

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA  
DEL TUBERCULO DE Xanthosoma robustus (QUEQUESQUE)  
Y DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE  
LA ACTIVIDAD"**

Informe Final de Tesis

Presentado por

Erick Giovanni Estrada Palencia

Estudiante de la carrera de

Química

Guatemala, 01 de Septiembre de 2004

<b>INDICE</b>	<b>pag.</b>
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCION.....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 CALSIFICACION BOTANICA.....	6
3.2 CARACTERIZACIÓN.....	6
3.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	7
3.4 SINONIMOS.....	7
3.5 USOS.....	7
3.6 ESTUDIOS REALIZADOS.....	7
3.6.1 ESTUDIOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLOGICOS.....	7
3.6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	7
3.7 PLAGUICIDAS EN GUATEMALA.....	8
3.7.1 USO DE LOS PLAGUICIDAS.....	9
3.7.2 IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS.....	9
3.7.3 ALTERNATIVAS PARA REDUCIR EL IMPACTO.....	10
3.8 CONTROL DE LAS ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LAS PLANTAS.....	11
3.8.1 METODOS NO QUÍMICOS.....	11
3.8.2 MÉTODOS QUÍMICOS.....	12
3.8.3 TIPOS DE FUNGICIDAS.....	12
3.9 HONGOS FITOPATOGENOS.....	12
3.9.1 GENERALIDADES.....	12
3.9.2 MORFOLOGIA.....	12
3.9.3 REPRODUCCIÓN.....	13
3.9.4 ECOLOGIA Y DISEMINACIÓN.....	13
3.9.5 CLASIFICACION.....	14
3.9.6 IDENTIFICACIÓN.....	14
3.10 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	15
3.10.1 ALCALOIDES.....	15
3.10.2 PRINCIPIOS AMARGOS.....	15
3.10.3 ACEITES ESENCIALES.....	15
3.10.4 FLAVONOIDES.....	16
3.10.5 TANINOS.....	16
3.10.6 SAPONINAS.....	16
3.10.7 ANTRAQUINONAS.....	16
3.10.8 CUMARINAS.....	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 GENERAL.....	18
5.2 ESPECIFICO.....	18
6. HIPOTESIS.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 UNIVERSO.....	20
7.2 MATERIALES.....	20
7.2.1 RECURSOS FISICOS.....	20
7.2.2 EQUIPO Y APARATOS.....	20

7.2.3	CRISTALERIA.....	20
7.2.4	REACTIVOS.....	21
7.2.5	CEPAS DE HONGOS.....	21
7.3	METODOS.....	21
7.3.1	AISLAMIENTO PURIFICACION E IDENTIFICACION.....	21
7.3.2	AISLAMIENTO DEL PATOGENO DE HOJAS.....	22
7.3.3	OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL A ANALIZAR..	22
7.3.4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO.....	22
7.3.5	OBTENICÓN DEL EXTRACTO MADRE .....	23
7.3.6	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO MADRE.....	23
7.3.7	CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.....	23
7.3.8	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	23
7.3.9	REALIZACIÓN DE BIOENSAYOS.....	23
7.3.10	BIOENSAYO.....	24
7.4	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	25
7.4.1	DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES.....	25
7.4.2	DETERMINACIÓN DE SAPONINAS.....	25
7.4.3	DETERMINACIÓN DE TANINOS .....	27
7.4.4	DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.....	28
7.4.5	DETERMINACIÓN DE ANTRAQUINONAS.....	29
7.4.6	DETERMINACIÓN DE CUMARINAS.....	30
7.4.7	DETERMINACIÓN DE ACEITES ESENCIALES .....	31
7.4.8	DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS AMARGOS.....	31
7.5	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AZUFRE.....	33
7.6	DETERMINACIÓN DE GLICOSIDOS CIANOGENICOS.....	33
7.7	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	34
8.	RESULTADOS	
8.1	AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS.....	35
8.2	PURIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATOGENOS.....	35
8.3	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATOGENOS.....	35
8.4	PREPARACION DE SOLUCIONES DE ESPORAS.....	36
8.5	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	36
8.5.1	EXTRACTO ACUOSO.....	36
8.5.2	EXTRACTO ETANOLICO .....	36
8.5.3	PARTICIÓN POR SOLVENTES.....	36
8.6	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	37
8.7	BIOENSAYOS.....	38
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
9.1	AISLAMIENTO PURIFICACION E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATOGENOS.....	40
9.2	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	40
9.3	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	40
9.4	BIOENSAYOS.....	41
10.	CONCLUSIONES.....	43
11.	RECOMENDACIONES.....	44
12.	REFERENCIAS.....	45
13.	ANEXOS.....	47

## 1. RESUMEN:

El control de enfermedades fúngicas en cultivos es un tema que involucra a biólogos, agrónomos, químicos, ambientalistas, etc. En conjunto estudian y analizan cada año nuevos productos tanto de origen orgánico como inorgánico, para el manejo y control de hongos, que cada vez incrementan su capacidad de mutar y de crear resistencia contra fungicidas cada vez mas potentes. Por este motivo se hace necesario crear nuevas alternativas, que controlen las enfermedades, pero que a la vez sean amigables con el medio ambiente, y estén al alcance de los agricultores con menos recursos.

Inicialmente se realizó el trabajo de campo que consistió en recolectar plantas de cultivos afectados por enfermedades fúngicas, identificando *in situ* algunos de los hongos presentes que posteriormente se aislaron, purificaron e identificaron en laboratorio, logrando identificarse 3 de los 20 hongos aislados, de las 5 cepas utilizadas 3 fueron aisladas y 2 son cepas proporcionas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Una vez establecidos los hongos fitopatógenos disponibles se procedió a obtener los extractos acuoso y etanólico de la planta *Xanthosoma robustus*. Del etanólico se hizo una partición líquido/líquido, con hexano, cloroformo y acetato de etilo. Posteriormente se realizó un tamizaje fitoquímico a los extractos acuoso y etanólico; obteniéndose los siguientes resultados: En el extracto etanólico se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, taninos, saponinas, principios amargos, en el extracto acuoso se detectó la presencia de los mismas familias de metabolitos a excepción de flavonoides y principios amargos. Se le atribuye la actividad fungicida a los flavonoides y antraquinonas. Para las pruebas biológicas se logró determinar que sí existe un efecto antifúngico de amplio espectro para todos los extractos en concentraciones que van desde 0.5 a 0.125 mg/ml, pero a partir de 0.05 mg/ml solo el extracto etanólico inhibió el crecimiento de micelio. Y a concentraciones de 0.0250 mg/ml no se logró evidenciar un efecto antifúngico.

## 2. INTRODUCCION:

Los fungicidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de hongos fitopatógenos, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha originado diversos problemas, como toxicidad a los usuarios y daños al medio ambiente, por lo que se deben extremar las precauciones al utilizarlos. A pesar de ésto, los fungicidas sintéticos son de uso cotidiano en Guatemala.

Ante esta situación, una alternativa prometedora es el uso de productos naturales derivados de las plantas para el control de hongos fitopatógenos. Existe información de cerca de 400 especies de plantas con propiedad fungicida y se estima que esta propiedad se presenta frecuentemente en algunas familias de metabolitos secundarios. Por ejemplo, en plantas con actividad antifúngica, se han sugerido que algunos compuestos bioactivos presentes en los extractos o aceites esenciales, como responsables de dicha actividad.

Actualmente en el interior del país, los agricultores utilizan "artesanalmente" el extracto acuoso del tubérculo de Xanthosoma robustus como pesticida de amplio espectro (presentando características insecticidas, nematocidas y fungicidas) al rociarlo en plantaciones de cultivos de café, tomate, chile, maíz, etc.,.

Dada la importancia que representa para la ciencia y para los agricultores el uso de este extracto, se propone la investigación del perfil fitoquímico y la validación de su actividad antifúngica de X. robustus, para la cual, según la base de datos NAPRALERT no existe información etnomédica, actividad biológica reportada del extracto, ni identificación de sus metabolitos secundarios.

Por lo tanto, es indispensable comprobar la actividad, identificar el extracto que presenta la actividad así como la familia de metabolitos secundarios presentes en dicho extracto por métodos de tamizaje fitoquímico, restringiendo el estudio únicamente a la determinación de la actividad antifúngica.

### 3. ANTECEDENTES

#### *Xanthosoma robustus (Quequesque)*

#### 3.1 CLASIFICACION BOTÁNICA:

Reino:	Plantae
Subreino:	Embriobionta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Arecidae
Orden:	Arales
Familia:	Araceae
Genero:	Xanthosoma
Especie:	Robustus

#### 3.2 CARACTERIZACION:

<b>Variables</b>	<b>Estado</b>
Hábito de crecimiento	Inclinado
Peciolo	Hastado
Orientación de la lámina	Erecta
Margen de la hoja	Ondulada
Apéndice de la hoja	Ausente
Forma de la lámina	Sagitado
Superficie de la hoja	Opaco
Jaspeado de la hoja	Ausente
Color de la savia de la punta de la hoja	Incolora
Patrón de venación	Y parte
Cerocidad del peciolo	Glauco
Patrón de la vaina de la hoja	Abierto
Formación de flores y frutos	Ausente
Manifestación de cornos	Manifiesta
Color de la corteza del corno	Café
Aroma del corno cocinado	Aromático
Palatabilidad del corno crudo	Irritante
Exterior del corno (epidermis)	Fibroso
Arreglo de las hojas	Destorso
Color de la hoja	Verde

### 3.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:

Habita en suelos húmedos, usualmente en pantanos o suelos pantanosos, en salientes, vertientes, o en el bosque, a 900 metros o menos, mas en pendientes y elevaciones bajas; se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz; Izabal; Jalapa; Jutiapa; Santa Rosa; Escuintla; Chimaltenango; Huehuetenango; San Marcos; Quetzaltenango; Retalhuleu. Se reporta desde Honduras a Costa Rica (1).

### 3.4 SINÓNIMOS:

Llamado “quiscamote”, “quiscamo” y “quiscamotillo” en Honduras, y “capote” en Chiapas. Los Quequesques es un caserío de el departamento de Guatemala, y los nombres vernáculos de las especies aparecen según el área geografica en que se localice. La planta crece mas a menudo en suelos pantanosos y en las orillas de ríos, algunas veces forma grandes colonias (1).

### 3.5 USOS:

Esta especie algunas veces se usan como ornamento en jardines y parques. El gran tamaño de las hojas favorece su uso para protección de la lluvia. Las hojas jóvenes son usadas, según dicen, en la cocina y alimentación en Guatemala, pero la raíz es considerada como venenosa. Las hojas cocidas supuestamente se dan a comer a las mujeres para estimular la lactancia de una forma natural. La savia cruda de la planta es usada en algunas áreas como un sustituto del azufre para inducir la coagulación de la goma utilizada en la fabricación de impermeables (1).

### 3.6 ESTUDIOS REALIZADOS:

#### 3.6.1 ESTUDIOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLOGICOS

En la actualidad no se encuentra registro de estudios fitoquímicos ni farmacológicos de la planta Xanthosoma robustus, según la base de datos NAPRALERT (anexo 1).

#### 3.6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA:

El único registro que se tiene del quequesque es: El quequesque contiene: proteínas 8.5%, grasa 0.7%, fibra cruda 4.1%, paredes celulares 22.6%, almidón 35.8%, carbohidratos solubles 31.5% y hemicelulosa 14.1% (10).

## RESUMEN DE CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA DE 7 CULTIVARES DE *Xanthosoma sp.*

Tabla 1

Colecta No.	475	554	370	453	563	610	612
% Humedad fresco	63.09	81.23	77.75	71.78	76.90	79.46	68.97
% Nitrógeno	2.34	2.66	2.69	0.74	1.05	2.38	1.45
% Proteína	14.61	16.62	16.47	4.59	6.22	14.90	9.03
% Humedad res.	12.63	11.95	12.73	12.72	12.57	13.20	14.58
% Materia seca	36.91	18.77	22.25	28.22	23.09	20.54	31.03
% Cenizas	5.52	4.24	6.42	3.34	4.40	7.91	2.73
% Fibra cruda	3.44	7.56	5.17	2.55	4.72	6.33	3.80
Calorías cal/gr.	396.64	438.94	401.75	420.75	411.47	407.61	423.09
% Azúcares	5.80	7.24	6.04	7.26	7.89	4.83	7.79
% Almidón	47.33	46.26	46.61	28.79	57.23	23.89	23.20

Fuente: Oscar Arnoldo Morales Soto (11)

### 3.7 PLAGUICIDAS EN GUATEMALA, USO E IMPACTO AMBIENTAL Y ALTERNATIVAS:

Los plaguicidas sintéticos se usan en grandes cantidades. Actualmente, los sistemas agrícolas dependen del uso de plaguicidas, debido a que inicialmente estos productos pueden controlar plagas y sus vectores en un lapso relativamente corto. Características como esta resultan muy atractivas ya que parecen garantizar el aumento en la producción de alimentos y, además, el control de vectores transmisores de enfermedades y la obtención de divisas a través de la exportación de diversos productos vegetales, en particular no alimenticios, como algodón y café.

La utilización unilateral y excesiva de los plaguicidas de origen químico (insecticidas, fungicidas, nematocidas, herbicidas, etc.,) para el combate de las plagas agrícolas, ha producido múltiples problemas que afectan la productividad misma y el bienestar de la población en general. Estas sustancias causan efectos nocivos a corto plazo, ocasionando alteraciones graves en la salud, o incluso la muerte, sobre todo, en los trabajadores relacionados con la aplicación o la producción de los plaguicidas. Los efectos a mediano y largo plazo para la mayoría de las sustancias pueden ser extremadamente graves e irreparables. Muchos de los efectos adversos de estas sustancias solo podrán ser evaluados íntegramente en el futuro, aunque se pueden hacer inferencias al respecto, tomando en cuenta que, para muchos de ellos, se han demostrado efectos extremadamente graves, tanto en animales de experimentación como en grupos expuestos ocupacionalmente. Este tipo de efectos no solo los pueden sufrir los



trabajadores relacionados con estas sustancias y sus familias sino, además, la población en general cuando ingiere crónicamente residuos de plaguicidas a través de sus alimentos.

En Guatemala, el conocimiento de la situación de los plaguicidas y su impacto en el ambiente es muy fragmentado y está basado más en la intuición y en ciertas apreciaciones cualitativas, que en estudios sistemáticos y profundos. Los pocos estudios que existen ya están prácticamente desactualizados (14).

### **3.7.1 USO DE LOS PLAGUICIDAS:**

Los mayores usuarios de plaguicidas en Guatemala son los agricultores, de los cuales se pueden mencionar cuatro grupos principales :

1. Los exportadores de productos tradicionales (café, banano, azúcar, algodón).
2. Los exportadores de productos no tradicionales.
3. Los productores de granos básicos (maíz, arroz, frijol)
4. Los productores de hortalizas para consumo regional.

Además de los agricultores, existen a nivel nacional, tres programas de fumigación que por su cobertura tienen mucha importancia. El primero está dirigido a combatir los vectores de diferentes enfermedades tropicales. El segundo es el programa para la erradicación de la mosca del mediterráneo (MOSCAMED) y el tercero, contempla las aspersiones para eliminar los cultivos de drogas como la marihuana y la amapola (15).

### **3.7.2 IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS:**

El uso de plaguicidas agrícolas, forestales, en salud pública y en otros campos ha prestado grandes beneficios. Sin embargo su uso incontrolado, excesivo, en gran escala e irreflexivo, ocasiona múltiples problemas, perturba los sistemas productivos, presenta riesgos de salud ocupacional y riesgos para la población en general, especialmente para el área rural. Las consecuencias del impacto de plaguicidas en el medio ambiente se pueden clasificar en aspectos ecológicos, de salud humana y socioeconómicos (14).

### **3.7.3 ALTERNATIVAS PARA REDUCIR EL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS:**

A pesar de la atracción que ejerce la táctica de control basada exclusivamente o intensivamente en los productos químicos y a pesar de toda la promoción que se realiza a favor de ella, muchos sectores de la población perciben ahora la necesidad de un cambio hacia tácticas de control más seguras, más eficaces y eficientes; y que también reduzcan el impacto ambiental de los plaguicidas. Las alternativas van desde el manejo racional de plaguicidas, entendido desde un enfoque de manejo integrado de plagas, hasta la eliminación completa no solo de

plaguicidas sino de toda forma de agroinsumo químico, en un enfoque alternativo dentro del marco de la producción agrícola orgánica (14).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) según una definición de la FAO, consiste en “un sistema de manejo de plagas, que, considerando el ambiente circundante y la dinámica de las poblaciones de las especies plaga, utiliza todas las técnicas y los métodos apropiados en la forma mas compatible posible, para mantener las poblaciones de las plagas a niveles inferiores a aquellos que causan daño económico” (15).

Un rasgo inherente al MIP es su carácter interdisciplinario. En el concurren métodos agrícolas o culturales, control biológico, desarrollo de variedades resistentes de plantas, utilización de atrayentes alimenticios y sexuales, hormonas, insectos estériles y plaguicidas. El uso de los plaguicidas no se elimina, sino que se utilizan solo cuando sea necesario y en dosis y áreas definidas, con base en criterios precisos (14).

### **3.8 CONTROL DE LAS ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LAS PLANTAS:**

#### **3.8.1 Métodos no químicos:**

A estos métodos se les da poca publicidad debido a que suelen requerir de cuidados por parte del agricultor, más que el uso de productos elaborados con fines comerciales. Sin embargo, aun cuando la labor es escasa y costosa, puede contribuir al control eficaz y económico de la enfermedad.

A continuación se enlistan los métodos más utilizados en la prevención de enfermedades fungosas (2):

**Saneario del cultivo:** aislamiento o destrucción del material enfermo en ciertas circunstancias bien definidas.

**Erradicación de los hospederos alternos:** El control adecuado de las plantas reduce la probabilidad de que el patógeno persista hasta el siguiente cultivo.

**Rotación de cultivos:** Muchas enfermedades persisten en los restos muertos del cultivo anterior o en el suelo en el que se ha sembrado un cultivo susceptible. La rotación puede emplearse en los casos en que el periodo de persistencia es de uno o dos años.

**Prevención:** pueden alterarse las condiciones ambientales o de invernadero para detener el desarrollo del patógeno.

**Multilíneas y mezclas:** La resistencia basada en genes individuales o en un pequeño numero de ellos está expuesta a interrumpirse. Y es un proceso largo. En multilíneas se alternan las líneas de cultivos.

**Cuarentena en plantas:** mecanismo que permite detener el avance de la enfermedad mediante acción reguladora.

### 3.8.2 Método químico:

Los compuestos químicos se utilizaron para controlar las enfermedades de las plantas mucho antes de que se conocieran los agente causales de enfermedad. Para que el control químico o cualquier otra forma de control de la enfermedad sea efectivo, debe estar justificado económicamente y no ser demasiado peligroso o inconveniente al aplicarlo.

Los compuestos químicos pueden clasificarse de acuerdo con su mecanismo de acción. Para que un fungicida sea útil, debe matar al patógeno o por lo menos inhibir su desarrollo sin que cause daños importantes al hospedero.

### 3.8.3 Tipos de fungicidas (15)

**Fumigantes del suelo:** Pueden esterilizar parcialmente el suelo, son inespecíficos, inhiben el crecimiento del patógeno sin afectar al hospedero, las especies de hongos a las que afecta son Fusarium y Verticillium.

**Fungicidas protectores:** Se aplican como aspersiones, la mayoría de estos fungicidas son tóxicos si entran en la planta, se caracterizan por ser de amplio espectro. Ejemplo de los mas antiguos son el azufre y cobre inorgánicos. Entre los fungicidas orgánicos podemos mencionar los ditiocarbamatos, el Cineb, ptalimidas, Captán que son más costosos pero causan menos daño a la planta.

**Fungicidas sistémicos:** A diferencia de los fungicidas protectores los sistémicos deben entrar en la planta y, para que sean translocados en ella deben ser razonablemente hidrosolubles. Ejemplo de fungicidas sistémicos son: benomyl, bencimidazol, oxatiinas, carboxina, hidroxipirimidinas, etirimol, morfolina, etc,.

**Fungicidas de post-cosecha:** Una restricción importante es que cualquier tratamiento aplicado durante la cosecha o después de esta no debe aportar al producto final de la cosecha toxicidad residual.

## 3.9 HONGOS FITOPATÓGENOS

### 3.9.1 Generalidades:

Son pequeños organismos, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. La mayoría de las 100000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o mas tipos de plantas (5).

### **3.9.2 Morfología de hongos fitopatógenos:**

La mayoría de los hongos tienen un soma vegetativo que consta de filamentos continuos más o menos alargados que pueden o no tener paredes transversales (septos). Al soma del hongo se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas. El diámetro y la longitud es variable según el hongo.

En algunos hongos, el micelio está constituido por células que contienen uno o dos núcleos por célula. En otros, el micelio es cenocítico, es decir, contiene muchos núcleos y está integrado por una célula multinucleada continua y tubular que puede o no ramificarse, o bien puede estar dividido por varios septos de ahí que cada segmento represente una hifa multinucleada. El crecimiento del micelio se produce en las puntas de las hifas.

Algunos de los hongos inferiores carecen de un micelio verdadero u producen un plasmodio multinucleado, amiboideo y desnudo (como en los myxomycetes) o un sistema de filamentos de diámetro más o menos distinto y que varía constantemente, denominado rizomicelio (como en los chytridiomicetes) (5).

### **3.9.3 Habitat e importancia de los hongos asexuales:**

Los hongos conidiales se encuentran en los mismos habitats que ocupan sus parientes sexuales esto significa que la gran mayoría son terrestres aunque algunas especies ocurren en habitat marinos o de agua dulce. Nutricionalmente la mayoría de los deuteromicetos son ya sea saprobios o parásitos débiles de las plantas además del estilo de vida saprofito algunas especies atrapan y consumen nematodos. Otros son simbioses en líquenes, endofitos de angiospermas y gimnospermas y formadores de micorrizas. Algunos son parásitos de otros hongos y líquenes. Muchos hongos conidiales son de gran importancia para nosotros porque son parásitos que causan enfermedades a plantas y animales incluyendo a los humanos. La actividad química de los deuteromicetos también es de importancia para los humanos. Algunos se usan en la producción comercial de ciertos químicos incluyendo algunos antibióticos, en el proceso de saborizado de alimentos. Otros envenenan nuestras comidas así como la de los animales domésticos (16).

### **3.9.4 Reproducción**

#### **Estructuras somáticas:**

Los deuteromicetos típicamente producen hifas septadas ramificadas y bien desarrolladas que son como la de sus parientes sexuales cercanos, algunas levaduras asexuales se reproducen únicamente por brotes. Un hongo asexual tiene las características somáticas de su parientes sexuales ya sean ascomicetes o basidiomicetes. Los poros de las septas pueden ser como los de los ascomicetes, o pueden ser septas doliporas, en hongos asexuales basidiomicetos. Algunos pero no todos los basidiomicetes asexuales producen conexiones de abrasadera, además algunos hongos conidiales producen apresorios, ahustorios, trampas de nematodos y tallos de líquenes (16).

### **Estructuras asociadas con la reproducción asexual:**

Los conidios se usan como características filogenéticas y taxonómicas, en primer lugar se uso la forma de las conidias, luego se uso la ontogenesis o desarrollo de conidios hasta llegar al sistema unitario de características que intenta definir tantas características morfológicas de los hongos conidiales como se a posible para determinar los generos y determinar su correspondencia con los taxones sexuales (16).

Los hongos se reproducen principalmente mediante esporas. Las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la separación de pequeños fragmentos del micelio en esporas) o ser el resultado de un proceso sexual.

En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y son diseminadas en el momento en que se rompe esta estructura o a través de una abertura que posee. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se les denomina zoosporas.

La reproducción sexual, o los procesos que se asemejan a ella, se presentan en la mayoría de los grupos de los hongos. En algunos de ellos, un par de células (gametos) de tamaño y forma semejante se fusionan y producen un cigoto, denominado zigospora.

Hasta la fecha no se sabe que los hongos imperfectos se reproduzcan sexualmente, debido a que este fenómeno no se presenta en este amplio grupo de hongos o a que aun no se ha podido descubrir en ellos.

En la mayoría de los hongos, los gametos masculino y femenino se forman en un mismo micelio (como es el caso de los hongos hermafroditas). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos del mismo micelio, al hongo se le denomina homotálico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan únicamente a los gametos femeninos de otro micelio sexualmente compatible, por lo que se dice que el hongo es heterotálico (5).

### **3.9.5 Ecología y diseminación:**

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan parte de su vida en las plantas que les sirven de hospederos, y otra parte de él en el suelo o en los residuos vegetales depositados en este sustrato. Algunos hongos pasan todo su ciclo de vida sobre el hospedero y sólo sus esporas se depositan en el suelo, donde permanecen en reposo hasta que son llevadas a un hospedero en el que germinan y se reproducirán.

La supervivencia y función de la mayoría de los hongos fitopatógenos depende ampliamente de las condiciones predominantes de temperatura y humedad o de la presencia de agua en su medio ambiente. Un micelio libre solo sobrevive dentro de un cierto rango de temperatura ( que va de  $-5$  a  $45^{\circ}$  C ) y cuando entra en contacto con superficies húmedas ya sea que se localicen por fuera de una planta hospedera o en el interior de esta. Sin embargo, la mayoría de las esporas resisten rangos bastante amplios de temperatura y humedad.

En la mayoría de los hongos, la diseminación de las esporas se efectúa en forma pasiva, aunque su liberación inicial en algunos hongos es enérgica. La distancia a la que las esporas son diseminadas varía con respecto al agente de diseminación. Es muy probable que el viento sea el agente más importante en la diseminación, otros agentes lo constituyen el agua y los insectos (5).

### **3.9.5 Clasificación de los hongos fitopatógenos:**

Los hongos que producen enfermedades en las plantas constituyen un grupo diverso y, debido a su abundancia y diversidad, aquí sólo se presentará una clasificación superficial de algunos de los géneros fitopatógenos más importantes.

### **3.9.6 Identificación:**

Existen más de 100000 especies de hongos, la identificación del hongo que afecta a una planta, puede facilitarse ya que existen guías especializadas donde se enlistan que hongos afectan específicamente dicho cultivo, con lo que se reduce considerablemente el número de posibles hongos responsables de la infección.

Las características más importantes de los hongos que se utilizan para su identificación, son sus esporas y cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de esporas). Estos órganos se examinan directamente en el microscopio compuesto después de haber sido retirados de la planta a la que han identificado. Con frecuencia, el espécimen infectado debe mantenerse húmedo durante algunos días para permitir el desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo o, en todo caso, este último debe aislarse y cultivarse en medios artificiales a fin de que su identificación se realice en base a los cuerpos fructíferos.

Debido a que por lo general siempre hay listas de los patógenos que afectan a una determinada planta hospedera, deben utilizarse los índices de hospederos como medios de rápida consulta de los nombres de las especies de hongos que pudieran corresponder al hongo que se desea identificar (5).

### **3.10 METABOLITOS SECUNDARIOS**

#### **DEFINICIONES:**

##### **3.10.1 ALCALOIDES**

Son sustancias básicas que contienen uno o mas átomos de Nitrógeno, usualmente forman parte de un sistema heterocíclico. Su clasificación es amplia y variada. Se encuentran en las plantas casi siempre en forma de sales, combinados con los ácidos más simples de los vegetales. Se menciona como ejemplo, la atropina, que es el alcaloide de la belladona, la morfina de la adormidera, o la colchicina del cólquico. Muchos alcaloides poseen acción antibacteriana, antiespasmódica, sedante, hipnótica, anestésica, laxante, broncodilatadora y anticancerígena (3).

##### **3.10.2 PRINCIPIOS AMARGOS**

Son las sustancias químicas caracterizados por el sabor amargo y su estructura terpenoide. La mayor parte derivan de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, todos ellos, tienen en común unidades de isopreno. Muchos terpenos han mostrado actividad antitumoral, citotóxica y antifúngica. Los principios amargos estimulan la secreción de jugos gástricos y desarrollan además una acción tónica. También tienen propiedades citotóxicas, antitumorales, analgésicas, antimaláricas, antibacterianas y amebicidas (3).

##### **3.10.3 ACEITES ESENCIALES**

Son componentes vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles; su olor es intenso. En algunos casos se llaman esencias. Generalmente constituyen los principios sápidos y aromáticos de las plantas. Derivan del isopreno, están formados de su mayoría por monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. Los aceites esenciales son los principios odoríferos de flores y especias se utilizan en la elaboración de perfumes, como saborizantes, analgésicos dentales, desinfectantes, expectorantes, sedantes, antiespasmódicas y actúan como repelentes de insectos (3).

##### **3.10.4 FLAVONOIDES**

Sustancias que tienen una misma composición química base, todos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico denominado flavona, y están arreglados bajo un sistema  $C_6C_3C_6$ . Entre sus funciones fisiológicas se encuentran la inhibición de sistemas enzimáticos y contribuyen a la polinización. Los flavonoides tienen la propiedad de actuar como conservadores de grasas o jugos de frutas debido a sus efectos antioxidantes. Presentan acción antibacteriana, anticancerígena, antifúngica y también como insecticidas (3).

### **3.10.5 TANINOS**

Se refieren a un grupo de sustancias químicas que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos que se encuentran formando glicósidos. Son componentes vegetales que están en condiciones de ligar las proteínas de la piel y mucosa, para transformarlas en sustancias insolubles resistentes. También se clasifican como polímeros fenólicos, de elevado peso molecular que forman coloides. Los taninos se caracterizan por su acción antibacteriana, anticancerígena por su uso en la curtiembre de cueros (3).

### **3.10.6 SAPONINAS**

Son glicosidos derivados de triterpenos o de esteroides. Se conocen 2 grupos: tipo esteroidal y triterpenoidal. Las saponinas son glicósicos vegetales que junto con agua forman una espuma permanente, que emulsiona el aceite en el agua y que poseen un efecto hemolítico importante. Las saponinas producen espuma más o menos estable, ya que son poderosos agentes tensoactivos. Cuentan con propiedad detergente, edulcorante, expectorante, diurética, antiinflamatoria y se ha reportado que sirven como materia prima para la síntesis de hormonas esteroidales (estrógenos, anticonceptivos orales, andrógenos y otros) (3).

### **3.10.7 ANTRAQUINONAS**

Constituyen el grupo más grande de sustancias del tipo quinona presentes en la naturaleza, suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado. Las antraquinonas presentan actividades antivirales por la inhibición del anión superóxido que producen los neutrófilos humanos, además presentan acción catártica, antifúngica, antibacterial, antiprotozoaria y en terapias biliares (3).

### **3.10.8 CUMARINAS**

Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas. Se caracterizan por el sistema benzo alfa pirona y su carácter lactónico hace que sean solubilizadas por soluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo. Su configuración química es  $C_6C_3$ . Las cumarinas presentan actividad estrogénica, insecticidas, antiviral, anticoagulante, saborizante, en perfumería, antiinflamatoria y anticancerígena (3).



#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Guatemala es un país predominantemente agroforestal donde se produce una gran variedad de productos, a los que se aplican cantidades considerables de fungicidas. Sin embargo, en el país se tiene un limitado conocimiento sobre los posibles efectos de los fungicidas en la salud de la población expuesta y sobre el medio ambiente.

El Quequesque es una planta ornamental, la cual es utilizada por agricultores como fungicida, dando resultados favorables en el control de hongos, constituyéndose como una alternativa del uso de pesticidas sintéticos, favoreciendo al ambiente y a la economía.

Al no existir registro de dicha actividad, se hace necesario validar científicamente su efecto fungicida, y determinar la familia de metabolitos secundarios responsables de este tipo de actividad biológica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 GENERAL:

5.1.1 Validación de la actividad antifúngica atribuida al tubérculo de X. robustus (Quequesque).

5.1.2 Determinación de la(s) familia(s) de metabolitos secundarios responsable(s) de la actividad antifúngica de X. robustus (Quequesque).

### 5.2 ESPECIFICOS:

5.2.1 Aislar, purificar e identificar algunos de los hongos fitopatógenos que afectan cultivos de café, tomate y maíz con la finalidad de establecer una batería de hongos en la cual, por medio de bioensayos se determine la fracción del extracto del tubérculo con actividad antifúngica.

5.2.2 Realizar el fraccionamiento fitoquímico de extractos acuoso y etanólico del quequesque para determinar cuál es la fracción que presenta actividad antifúngica.

5.2.3 Identificar la familia de metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica del tubérculo de X. robustus (Quequesque)

## 6. HIPOTESIS

Los extractos etanólico y acuoso de X. robustus presenta actividad antifúngica y es posible realizar tamizaje fitoquímico del extracto para identificar la/las familia(s) de metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Universo

Tubérculo de X. robustus

### 7.2 Materiales

#### 7.2.1 Recursos Físicos

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT-

#### 7.2.2 Equipo y aparatos

Rotavapor Buchi 15060107

Cromatoplasmas de sílica gel G60f-254

Columna cromatográfica de vidrio de 3x50cm

Espectrofotómetro infrarrojo PE-283

Espectrofotómetro UV-VIS PE-Lambda III

Balanza analítica AND 0-200g FR-200

Balanza semianalítica O'hauss 0-2kg GT-4100

Horno de convección VWR 1300U

Desecadora

Cajas de petri

#### 7.2.3 Cristalería

Beakers de 100, 250, 500, 1000ml

Probetas de 10, 50, 100ml

Balones de fondo redondo

Erlenmeyer de 25, 250ml

Tubos de ensayo

Cámara cromatográfica de vidrio de 250x40x80mm

Micropipetas de vidrio

Vidrios de reloj

## 7.2.4 Reactivos

Metanol  
Etanol al 80%  
n-butanol  
Ácido acético  
Acetona  
Diclorometano  
Cloroformo  
Silica gel G-60

## 7.2.5 Cepas de hongos

No existe cepario de hongos fitopatógenos en las facultades de CCQQ y Farmacia y Agronomía de la USAC, por lo que se deberá cultivar los hongos que afectan a las plantas de interés.

## 7.3 Métodos

### 7.3.1 Aislamiento, purificación e identificación de hongos fitopatógenos

1. Esterilización del material de cristalería, que incluye cajas de petri, tubos de ensayo, pipetas, etc,. Mediante calor seco ( de 15 160<sup>0</sup> C durante una hora o más) o autoclave, o bien sumergiendo ese material durante un minuto o más en una solución de ácido sulfúrico – dicromato de potasio , en cloruro mercuríco 1 : 1000, en formalina al 5% en alcohol etílico al 95%. Enjuagar con agua estéril por lo menos 3 veces.
2. Preparación de soluciones para tratar la superficie del tejido infectado, con el fin de eliminar o reducir notablemente los contaminantes de superficie: solución de hipoclorito de sodio al 5.75%, alcohol etílico al 95%, cloruro de mercurio 1 : 1000, los tejidos deben secarse con un trozo de papel estéril cuando sean tratados con las dos primeras soluciones y pasarse por tres cambios de agua estéril.
3. Preparación de medios de cultivo en el que se desarrollan los hongos y bacterias patógenos. Puede utilizarse un gran número de medios de cultivo. Algunos de ellos son totalmente sintéticos hechos a base de cantidades conocidas de ciertos compuestos químicos y por lo general son bastante específicos. La mayoría de los medios de cultivo contienen un extracto de una fuente natural de carbohidratos y otros nutrientes como papa, harina de maíz, habas o extracto de malta, a los que se le añaden cantidades variables de agar para solidificar el medio y formar un gel en el que se desarrollara el patógeno.

### 7.3.2 Aislamiento del patógeno de hojas:

En caso de que la infección de las hojas de una planta avance en forma de tizón o una mancha folia fungosa y en caso de que las esporas del hongo aparezcan sobre su superficie, algunas de esas esporas deben depositarse sobre una caja de petri que contenga medio de cultivo o bien deben recolectarse con la punta de una aguja estéril o un escalpelo y colocarse sobre la superficie del medio de cultivo. Si el hongo crece en cultivo, al cabo de unos cuantos días aparecerán colonias de micelio aisladas debido a la germinación de las esporas. Estas se resiembran en placas y de esta forma se asegura que algunas de ellas contengan al patógeno libre de cualquier tipo de contaminante.

En ocasiones, el aislamiento del patógeno se logra mediante la esterilización superficial de la zona infectada con soluciones de cloro o de Rada, separando una pequeña porción de tejido infectado con un escalpelo estéril u otro objeto y colocándola en una caja de Petri que contenga un medio de cultivo.

Sin embargo el método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es aquel en el que se seleccionan varios cortes pequeños de 5 a 10mm<sup>2</sup> a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos. Esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, a fin de que cada uno de ellos se esterilice (a nivel de superficie) a diferentes tiempos. Algunos de los cortes depositados en el esterilizante de superficie durante periodos intermedios permitirán que solo el patógeno se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que se ha permitido que el esterilizante actué el tiempo suficiente para destruir a todos los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno. Y para terminar de purificar la cepa se cambia de caja hasta lograrlo.

### 7.3.3 Obtención del material vegetal a analizar

Tubérculo de Xanthosoma robustus (Quequesque), proporcionado por FUNDEBASE en fresco y clasificado por el Ing. Mario Veliz del Herbario BIGUA de la Facultad de CCQQ y Farmacia.

### 7.3.4 Obtención del extracto acuoso del tubérculo del Quequesque

Se procede a pelar y picar el tubérculo en pequeñas porciones, se pesa una cantidad conocida y se deja en un recipiente cerrado con una cantidad de agua determinada, durante 4 – 5 días para una extracción efectiva (maceración). Lo anterior coincide con el método empírico utilizado por los agricultores en el campo.

### **7.3.5 Obtención del extracto madre.**

El material vegetal seco y molido se coloca en una percoladora de vidrio y se le agregan disolventes en orden decreciente de polaridad empezando con hexano, luego cloroformo y por último etanol al 80%. Cada uno de los disolventes se agrega en tres porciones sucesivas de 1L cada una (pueden ser hasta 5, dependiendo de la intensidad del color de las fracciones extraídas) Entre cada porción se deja reposar el solvente por una noche, luego se recolecta y se unifican todas las fracciones.

### **7.3.6 Concentración del extracto madre.**

Se obtienen como mínimo 3L de extracto madre, los cuales se concentran en rotavapor a una temperatura no mayor de 55<sup>0</sup>C hasta llegar a una consistencia pastosa.

### **7.3.7 Cromatografía en columna con Sephadex.**

Se pesan entre 1 y 3 g de extracto madre y se disuelven con la menor cantidad posible de metanol. Se empaca una columna de vidrio de 3 x 50cm utilizando 100g de Sephadex y 500 ml de metanol y se deja reposar hasta que toda la fase estacionaria se empaque bien. Se eluye el extracto madre en la columna (por gravedad) utilizando metanol como fase móvil. Se colectan las fracciones en tubos de ensayo, deben obtenerse aproximadamente 3 ml y cambiar de tubo, hasta que todo el extracto ha eluido.

### **7.3.8 Cromatografía en capa fina**

Todas las fracciones obtenidas se analizan por cromatografía en capa fina utilizando 2 diferentes fases móviles; butanol:agua:ácido acético (60:25:15) y cloroformo:metanol:agua (80:18:2) para determinar cuales son las que pueden unirse.

### **7.3.9 Realización de bioensayos**

Las fracciones obtenidas en cromatografía en columna y en cromatografía en capa fina se concentran nuevamente en rotavapor y se llevan a una consistencia pastosa, se anota el peso de cada una y se prueba su actividad antifúngica contra las especies de hongos aislados e identificados. En esta parte se determinará cual de las fracciones obtenidas presenta mayor actividad, es decir contra todas o el mayor número de especies de hongos en estudio.

### 7.3.10 Bio-ensayo para la determinación del efecto antifúngico del Quequesque

Tamizaje antimicótico *in-vitro*

Preparación de medio de cultivo para hongos filamentosos

Preparar tubos con 13.5ml de agar Sabouraud

Esterilizar, dejar enfriar a 50<sup>0</sup> C y agregar 1.5ml del extracto de la planta a probar (Dilución 1:100). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1mg/ml

Verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36<sup>0</sup> C durante 24 horas para chequear esterilidad.

Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

#### 1.2 Preparación de inóculo de hongos filamentosos

##### 1.2.1 Preparar medio de Takashio (Sabouraud

modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6g
NaSO <sub>4</sub>	0.3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3g
Peptona	0.3g
Agar-agar	0.6g

Agregarlo a 300ml de agua, disolver, verter 10 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48horas a 25<sup>0</sup>C para descartar contaminación.

1.2.2 Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27<sup>0</sup>C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo.

1.2.3 Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.

1.2.4 Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar un minuto en vortex y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.

1.2.5 Llevar la suspensión a 100esporas/ $\mu$ l =  $1 * 10^5$  esp/ml (aproximadamente 10 esporas/ cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

1.3 Inoculación de hongos filamentosos en placa. Se abren cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5mm de diámetro. En forma equidistante. Tomar 30 $\mu$ l de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27<sup>0</sup>C por 14 días. Hacer 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

1.4 Lectura e interpretación de resultados. Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.

Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.



## **7.4 Tamizaje fitoquímico del tubérculo del Quequesque**

### **7.4.1 Determinación de Alcaloides:**

#### **Preparacion del extracto para cromatografía en capa fina:**

Humedecer 1g del material vegetal con 1 ml de solución de hidróxido de amonio 10%. Extraer con 5ml de metanol, agitando esporádicamente mientras se calienta a 60°C durante 15 minutos.

#### **Fase estacionaria:**

Cromatoplasacas de silica gel G60f – 254

#### **Fase móvil:**

Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10)

#### **Estándar:**

Solución alcoholica de quinina o emetina al 1%

#### **Detección:**

Revelador Reactivo de Dragendorff:

Se observan manchas de color café o naranja luego de asperjar. Los colores no son estables. Las manchas pueden hacerse más intensas si se asperja primero el reactivo de Dragendorff y luego una solución de nitrito de sodio al 5% ó ácido sulfúrico al 5% en etanol.

### **7.4.2 Determinación de saponinas:**

#### **7.4.2.1 Test de espuma:**

Pesar 100mg de material vegetal seco y pulverizado y colocarlo en un tubo de ensayo. Para comparar utilizar 2 tubos control: a) 2 ml de control de saponinas(preparación: disolver 250 mg de estándar de saponinas en 50ml de agua). b) 2 ml de agua destilada.

Añadir 10 ml de agua destilada a cada tubo. Calentar en baño de maria durante 30 minutos.

Enfriar, tapar y agitar vigorosamente durante 30 a 40 seg. Dejar reposar los tubos en posición vertical durante media hora. Si luego de transcurrido este tiempo se observa una capa de espuma mayor de 3 cm. En la superficie del líquido, se presume que la muestra contiene saponinas. Si la espuma es poca y fugaz atribuirse a una mínima concentración de saponinas o también a la presencia de proteínas o ácidos orgánicos.

#### **7.4.2.2 Test de hemolisis:**

Preparar una caja de petri con agar sangre y usando un tubo de ensayo de aproximadamente 1 cm de diámetro, remover una capita de agar sangre de 3 partes diferentes de la caja, equidistantes entre si.

Calentar con un mechero un agitador de vidrio de 1 a 2 mm de diámetro, e inmediatamente sellar los bordes del agar de cada agujero, de manera que al introducir dentro de cada copa el líquido de las muestras, no se difunda por debajo de la capa de agar. Es posible que se requiera repetir varias veces el calentamiento hasta sellar adecuadamente.

Utilizando un gotero o una pipeta Pasteur, añadir suficiente extracto vegetal acuoso a una de las copas hasta casi llenarla, de modo que la muestra no se extienda sobre la superficie del agar-sangre. Llenar la segunda copa con control de saponinas y la tercera con agua destilada.

Dejar en reposo durante 24 horas, y observar la presencia de zonas claras de hémolisis que circunden cualesquiera de las copas. Si se encuentran presentes, medir la zona desde el punto más lejano de hémolisis a la orilla de la copa (en mm). Anotar los resultados.

#### **7.4.2.3 Cromatografía en capa fina:**

Se realiza esta prueba sólo en caso de que el resultado del test de espuma haya sido positivo.

##### **Preparación del extracto:**

Extraer 1 g del material vegetal pulverizado con 5 ml de metanol, calentando en baño de maría durante 15 minutos. Evaporar hasta aproximadamente 1 ml, mezclar con 0.5 ml de agua, y luego extraer con 3 ml de butanol. La fase butanólica se utiliza para cromatografía.

**Solución Estándar:**

Preparar una solución de saponinas al 0.1% en metanol.

**Fase estacionaria:**

Cromatoplasmas de sílica gel 60 F-254

**Fase móvil:**

Cloroformo-metanol-agua (65:50:10)

Con esta fase móvil se separan todas las mezclas de saponinas contenidas en drogas vegetales. Sin embargo, la mezcla debe ser preparada EXACTAMENTE. Debe emplearse cloroformo grado analítico (el de grado técnico contiene alcohol), y la cromatografía debe realizarse a 20<sup>0</sup> C, 30 minutos después de haber añadido el solvente, para saturar la cámara. A temperaturas más altas, la separación no es lo suficientemente adecuada.

**Detección:**

Reactivo de cloruro de antimonio III:

Preparar una solución de cloruro de antimonio al 20% en cloroformo. Asperjar la cromatoplasma. Luego calentar por 5-6 minutos a 100<sup>0</sup>C. Evaluar en visible (colores rojo-violeta) o bajo luz UV de 365nm (fluorescencia rojo-violeta, azul y verde).

**7.4.3 Determinación de taninos y/o compuestos fenolicos:**

Extraer 10g de material vegetal con 25ml de agua destilada, llevando a ebullición durante 15 minutos.

Dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar de 3 a 4 gotas de solución de NaCl al 10%, con el objeto de precipitar cualquier compuesto no-taninico, y evitar un resultado falso-positivo.

Filtrar la solución o suspensión resultante ya sea al vacío o por gravedad, y transferir 3 ml del filtrado a cada uno de cuatro tubos de ensayo.

Añadir a cada uno de los tubos de ensayo el reactivo que se indica:

Tubo 1: 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1%

Tubo 2: 4 a 5 gotas de react. De gelatina-sal (1% gel 10%sal)

Tubo 3: 3 a 4 gotas de soln. De  $\text{FeCl}_3$  al 10%

Tubo 4: ningún reactivo (control).

Observar en cada caso si se produce formación de precipitado, y/o cambio de color.

#### **Interpretación de resultados:**

La ausencia de reacción con cloruro férrico, implica carencia de taninos y compuestos fenólicos.

Un color grisáceo o negro-grisáceo al reaccionar con cloruro férrico (asumiendo que se forma precipitado luego del test de sal-gelatina), implica presencia de taninos del tipo catecol.

Un color negro-azulado al añadir cloruro férrico (asumiendo que hubo precipitado en el ensayo de sal-gelatina) implica presencia de taninos del tipo pirogalol.

Un resultado negativo con el test de sal gelatina, pero producción de color grisáceo o negro-azulado, luego de añadir cloruro férrico, implica ausencia de taninos, y los cambios de color se atribuyen a otros constituyentes fenólicos del vegetal.

#### **7.4.4 Determinación de flavonoides:**

##### **Preparación del extracto:**

Extraer 1 g de material vegetal con 10 ml de metanol durante 5 min a  $60^\circ\text{C}$ , en baño de maria. Filtrar y utilizar el filtrado claro para la cromatografía:

##### **Solución estándar:**

Rutina al 0.05% en metanol. El límite de detección promedio para flavonoides es 5-10 microgramos.

##### **Fase estacionaria:**

Silica el G60 F-254

##### **Detección:**

Eliminar los residuos de solvente (ácidos) de la cromatoplaca con la ayuda de una secadora de pelo.

**Sin tratamiento Químico:**

Observar bajo luz UV – 254 nm todos los flavonoides fluorescen como zonas azules oscuras sobre fondo amarillo. Bajo luz UV-365 nm los flavonoides fluorescen, dependiendo del tipo de estructura, ya sea de color amarillo, azul o verde. Algunos extractos de plantas, como el caso de la ruda, frecuentemente contienen otros materiales, tales como ácidos de plantas y cumarinas, que forman zonas fluorescentes de color azul.

**Revelador:**

Asperjar la cromatoplaaca primero con difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol, y luego con polietilenglicol-4000 al 5% en etanol.

Se produce intensa fluorescencia a 365nm, ya sea inmediatamente, o después de 15 minutos. El polietilenglicol incrementa la sensibilidad desde 10 hasta 2.5 microgramos. La fluorescencia es dependiente de la estructura.

**7.4.5 Determinación de antraquinonas:****Preparación del extracto**

Extraer 0.5 g de material vegetal con 5 ml de metanol, calentando durante 5 minutos en baño de maria. Filtrar y utilizar el filtrado claro para cromatografía.

**Fase estacionaria:**

Silica gel 60 F-254

**Fase móvil:**

n-propanol-acetato de etilo-agua (40:40:30)

**Detección:**

Reactivo de ácido nítrico-hidroxido de potasio

Asperjar con ácido nítrico concentrado y calentar por 15 min a 120°C. Luego asperjar con hidróxido de potasio al 10% en etanol. Los senósidos se detectan como 7-9 bandas de color café-rojizo (vis) o como zonas fluorescentes amarillo-limón o celestes (UV 365nm). Las bandas principales se deben al senósido A (Rf 0.4) y al senósido B (Rf 0.2). El senósido D aparece a un Rf de 0.5-0.55; el senósido C se observa como una banda débilmente coloreada (Rf 0.7), y ka reina, de color rojo-naranja (Rf 0.8). Las otras agliconas migran al frente del solvente.

#### **7.4.6 Determinación de cumarinas:**

##### **Preparación del extracto:**

Extraer 1 g de material vegetal pulverizada con 10ml de metanol, agitando esporádicamente durante 30 minutos, en baño de maria. Filtrar y evaporar el filtrado claro hasta aproximadamente 1 ml. Aplicar sobre la cromatoplaça.

##### **Solución estandar:**

Preparar una solución de cumarina al 1% en metanol.

##### **Fase estacionaria:**

Cromatoplaças de sílica gel 60 F-254

##### **Fase móvil:**

Tolueno-acetato de etilo (93:7)

##### **Detección:**

##### ***Sin tratamiento químico:***

Luz UV 254nm

Todas las cumarinas muestran clara fluorescencia

Luz UV 365nm

Todas las cumarinas muestran intensa fluorescencia azul o azul-verdosa. Las furanocumarinas fluorescen de color amarillo, café o azul (límite de detección: 1 microgramo)

##### ***Revelador: reactivo de hidróxido de potasio.***

Las cumarinas no sustituidas fluorescen de color amarillo-verdoso en UV 365nm. Sólo después de asperjar con reactivo de KOH (KOH al 5% ó 19% en etanol). La placa es asperjada y evaluada ya sea en visible o bajo luz UV 365nm con o sin calentamiento. Las cumarinas se observan azules a esta longitud de onda.

#### **7.4.7 Determinación de aceites volátiles:**

##### **Preparación del extracto:**

Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10ml de diclorometano, agitando esporádicamente durante 15 min. Filtrar la suspensión, y evaporar el filtrado claro hasta sequedad, en baño de maria. Disolver el residuo en 1 ml de tolueno, y aplicar sobre la cromatoplaça.

NOTA. Este método también extrae otras sustancias lipofílicas

##### **Solución estándar:**

Preparar una solución de mentol (proporción 1:30) en tolueno.

##### **Fase estacionaria:**

Cromatoplaças de sílica gel 60 F-254

##### **Fase móvil:**

Tolueno-acetato de etilo (93:7)

Este sistema es útil para el análisis y comparación directa de todos los aceites esenciales de importancia:

##### **Detección:**

Sin tratamiento químico:

Luz UV 254 nm todos los compuestos que contienen por lo menos dos dobles enlaces conjugados fluorescen. Los derivados del fenilpropano poseen esta propiedad, ejemplo el anetol safrol, apiol, eugenol. Otros compuestos que fluorescen son el cinamaldehido, anisaldehido, timol y piperitona.

Luz UV 365 nm. El metil-antranilato muestra intensa fluorescencia azul.

##### **Revelador:**

Vainilla-ácido sulfúrico:

Solución I: ácido sulfúrico al 5% en etanol

Solución II: vainillina al 1% en etanol

Asperjar vigorosamente la placa con la solución I, e inmediatamente con la solución II. Después de calentar a 110<sup>0</sup>C durante 5-10min bajo observación, evaluar la placa en visible.

El reactivo detecta los componentes de los aceites esenciales (terpenoides, derivados de fenilpropano, fenoles, etc., ) Las coloraciones observadas en visible varían entre azul intenso, verde, rojo y café.

#### **7.4.8 Determinación de principios amargos:**

##### **Preparación del extracto:**

Extraer 1g de material vegetal pulverizado con 10ml de metanol, calentando en baño de maría, a 60<sup>0</sup>C durante 10 minutos. Filtrar la mezcla, y evaporar el filtrado hasta un volumen de aproximadamente 2 ml Utilizar hojas de Neurolaena lobata como control, extrayendo de igual manera.

##### **Solución estándar:**

Preparar una solución de artemisinina al 1% en metanol

##### **Fase estacionaria:**

Cromatoplacas de sílica 60 F-254

##### **Fase móvil:**

Cloroformo-metanol (95:5)

##### **Detección:**

Sin tratamiento químico:

UV 254nm

Sustancias con dobles enlaces conjugados, tales como la cuasina, muestran fluorescencia

Revelador: anisaldehído-ácido sulfúrico

Mezclar 0.5ml de anisaldehído con 10ml de ácido acético glacial, seguido por 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en este orden.

El reactivo tiene limitada estabilidad, y no debe usarse cuando el color se torna rojo-violáceo. Luego de asperjar la placa se calienta a 100<sup>0</sup>C durante 5 10 min y se observa en visible o bajo luz UV 365nm

Se observan las siguientes coloraciones: rojo-violeta, café-rojizo, azul-verdoso y azul.



## 7.5 Determinación cuantitativa de azufre en el Quequesque

Pesar 1 gramo de muestra en una cápsula de porcelana grande. Agregar 7.5 ml de solución de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (disolver 950 gramos de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  libre de P; en agua destilada y aforar a 1 litro), procurando que todo el material entre en contacto con la solución de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  para garantizar la completa oxidación del azufre presente en la muestra. Calentar en estufa a  $180^\circ\text{C}$  hasta que ya no se de mas reacción. Transferir la cápsula caliente al horno a una temperatura menor o igual a  $500^\circ\text{C}$  y manténgala hasta que la muestra se oxide completamente. ( No deben existir partículas de color negro, si es necesario remueva la muestra y regrésela al horno). Retire la cápsula y déjela enfriar. Agregar agua y HCl en exceso. Llevar la solución a ebullición, filtrar y hacer lavados con agua destilada a la cápsula. Si prefiera transfiera la solución a un beacker de 250ml y diluya con agua destilada.

Determinación:

Diluir completamente la solución filtrada a 200ml, tomar una alícuota de 100ml y tratarla como sigue:

Diluir la alícuota aproximadamente a 200ml con agua destilada y agregar HCl hasta aproximadamente 0.5ml de ácido libre. Calentar hasta ebullición y agregar 10ml de una solución de  $\text{BaCl}_2$  al 10% agitando constantemente. Continúe calentando por 5 minutos aprox. Y mantenga esta temperatura durante 5 horas aprox. Mantener caliente el recipiente. Decantar a través de papel filtro o quemar y pesar gooch. Agregar de 15 a 20 ml de agua hirviendo al precipitado, transferir a un filtro y lavar con agua caliente hasta que el precipitado este libre de cloro. Secar el sólido y pesar, quemar, y pesarlo como  $\text{BaSO}_4$

$$\text{Peso de ppt} * 0.1374 = \text{S}$$

## 7.6 Determinación de glicosidos cianogenicos

### 7.6.1 Test de Guignard

1. Introduzca de 2 a 5 gm de su muestra vegetal en un frasco erlenmeyer de 125ml y adicione agua destilada en cantidad suficiente para humeder la muestra.
2. Prepare una tira de papel filtro (Watman No. 1) con picrato de sodio a través de la introducción de la tira de papel en una solución de picrato de sodio frescamente preparada y luego deje secar la tira.  
Solución de picrato de sodio: 5 g. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.5 g. de ácido picrico y agua en cantidad suficiente para completar 100ml.
3. Adicione 1 ml de cloroformo al erlenmeyer que contiene la muestra humedecida. Esto mejorará la actividad enzimática.

4. Inserte la tira con picrato de sodio en el erlenmeyer tomando cuidado de que la misma no toque las paredes del frasco y deje un espacio de 1 cm entre la muestra y la parte inferior de la tira; luego doble la parte inferior de la tira; luego doble la parte superior de la tira en la orilla de la boca del erlenmeyer.
5. Tape el frasco con un corcho y caliente a una temperatura de 35<sup>0</sup> C durante 3 horas o más.
6. Observe cualquier cambio de color en el papel. Concentraciones altas de HCN se detectan generalmente dentro de 15 minutos y el cual es evidenciado mediante cambio de color que sufre el papel de picrato, el cual pasa de color amarillo a rojo-café. Ningún cambio de color al término de las 3 horas indica ausencia de glicosidos cianogenicos.

### 7.6.2 Control

Lleve a cabo un experimento de control similar y utilice para ello corteza de cereza silvestre u otro heteróxido cianogenico que sepa que existe en plantas.

## 7.7 Diseño de la investigación

### 7.7.1 Diseño experimental

Diseño de bloques al azar

El número de réplicas es el necesario para realizar un ensayo binomial con un nivel  $\alpha = 0.10$  (de acuerdo a la tabla de la distribución de probabilidad binomial).

Respuesta:

Inhibición (+)  
No inhibición (-)

### 7.7.2 Análisis de resultados:

Prueba de hipótesis binomial

Ho:  $p = q = 0.5$   
Ha:  $p > 0.5$

Con  $n = 4$  ensayos (de c/hongo) se espera que los 4 sean éxito (+) para rechazar Ho y concluir que la planta (infusión o extracto) tiene efecto antifúngico ( $p < 0.10$ ).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS

Cultivos infectados de los cuales se aislaron los hongos fitopatógenos: café, tomate, chile, maíz.

Los cultivos fueron seleccionados al azar, y se encuentran en la aldea Tzalpetei, San Antonio Palopó, Sololá, Guatemala, 1800msnm.

Se lograron aislar 37 diferentes “microorganismos”

### 8.2 PURIFICACION DE HONGOS FITOPATOGENOS

En el proceso de purificación o de reinoculación se trabajaron únicamente 20 cepas (ver anexo 1). Se descartaron las cepas que presentaban impurezas como otros hongos, bacterias, ácaros, etc.

### 8.3 IDENTIFICACION DE HONGOS FITOPATOGENOS

Se realizó una identificación de campo *in situ* a los hongos que se encontraban afectando las plantas que se colectaron, y estos son los resultados del trabajo de campo:

Fumagina  
Cercospora  
Cenicilla  
Helminthosporium  
Phytophthora  
Aspergillus  
Penicillium  
Phoma  
Antracnosis  
Tizón  
Fusarium

Los anteriores fueron identificados por el Ing. Agrónomo Edil Rodríguez de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

De las 20 cepas de hongos fitopatógenos aisladas se lograron identificar las siguientes cepas:

1. Fusarium sp
2. Aspergillus \*
3. Coletotricum
4. Mucor sp
5. Penicillium \*

\* Cepas “estándar” incluidas para los bioensayos (proporcionadas por el Departamento de Microbiología General).

Todas las cepas se sometieron a cultivo en placa para identificación.

#### **8.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ESPORAS**

Se sembraron los hongos en un medio pobre en nutrientes (Takashio) para inducir esporulación.

Se prepararon soluciones de esporas de cada una de las cepas hasta una concentración de 100 esporas por microlitro.

#### **8.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS**

##### 8.5.1 Extracto acuoso:

Se pesaron 2,200gramos de material vegetal crudo, en 1 galón de agua, después del proceso de percolación y filtrado se sometió el extracto a liofilización del cual se obtuvieron 31.18 gramos de extracto acuoso.

##### 8.5.2 Extracto etanólico:

Se pesaron 400 gramos de material vegetal seco, en 2.5 litros de etanol, después del proceso de percolación y filtrado se sometió el extracto a reconcentración en rotavapor, del cual se obtuvieron 30.2 gramos de extracto etanolico seco.

##### 8.5.3 Partición por solventes:

A partir del extracto etanólico, se realizaron las extracciones líquido – líquido con los siguientes solventes: Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo. Se eliminaron los solventes y los extractos se dejaron en una desecadora para eliminar la mayor cantidad de solvente.

## 8.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Se determinó presencia o ausencia de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina a los extractos acuoso y etanólico, Según fuentes de bases de datos consultadas no existía información al respecto, para el X. robustus.

**Tabla 1: Tamizaje fitoquímico**

<u>METABOLITO SECUNDARIO</u>	<u>EXTRACTO ACUOSO</u>	<u>EXTRACTO ETANOLICO</u>
ALCALOIDES	+	+
FLAVONOIDES	-	+
CUMARINAS	+	+
ANTRAQUINONAS	+	+
TANINOS	+	+
SAPONINAS	+	+
PRINCIPIOS AMARGOS	-	+

- + Presencia de metabolito secundario
- ausencia de metabolito secundario

Una porción de material vegetal seco se sometió a análisis de determinación de aceites esenciales, por el método de hidrodestilación "Neoclevenger", obteniendo como resultado presencia de aceite esencial pero en una cantidad mínima (no cuantificable). No se logro cuantificar azufre y glicosidos cianogenicos.

## 8.7 BIOENSAYOS

tabla 2. extracto acuoso:

	Concentraciones utilizadas de los extractos					
	0.0mg/ml CONTROL	0.5 mg/ml	0.250 mg/ml	0.125 mg/ml	0.05 mg/ml	0.0250 mg/ml
<u>Fusarium</u>	-	+	+	-	-	-
<u>Aspergillus</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Coletotricum</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Mucor</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Penicillium</u>	-	+	+	+	-	-

(+) **Inhibe:** Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparando con el control.

Tabla 3. extracto etanólico:

	Concentraciones utilizadas de los extractos					
	0.0mg/ml CONTROL	0.5 mg/ml	0.250 mg/ml	0.125 mg/ml	0.05 mg/ml	0.0250 mg/ml
<u>Fusarium</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Aspergillus</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Coletotricum</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Mucor</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Penicillium</u>	-	+	+	+	+	-

(+) **Inhibe:** Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

Tabla 4. extracto hexanico:

	Concentraciones utilizadas de los extractos					
	0.0mg/ml CONTROL	0.5 mg/ml	0.250 mg/ml	0.125 mg/ml	0.05 mg/ml	0.0250 mg/ml
<u>Fusarium</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Aspergillus</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Coletotricum</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Mucor</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Penicillium</u>	-	+	+	-	-	-

(+) **Inhibe:** Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

**Tabla 5. extracto cloroformico:**

	<b>Concentraciones utilizadas de los extractos</b>					
	0.0mg/ml CONTROL	0.5 mg/ml	0.250 mg/ml	0.125 mg/ml	0.05 mg/ml	0.0250 mg/ml
<u>Fusarium</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Aspergillus</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Coletotricum</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Mucor</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Penicillium</u>	-	+	+	+	-	-

**(+) Inhibe:** Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control

**tabla 6. extracto acetato de etilo:**

	<b>Concentraciones utilizadas de los extractos</b>					
	0.0mg/ml CONTROL	0.5 mg/ml	0.250 mg/ml	0.125 mg/ml	0.05 mg/ml	0.0250 mg/ml
<u>Fusarium</u>	-	+	+	-	-	-
<u>Aspergillus</u>	-	+	+	+	+	-
<u>Coletotricum</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Mucor</u>	-	+	+	+	-	-
<u>Penicillium</u>	-	+	+	-	-	-

**(+) Inhibe:** Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS.

Las cepas de hongos utilizadas fueron aisladas de cultivos de café, tomate, chile y maíz, que se encuentran en la aldea Tzampetei, Municipio de San Antonio Palopó, Departamento de Sololá, Guatemala a 1800 msnm, gracias a la colaboración de la Organización No Gubernamental FUNDEBASE. Se realizó una caminata en la que se localizaron los cultivos que estaban siendo afectados por enfermedades fúngicas. Se tomaron muestras en condiciones estériles colocando las muestras en bolsas apropiadas. Simultáneamente se realizó una identificación del hongo in situ. Las muestras fueron remitidas al Ing. Agrónomo Edil Rodríguez quien determinó qué hongos afectaban dichos cultivos mediante un análisis macroscópico (estereoscopio). Posteriormente se procedió según el procedimiento al aislamiento de los hongos fitopatógenos logrando aislar 37 hongos diferentes de los cuales 20 se purificaron 20 y se identificaron 3 que son Coletotricum, Fusarium, y Mucor, como complemento se utilizaron 2 cepas de hongos que proporciono el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala que son Aspergillus y Penicillium. A las cepas mencionadas se les inoculó en un medio pobre en nutrientes (Takashio) para inducir esporulación, y preparar las soluciones de concentración conocida que posteriormente se utilizan en los bioensayos.

### 9.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Simultáneamente se trabajó en la obtención de los extractos acuoso y etanólico, para el acuoso se sometió el material vegetal fresco a un proceso de percolación y el extracto obtenido se liofilizó y refrigeró para su posterior uso, el etanolico también se sometió a percolación y posteriormente al extracto se le eliminó el solvente con la ayuda de un rotavapor, el producto seco se almacenó en refrigeración para su posterior utilización. Al extracto etanolico se le realizó partición por solventes, hexano, cloroformo y acetato de etilo, que fueron utilizados para las pruebas de bioactividad. Obteniéndose 1.4, 2.8 y 2.1 gramos de extracto respectivamente. Estos extractos disueltos en etanol, en concentraciones desde 0.5 hasta 0.0250mg/ml son mezclados con agar Sabouraud (Agar/Planta) para los bioensayos.

### 9.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Según las bases de datos consultadas no existía información fitoquímica acerca del X. robustus, por lo que se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico de las fracciones acuosa y etanólica. Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina revelan que el X. robustus contiene los siguientes metabolitos secundarios: en el extracto etanolico alcaloides, flavonoides, cumarinas,



antraquinonas, taninos, saponinas, principios amargos, los mismos se determinaron en el extracto acuoso con excepción de flavonoides y principios amargos. Durante el proceso de manipulación del tubérculo se observó presencia de una resina viscosa insoluble en agua y medio básico pero soluble en hexano, lo que indica la posible presencia de taninos. Fue mas evidente la revelación de los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina presentes en el extracto etanólico que en el acuoso, por lo que se deduce que existe una mayor afinidad en la solubilidad de los mismos en etanol, ya que las manchas del extracto acuoso eran muy tenues y difíciles de detectar, y las del extracto etanólico eran bastante evidentes.

Dada la disponibilidad de reactivos para determinación de alcaloides se realizaron las pruebas de Mayer, Wagner y Dragendorff obteniéndose para todas un resultado positivo en cuanto a la presencia de los mismos.

Se recomienda para estudios posteriores realizar determinaciones de familias de metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos obtenidos de X. robustus especialmente en aquellos que tienen un mayor potencial de actividad fungicida.

De las familias de metabolitos secundarios determinados para X. robustus se le pueden atribuir propiedades antifúngicas a antraquinonas y flavonoides, de los cuales se conoce ampliamente su actividad según la literatura.

También se le realizó por el método de hidrodestilación Neoclevenger la prueba de presencia de aceites esenciales y se determino que el tubérculo de X. robustus posee aceite esencial pero en cantidades no cuantificables. No se determino cuantificación de azufre y glicosidos cianogenicos.

#### 9.4 BIOENSAYOS

El trabajo para la determinación de actividad antifúngica inicia con la perforación de cuatro agujeros equidistantes en las cajas de petri (agar/planta) esto se puede trabajar en caja de petri tradicional o cuadriplate, utilizando un diseño de bloques al azar, que contienen una mezcla de agar nutritivo y diferentes concentraciones de todos y cada un de los extractos obtenidos (acuoso, etanolico, acetato de etilo, cloroformico, hexanico), posterior a la perforación con campanilla de durham, se incuba a 27<sup>0</sup>C durante un día, para descartar la cajas que presenten algún contaminante. En estos agujeros o pozos de inoculan 10microlitros de la solución de esporas de cada uno de las cinco cepas de hongos disponibles para el bioensayo. Se dejan en incubación a 27<sup>0</sup>C durante 27 días (según el procedimiento), pero según el monitoreo o registro de medición que se realizaba diariamente, se necesitan básicamente 7 días para observar el crecimiento de micelio dentro de las cajas y determinar si existe inhibición o no. Para los bioensayos se hace uso de la metodología propuesta por el departamento de estadística de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Bloques al azar). Además se realizó por duplicado para compensar una posible

contaminación. Como control se utilizó una caja de Petri que únicamente contenía agar Sabouraud, la cual se usaba de referencia para determinar los diámetros de crecimiento de los hongos y establecer qué extractos presentaban actividad. Se observó que todos los extractos en una concentración que va desde 0.5 hasta 0.125mg/ml presentan actividad antifúngica ( $p < 0.10$ ), pero esta tendencia desaparece al disminuir la concentración del extracto.

Básicamente el extracto etanólico fue el único en presentar actividad antifúngica en una concentración de 0.05mg/ml. Ninguno presenta actividad cuando la concentración del extracto es de 0.0250mg/ml, por lo que se concluye que el extracto etanolico podría presentar una mayor concentración de familias de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Esto sugiere realizar un tamizaje fitoquímico a este extracto en estudios posteriores.

También se trabajó una modificación del método, simultáneamente, que consistió básicamente en inocular fragmentos de agar con micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos utilizados, en las cajas de petri que contenían las diferentes concentraciones de los extractos ya mencionados. Se obtuvo resultados aceptables, ya que el comportamiento del hongo es muy similar en ambos métodos, en lo que se refiere al desarrollo de micelio, pero con el método de los pozos se mantienen constantes más factores que podrían modificar el criterio de apreciación de los resultados, por lo que la modificación del método se justifica desde el punto de vista económico, porque se omiten los pasos de perforación, preparación de medio de cultivo Takashio, preparación de soluciones de esporas, inoculación de soluciones de esporas, además el tiempo en el que se obtienen los resultados se reduce de 28 días que se necesitan para el método original a 8 días que se necesitan con el método modificado. Cabe mencionar que se recomienda hacer un estudio más minucioso para determinar si es recomendable o no utilizar esta modificación, para este caso en particular, únicamente se hace alusión de su uso como complemento para la determinación de actividad antifúngica de los diferentes extractos obtenidos del *X. robustus* y es de gran ayuda si se quieren resultados en un menor tiempo y con una menor inversión.

## 10. CONCLUSIONES

1. Las cepas de hongos aisladas, purificadas e identificadas son Fusarium sp., Coletotricum y Mucor sp.,
2. Se determinó la presencia de los siguientes familias de metabolitos secundarios en el extracto etanólico alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, taninos, saponinas, principios amargos, los mismos se determinaron en el extracto acuoso con excepción de flavonoides y principios amargos.
3. Las familias de metabolitos secundarios presentes en X. robustus que según la literatura tienen potencial de actividad fungicida son las antraquinonas y los flavonoides.
4. Todos los extractos presentan inhibición en el crecimiento de hongos fitopatógenos hasta una concentración de 0.125mg/ml, por debajo de la cual ya no hay actividad fungicida.
5. El extracto etanólico fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición y amplio espectro contra hongos a una menor concentración 0.05mg/ml.
6. Por el método de hidrodestilación Neoclevenger se determinó que el tubérculo de X. robustus posee aceite esencial pero en cantidades no cuantificables.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Actualizar el cepario de hongos fitopatógenos de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC regularmente, a manera de realizar pruebas posteriores con una batería mas completa.
2. Identificar todos los hongos fitopatógenos que conforman la batería de hongos fitopatógenos aislados y purificados, para complementar el amplio cepario con el que cuenta el Departamento de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
3. Realizar el tamizaje fitoquímico a las fracciones que presenten mayor actividad en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, para determinar que familias de metabolitos secundarios se encuentran presentes en esa fracción.
4. Fomentar el estudio de plantas con actividad antifúngica, para proveer al agricultor de insumos de origen natural, como alternativas en la alternancia de fungicidas para el manejo y control de hongos fitopatógenos.

## 12. REFERENCIAS

1. Stanley, P. & Williams, L. Flora de Guatemala, Guatemala. 1962. Eieldiana, Botany Editors, pág. 326-327-360-363.
2. Manners, J.G. Introducción a la fitopatología, Mexico, LIMUSA. 1986 pag. 205-235.
3. Wagner, S. H. Bladt, E.M. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 1983 pag. 60-140.
4. Harborne, J.B, Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant analisis), Chapman & Hall Ltd. New York, 1984 pag, 20-130.
5. Agrios, Geroge, N, Manual de Enfermedades de las plantas. México, Ediciones Ciencia y Técnica, 1991 pag. 201 - 220.
6. Dreisbach, Robert. Manual de Toxicología Clínica. México, Editorial el Manual Moderno, 1984. pag. 180, 192-193, 229, 234.
7. The Merck INDEX 10th, Edition. Ranhway, N,J. USA, 1983, pag. 1662, 2161, 8849.
8. Clauss, Edward, P. Pharmacognosy, Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1956. pag 676-677.
9. Romero, Cova Sebastian, Hongos Fitopatogenos, México, Universidad Autonoma Chapingo, Dirección de Patrono Universitario, 1988, pag. 88 – 105.
10. Dickinson, C.H., Lucas, J. A, Patología Vegetal y Patógenos de Plantas, México Limusa, 1987 pag 251.
11. Morales Soto, Oscar Arnoldo, Caracterización Agronómica, Morfológica y Bromatológica de 7 cultivares de Quequesque en San Miguel Panam Suchitepequez, Guatemala. Tesis Ing. Agrónomo Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1988. pag.12 – 26.

12. De Pöll, Elfriede, Plantas Comestibles y Tóxicas de Guatemala, 1983. pag 67-68.
13. Gros, Eduardo. Introducción al Estudio de los Productos Naturales, Washington, EU, OEA. 1985 Pag 146-161.
14. Campos, Marit de, Finkelman, Jacobo. Situación Actual del uso y manejo de plaguicidas en Guatemala, Publicación técnica del proyecto "Aspectos Ocupacionales y Ambientales de la Exposición a los Plaguicidas en el Istmo Centroamericano"(PLAGSALUD), Guatemala, 1998 pag, 60-85.
15. Calderon, Ruth, Meléndez, Lizeth. Recopilación de las Investigaciones de Plaguicidas realizadas en el Salvador. (Publicación técnica del proyecto "Aspectos Ocupacionales y Ambientales de la Exposición a los Plaguicidas en el Istmo Centroamericano"(PLAGSALUD)), San Salvador, 2001, pag. 20 – 125.
16. Alexopolus, C.J. Introducción a la micología, fourth edición, Publicación de John Wiley & Sons, New York, USA, 1996, pag. 217-223.

