecimiento e inhibición de *F. oxysporum* por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.

Concentración (ppm)	Crecimiento (%)	Inhibición (%)	IC50 (ppm)
Tallos			
1000	75	25	>1000
500	75	25	
250	90	10	
125	90	10	
Hojas			
1000	45	55	489.2
500	49.5	50.5	
250	57.5	42.5	
125	60	40	
Flores			
750	47.5	52.5	394.9
500	48	52	
250	52.5	47.5	
125	60.5	39.5	



(Izquierda) Figura 18. Crecimiento de *P. capsici* a diferentes concentraciones de los tres extractos. Tallos: a) 250 ppm, b) 500 ppm, c) 750 ppm y d) 1000 ppm; hojas: e) 50 ppm, f) 75 ppm, g) 125 ppm y h) 250 ppm; flores: i) 125 ppm, j) 250 ppm, k) 500 ppm y l) 750 ppm. (Derecha) Gráfica 7. Curva de inhibición de los tres extractos sobre *P. capsici*.

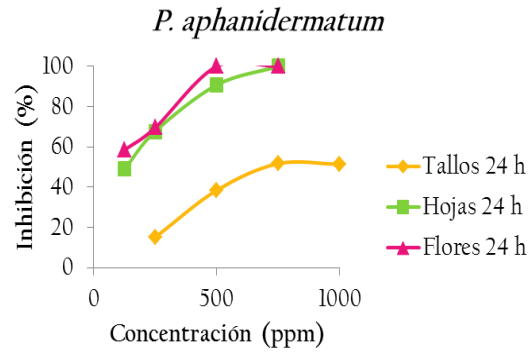
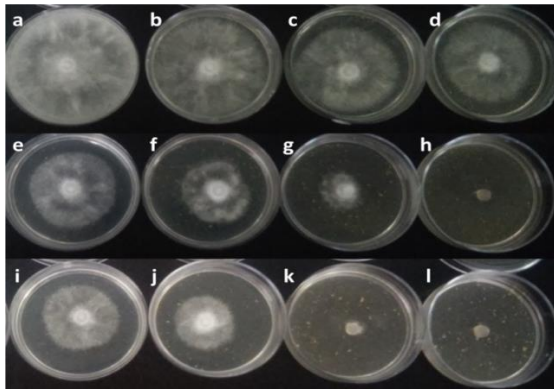
Tabla 5. Porcentaje de crecimiento e inhibición de *P. capsici* por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.

Concentración (ppm)	Crecimiento (%)	Inhibición (%)	IC50
Tallos			
1000	81.18	18.82	>1000
750	91.18	8.82	
500	90	10	
250	95.88	4.12	
Hojas			
250	0	100	143.2
125	70.59	29.41	
75	81.76	18.24	
50	86.47	13.53	
Flores			
750	0	100	261.5
500	11.76	88.24	
250	53.53	46.47	
125	74.12	25.88	

Con *P. capsici* (Tabla 5; Figura 18), se utilizaron concentraciones menores que en las pruebas de los hongos verdaderos. Para el extracto de tallos, la única concentración que fue significativamente diferente al control, fue 1000 ppm con lo cual la IC50 es mayor a esta cantidad. La IC50 del extracto de hojas fue mucho menor al extracto de flores, ya que el primero alcanzó el 100% de inhibición en 250 ppm, por lo cual la curva de inhibición de ambos extractos es diferente a comparación del resto de los fitopatógenos (Gráfica 7).

Por último, para *P. aphanidermatum* (Tabla 6; Gráfica 8; Figura 19), el extracto de tallos tuvo una IC50 de 701 ppm, la cual es la más alta del total de concentraciones inhibitorias obtenidas; en 250 ppm no existe diferencia significativa con el control negativo. El extracto de flores tiene un mayor porcentaje de inhibición, llegando al 100% en 500 ppm y el extracto de hojas alcanza el 100% de inhibición a 750 ppm.

No se encontró publicada una estandarización para la concentración de extracto que debe ser utilizada en la realización de los bioensayos. Por ello, se utilizó como máxima concentración 1000 ppm, que equivale al 0.1% de la solución, lo cual, equivaldría a ocupar una gran cantidad de extracto si se quisiera utilizar como fungicida a gran escala.



(Izquierda) Figura 19. Crecimiento de *P. aphanidermatum* a diferentes concentraciones de los tres extractos. Tallos: a) 250 ppm, b) 500 ppm, c) 750 ppm y d) 1000 ppm; hojas: e) 125 ppm, f) 250 ppm, g) 500 ppm y h) 750 ppm; flores: i) 125 ppm, j) 250 ppm, k) 500 ppm y l) 750 ppm. (Derecha) Gráfica 8. Curva de inhibición de los tres extractos sobre *P. aphanidermatum*.

Tabla 6. Porcentaje de crecimiento e inhibición de *P. aphanidermatum* por extracto, concentraciones utilizadas e IC50.

Concentración (ppm)	Crecimiento (%)	Inhibición (%)	IC50
Tallos			
1000	48.62	51.38	701.5
750	48.31	51.69	
500	62	38.46	
250	84.92	15.08	
Hojas			
750	0	100	136.4
500	9.23	90.77	
250	32.31	67.69	
125	51.08	48.92	
Flores			
750	0	100	105.5
500	0	100	
250	30.46	69.54	
125	41.54	58.46	

La concentración de metabolitos secundarios varía según la planta porque depende de muchos factores abióticos, como la temperatura, salinidad o la cantidad de luz percibida (Akula y Ravishankar, 2011), y de factores bióticos que tienen que ver con sus interacciones ecológicas; por ejemplo, en algunos casos se tienden a acumular ciertos metabolitos en hojas y flores como protección de los órganos productores y reproductivos, contra insectos, microorganismos y herbívoros (Achakzai *et al.*, 2009).

Por otra parte la presencia de lignina, un polímero muy duro que está presente en la pared celular, para conferir soporte y resistencia estructural a los tallos (Campbell y Reece, 2008), hace que se vuelvan más difíciles de consumir por parte de los depredadores ya que sólo ciertas bacterias y hongos pueden degradar este compuesto (Bugg *et al.*, 2011), volviéndolos menos vulnerables.

Con los resultados de las secciones anteriores, se decidió encontrar el o los metabolitos secundarios responsables de la actividad en el extracto de hojas, debido a que éste presentó resultados óptimos en las diferentes pruebas realizadas. Su efecto inhibitorio aumenta a las 72 horas, excepto en *P. capsici*, pero en este oomiceto presenta el 100% de inhibición a las 48 horas. Este extracto se eligió sobre el de flores que también tenía valores muy similares, porque de manera práctica se obtuvo una mayor cantidad el extracto de hojas y éstas pueden encontrarse fácilmente al ser una planta perenne, pues el periodo de floración de *S. sessei* es anual.

6.4. Cromatografía en columna del extracto de hojas

Se obtuvieron 38 fracciones primarias que se juntaron por su similitud, con lo cual se obtuvieron ocho fracciones finales cuyo peso dependió del número de fracciones primarias que las integraron (Tabla 7). Se determinó que las fracciones 1, 2, 3 y 8 se utilizarían para el bioensayo dos porque se tenía una mayor cantidad de éstas, lo que permitía que se pudiera continuar el estudio.

Tabla 7. Peso de las fracciones de la cromatografía de columna del extracto de hoja. Se resaltan las fracciones que fueron utilizadas para el bioensayo dos.

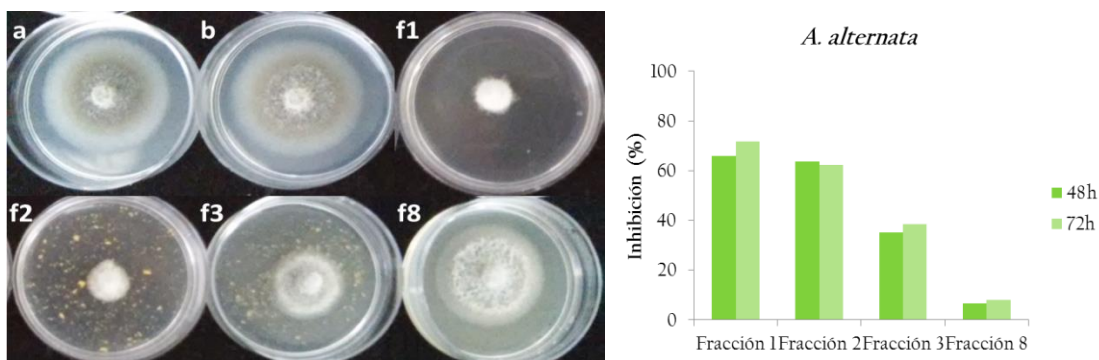
Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)
1	2.11	5	0.10
2	1.33	6	0.07
3	0.36	7	0.08
4	0.13	8	1.25

6.5. Bioensayo dos. Utilización de las fracciones de la cromatografía en columna

Aunque se tuvo un valor de IC50 particular para cada uno de los fitopatógenos, se decidió ocupar un valor redondeado, que fuera superior, para poder tener un comparación precisa entre fracciones debido a las discordancias que hubo entre los dos primeros bioensayos. Los valores redondeados para la IC50 fueron: 250 ppm para *A. alternata*, 500 ppm para *F. oxysporum* y 150 ppm para *P. capsici* y *P. aphanidermatum*. El

100% de crecimiento para cada fitopatógeno se volvió a tomar a partir del control de DMSO, ya que nuevamente no mostró diferencias significativas con respecto al control de PDA.

La inhibición de *A. alternata* fue mayor en la fracción 1 y 2 (Tabla 8; Gráfica 9); a las 72 horas el efecto disminuyó en la fracción dos, mientras que en la fracción uno se mantuvo. La fracción ocho es la que presentó un menor porcentaje de inhibición y aunque el análisis lo diferenció significativamente del control, éste valor sigue siendo muy bajo. Se observó un cambio en la coloración del micelio, ya que en las primeras dos fracciones la coloración fue blanca comparado con el color verde de los controles (Figura 20) y el micelio empezó a crecer primero sobre el inóculo antes de expandirse por la placa de PDA.

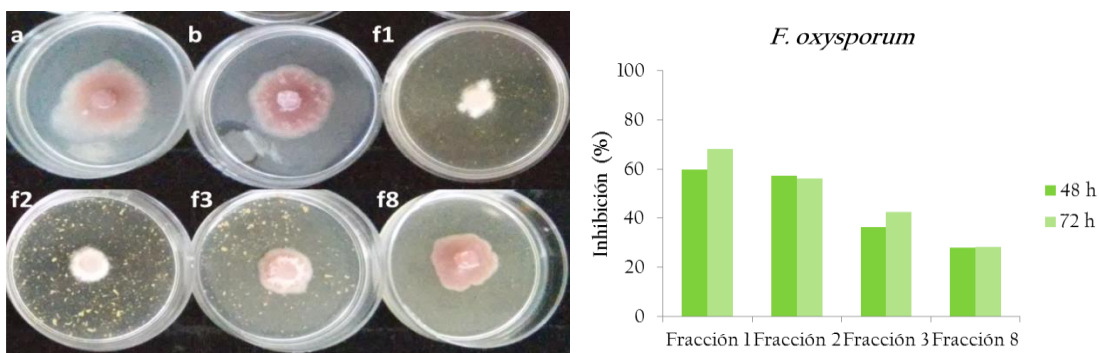


(Izquierda) Figura 20. Crecimiento de *A. alternata* a las 48 horas en: a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas. (Derecha) Gráfica 9. Porcentaje de inhibición para *A. alternata* con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.

Tabla 8. Porcentaje de crecimiento e inhibición de los fitopatógenos con las fracciones utilizadas. En las columnas se presenta por fracción para que puedan ser comparados fácilmente los porcentajes de inhibición que están resaltados, ya que en general se demostró que la fracción uno es la más efectiva en las dos mediciones mientras que la fracción ocho es la menos efectiva. (*) *P. aphanidermatum* sólo fue medido a las 24 horas.

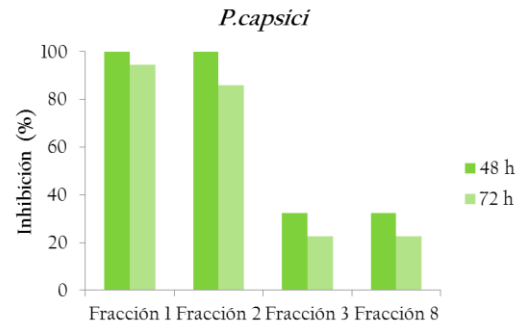
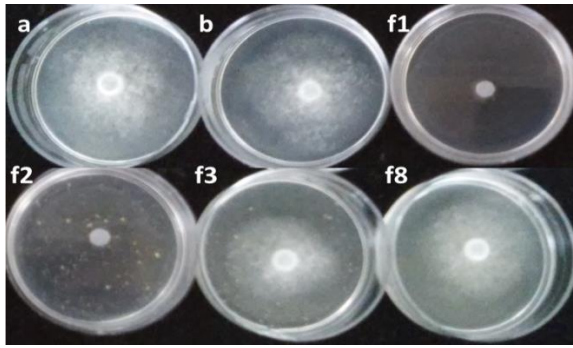
Fracción	1		2		3		8	
Medición	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
<i>A. alternata</i>								
Crecimiento (%)	34.05	28.22	36.22	37.63	64.86	61.67	93.51	91.99
Inhibición (%)	65.95	71.78	63.78	62.37	35.14	38.33	6.49	8.01
<i>F. oxysporum</i>								
Crecimiento (%)	40.26	31.75	42.86	43.78	63.64	57.60	72.08	71.89
Inhibición (%)	59.74	68.25	57.14	56.22	36.36	42.40	27.92	28.11
<i>P. capsici</i>								
Crecimiento (%)	0	5.58	0	13.95	67.69	77.48	97.96	99.17
Inhibición (%)	100	94.42	100	86.05	32.31	22.52	2.04	0.83
<i>P. aphanidermatum</i> *								
Crecimiento (%)	80.39		91.91		100		100	
Inhibición (%)	19.61		8.09		0		0	

La inhibición de *F. oxysporum* es similar a la de *A. alternata*; con la fracción ocho aumentó la capacidad de inhibición, aunque todavía está por debajo del 50% (Tabla 8; Gráfica 10). En cuanto a la morfología, también se observa el mismo efecto que con *A. alternata*, donde la coloración del micelio que crece en las tres primeras fracciones es más pálida (Figura 21).



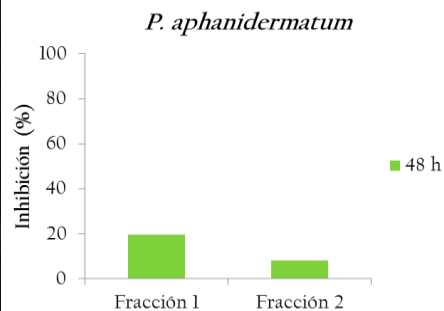
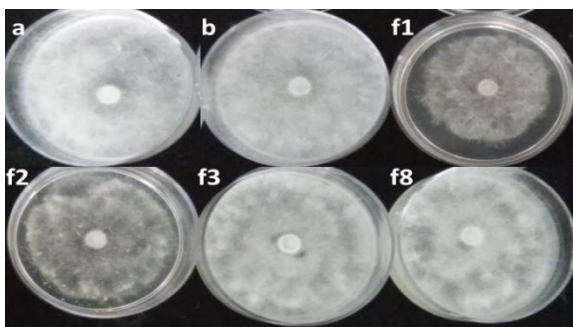
(Izquierda) Figura 21. Crecimiento de *F. oxysporum* en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas. (Derecha) Gráfica 10. Porcentaje de inhibición para *F. oxysporum* con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.

En la evaluación de *P. capsici*, se alcanzó el 100% de inhibición con las dos primeras fracciones a las 48 horas y disminuyó a las 72 horas (Tabla 8; Gráfica 11), aunque esta disminución es mucho menor a la que se presentó en los dos bioensayos anteriores. El crecimiento del micelio en la fracción ocho no fue significativamente diferente al del control en ninguna de las dos mediciones. Al contrario de los ascomicetos, en este caso la morfología en controles y tratamientos es similar (Figura 22).



(Izquierda) Figura 22. Crecimiento de *P. capsici* en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas. (Derecha) Gráfica 11. Porcentaje de inhibición para *P. capsici* con las cuatro fracciones utilizadas a las 48 y 72 horas.

En *P. aphanidermatum*, se puede ver que aunque se usó la IC50, la inhibición estuvo muy por debajo de ese nivel y sólo se presentó en las primeras dos fracciones (Tabla 8; Gráfica 12; Figura 23). Podemos atribuir este comportamiento inesperado al acelerado crecimiento de la cepa, ya que se ha visto que este fitopatógeno puede crecer en 24 horas, llenando una caja de Petri (Agrios, 2005); lo que permitió que después de la inhibición hubiera crecimiento del fitopatógeno.



(Izquierda) Figura 23. Crecimiento de *P. aphanidermatum* en a) control negativo, b) control negativo de disolvente, f1) fracción uno, f2) fracción dos, f3) fracción tres y f8) fracción ocho de la cromatografía en columna del extracto de hojas. (Derecha) Gráfica 12. Porcentaje de inhibición para *P. aphanidermatum* con la fracción uno y dos a las 24 horas; la fracción tres y ocho no están representadas debido a que no presentaron inhibición.

Con los resultados anteriores se determinó seguir trabajando con la fracción uno del extracto, ya que presentó una mejor inhibición, habiendo una mayor probabilidad de que se encontrara un compuesto responsable de la actividad. Por otra parte, se tenía una mayor cantidad de esta fracción y se podía obtener una mayor cantidad de compuesto activo lo cual no afectaría la viabilidad del estudio.

6.6. Cromatografía en columna flash de la fracción uno del extracto de hojas

Se obtuvieron 133 fracciones, que por su similitud se juntaron en 18 fracciones finales, de las cuales tres (Tabla 9) fueron tomadas para realizar la comparación con la sesseina. Las fracciones elegidas se denominaron como uno, dos y tres. El resto de las fracciones no se analizaron debido a la poca cantidad de muestra que se tenía, lo que significaba que no se pudieran probar en un bioensayo, y a la diferencia a simple vista que tenían con la sesseina.

Tabla 9. Peso de las fracciones utilizadas para la comparación con la sesseina.

Fracción	Peso (mg)
1	72.7
2	467.3
3	37

6.7. Obtención y elucidación de la sesseina

La sesseina que se aisló pertenecía a la fracción dos de la CCF, una parte se cristalizó en forma acicular, mientras que el resto tuvo una textura polvosa (Figura 24). Presentó un color amarillo, un m/z de 342 y un punto de fusión de 158°C a 160°C.



Figura 24. Sesseina obtenida en polvo y cristales.

En el espectro de ATR (Anexo A.4) se puede observar una banda que aparece en 3253.64 cm^{-1} , que pertenece al grupo hidroxilo de la sesseina, las bandas observadas en 2970.91 cm^{-1} , 2938.34 cm^{-1} , 2875.50 cm^{-1} pertenecen a los carbonos saturados que junto con las bandas en 1464.59 cm^{-1} y 1399.79 cm^{-1} confirman la presencia de metilenos y metilos; en 1733.23 cm^{-1} aparece la banda correspondiente a la lactona de la sesseina, mientras que en 1634.09 cm^{-1} y 1648.92 cm^{-1} , se observan los carbonilos de la quinona.

Los espectros de RMN fueron interpretados y asignados con la ayuda del M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez; en estos, se pueden observar las señales correspondientes a cada uno de los hidrógenos y carbonos de la molécula de sesseina, con lo cual se confirma que el compuesto aislado se trata de este diteperno. En la tabla 10 y 11 se presentan las asignaciones los carbonos e hidrógenos que están ilustrados en los Anexos 5 y 6. El espectro de RMN del experimento de HSQC (Anexo A.7) comprueba la correspondencia entre los carbonos y los hidrógenos.

Las asignaciones de los espectros de RMN de la sesseina aislada son concordantes con las publicadas por Jiménez *et al.* (1988), existe una variación en el desplazamiento que se debe, básicamente, a que el equipo utilizado en dicho estudio tenía una menor resolución que el que se utilizó en este trabajo.

(Izquierda) Tabla 10. Asignaciones de los carbonos de la sesseina aislada. (Derecha) Tabla 11. Asignaciones de los hidrógenos de la sesseina aislada.

Carbono	Asignación (δ_C ppm)	Carbono	Asignación (δ_C ppm)	Hidrógeno	Asignación (d_H ppm)
C-1	26.00	C-12	150.99	H-1	1.55 s; 2.19 s
C-2	21.16	C-13	143.87	H-2	1.53 m; 1.45 m
C-3	35.55	C-14	183.56	H-3	2.84 m; 1.44 m
C-4	42.05	C-15	24.46	H-5	1.87 d $J=2.4$
C-5	42.74	C-16	19.73	H-6	1.99 m; 1.58 m
C-6	40.26	C-17	19.92	H-7	6.00 dd $J=3.8, 1.9$
C-7	62.18	C-18	23.23	H-15	3.18 sep $J=7.0$
C-8	126.10	C-19	174.79	H-16	1.20 s
C-9	140.51	C-20	73.53	H-17	1.18 s
C-10	37.75	C-21	169.20	H-18	1.23 d $J=1.08$
C-11	184.66	C-22	20.99	H-20	4.84 dd; 4.23 dd $J=12.3, 2.1; J=12.3, 0.8$
				H-22	2.06 s

6.8. Bioensayo tres. Utilización de la sesseina

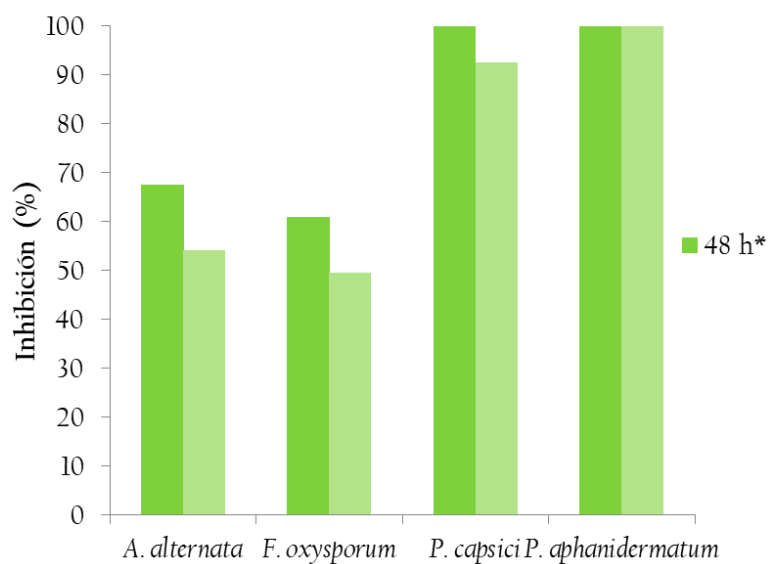
En el último bioensayo se obtuvieron resultados superiores a la IC50 del extracto, teniendo una mejor inhibición en los oomicetos que en los ascomicetos, porque en los primeros se alcanzó el 100% de inhibición y para el caso de *P. aphanidermatum* ésta se mantuvo (Tabla 12; Gráfica 13). En cuanto a la morfología de los fitopatógenos, los dos ascomicetos tuvieron un color blanco, diferente a los controles y el micelio crecía sobre el inóculo (Figura 25).

En el caso de los ascomicetos, la coloración varía según el medio donde se desarrollan y su estadio (Agrios, 2005); para el caso de *F. oxysporum*, dependiendo de la cantidad de luz recibida se expresarán, en mayor o menor proporción, los genes encargados de la síntesis de los carotenoides responsables de sus color (Avalos y Estrada, 2010). Debido a que los controles y tratamientos estuvieron bajo las mismas condiciones, la coloración pálida de *A. alternata* y *F. oxysporum* se atribuye a que el micelio no llegó a desarrollarse idóneamente y por lo tanto no poseía la coloración característica. Además, con base en la información anterior, se sugiere que tanto el extracto como la sesseina podrían llegar impedir la correcta expresión genética, en cualquiera de sus etapas, de *F. oxysporum* y por lo tanto esto se ve reflejado en la coloración de los hongos.

Tabla 12. Porcentaje de crecimiento e inhibición de los fitopatógenos en el medio adicionado con sesseina. (*) Para *P. aphanidermatum* las columnas de 48 h presentan la medición del micelio a las 24 horas.

Crecimiento (%) 48 h	Inhibición (%) 48 h	Crecimiento (%) Control lleno	Inhibición (%) Control lleno
<i>Alternaria alternata</i>			
32.53	67.47	45.88	54.12
<i>Fusarium oxysporum</i>			
39.07	60.93	50.39	49.61
<i>Phytophthora capsici</i>			
0	100	7.45	92.55
<i>Pythium aphanidermatum</i> *			
0	100	0	100

Inhibición de los fitopatógenos causa por la sesseina



Gráfica 13. Comparación del porcentaje de inhibición de los fitopatógenos a las 48 horas y una vez que los controles negativos estuvieron llenos. (*) Para *P. aphanidermatum* la primera medición se realizó a las 24 horas.

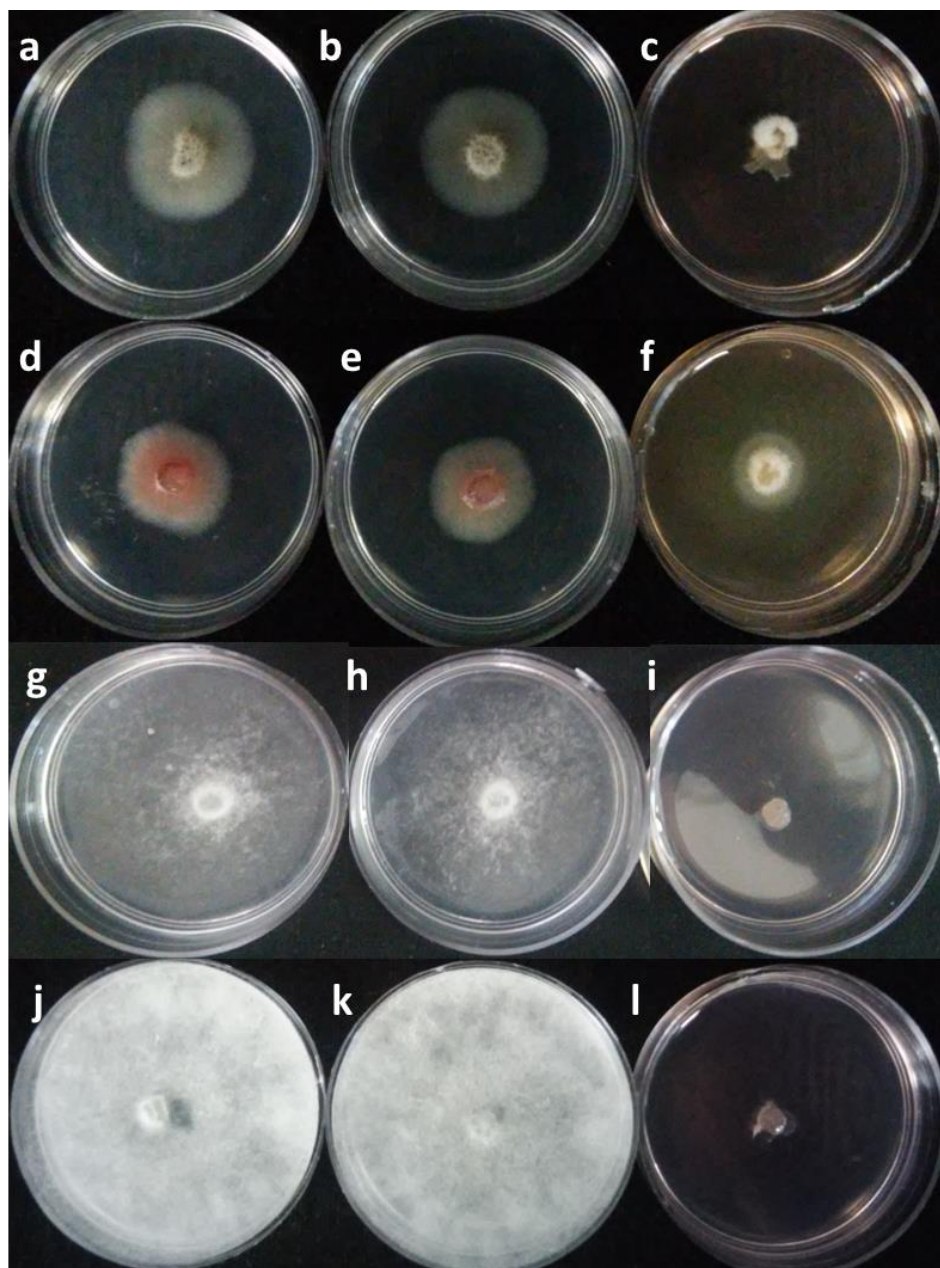


Figura 25. Crecimiento de los fitopatógenos en los controles y el medio con sesseina. *A. alternata*: a) control negativo, b) control negativo de disolvente y c) sesseina; *F. oxysporum*: d) control negativo, e) control negativo de disolvente y f) sesseina; *P. capsici*: g) control negativo, h) control negativo de disolvente y i) sesseina; *P. aphanidermatum*: j) control negativo, k) control negativo de disolvente y l) sesseina.

Para el caso de *P. capsici*, como se observó en los otros tres bioensayos, al principio no hay crecimiento micelial; sin embargo, éste comienza a crecer posterior a las 48 horas

de sembrado, lo cual indicaría que tanto la sesseina como el extracto tienen un efecto fungistático, ya que sólo retrasan el crecimiento. El efecto fungistático es la inhibición del crecimiento micelial, que puede ser causado por ciertas sustancias, donde se ha observado que hay un ligero crecimiento retardado y posteriormente hay un incremento considerable del micelio (Kirk *et al.*, 2001). El crecimiento de este oomiceto fue mayor en los bioensayos con el extracto (mayor al 50%) que en el bioensayo de la sesseina (menor al 10%); para ambos casos un aumento en la concentración podría cambiar el efecto de fungistático a fungicida, tal como se ha visto en otros casos (Gamboa-Alvarado *et al.*, 2003; García-Camarillo, 2006).

La utilización de la sesseina, como un compuesto puro tiene grandes ventajas, como el aumento del efecto inhibitorio, por ejemplo en *P. aphanidermatum* donde resulta tener una eficiencia del 100%. También es más fácil realizar pruebas de toxicidad para cierto tipo de organismos con un solo compuesto que con una mezcla, donde se tenga que discernir cuál compuesto es tóxico, si tal prueba resultará positiva, y se facilitaría hallar el mecanismo de acción que permita comprender como actúa sobre los organismos.

El porcentaje de inhibición en *A. alternata*, *F. oxysporum* y *P. capsici* disminuye cuando el control está lleno. En el caso de los ascomicetos, puede ser resultado de la degradación de la sesseina, junto con la resistencia del micelio que ocasionó que éste pudiera crecer nuevamente. La resistencia fúngica se da como una respuesta adaptativa, debido a que son organismos con tiempos generacionales cortos. Puede darse porque hay variaciones genéticas o epigenéticas, que hacen posibles diferencias bioquímicas,

fisiológicas o fenotípicas; o simplemente por un aumento de la sensibilidad del fitopatógeno al compuesto pesticida, dando como respuesta una reducción a la exposición al antifúngico y el crecimiento micelial, en lugares donde no esté presente (R4P Network, 2016).

En los ascomicetos, la presencia de los septos que son paredes transversales que dividen a las hifas (Campbell y Reece, 2008), les confiere un mayor resistencia porque si la pared celular es afectada en algún punto, el material citoplasmático sólo se perderá en la parte dañada. En cambio los oomicetos no presentan estas estructuras, lo cual provoca que si existe un daño en la pared y membrana celulares, todo el material citoplasmático se pierde.

La habilidad de los hongos para producir ciertos compuestos también desempeña un rol importante en la resistencia, porque minimizan el daño y les dan la oportunidad de tener diversas respuestas, por ejemplo, la producción de metabolitos secundarios en especies de *Fusarium* y su rápida sucesión hace que sean más difícil de erradicar (Moretti y Sarocco, 2016). Por otra parte, los mecanismos de acción más conocidos de los fungicidas, y en particular de los extractos vegetales, involucran un daño en pared y membrana celulares, causando como una consecuencia la formación de radicales libres, que dañan los organelos y el DNA. Por ello, algunos hongos como *F. oxysporum* y *A. alternata* producen catalasas para la transformación de los radicales y así anular el daño producido por ellos (Beltrán *et al.*, 2006).

Un aumento en la sensibilidad y la diversidad de mecanismos de resistencia de los ascomicetos pudo permitir que los hongos sobrevivieran sobre el inóculo que no estaba tratado. Lo anterior explicaría por qué hay una menor inhibición en estos organismos y por qué se utiliza una mayor cantidad de extracto y sesseina, comparado con los valores obtenidos para los oomicetos.

Otra posibilidad que puede actuar en conjunto con la resistencia fúngica, para que haya un decaimiento de la inhibición a las 72 horas, en el medio adicionado con sesseina que no se observa en el extracto, es que existen otros compuestos minoritarios en el extracto que actúan en conjunto para que la inhibición se mantenga. Se ha reportado que los principales causantes de la actividad fungicida son los monoterpenos y sesquiterpenos como eugenol, linalol, viridiflorol, globulol, α -cadineno y bergamotol (Medjahed *et al.*, 2011; Motjaba *et al.*, 2011; Waller *et al.*, 2017), pero éstos han sido obtenidos solamente de los aceites esenciales porque han sido más estudiados. Sin embargo, según Cabral *et al.* (2013), los extractos están conformados por una gran variedad de metabolitos secundarios. lo que hace difícil relacionar un solo compuesto con la actividad, por lo cual comúnmente actividad resulta un efecto sinérgico de todos los componentes.

La interacción entre distintos compuestos promueve que haya diferentes mecanismos de acción para atacar a los fitopatógenos, cada uno con diferentes blancos de acción que desencadenan distintas señales, decreciendo el riesgo de que haya una resistencia por parte de ellos y aumentando la probabilidad de supervivencia de las plantas (Cabral *et al.*, 2013; Osbourn y Lanzotti, 2009). Generalmente este tipo de

interacciones se estudian utilizando dos o más extractos de plantas, pero haciendo un recuento de los compuestos que se encuentran responsables de la actividad antifúngica en estos estudios, se encuentran mezclas de diterpenos y triterpenos con compuestos fenólicos, que por lo regular se tratan de flavonoides y en algunos casos taninos, ácidos fenólicos, cumarinas y saponinas (Céspedes *et al.*, 2014; Lagrouh *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Ncube *et al.*, 2012; Williamson, 2001).

La sinergia es el efecto de una combinación de sustancias que tiende a ser mayor al efecto esperado de esas sustancias por separado (Williamson, 2001), lo cual es contrario a la inhibición causada por la sesseína, ya que es mayor que la provocada por el extracto de hojas. A pesar de esto, y como se explicó anteriormente, se cree que el extracto posee una mezcla de diterpenos con triterpenos y flavonoides. Además en las fracciones probadas del extracto, también hubo una actividad inhibitoria, demostrando que hay un efecto sinérgico de los diferentes compuestos del extracto que promueve la manutención de la inhibición del crecimiento.

Por otro lado, la purificación de los compuestos aumenta el costo de un posible producto final y se necesitan más equipos y disolventes, por lo cual es más prometedor y rentable utilizar el extracto de la planta (Cabral *et al.*, 2013). Con la información anterior se pueden resaltar las ventajas y el gran potencial que tiene el uso del extracto de hojas.

Las técnicas para la realización de bioensayos *in vitro*, para probar la actividad biológica de los extractos y compuestos son muy variadas, haciendo que la

comparación de resultados de los estudios sea difícil porque se ven influenciados por factores como el origen de la planta, el método utilizado para la extracción, la composición y cantidad de los componentes de los extractos que determinan el alto o bajo potencial del extracto (Waller *et al.*, 2017). Otro factor importante es el tipo de disolvente utilizado, pues influye en la composición del extracto y por lo tanto en su actividad en un organismo determinado. Martins *et al.* (2015) reportaron para *Candida* spp., que los extractos obtenidos con metanol e hidroalcohólicos presentan concentraciones inhibitorias más bajas que las obtenidas con extractos acetónicos, de diclorometano y etanol. Jasso *et al.* (2011), obtuvieron mejores resultados utilizando extractos etanólicos de plantas mexicanas para tres de los cuatro de los hongos que probaron y para el restante se obtuvo una mejor inhibición con su extracto hexánico.

Comparando los estudios donde se utilizaron extractos de salvas, los resultados tienden a ser variados. Se reportó que la mínima concentración inhibitoria (MIC) del extracto de ácido acético de *S. sclarea* y de *S. officinalis* es de 125 ppm, ambos extractos fueron probados con especies de *Alternaria* (Dellavalle *et al.*, 2011). Motjaba *et al.* (2011) probaron el extracto de éter y acetato de etilo de *S. multicaulis* contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo una MIC de 106.7 ppm y 298.7 ppm, respectivamente. Los extractos hexánico, hidroalcohólico, de acetato de etilo y de butanol de *S. texana* se probaron contra cuatro hongos patógenos obteniendo una MIC de 60 ppm a 500 ppm dependiendo del extracto y del hongo que se utilizó siendo el más efectivo el extracto de acetato de etilo y el extracto hidroalcohólico presentó valores más altos (Alanís *et al.*, 2007).

La mínima concentración inhibitoria es la concentración más baja de extracto que se utiliza en el tratamiento y donde no hay crecimiento aparente, la IC50 es la concentración donde no hay un 50% de inhibición del crecimiento total. Aunque se trata de dos medidas diferentes, la IC50 obtenida para cada uno de los fitopatógenos probados (250 ppm para *A. alternata*, 500 ppm para *F. oxysporum*, 150 ppm para *P. capsici* y 150 ppm para *P. aphanidermatum*; sección 6.3 y 6.5), demuestra que el extracto tiene una eficacia promedio comparada con otros estudios; pues ya que los valores se encuentran dentro del rango de las concentraciones reportadas y éstas podrían fluctuar si se prueban en otros organismos o se modifican las condiciones de extracción.

La baja o nula toxicidad de los extractos de plantas y sus residuos sobre animales como peces, aves y mamíferos ha sido muy referida (Cabral *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2015; Osbourn y Lanzotti, 2009; Sharma *et al.*, 2017); trabajos como el de Al-Assiuty *et al.* (2014) (Capítulo 3) y Mansour *et al.* (2015) demuestran que la toxicidad de los compuestos extraídos de plantas es menor que la de los insecticidas comerciales. Sin embargo, hay pocos estudios donde se compare la toxicidad de extractos con de la de ciertos pesticidas, y muchos de los extractos no son necesariamente menos tóxicos que los compuestos sintéticos (Tör y Woods, 2017). Por lo cual hacer pruebas de toxicidad y del tiempo de degradación de los extractos debería ser un punto importante para cerciorarse de la seguridad al utilizarlos.

Capítulo 7. Conclusiones

En este estudio se encontró la propiedad antifúngica del extracto de hojas y del extracto de flores de *Salvia sessei* sobre los fitopatógenos, los dos extractos tienen una composición similar que consisten en una mezcla de diterpenos, triterpenos y flavonoides. El extracto de tallos no fue tan eficaz, aunque si presentó una ligera actividad. Se eligió al extracto de hojas para la continuación del estudio, ya que posee una gran eficacia y se obtiene una gran cantidad de éste con poco material vegetal.

Del extracto de hojas se aisló la sesseina, un diterpeno que ya había sido caracterizado, pero no se había probado en algún ensayo de actividad biológica, por lo tanto, el presente trabajo se convierte en la primera descripción de su actividad biológica como fungicida y es una nueva aportación de la actividad antifúngica de los diterpenos.

Tanto con el extracto como con la sesseina, existe una mejor inhibición en los oomicetos porque se utilizó una menor concentración del extracto y del compuesto. Con los resultados obtenidos, se concluye que bajo las condiciones en las que se realizó el estudio, *P. aphanidermatum* es el fitopatógeno para el cual se presenta una mayor actividad antifúngica.

Con *P. capsici* se muestra un efecto fungistático, porque el micelio crece a las 72 horas después de haber sido inhibido completamente. Este efecto podría convertirse en antifúngico si se aumentaran las cantidades de extracto y sesseina que se utilizan en el tratamiento contra este oomiceto.

Se propone que el extracto tiene un efecto sinérgico, ocasionado por los compuestos que lo conforman. Aunque la inhibición del extracto es menor en comparación con el tratamiento de la sesseina, el sinergismo mantiene el efecto antifúngico, impidiendo el crecimiento de los hongos, provocando que existan diferentes blancos donde el extracto actúa y haciendo que los patógenos sean menos propensos a desarrollar una respuesta de resistencia contra el extracto. Se sugiere que el extracto ocasiona daños en la pared celular y en la membrana, causando daño celular y la muerte de los hongos y los fungoides. Sin embargo el mecanismo de acción debe ser estudiado por separado, para ser comprobado y, en lo posible, determinar los blancos o las reacciones que produce.

La concentración de extracto utilizada para los cuatro fitopatógenos, se encuentra dentro del rango de los demás estudios publicados. Sin embargo, estas concentraciones pueden variar a futuro, de acuerdo a las condiciones ambientales donde se encuentre la planta y los factores experimentales que sean determinados para la obtención del extracto. Si se siguen otros protocolos ya publicados, se podría hacer una comparación directa y los valores obtenidos en este trabajo podrían cambiar, siendo más bajos.

Además, se necesitan realizar pruebas de toxicidad contra blancos específicos que sean organismos clave, con animales y con humanos; pruebas del tiempo de degradación y comparaciones con fungicidas comerciales, aunado a efectuar pruebas *in vivo* con plantas infectadas, para ver la interacción planta-patógeno-fungicida con los factores bióticos y abióticos que la rodean.

Este estudio demuestra, en primera estancia, la eficacia de utilizar la sesseina como compuesto y, sobretodo, la utilización del extracto de hojas de *S. sessei* como una opción viable y con gran potencial contra fitopatógenos generalistas que son de gran importancia.

Finalmente, aunque las propiedades antifúngicas de la familia Lamiaceae son muy estudiadas, este trabajo es uno de los pocos reportes en México donde se ha estudiado la actividad antifúngica del género *Salvia* contra fitopatógenos. Con ello se contribuye a la línea de investigación para estudiar las propiedades antifúngicas de este género, resaltando la importancia de las salvias mexicanas y en particular de *Salvia sessei*, la cual sólo tiene un uso ornamental.

Capítulo 8. Referencias

- Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S. A., & Tareen, R. B. (2009). Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pakistan Journal of Botany* 41(5): 2129-2135.
- Agrios, G. (2005). Plant diseases caused by fungi. En: Agrios, G. Plant Pathology. Fifth Edition. *Elsevier Academic Press*: 385-593.
- Ahlenslager, K. (1984). Systematic studies of *Salvia* subgenus *Calosphace* section *Erythrostachys* (Lamiaceae). *Theses, Dissertations, Professional Papers*. Paper 7401.
- Akula, R., Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1720-1731.
- Al-Assiuty, A., Khalil, M., Ismail, A., Straalen, N., Ageba, M. (2014). Effects of fungicides and biofungicides on population density and community structure of soil oribatid mites. *Science of the Total Environment* 466-467: 412-420.
- Al-Sheikh, H. (2010). Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 347-352.
- Alanís, B., González, G., Salazar, R., Waksman, N., Rivas, V. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 468-471.
- Aristeguí, B. (2002). *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. *Revista Iberoamericana de Micología*: 19-21.

-
- Avalos, J., Estrada, A. (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 930-938.
- Babadoost, M. (2005). *Phytophthora* blight of cucurbits. *The Plant Healer Instructor*.
- Beltrán, M., Ogura, T., Manzo, G., Arias, C. (2006). Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y Resistencia a los fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1): 50-58.
- Ben-Jabeur, M., Ghabri, E. Myriam, M., Hamada, W. (2015). Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and *Fusarium* wilt. *Plant Physiology Biochemistry* 94: 35-40.
- Bernards, M. (2010). Plant natural products: a primer. *Canadian Journal of Zoology* 88: 601-614.
- Bisio, A., Schito, A., Nejad, S., Hamburger, M., Mele, G., Piatti, G., Romussi, G., Dal Piaz, F., De Tommasi, N. (2015). Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry* 110: 120-132.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Singh, R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current Opinion in Biotechnology* 22(3): 394-400.
- Cabral, L., Fernández, V., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166: 1-14.
- Calvano, T., Blatz, P., Vento, T., Wickes, B., Sutton, D., Thompson, E., White, C., Renz, E., Hophentl, D. (2011). *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *Journal of Clinical Microbiology* 49(10): 3710-3713.
- Campbell, N., Reece, J. (2008). Biology eighth edition. *Pearson Education*.

-
- Castro-Rocha, A., Flores, J., Aguirre, M., Fernández, S., Rodríguez, G., Osuna, P. (2014). Traditional and molecular studies of the plant pathogen *Phytophthora capsici*: A Review. *Plant Pathology Microbiology* 5(6): 245.
- Céspedes, C., Salazar, J., Ariza, A., Yamaguchi, L., Ávila, J., Aqueveque, A., Kubo, I., Alarcón, J. (2014). Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environmental Research* 132: 391-406.
- Clebsch, B. (2008). The new book of salvias: sages for every garden. Portland, Oregon: Timber Press.
- Córdova, I., Aragon, O., Díaz, L., Franco, S., Serafin, N., Pozos, A., Soto, T., Martínez, F., Isiordia, M. (2016). Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a organismos de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología* 48(3): 217-221.
- Correia, M., Rodrigues, M., Paiga, P., Delerue, C. (2016). Fungicides. *Encyclopedia of food and health*: 169-176.
- Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists: 1250-1318.
- Dananjaya, S., Udayangani, R., Yeop, S., Edussuriya, M., Nikapitiya, C., Lee, J., Zoysa, M. (2017). *In vitro* and *in vivo* antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. *Microbiological Research* 201: 21-29.
- Del Castillo, J., Swett, C. (2017). First Report of *Pythium aphanidermatum* causing root rot and decline of *Poinsettia* in Maryland. *Plant Disease* 101(8): 1556.

-
- Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Dalla, M. (2011). Antifungal activity of medicinal plants extracts against phytopathogenic fungus *Alternari* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(2): 232-239.
- Dewick, P. (2009). Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. Third edition. *John Wiley & Sons Ltd.*
- Ellis, S., Boehm, M., Mitchell, T. (2008). Fungal and fungal-Like diseases of plants. *Fact Sheet Agricultural and Natural Resources*. The Ohio State University.
- English, J., Laday, M., Bakonyi, J., Schoelz, J., Érsek, T. (1999). Phenotypic and molecular characterization of species hybrids derived from induced fusion of zoospores of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora nicotianae*. *Mycological Research* 103(8): 1003-1008.
- Epling, C. (1939). A Revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. Fedde, F., (ed.). *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*. Verlag des Repertoriums, 110, Dahlem dei Berlin. University of California Press: Berkley, CA.
- Gabriel, M., Postigo, I., Tomaz, C., Martínez, J. (2016). *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environment International* 89-90: 71-8
- Gamboa-Alvarado, R., Hernández, D., Guerrero, E., Sánchez, A. (2003). Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (de Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojásén (*Flourensia cerua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(13): 13-18.
- García-Camarillo, E., Quezada, Y., Moreno, J., Sánchez, G., Moreno, E., Pérez, C. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*

-
- Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (F. A. Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1): 8-12.
- Hausbeck, M., Lamour, K. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease* 88(12): 1292-1303.
- Hu, J., Hong, C., Stromberg, E., Moorman, G. (2008). Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* 57: 738-736.
- Jasso, D., Rodríguez, R., Hernández, F., Aguilar, C., Sáenz, A., Villareal, J., Moreno, L. (2011). *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* 34: 960-966.
- Jiménez, M., Portugal, E., Lira, A., Soriano, M., Toscano, R. (1988). A new royleanone-type diterpene from *Salvia sessei*. *Journal of Natural Products* 51(2): 243-248.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J., Stalpers, J. (2001). Ainsworth & Birby's Dictionary of the Fungi, ninth edition. CABIPublishing, Wallingford.
- Liu, X., Ouyang, C., Wang, Q., Li, Y., Yan, D., Yang, D., Fang, W., Cao, A., Guo, M. (2017). Effects of oil extracts of *Eupatorium adenophorum* on *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 140: 90-96.
- Lagrouh, F., Dakka, N., Bakri, Y. (2017). The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal De Mycologie Médicale* 27(3): 303-311.
- Leadbeater, A. (2014). Plant health management: fungicides and antibiotics. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* 4: 408-424.

-
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological control* 101: 17-30.
- Leonberger, K., Jackson, K., Smith, R., Ward Gauthier, N. (2016). Plant Diseases. *Kentucky Master Gardener Manual Chapter 6*.
- López-Pérez, Y., Tejero, D., Torres, A., Luna-Vega, I. (2011). Flora del bosque mesófilo de montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, Estado de México, México. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana*. 85: 35-53.
- Mahlo, S., McGaw, L., Eloff, J. (2010). Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plants pathogens. *Crop Protection* 29: 1529-1533.
- Mansour, S., El-Sharkawy, A., Abdel, N. (2015). Toxicity of essential plants oils, I comparison with conventional insecticides, against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Industrial Crops and Products* 63: 92-99.
- Márquez, J., Collazo, M., Martínez, M. Orozco, A., Vázquez, S. (editoras). (2013). *Biología de angiospermas. UNAM, Facultad de Ciencias*.
- Martin, F., Loper, J. (1999). Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18(2): 11-181.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* 74: 648-670.
- Martínez, M., Fragoso, I., García, M., Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 30-86.

-
- Martínez, M., Bedolla, B., Cornejo, G., Fragoso, I., García, M., González, J., Lara, S., Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences* 95(4): 780-806.
- Mdee, L., Masoko, P., Eloff, J. (2009). The activity of extracts of seven common invasive plants species of fungal phytopathogens. *South African Journal of Botany* 75: 375-379.
- Medjahed, F., Merouane, A., Saadi, A., Bader, A., Cioni, P., Flamini, G. (2016). Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(2): 195-200.
- Michielse, C., Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10(3): 311-324.
- Moretti, A., Sarocco, S. (2016). Fungi. *Encyclopedia of Food and Health*: 162-168.
- Motjaba, T., Hamid, G., Borzo, S., Shiva, N., Esmali, S. (2011). In vitro antibacterial and antifungal activity of *Salvia multicaulis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 14(2): 255-259.
- Ncube, B., Finnie, J., Van Staden, J. (2012). In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 81-89.
- Osbourn, A., Lanzotti, V. (2009). Plant-derived natural products, synthesis, function and application. *Springer*.
- Patriarca, A., Vaamonde, G., Pinto, V. (2014). *Alternaria*. *Encyclopedia of Food Microbiology Volume 1*: 54-60.

-
- Pansera, M., Pauletti, M., Perin, C., Camatti, V., da Silva, R. (2013). Utilization of essential oil and vegetable extracts of *Salvia officinalis* L. in the control of rot sclerotinia lettuce. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science* 6(2): 83-88.
- Pool, A., Knapp, S. (2012). Lamiaceae. En: Davidse, G., Sousa, S., Knapp, S., Chiang, F. (editores). *Flora Mesoamericana* 4(2): 1-195.
- Prestch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M. (2009). Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. *Springer*.
- R4P (Reflection and Research on Resistance to Pesticides) Network. (2016). Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science* 21(10): 834-853.
- Regueiro, J. Olguín, N., Simal, J., Suñol, C. (2015). Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. *Environmental Research* 140: 37-44
- Rekha, P., Chandra, B., Vijaya, S., Indumathi, C., Mithyantha, M. (2006). Studies on the identification of suitable solvents for microbial bioassay. *Current Science* 90(12): 1663-1667.
- Rodríguez, M. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana (Número especial)* 1: 53-78.
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123(3): 308-311.
- Springob, K., Kutchan, T. (2009). Introduction to the different classes of natural products. En: Osbourn, A., Lamzotti, V. (editoras). *Plant-derived Natural Products, Synthesis, Function and Application*, Springer.

-
- Taiz, L. Zeiger, E. Moller, I., Murphy, A. (2015). Appendix 4 Secondary Metabolites. Plant physiology and development sixth edition. *Sinauer Associates*.
- Topçu, G. (2006). Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *Journal of Natural Products* 69(3): 482-487.
- Tör, M., Woods, A. (2017). Fungal and Oomycete diseases. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences second edition* 3: 77-82.
- Tyler, B. (2007). *Phytophthora sojae*: Roots rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology* 8(1): 1-8.
- Villaseñor, J. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559-902.
- Waller, S., Cleff, M., Figueredo, E., Luiza, A., Reis, A., Braga, J., Osório, R., Araújo, M. (2017). Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microbial Pathogenesis* 104: 232-237.
- Williamson, E. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8(5): 401-409.
- Wu, Y., Ni, Z., Shi, Q., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y., Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemicals Reviews* 112: 5967-6026.

Anexos

Los primeros espectros corresponden a los extractos de *S. sessei*, los cuáles fueron realizados en IR con la técnica de pastilla hecha con bromuro de potasio (KBr). Para el caso del espectro de ATR de la sesseina, no se necesitó agregar otra sustancia. Estos espectros fueron realizados en el Laboratorio de Espectroscopia del Instituto de Química.

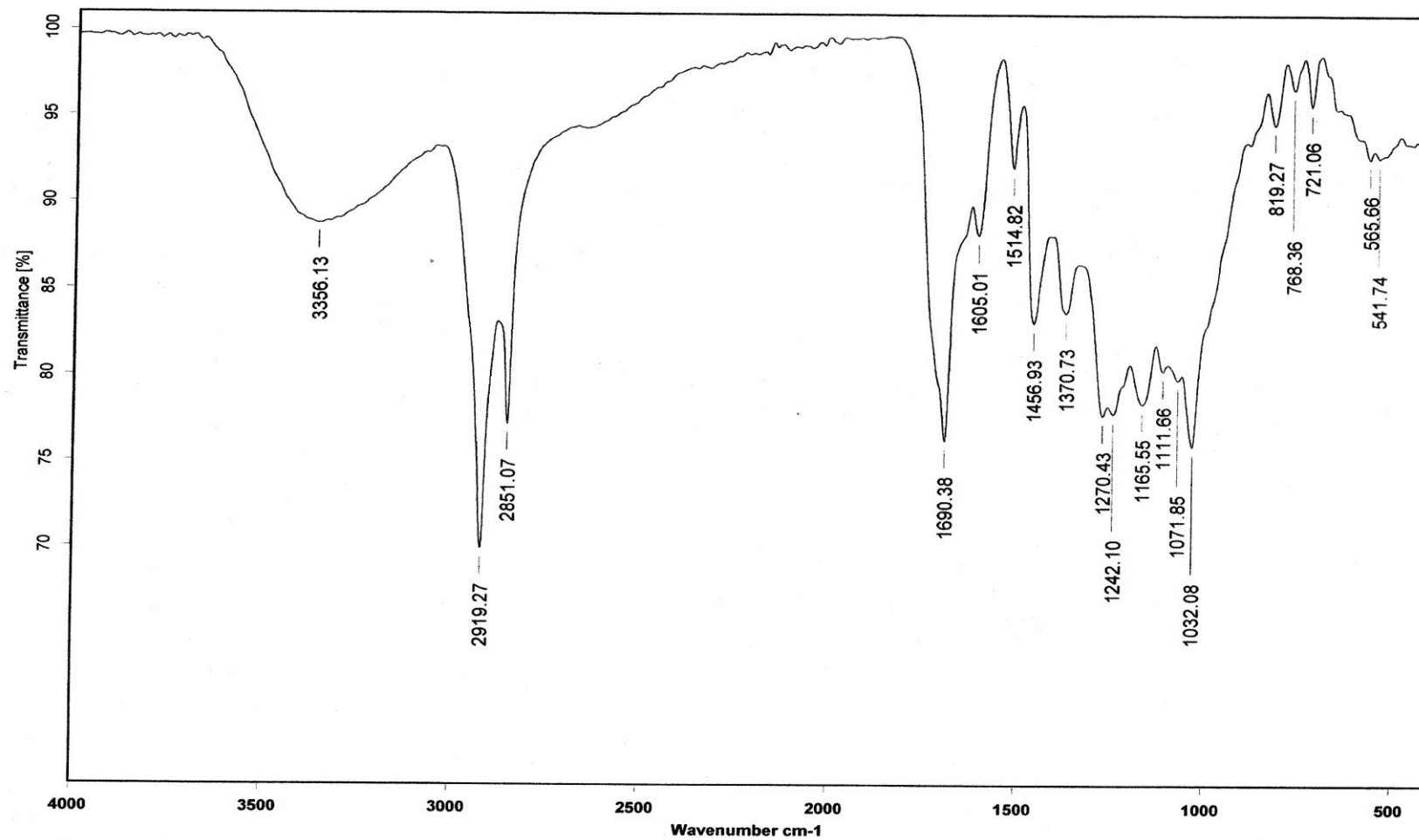
Los espectros de RMN (todos los experimentos) se realizaron en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química fundado por CONACYT-México (Proyecto 0224747) y la UNAM.

A.1. Espectro de IR del extracto de tallos



Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopía

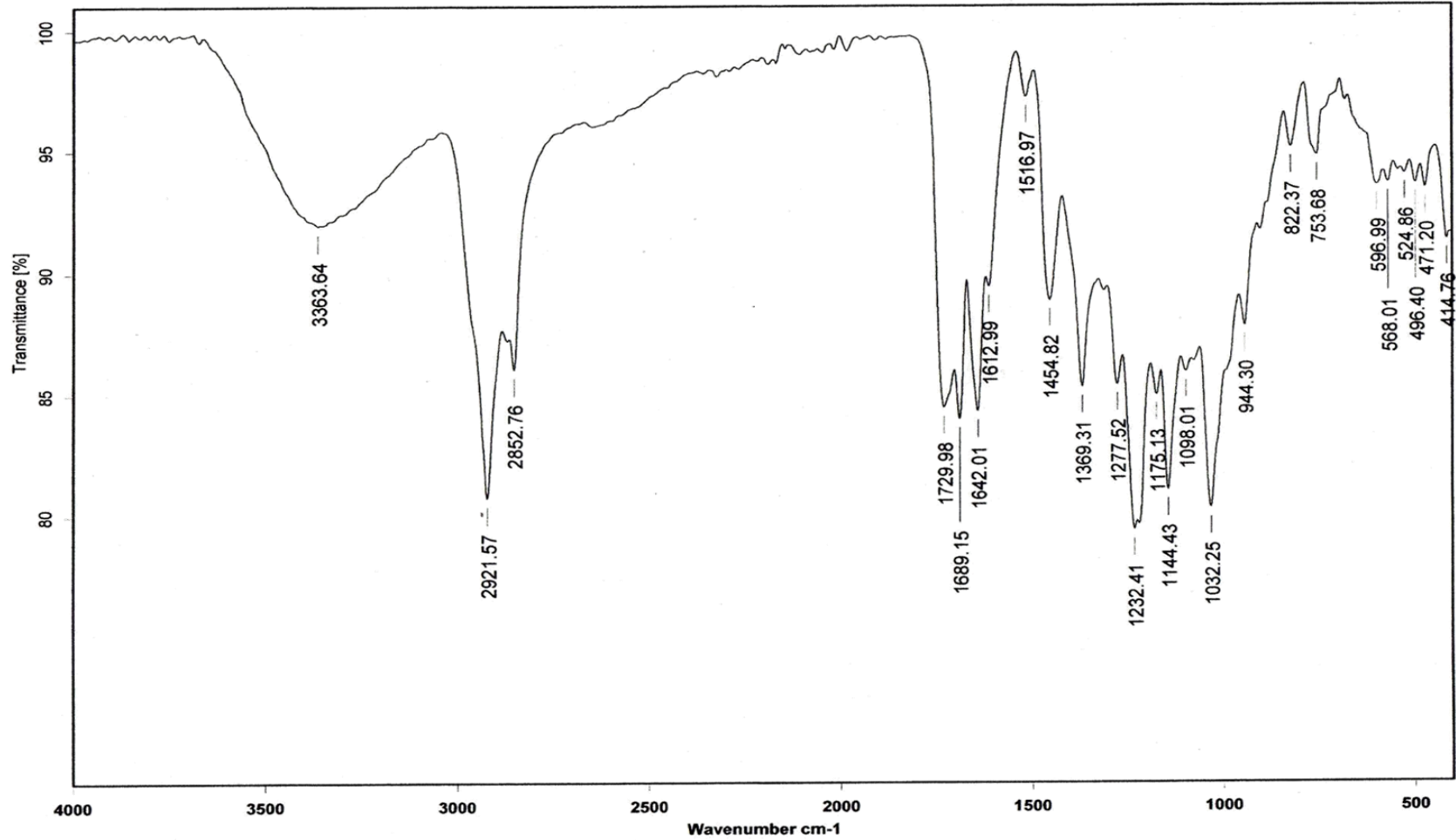


A.2. Espectro de IR del extracto de hojas



Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopía

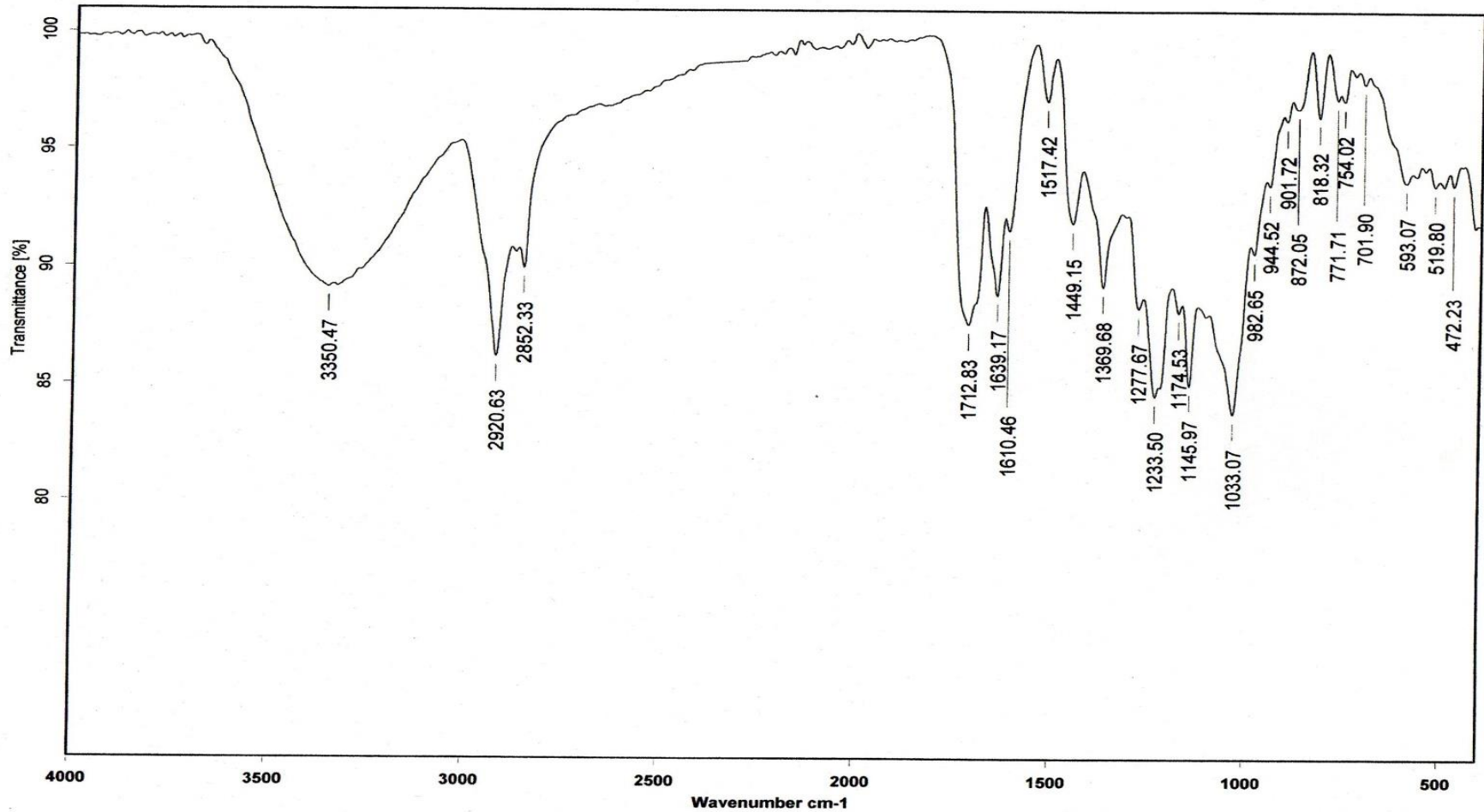


A.3. Espectro de IR del extracto de flores

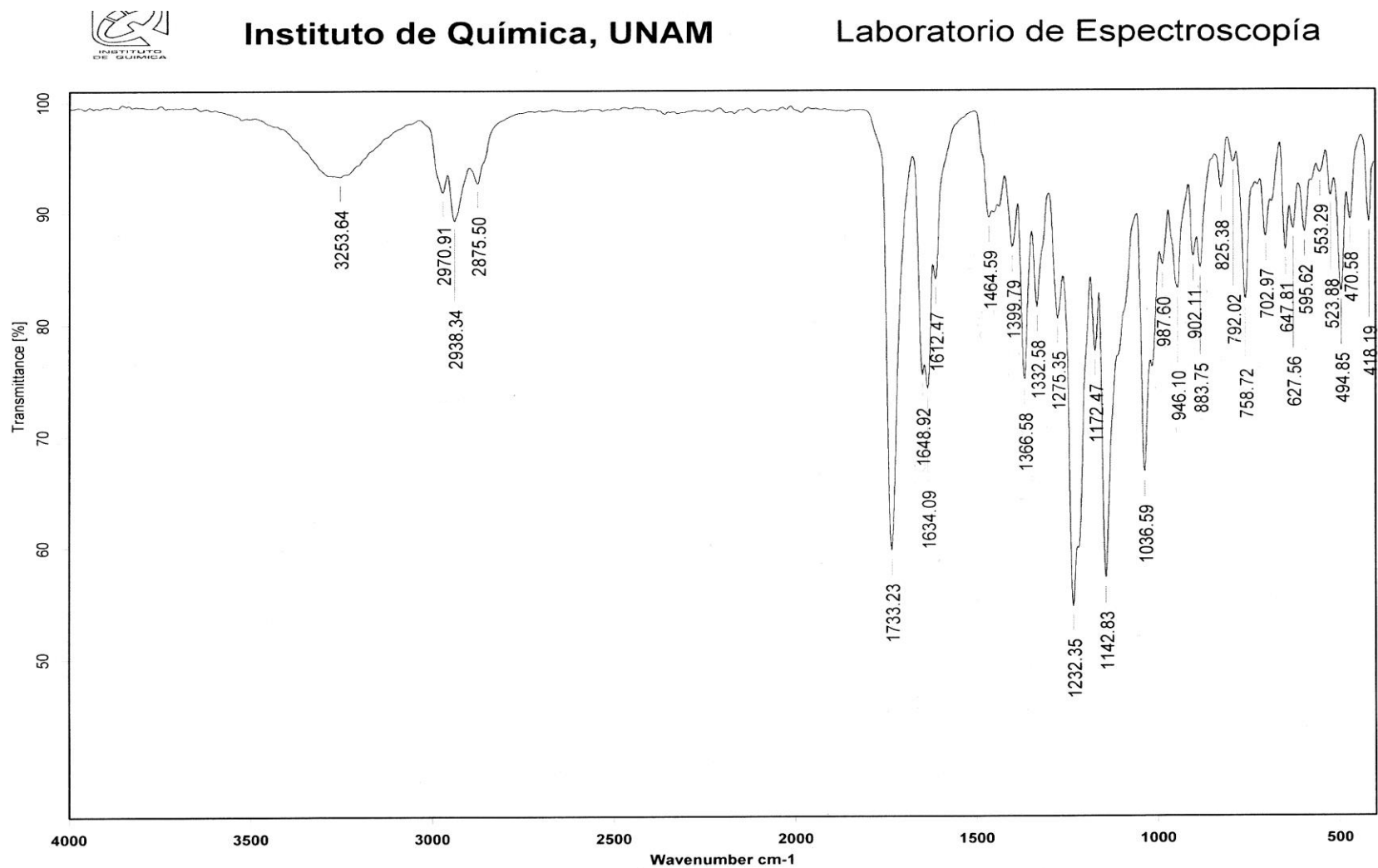


Instituto de Química, UNAM

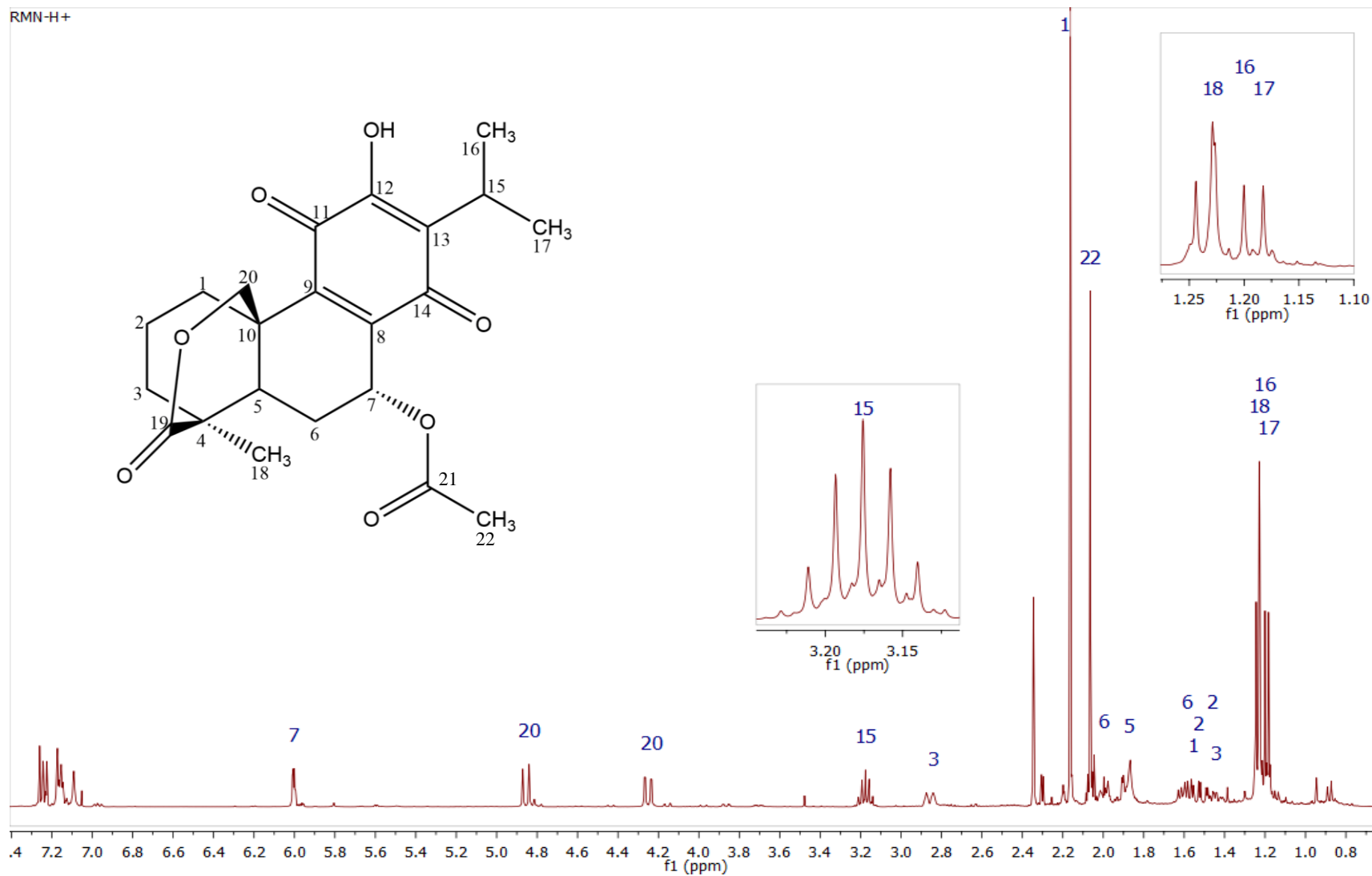
Laboratorio de Espectroscopía



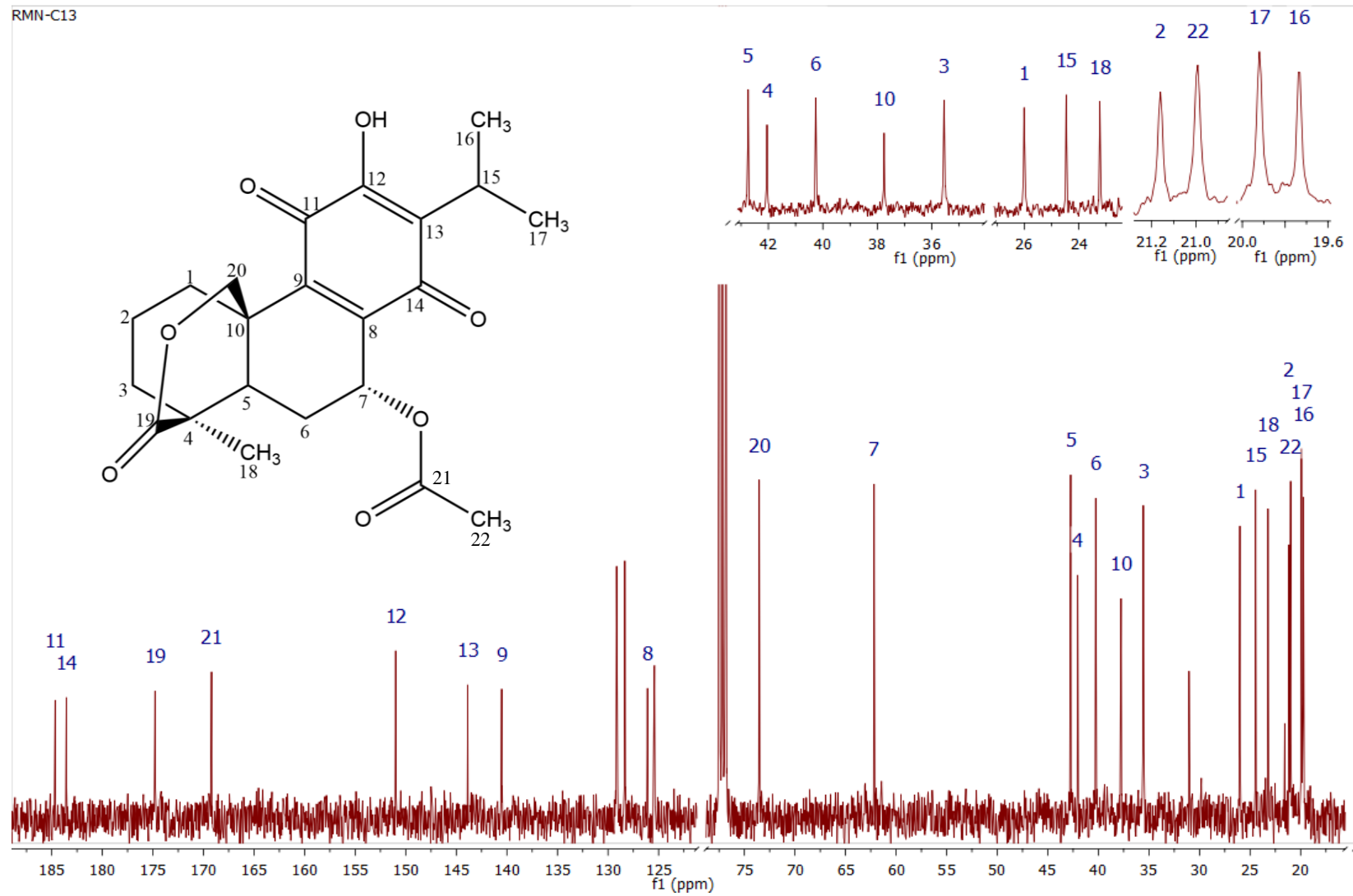
A.4. Espectro de IR de sesseina



A.5. Espectro de RMN-¹H de sesseina



A.6 Espectro de RMN-¹³C de sesseina



A.7. Espectro de HSQC de sесеina

