



COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

**Evaluación del potencial farmacológico  
del hongo *Fusarium oxysporum***

TRABAJO RECEPCIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
PROMOCIÓN DE LA SALUD

PRESENTAN  
**YESSENIA MARTÍNEZ ORTIZ**

Director del trabajo recepcional  
**M. en B. Edgar del Carmen Sierra Palacios**

Ciudad de México, noviembre 2016.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## **Agradecimientos**

**A.** A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y a la Asamblea Legislativa del Distrito Federal, por el apoyo brindado para la elaboración del presente trabajo recepcional a través de la Beca UACM-ALDF modalidad titulación 2015-I.

**B.** A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por el apoyo brindado para la impresión y empastado del presente trabajo recepcional a través de la convocatoria para la impresión y/o empastado del trabajo recepcional o tesis 2016.

- ***A Dios.***

Por estar siempre conmigo, darme salud, la oportunidad de vivir y ser mi guía en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón en momentos difíciles e iluminar mi mente, ya que gracias a él culmino una etapa más como estudiante.

- ***A mis padres Margarita y Marino.***

Por ser mis papás, por apoyarme en todo momento, por sus consejos, por educarme e infundirme valores para ser una mejor persona y salir adelante, por su amor incondicional y por ayudarme a cumplir una meta más en la vida.

- ***A mis hermanos Abigail y Ulises.***

Por ser mis hermanos y amigos a la vez, por sus consejos, por el cariño que me dan, por la motivación que un día me dieron para que siguiera estudiando.

- ***A mis amigos Claudia Jarquín, Alberto Díaz, Susana López y Nallely Basurto.***

Por recorrer un camino juntos, por el apoyo que me brindaron, por todas las aventuras que vivimos, pero sobre todo por su sincera amistad.

- ***A mi compañero de laboratorio Ismael Villicaña Sánchez.***

Por su amistad, tiempo, paciencia y apoyo incondicional, además por compartirme sus conocimientos para así poder realizar este trabajo.

- ***A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.***

Por mi formación profesional como licenciada en Promoción de la Salud.

- ***A mi director de tesis***

El Profesor Edgar del Carmen Sierra Palacios, por su verdadero compromiso y valiosa enseñanza a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación, por su paciencia y apoyo incondicional a mi desarrollo tanto como persona, como profesional.

- ***A mis lectores***

Los Profesores Aída Sandoval, José Alberto Mendoza Espinoza, José Antonio Navarro y Olivia Sandoval, por brindarme su tiempo para la revisión del escrito del presente trabajo de investigación.

- ***Al laboratorio de Biología***

Por el espacio que me brindo para realizar las pruebas de investigación, en especial a la profesora Bernarda García Ocón por su apoyo.

A todos los que me acompañaron en este camino y no los recordé al escribir estas líneas, gracias.

*Yessenia Martínez Ortiz.*

*“Yess”*

**Índice general**

<b>Índice general</b>	<b>V</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>X</b>
<b>Índice de anexos</b>	<b>XI</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>XIII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica</b>	<b>3</b>
2.1 Importancia de los hongos	3
2.2 Estructura celular de los hongos	3
2.3 Usos y propiedades de los hongos	6
2.3.1 Ornamentales	6
2.3.2 Comestibles	6
2.3.3 Medicinales	7
2.3.4 Tóxicos	7
2.3.5 Alucinógenos	8
2.3.6 Hongos parásitos	8
2.4 El género <i>Fusarium</i>	11
2.4.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	13
2.5 Metabolitos secundarios con actividad farmacológica	14
2.5.1 Alcaloides	14
2.5.2 Compuestos fenólicos	15
2.5.2.1 Antraquinonas	15
2.5.2.2 Taninos	15
2.5.2.3 Cumarinas	16
2.5.2.4 Flavonoides	16
2.5.3 Terpenos	17
2.5.3.1 Saponinas	17
2.6 Metabolitos producidos por los hongos con actividad farmacológica	18
2.6.1 Antioxidantes	18
2.6.2 Antimicrobianos	18
	<b>V</b>

2.6.3 Otras aplicaciones médicas y cosméticas	19
2.7 PCR e Identificación molecular de hongos	19
2.8 Técnicas analíticas en la evaluación química y farmacológica de hongos	22
2.8.1 Cromatografía de capa fina (TLC)	22
2.8.2 Espectro ultravioleta / visible (UV/Vis)	23
2.8.3 Determinación de fenoles totales	23
2.8.4 Determinación de flavonoides totales	24
2.8.5 Determinación de la capacidad antioxidante	24
<b>Capítulo 3. Planteamiento del problema</b>	25
<b>Capítulo 4. Justificación</b>	26
<b>Capítulo 5. Objetivos</b>	28
5.1 General	28
5.2 Particulares	28
<b>Capítulo 6. Metodología</b>	29
6.1 Diseño de la investigación	29
6.2 Adquisición del material biológico	31
6.3 Cultivo del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	31
6.3.1 Medio sólido papa-dextrosa-agar (PDA)	31
6.3.2 Medio líquido papa-dextrosa (PD)	31
6.4 Obtención de los extractos del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	32
6.5 Extracción de ADN del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	32
6.6 Electroforesis en geles de agarosa	33
6.7 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	35
6.8 Identificación taxonómica y molecular del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	36
6.9 Caracterización química de los extractos de <i>Fusarium oxysporum</i>	36
6.9.1 Obtención de los extractos	36
6.9.2 Espectro de absorción de ultravioleta/visible	36
6.9.3 Determinación de antraquinonas	36
6.9.4 Determinación de alcaloides	37
6.9.5 Determinación de taninos	37
6.9.6 Determinación de saponinas	37

6.9.7 Determinación de cumarinas	38
6.10 Evaluación farmacológica <i>in vitro</i> de los extractos de <i>Fusarium oxysporum</i>	38
6.10.1 Contenido de flavonoides totales	38
6.10.2 Contenido de fenoles totales	39
6.10.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	39
6.10.4 Evaluación de la toxicidad <i>in vitro</i> en <i>Artemia salina</i>	40
<b>Capítulo 7. Resultados y discusión</b>	41
7.1 Obtención de la cepa de <i>Fusarium oxysporum</i>	41
7.2 Obtención de biomasa	43
7.3 Extracción de ADN	45
7.4 Amplificación por PCR del marcador LSU	46
7.5 Identificación molecular del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	47
7.6 Caracterización química	50
7.6.1 Espectro de UV/visible	50
7.6.2 Evaluación química cualitativa de los extractos de <i>Fusarium oxysporum</i>	52
7.6.3 Evaluación farmacológica <i>in vitro</i> de los extractos de <i>F. oxysporum</i>	54
7.6.3.1 Fenoles totales	54
7.6.3.2 Flavonoides totales	56
7.6.3.3 Capacidad antioxidante DPPH	58
7.6.3.4 Evaluación <i>In vitro</i> de la toxicidad en el modelo de <i>Artemia salina</i>	60
<b>Capítulo 8. Conclusiones</b>	62
<b>Capítulo 9. Perspectivas</b>	63
<b>Capítulo 10. Relevancia del presente estudio en la promoción de la salud</b>	64
<b>Capítulo 11. Bibliografía</b>	66

Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura general de los hongos	5
<b>Figura 2.</b>	El hongo <i>Fusarium sp.</i> creciendo en medio sólido en caja de Petri	12
<b>Figura 3.</b>	Esquema del proceso de la polimerización en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	20
<b>Figura 4.</b>	Representación esquemática de los genes ribosomales en hongos	21
<b>Figura 5.</b>	Diagrama del diseño experimental de la evaluación química y farmacológica de <i>Fusarium oxysporum</i>	30
<b>Figura 6.</b>	Preparación de un gel de agarosa	34
<b>Figura 7.</b>	Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> creciendo en medio PDA	41
<b>Figura 8.</b>	Gráfica del crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> cultivado en medio PDA	42
<b>Figura 9.</b>	Crecimiento del micelio de <i>Fusarium oxysporum</i> en reactores de cultivo	43
<b>Figura 10.</b>	Electroforesis del ADN genómico de <i>Fusarium oxysporum</i> en gel de agarosa al 0.8 % (p/v)	45
<b>Figura 11.</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) del fragmento de PCR del gen 28S de la subunidad mayor del ribosoma de <i>Fusarium oxysporum</i>	46
<b>Figura 12.</b>	Secuencia parcial del gen 28S (LSU) de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenida por PCR	48
<b>Figura 13.</b>	Espectro UV/VIS de los extractos de metanol, agua, acetona, acetato de etilo, hexano y caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> cultivado en medio líquido PD pH 5.0	51
<b>Figura 14.</b>	Gráfica de la concentración de fenoles totales en los extractos de acetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	55
<b>Figura 15.</b>	Gráfica de la concentración de flavonoides totales presentes en los extractos de acetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	57

- Figura 16.** Gráfica de la capacidad antioxidante de los extractos acetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* cultivado en medio líquido PD 59
- Figura 17.** Toxicidad del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina*. 60
- Figura 18.** Toxicidad del extracto acuoso de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina*. 61
- Figura 19.** Toxicidad del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina*. 61

Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Algunos usos de los hongos	10
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar	33
<b>Tabla 3.</b> Reacción de PCR para 25 µL (fragmento LSU)	35
<b>Tabla 4.</b> Micelio obtenido y empleado en la elaboración de los extractos de acetato de etilo, acetona, agua, hexano y metanol de <i>Fusarium oxysporum</i>	44
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la secuencia nucleotídica del marcador LSU de <i>Fusarium oxysporum</i>	49
<b>Tabla 6.</b> Evaluación química cualitativa de los extractos y caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	53

Índice de anexos

<b>Anexo 1. Reactivos, materiales y equipos</b>	73
A. Reactivos	73
B. Equipos	74
C. Materiales de vidrio	75
D. Materiales de plástico	75
E. Otros	76
<b>Anexo 2. Cálculos de fenoles totales</b>	77
A. Curva patrón	77
B. Fenoles del extracto de acetona de <i>Fusarium oxysporum</i>	79
C. Fenoles del extracto de acetato de etilo de <i>Fusarium oxysporum</i>	79
D. Fenoles del extracto de hexano de <i>Fusarium oxysporum</i>	80
E. Fenoles del extracto acuoso de <i>Fusarium oxysporum</i>	80
F. Fenoles del extracto de metanol de <i>Fusarium oxysporum</i>	81
G. Fenoles del caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	81
<b>Anexo 3. Cálculos de flavonoides totales</b>	82
A. Curva patrón	82
B. Flavonoides totales del extracto de acetona de <i>Fusarium oxysporum</i>	84
C. Flavonoides totales del extracto de acetato de etilo de <i>Fusarium oxysporum</i>	84
D. Flavonoides totales del extracto de hexano de <i>Fusarium oxysporum</i>	85
E. Flavonoides totales del extracto acuoso de <i>Fusarium oxysporum</i>	85
F. Flavonoides totales del extracto de metanol de <i>Fusarium oxysporum</i>	86
G. Flavonoides totales del caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	86
	XI

<b>Anexo 4. Cálculos de la capacidad antioxidante DPPH</b>	87
<b>A.</b> Curva patrón	87
<b>B.</b> Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acetona de <i>Fusarium oxysporum</i>	89
<b>C.</b> Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acetato de etilo de <i>Fusarium oxysporum</i>	89
<b>D.</b> Capacidad antioxidante DPPH del extracto de hexano de <i>Fusarium oxysporum</i>	90
<b>E.</b> Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acuoso de <i>Fusarium oxysporum</i>	90
<b>F.</b> Capacidad antioxidante DPPH del extracto de metanol de <i>Fusarium oxysporum</i>	91
<b>G.</b> Capacidad antioxidante DPPH del caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i>	91
<b>Anexo 5. Datos y cálculos de toxicidad <i>in vitro</i> en <i>Artemia salina</i></b>	92
<b>A.</b> Datos del extracto de metanol de <i>Fusarium oxysporum</i> en <i>Artemia salina</i>	92
<b>B.</b> Datos del extracto acuoso de <i>Fusarium oxysporum</i> en <i>Artemia salina</i>	93
<b>C.</b> Datos del extracto del caldo de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> en <i>Artemia salina</i>	94

## Abreviaturas

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>Abs</b>	Absorbencia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>L</b>	Litro
<b>LSU</b>	Unidad mayor ribosomal ó 28S
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mg EAA/g</b>	Miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto
<b>mg EAG/g</b>	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto
<b>mg EQ/g</b>	Miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos salinos.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
<b>PDA</b>	Papa dextrosa agar
<b>PD</b>	Papa dextrosa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos

<b>TAE</b>	Buffer de electroforesis con tris-ácido acético-EDTA
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina
<b>Uv</b>	Ultravioleta
<b>Uv/vis</b>	Ultravioleta/visible
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>xg</b>	Campos gravitacionales
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μg</b>	Microgramos
<b>μm</b>	Micrómetros

## Capítulo 1. Introducción

Los hongos son organismos que tienen una función primordial en el funcionamiento de la biosfera, son los encargados de reciclar la materia orgánica hacia el suelo, ya que se encargan de degradar todos aquellos compuestos orgánicos provenientes de animales, plantas y otros organismos. Tienen la capacidad de formar asociaciones con algas o plantas, función que permite que existan los bosques. Presentan la capacidad bioquímica para transformar compuestos tóxicos en sustancias inocuas. La presencia de una alta cantidad de recursos naturales ha permitido el desarrollo de ciertos grupos humanos, la historia ha demostrado que cada una de las culturas antiguas ha buscado cómo utilizar de la mejor manera cada uno de los recursos naturales con que cuenta. Los hongos son un recurso natural que ha sido empleado por diferentes grupos humanos para alimentarse, curar enfermedades, entre otros usos. Se tiene conocimiento que los hongos han tenido un vínculo cercano en toda la evolución de la especie humana, ya que se sabe que los hongos fueron los primeros organismos multicelulares eucariotas (Zulueta *et al.* 2007).

Los hongos han sido utilizados por distintas culturas, para los griegos eran una fuente de alimento apreciada, mientras que los romanos los consideraban un platillo gourmet, los egipcios los utilizaron como alimento altamente codiciados e inclusive les dieron un uso industrial, en la elaboración de pan, cerveza y vino.

En Mesoamérica, principalmente en México, los hongos fueron una fuente importante de alimento, medicina y recreación. Esos usos se han mantenido y se siguen utilizando por parte de la población, actualmente en México existen 200,000 especies de las cuales se tiene información de un 4%, lo cual muestra que son organismos poco estudiados (Guzmán, 2007).

Dentro de la diversidad de los hongos, algunas especies pueden causar un daño de forma directa o indirecta a la actividad humana. Un grupo de esos hongos son aquellos denominados hongos fitopatógenos, estos organismos tienen importancia por los efectos negativos que tienen sobre los cultivos agrícolas (Keller *et al.* 2005; Pérez-García *et al.* 2011). Teniendo conocimiento de aproximadamente 1,500 especies fitopatógenas (Pérez-García *et al.* 2011; Patel *et al.* 2014).

Los estudios químicos y farmacológicos realizados a estos hongos han sido relativamente pocos (Rivera, 2007). Por lo que surge la necesidad de estudiar a este

grupo de hongos utilizando al hongo *Fusarium oxysporum*, al cual se le realizaron pruebas de grupos químicos (alcaloides, antraquinonas, taninos, cumarinas y saponinas), la determinación de actividades farmacológicas (flavonoides, fenoles totales, capacidad antioxidante y toxicidad in vitro en el modelo de *Artemia salina*).

El desarrollo del presente trabajo permitió la estandarización de las condiciones de cultivo y crecimiento en medio líquido PD y medio sólido de PDA. Finalizando con la identificación molecular, utilizando el marcador de ADNr de la unidad mayor ribosomal LSU ó 28s.

## Capítulo 2. Revisión bibliográfica

### 2.1 Importancia de los hongos

Los hongos son organismos que han estado relacionados con el hombre desde hace cientos de años, ya que desde la prehistoria los hongos han sido utilizados por el hombre como material para encender el fuego, una fuente de alimentación, como medicamento, además de ser utilizados para cultos religiosos (Bertelsen, 2013), lo que permite ver la importancia de estos organismos en la vida cotidiana.

Los hongos son proveedores de ciertas sustancias químicas requeridas por los árboles, por lo que los hongos son organismos que se alimentan de materia orgánica, misma que se transforman en compuestos que retornan al suelo, lo que conlleva a que la fertilidad del suelo se mantenga y así pueda existir la vegetación. (González-Espinosa *et al.* 2005)

Algunos otros hongos se asocian con algas, formando lo que normalmente conocemos como líquenes, dichos organismos funcionan como sensores ambientales, a menor cantidad de líquenes mayor contaminación del ambiente.

Otros hongos han sido empleados para el tratamiento de ciertos padecimientos médicos. Aproximadamente existen alrededor de 130 a 300 especies de hongos medicinales, de los cuales 20 son altamente comercializadas (De Diego, 2011).

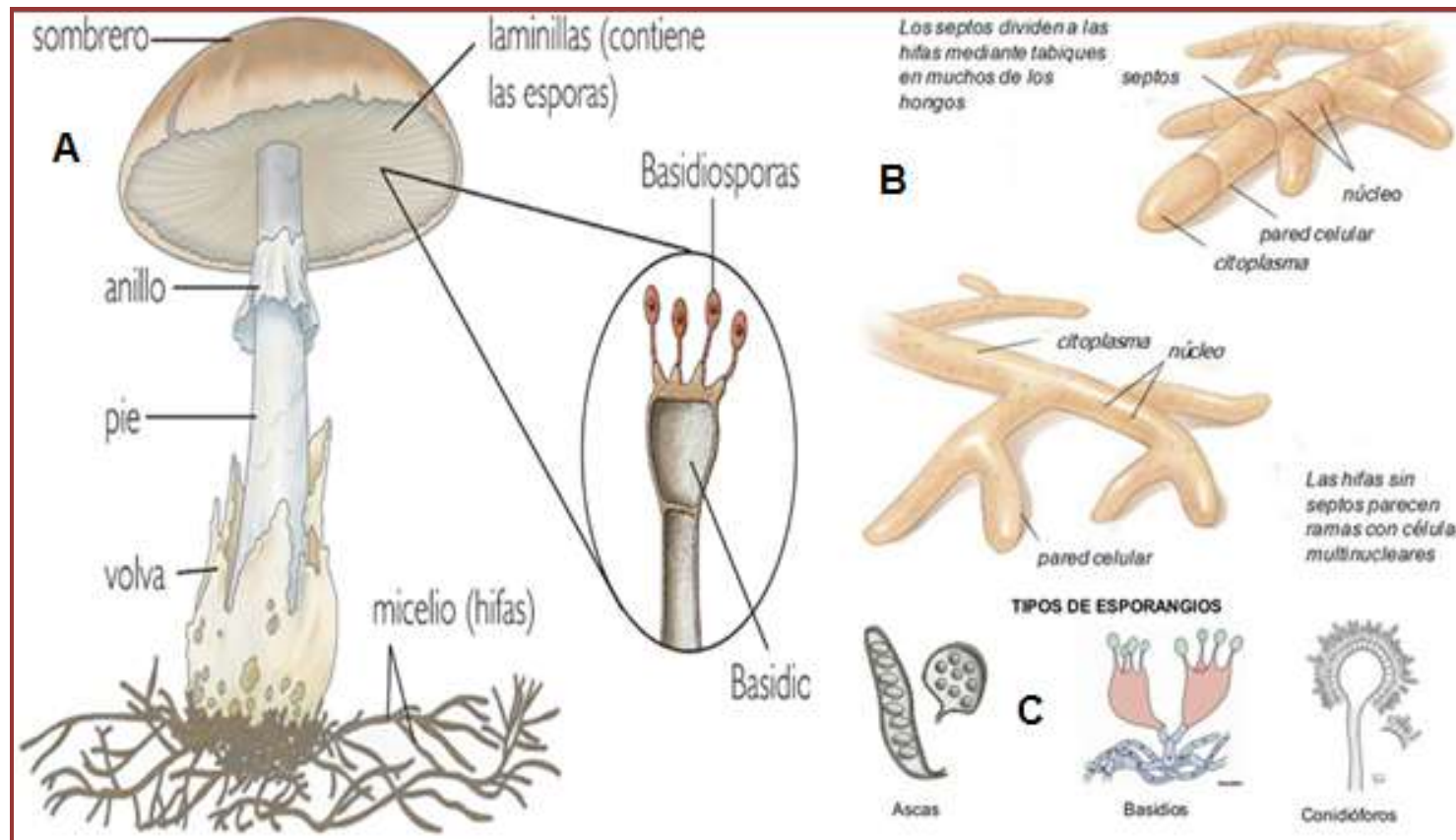
### 2.2. Estructura celular de los hongos

Los hongos fueron los primeros organismos pluricelulares, aunque anteriormente se les asociaba con las plantas, los análisis de ADN ribosomal muestran una cerca relación evolutiva con los animales. Para algunos autores los hongos han evolucionado poco, debido a que siguen manteniendo una estructura sencilla formada por pocos elementos, hifa, micelio y espora; aunque los basidiomicetos forman estructuras un poco más elaboradas (figura 1A) (Contreras–Ramos *et al.* 2007).

El origen de los hongos es a partir de las esporas, que son como las semillas de las plantas, cuando éstas encuentran las condiciones adecuadas de luz, humedad, temperatura y nutrientes, germinan y producen hifas, estas últimas son estructuras encargadas de construir la unidad estructural de los hongos. Las esporas juegan un rol importante en la propagación y perpetuación de las especies de los hongos, las

esporas pueden provenir de un proceso de reproducción sexual o de tipo asexual, característica que hace que los hongos puedan sobrevivir casi en cualquier ambiente. Las esporas presentan distinta forma en cada uno de los grupos en que se clasifican a los hongos, por eso también juegan un rol importante en la identificación de los mismos, pudiendo encontrar ascosporas, basidiosporas, zoosporas, etc. (figura 1C).

Las hifas emergen de las esporas y se ramifican formando una masa algodonosa llamada micelio, que se extiende sobre la superficie (tierra, madera, agua, etc.), en realidad el hongo está constituido por el micelio y este puede permanecer por cientos de años sobre el sustrato (madera, suelo, etc.) (Harris, 2008). Normalmente encontramos dos tipos de hifas, las septadas y las no septadas. Las primeras presentan una división del micelio en determinados puntos, pero dicha barrera no es impermeable totalmente, ya que presenta un poro que permite la interacción citoplasmática entre un compartimento y otro del micelio. En las no septadas el micelio no presenta ninguna división, por lo que el citoplasma se extiende por toda la longitud de la hifa (figura 1B) (Arauz, 1998; Rivera, 2007).



**Figura 1.** Estructura general de los hongos. **A.** Carpóforo de un basidiomicete con sus distintas partes. **B.** Tipo de hifas presentes en los hongos. **C.** Estructuras asociadas a diferentes esporas fúngicas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> a. Fuente: <https://inmunosetas.files.wordpress.com/2012/02/basidiosporas.png> (19-10-2015).

b. Fuente: <https://www.google.es/search?q=estructura+de+los+hongos&biw=1366&bih=667&source=Inms&tbn=isch&s> (19-10-2015)

c. Fuente: <http://www.riskscience.umich.edu/fungal-meningitis-outbreak-and-exposure-to-aspergillus-spores/> (19-10-2015).

## 2.3 Usos y propiedades de los hongos

Los hongos han sido ampliamente de utilidad para la humanidad, diversas son sus aplicaciones y usos de estos, entre los cuales se pueden mencionar: ornamental, comestibles, medicinal, tóxico, parásito y alucinógeno. Algunos hongos reportados para estas actividades mencionadas se enlistan en la tabla 1 (Keller *et al.* 2005).

### 2.3.1 Ornamentales

Algunos hongos presentan coloraciones bastante llamativas por lo que se han utilizado para la elaboración de ciertos arreglos ornamentales, e inclusive algunos hongos cultivados como las setas (*Pleurotus sp.*) son utilizados para confeccionar arreglos ornamentales junto a flores o follaje de plantas. Para algunos indígenas del país, los hongos son empleados en la elaboración de adornos en ofrendas, es el caso de los náhuas de Puebla y Tlaxcala, los zapotecas en Oaxaca y los tzotziles y tojolabales en Chiapas. Las especies más empleadas son las *Amanita muscaria*, *Pholiota squarrosa*, *Aleuria aurantia*, entre otros (Poppe y Heungens, 1991; Alfaro, 1996).

### 2.3.2 Comestibles

Es el principal uso que se les ha dado a los hongos, además de ser el primer empleo que el hombre les proporcionó a estos organismos. Se tienen registradas más de mil especies comestibles, sin embargo son pocas las que se consumen en alto volumen, entre los hongos silvestres encontramos *Lactarius deliciosus*, *Boletus edulis*, *Russula brevipes*, *Amanita caesarea*, *Agaricus campestris*, etc. Entre los hongos que son cultivados tenemos a *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, entre otros. El consumo de hongos no está extendido de forma global, las zonas de consumo abarcan países asiáticos como China, Japón, Corea del Sur, países europeos como Francia, España, Italia y países del continente Americano como E.U.A., México y Guatemala. Estos organismos en algunos sitios son comparados con la carne proveniente de animales de sacrificio como el pollo, cerdo o res, esto debido a la alta cantidad de proteínas y minerales (Boa, 2005).

### 2.3.3 Medicinales

En varias culturas el empleo de los hongos para curar ciertos padecimientos médicos está ampliamente extendido. Se estima que existen alrededor de 470 especies y subespecies de hongos medicinales, sin embargo son un número reducido los que se emplean de forma masiva y que son ampliamente comercializadas a nivel global (Boa, 2005). Entre los hongos medicinales más empleados se encuentran *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Penicillium chrysogenum*, *Trametes versicolor*, *Cordyceps sinensis*, entre otros. Varios grupos indígenas en México, específicamente en los estados de Oaxaca y Chiapas siguen utilizando una cantidad importante de hongos silvestres en la cura de padecimientos médicos. La cantidad de recursos que mueven *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Penicillium chrysogenum* es sorprendente, las estimaciones de la comercialización de estos hongos o los productos derivados de estos hongos sobrepasa la cantidad de los 18 billones de dólares anuales, junto con otros suplementos alimenticios (Wasser, 2014).

### 2.3.4 Tóxicos

Dentro de los hongos existen algunos organismos que producen ciertas sustancias que pueden provocar malestar gastrointestinal o la muerte; Boa (2005), reporta 170 especies de este tipo. A los primeros se les conoce como especies tóxicas y a los segundos como mortales o letales. Pero se debe tener en cuenta que la cantidad de hongos tóxicos es sumamente inferior al grupo de hongos no tóxicos. Es importante ejemplificar lo antes mencionado, Guzmán (2007), reportó en México 200 especies de hongos comestibles *versus* 50 tóxicas y 5 mortales. Por lo que queda claro que las especies mortales ocupan un porcentaje sumamente pequeño. Desgraciadamente un mal abordaje del tema de los hongos tóxicos en la prensa ha llevado a una restricción en el consumo de hongos silvestres. Las especies tóxicas más estudiadas son *Amanita muscaria*, *Boletus satanas*, *Lactarius pubescens*, *Psilocybe fascicularis*, entre otros., algunas especies mortales son *Amanita phalloides*, *Galerina marginata*, *Lepiota pseudohelveola*, *Paxillus involutus*, etc. (Pardavé *et al.* 2006; Gómez y Gómez, 2015).

### 2.3.5 Alucinógenos

En algunas regiones del mundo los hongos son empleados dentro de ciertos ritos religiosos, siendo el caso de México y la región de Siberia en Rusia. Según algunos reportes, existen alrededor de 150 especies que sintetizan sustancias psicoactivas, de las cuales, 55 crecen en México. Durante los años 60 y 70s estos hongos se volvieron populares, gracias a la información difundida por la prensa sobre su empleo en las ceremonias de algunos grupos indígenas, pero cabe destacar que esta actividad se había practicado desde muchos años atrás. Esta tradición ha sobrevivido hasta nuestros días, ya que en algunos lugares las personas la siguen practicando. Los hongos más estudiados que presentan esta característica son *Psilocybe mexicana*, *Psilocybe wassoni*, *Psilocybe aztecorum*, *Psilocybe cubensis* (Mata *et al.* 2005).

### 2.3.6 Hongos parásitos

Algunos hongos presentan la característica de poder invadir a otros organismos y vivir a expensas de ellos. Estos hongos pertenecen a un grupo grande, pudiendo atacar a mamíferos, aves, reptiles, plantas, insectos e inclusive a otros hongos. Por la importancia económica que revisten sus ataques, los que parasitan a las plantas han sido los más estudiados, llamándoles hongos fitopatógenos. Atacan normalmente a toda la planta, generando síntomas de clorosis (perdida del color verde), marchitez y alteraciones en el crecimiento (Arauz, 1998).

El origen de las enfermedades causadas por estos hongos no es espontánea, sino que debido al movimiento de las esporas de los hongos, estas pueden diseminarse muy fácilmente por el viento, el agua, organismos pequeños como insectos y ácaros, el movimiento de gente, maquinaria o animales<sup>2</sup>.

Los hongos fitopatógenos no solo causan enfermedades a las plantas, si no también tienen funciones en el agrosistema que son importantes para el mantenimiento del equilibrio ecológico que si son manejadas adecuadamente resultan de beneficio al agricultor.

De las 100,000 especies de hongos descritas, solo unas 8,000 producen enfermedades en plantas y unas 100 causan enfermedades en humanos y animales. La mayoría de los hongos ayudan al reciclaje de la materia orgánica, liberando

---

<sup>2</sup> <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1354/2/02.pdf> (15-9-2015)

nutrimentos que enriquecen al suelo que sirven de alimento a organismos que se benefician del suelo como las lombrices (Arauz, 1998). Los hongos fitopatógenos más importantes por el número de hospederos que atacan y por su incidencia en los cultivos agrícolas son los del género *Phytophthora sp*; *Rhizoctonia sp*; *Pythium sp*; *Phymatotrichum sp*; *Fusarium sp.* y *Sclerotium sp.* (Rodríguez, 2001).

❖ **Tabla 1.** Algunos usos de los hongos.

Ornamentales	Comestibles	Medicinales	Tóxicos	Alucinógenos	Parásitos
<i>Amanita muscaria</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Penicillium notatum</i>	<i>Amanita phalloides</i>	<i>Claviceps purpurea</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
<i>Hydnellum peckii</i>	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Cortinarius orellanus</i>	<i>Psilocybe aequatoriae</i>	<i>Cándida albicans</i>
<i>Pholiota squarrosa</i>	<i>Russula brevipes</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Psilocybe allenii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Aleuria aurantia</i>	<i>Amanita caesarea</i>	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	<i>Psilocybe antioquiensis</i>	<i>Aspergillus spp</i>
	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Agaricus blazei</i>	<i>Galerina marginata</i>	<i>Psilocybe atlantis</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Lepiota helveola</i>		<i>Strongyloides stercoralis</i>
		<i>Grifola frondosa</i>			<i>Sarcoptes scabiel</i>

## 2.4 El género *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos, con una amplia distribución en el mundo, se considera un hongo cosmopolita, diversas especies son comunes principalmente en el suelo, agua y aire; algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y animales. Existen más de 100 especies, las cuales atacan entre 81 a 101 plantas de interés agrícola, 12 de ellas se consideran patógenas para el humano, entre ellas destaca *Fusarium solani*, *Fusarium verticilloides* y *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, algunas especies han sido empleadas como mico-herbicidas por su capacidad de infectar a ciertas malezas.

Los miembros del género *Fusarium* pueden ser cultivados de forma artificial en el laboratorio, pudiendo crecer en medios de cultivo como agar-papa-dextrosa (PDA), agar sabouraud, agar clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Los agares PDA y sabouraud permiten observar el crecimiento de la colonia, morfología y pigmento; mientras que el agar CLA, permite observar el desarrollo de las cadenas de los microconidios y la morfología en detalle de los macroconidos (Tapia y Amaro, 2014).

La morfología del género *Fusarium* está basada en características macro y microscópicas como: tipo de micelio aéreo, pigmentación, tasa de crecimiento de la colonia, ausencia o presencia de esporodoquios y esclerocios; son características básicas de identificación. El micelio aéreo suele ser abundante y el color que desarrolla depende de la especie, pudiendo ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc., el medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA) es el más utilizado en la observación de estas características (Figura 2).

El género produce tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas. El macroconidio es la spora principal en la caracterización, su forma y tamaño varían según la especie, puede originarse a partir de estructuras especializadas, los esporodoquios, así como también de los monofiálides, polifiálides o directamente a partir del micelio aéreo. La presencia de una célula basal en forma de pié se considera característica de *Fusarium sp.*

El microconidio es un carácter taxonómico primario, se considera su presencia o ausencia. Si está presente las características consideradas son forma, modo de formación, si están solos, falsas cabezas, cabezas o cadenas. Pueden formarse en el micelio aéreo a partir de mono o polifiálides pero no en esporodoquios. Otros

caracteres taxonómicos primarios son las clamidosporas, conidióforos y mesoconidios. Para observar este tipo de características suelen usarse medios naturales como el agar hojas de clavel (CLA) y agar nutriente sintético (SNA). Este tipo de identificación requiere de una cuidadosa observación y un grado de conocimiento de taxonomía para distinguir los patógenos a nivel de especie. Esto ha llevado a un creciente interés en la obtención de métodos más sensibles para la identificación de especies de *Fusarium* en el material vegetal infectado, incluyendo las técnicas que implican el diagnóstico molecular (Kikot, 2012).



**Figura 2.** El hongo *Fusarium sp.* creciendo en medio sólido en caja de Petri. La característica principal del crecimiento de este hongo es la forma algodonosa del micelio y la coloración roja<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Fuente: <http://www.sun.ac.za/english/faculty/agri/plant-pathology/ac4tr4/background/banana-fusarium-wilt-fungus> (10-7-2015).

#### 2.4.1 *Fusarium oxysporum*

La especie *F. oxysporum* es la de mayor importancia fitopatológica de estos organismos, está catalogada como la de mayor número de hospederos y una de las que mayor daño económico provoca con sus infecciones. Normalmente provoca marchitamiento vascular, pudrición de la corona (base del tallo) y de la raíz, lo que conlleva a la muerte del huésped. Es una especie de *Fusarium* de crecimiento rápido, produciendo tres diferentes tipos de esporas, microconidios, macroconidios y clamidiasporas. Los microconidios son estructuras unicelulares, no septadas, hialinas, elipsoidales o cilíndricas, de forma recta o curvada. Los macroconidios presentan una pared delgada, con forma fusiforme, larga, moderadamente curvada, con 3-5 septos y formada por varias células. Las clamidiasporas presentan una pared gruesa, altamente resistente, esporas simples o en pares; se forman por condensación de las hifas o de los macroconidios. Son las esporas responsables de la supervivencia del hongo en tejido muerto o en el suelo por largos períodos.

*Fusarium oxysporum* es un hongo que presenta diferentes formas patogénicas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de varias plantas, más de 100 especies. Las formas especiales solo pueden normalmente afectar a un solo hospedero, como ejemplo *Fusarium oxysporum phaseolii* solo afecta al frijol, mientras que *Fusarium oxysporum lycopersisi* solo ataca al jitomate (Agrios, 1988). Su principal característica es producir un crecimiento en grandes colonias en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a una temperatura de 25°C. Las colonias se pueden presentar de dos tipos: una de tipo micelial, que se caracteriza por una abundante producción de micelio aéreo, algodonoso, con coloraciones blanco a rosado durazno, pero generalmente con un color púrpura o violeta más intenso en la superficie y pocas mitocondrias. La segunda colonia es de tipo pionotal con muy poca formación de micelio o ninguna y demasiadas mitocondrias (Garcés *et al.* 2001).

## **2.5 Metabolitos secundarios con actividad farmacológica**

### **2.5.1 Alcaloides**

Este tipo de compuestos está altamente extendido en los vegetales, fueron los primeros compuestos activos en ser aislados. Son compuestos muy diversos, sin embargo los une la característica de contener átomos de nitrógeno en su estructura. Tienen un carácter de tipo básico generalmente, su formación parte de aminoácidos principalmente, pero algunos otros derivan de esteroides o terpenos.

Su ubicación en su fuente natural, son las hojas, corteza, raíz, fruto y semillas; se encuentran asociados a ciertos ácidos orgánicos como el málico, cítrico o en combinación con taninos. Los alcaloides con átomos de oxígeno son sólidos, cristalizables y generalmente incoloros o blancos. Mientras que los que carecen de oxígeno son líquidos a temperatura ambiente, volátiles y con un olor característico. Los alcaloides en su forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos no polares y polares. Los alcaloides que forman sales son solubles en agua y alcohol, e insolubles en solventes orgánicos no polares. Una característica esencial es que son amargos. Estos compuestos presentan actividad óptica, siendo las formas levóginas las más activas en comparación con las dextróginas.

La detección de los alcaloides a nivel de laboratorio se puede realizar de tres formas, por precipitación, cristalización o por colorimetría. En la primera, los alcaloides son puestos con metales pesados en solución acuosa, por colorimetría, normalmente se colocan con sustancias deshidratantes como el sulfúrico, nítrico o con permanganato de potasio.

La concentración de alcaloides en plantas puede variar desde unas pocas partes por millón (ppm) hasta 0.1-3% de forma general, sin embargo esto depende del clima, se tiene registrado que a mayor temperatura mayor concentración de alcaloides. Las actividades que presentan los alcaloides abarcan desde estimulantes del sistema nervioso, antifibrilantes, espasmolíticos, bloqueadores neuromusculares, antimaláricos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antipiréticos, antihiper glucémicos, antipsoriáticos, antihelmínticos, antiagregantes de plaquetas y antimicrobianos (López-Casamayor, 2007).

## **2.5.2 Compuestos fenólicos**

### **2.5.2.1 Antraquinonas**

Son compuestos químicos que se encuentra de forma limitada en los vegetales, suelen ser abundantes en hongos y líquenes. Su estructura química está formada por un compuesto aromático unido a dos cetonas en posición para y pocos en posición orto. Poseen el sistema tricíclico del antraceno, pero con el anillo central más oxidado, lo cual permite diferenciarlas de los otros derivados antracénicos. La actividad farmacológica de estos compuestos es como laxante o purgante.

Una forma de determinar antraquinonas es con la reacción de Bornträger, donde la muestra se disuelve en solvente orgánico, reacción que proporciona un color amarillo, posteriormente se añade hidróxido de potasio el cual hace cambiar la coloración de amarillo a rojo, lo que comprueba la presencia de antraquinonas (Delmulle y Demeyer, 2010).

### **2.5.2.2 Taninos**

Los taninos son sustancias químicas orgánicas que se extraen de las plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, tienen un sabor astringente, el cual ayuda a las plantas a protegerse de ataques microbianos, fúngicos y algunos herbívoros. También se utilizan para el curtido de la piel de los animales ya que reaccionan con las proteínas de colágeno que se encuentran en la piel, generando así la resistencia de la piel al calor a la putrefacción por el agua y el ataque a los microorganismos.

De manera química los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol. Estos abundan en las cortezas de arboles como los robles y los castaños.

Los taninos se clasifican en dos categorías, esto de acuerdo a su vía de biosíntesis y propiedades químicas, la primera categoría de taninos son los condensados, estos son polímeros de flavonoides llamados antocianidina que pueden ser encontrados en semillas, frutas y madera de plantas leñosas. La segunda categoría es la de los taninos hidrosolubles, que son polímeros heterogéneos que están formados por ácidos fenólicos, particularmente por ácido gálico y azúcares simples, son más

pequeños que los condensados y se hidrolizan con facilidad ya que solo se necesita ácido<sup>4</sup>.

Debido a su potencial antibacteriano, antiviral y antiparasitario, los taninos pueden desempeñar una función protectora impidiendo la absorción de metales pesados, además de que previenen enfermedades cardiovasculares y se consideran anticancerígenos (Villicaña, 2015).

### **2.5.2.3 Cumarinas**

Las cumarinas son compuestos químicos, caracterizados por ser incoloras y cristalinas. Se consideran metabolitos secundarios de las plantas, sus concentraciones en las plantas son altas y se pueden encontrar en todas las partes de la planta, pero la mayor concentración se encuentra en los frutos y las flores. Tienen un sabor amargo el cual genera la supresión del apetito evitando así que los animales las consuman, previniendo probables hemorragias internas y disminuyen el sobrepastoreo. Las actividades biológicas que realizan las cumarinas son antitumoral, antiinflamatorias, analgésicas, antisépticas y antihipertensiva (Venugopala *et al.* 2013).

### **2.5.2.4 Flavonoides**

Su nombre deriva del latín, que significa “amarillo”, son los compuestos más abundantes de los polifenoles (Beltrán, 2011). Los fenoles tienen gran importancia en la coloración de hojas, tallo, flores y frutos. Las plantas que reportan presencia de flavonoides son el eucalipto, cítricos, cola de caballo, ruda, etc. En hongos son escasos los reportes de flavonoides, se tiene el dato de la detección de catequina y miricetina (Nijveldt *et al.* 2001).

Algunas de las funciones que tienen los flavonoides es la de atraer a los polinizadores hacia las flores o los animales que comen los frutos con la intención de dispersar mejor las semillas. Otras veces los flavonoides tienen la función de atraer a ciertas presas, como es el caso de las plantas carnívoras que utilizan antocianinas para atraer a los insectos y comerlos. También protegen a las plantas de los nocivos efectos de los rayos solares, también estos compuestos

---

<sup>4</sup> <https://books.google.com.mx/books?id=R9tif4trf2AC&pg=PA104&dq=taninos&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiN9K-KrqDMAhUMmoMKHYdOCZAQ6AEIlzAC#v=onepage&q=taninos&f=false>

hacen que las plantas presenten un sabor desagradable evitando así que sean alimento para los animales.

Los flavonoides tienen un papel importante en la alimentación humana, ya que presentan propiedades medicinales como antioxidantes, anticancerígenos, cardiotónicos, antitrombóticos, disminuidores de colesterol, antiinflamatorios, analgésicos y antimicrobianos (Nijveldt *et al.* 2001).

### 2.5.3 Terpenos

La palabra terpeno es una derivación de *turpentine*, “aguarrás” en inglés. Los terpenos son unos de los principales componentes del aguarrás y de los aromas de las flores, son producidos por varias plantas particularmente las plantas coníferas. Se derivan del ácido mevalónico proveniente del acetyl coenzima A, pero tradicionalmente se consideran derivados del *isopreno* (2-metil-1,3- butadieno), lo cual ayuda a clasificarlos.

Se encuentran en los aceites de las plantas que son utilizados como aditivos para las comidas, por su aroma se utilizan en la industria para realizar fragancias en la perfumería. En la medicina tienen una gran importancia por sus propiedades anticancerígenas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc; además de que también se utilizan en aromaterapia (Avalos *et al.* 2009).

También se conocen terpenos sintéticos, estos han sido utilizados para expandir la variedad de aromas y saborizantes de los alimentos (Breitmaier, 2006).

#### 2.5.3.1 Saponinas

Saponina, palabra proveniente del latín *sapo*, “jabón” son glucósidos de esteroides. Son llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón, ya que cada molécula está formada por un elemento soluble en lípidos (esteroide) y un elemento soluble en agua (azúcar) los cuales se agitan en agua y forman espuma.

Las saponinas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, pero también han sido aisladas de bacterias y animales marinos como las estrellas o los pepinos de mar. Se sabe que las saponinas tienen una función de defensa en las plantas, ya que tienen función antimicrobiana y repelente de insectos.

Varios estudios han reportado que las saponinas presentan compuestos con actividad terapéutica, como expectorante, inmunogénico, anticancerígeno,

antibacteriano, anticolesterolémico, antiinflamatorio, antifúngico. Se les considera como sustancias tóxicas, ya que provocan la hemólisis de glóbulos rojos. Además que son empleadas como estructuras orgánicas para la síntesis de nuevos compuestos como hormonas, etc. (Romo de Vivar, 2006).

## **2.6 Metabolitos producidos por los hongos con actividad farmacológica**

Los hongos han sido considerados como alimentos en varias partes del mundo desde la antigüedad por su especial sabor y olor. Recientemente se ha descubierto que muchas especies de hongos tienen la capacidad de producir compuestos con excelentes propiedades biológicas. Los hongos tienen una larga historia de uso en la medicina oriental y en las culturas prehispánicas de América Latina, pero es en el siglo pasado y el actual donde se han comenzado a estudiar sus propiedades medicinales bajo estudios científicos rigurosos, lo que ha llevado a encontrar que los hongos son una fuente valiosa de nutracéuticos, antioxidantes, anticancerígenos, prebióticos, inmunomoduladores, anti-inflamatorios, cardiovasculares, antimicrobianos y anti-diabéticos (Synytsya *et al.* 2009).

De acuerdo a los reportes que se tienen de los distintos estudios sobre la química de los hongos, estos son pequeñas biofábricas que pueden producir sustancias químicas que tienen un impacto como:

### **2.6.1 Antioxidantes**

Tienen la capacidad de eliminar radicales libres y actuar como agentes reductores. Por lo que muchos investigadores han reportado que la actividad antioxidante es el resultado de una mezcla de los productos químicos tales como el ácido ascórbico, los carotenoides, compuestos fenólicos esterificados, fenólicos libres y flavonoides (Villares, 2012; Ya-Jun *et al.* 2012).

### **2.6.2 Antimicrobianos**

Los hongos son conocidos por sus potentes metabolitos secundarios antimicrobianos. Como sabemos los hongos sintetizan moléculas con actividad microbicida como las quinolonas, fluoroquinolonas, penicilinas o betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas, etc. En estudios recientes han encontrado que aparte de las moléculas antes mencionadas, los hongos son capaces de producir pequeños

péptidos con actividad antimicrobiana, capaces de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, protozoos, etc. (Molitoris, 1994).

### 2.6.3 Otras aplicaciones médicas y cosméticas

Los hongos tienen también aplicaciones potenciales como hepatoprotectores, reductores de colesterol, glucosa y como agentes anti-inflamatorios. Además de sus conocidas aplicaciones médicas, diferentes extractos de hongos son adicionados en los productos cosméticos como cremas hidratantes, agentes antienvjecimiento, revitalizadores de la piel y crema para blanquear (Wang y Marcone, 2011).

### 2.7 PCR e Identificación molecular de hongos

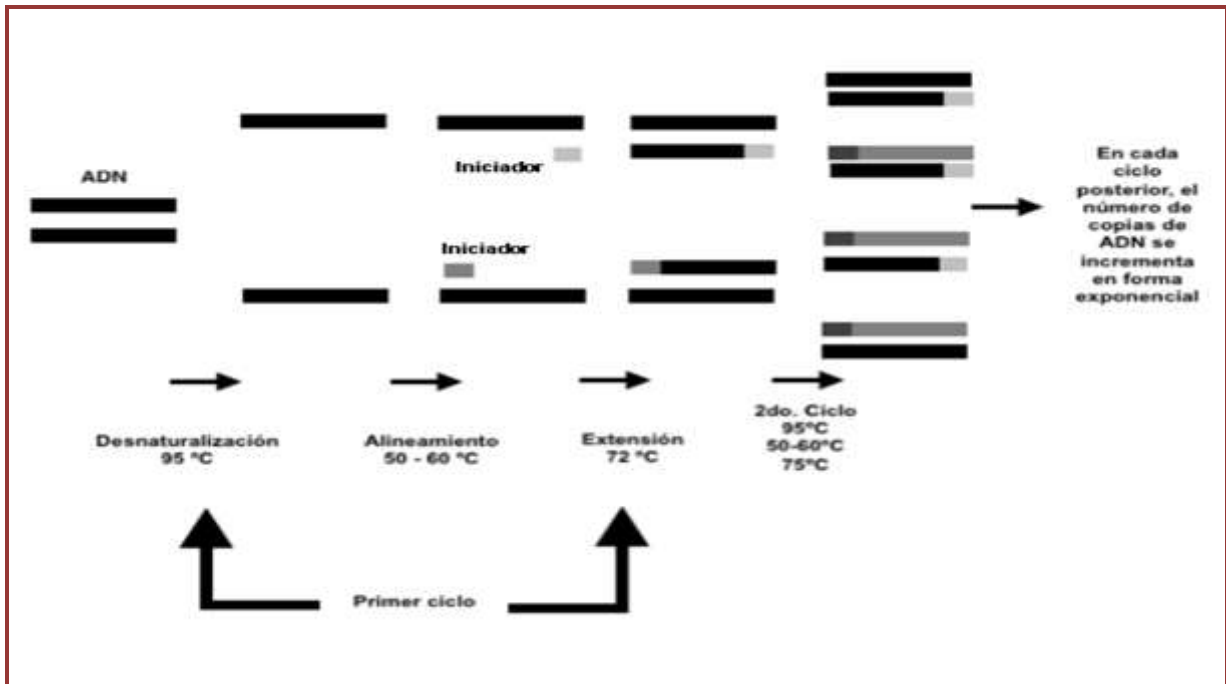
La reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es la técnica de rutina más empleada para el copiado o reproducción de fragmentos de ADN *in vitro*. Sus inicios se remontan a 1971 cuando Gobin Khorana intentó amplificar un fragmento de ADN de forma artificial. Tuvo que pasar más de una década para que el proceso fuera desarrollado de forma definitiva, siendo Kary Mullis y sus colegas los artífices de esta técnica. El proceso de PCR está fundamentado en la replicación natural del ADN a nivel celular, donde se requieren de una serie de sustancias químicas y proteínas para llevar a cabo el proceso.

La técnica *in vitro* requiere de un ADN molde, nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina), oligonucleótidos<sup>5</sup> o iniciador y una ADN polimerasa. La reacción es llevada a cabo en tres pasos: desnaturalización, hibridación y polimerización o extensión. En la desnaturalización el ADN es calentado a 94-95°C lo que permite la separación de las cadenas de ADN por ruptura de los puentes de hidrógeno que unen a las bases nitrogenadas de las cadenas complementarias; La hibridación es dependiente de la secuencia de los oligonucleótidos, pero de forma normal se realiza a una temperatura de 50-60°C donde los oligonucleótidos se unen a una secuencia complementaria de ADN molde. Por último, la ADN polimerasa busca un extremo 3' libre para comenzar a pegar nucleótidos libres hasta encontrarse con el oligonucleótido del extremo opuesto, conociéndose esta fase como polimerización,

---

<sup>5</sup> Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ADN de 15-30 pb (pares de bases o nucleótidos) de cadena sencilla que se unen al ADN molde por medio de la hibridación o unión de secuencias complementarias. Estas pequeñas cadenas de ADN son diseñadas de acuerdo a la secuencia de ADN molde que se quiere amplificar, tienen la función de flanquear el fragmento a amplificar y proporcionar un extremo 3' libre para que la ADN polimerasa inicie la formación o polimerización de una nueva cadena de ADN.

la cual se realiza a una temperatura de 72°C. El ciclo de desnaturalización, hibridación y polimerización genera una nueva molécula de ADN, normalmente este ciclo se repite 30 veces, lo que teóricamente permite generar un millón de copias a partir de una molécula de ADN molde (figura 3) (Serrato *et al.* 2014).

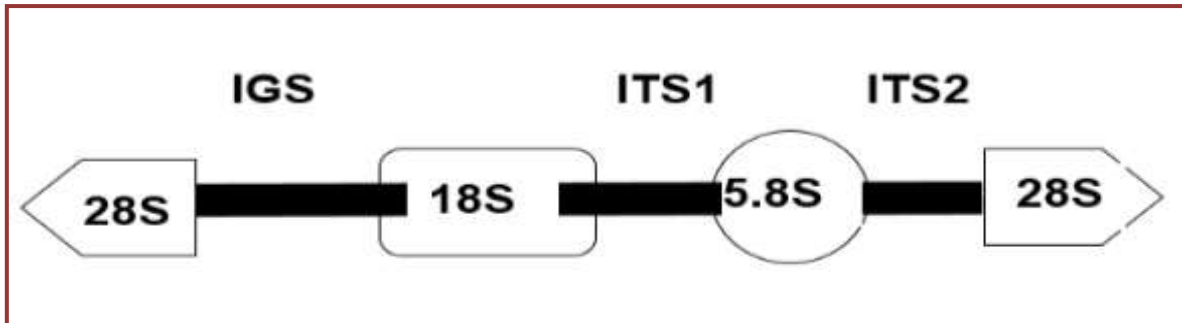


**Figura 3.** Esquema del proceso de la polimerización en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)<sup>6</sup>.

En las últimas décadas la identificación de organismos ha sufrido una amplia modificación, aunque se siguen realizando la identificación taxonómica (tradicional como la mencionan algunos autores), en muchas ocasiones se hace uso de la identificación molecular, esto debido principalmente por la falta de especialistas en la taxonomía de ciertos grupos de organismos y por la rapidez con que se requieren los resultados. En el caso de los hongos, una amplia serie de estudios han determinado que las regiones del genoma que permiten las mejores identificaciones de estos organismos son los genes ribosomales y las regiones de ADN que los separan, llamadas regiones espaciadoras transcritas (ITS). Los genes ribosomales más empleados son el 28S o LSU y el 18S ó SSU, siendo el espaciador transcrito número 2 ampliamente usado también (figura 4) (Garzón, 2013).

<sup>6</sup> Fuente: Serrato *et al.* 2014.

La amplificación de un fragmento de algunas de las regiones ribosomales permite realizar la identificación del hongo, la secuencia nucleotídica obtenida de la amplificación se contrasta con secuencias almacenadas en bases de datos especializadas como GenBank (National Center for Biotechnology Information), ENA (European Nucleotide Archive of European Molecular Biology Laboratory) y DDJB (DNA Data Bank of Japan). El contraste de secuencias de ADN se realiza por medio de un algoritmo matemático que realiza la búsqueda de similitud de la secuencia dada con las secuencias almacenadas, el algoritmo más empleado para esta tarea es el Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990; Saikia y Kadoo, 2010).



**Figura 4.** Representación esquemática de los genes ribosomales en hongos (Garzón, 2013)

## **2.8 Técnicas analíticas en la evaluación química y farmacológica de hongos**

### **2.8.1 Cromatografía de capa fina (TLC)**

Es una técnica analítica próxima, que permite poder saber de forma general la constitución de un extracto, aunque en casos especiales puede servir para determinar algún compuesto característico por medio del empleo de estándares ya conocidos. Sus inicios datan de principios del siglo pasado cuando Michael Tswett la utilizó para el estudio de pigmentos vegetales. Unos años después, en 1912, Ismalov y Scraiber la perfeccionaron empleando como base láminas de cristal recubiertas con alúmina.

Quien logró estandarizar la técnica fue Stahl en 1956, fue desde este momento que se masificó en el estudio analítico. Las placas para cromatografía de capa fina pueden ser de vidrio, aluminio o plástico, recubiertas de una matriz como silica gel, alúmina, celulosa o poliamidas. La muestra a analizar es colocada cerca de uno de los extremos de la placa, la muestra es absorbida por los componentes de la matriz debido a las interacciones químicas que se establecen. La placa posteriormente es colocada en un sistema de solvente llamado fase móvil, esta última migra sobre la superficie de la placa a través de la matriz por capilaridad, arrastrando a los componentes de la muestra. Los componentes pequeños migran de forma más rápida y los grandes de forma más lenta. Al final de la separación los compuestos son visualizados por la adición de alguna sustancia química, temperatura o por luz ultravioleta.

La velocidad del desplazamiento de cualquier molécula desconocida es importante para caracterizar dicha molécula, debiendo calcular para ello su factor de retención [Rf], que es el cociente de la distancia recorrida del compuesto entre la distancia recorrida del solvente. Cuando se quiere identificar alguna sustancia desconocida es importante correr los estándares junto con la sustancia desconocida (Waksmundzka-Hajnos *et al.* 2008; Sherma, 2003).

### **2.8.2 Espectro Ultravioleta/visible (UV/vis)**

Es la técnica aplicada para conocer de inicio la composición proximal de un extracto, o la identificación de un conjunto de compuestos o de una sustancia. Aunque la dispersión de la luz ya se conocía desde el siglo XVIII por Newton, fue hasta 1859 que Bunsen y Kirchhoff crearon el análisis espectral. El fundamento de esta técnica está basado en la absorción de cierta longitud de onda de la luz por parte de un compuesto o sustancia. El espectro electromagnético se extiende desde la energía de mayor longitud como las ondas de radio o microondas pasando por la luz visible, ultravioleta hasta la energía de menor longitud de onda como los rayos gamma. Normalmente la espectrometría utiliza la energía con longitud de onda de la región de 200 a 1,000 nm, zona donde absorben la mayoría de los compuestos orgánicos, por debajo de los 200 nm se requieren condiciones de vacío, ya que el oxígeno y los solventes suelen absorber en esa región, denominada uv de vacío.

Para la medición de la absorción de la energía por parte de los compuestos orgánicos se utiliza el espectrofotómetro, una de las aplicaciones más recurrentes realizadas en estos equipos es la de determinar la concentración de algún compuesto, para ello los valores de absorbancia obtenidos deben estar en el rango de 0.1 a 0.8, independientemente de la sensibilidad del equipo, ya que en esta región se considera que la absorbancia tiene una relación lineal con la concentración de acuerdo a la ley de Lambert-Beer (Skoog, 2007).

### **2.8.3 Determinación de fenoles totales**

Los fenoles son componentes importantes a nivel metabólico, ya que están asociados a una cantidad importante de actividades bioquímicas, que permiten la sobrevivencia de los organismos que los sintetizan. La determinación de los compuestos fenólicos se realiza debido a que están asociados a diferentes actividades farmacológicas. Los métodos de detección de estos compuestos se realizan normalmente por la técnica desarrollada por Singleton y Rossi (1965), la cual utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Para la determinación de los fenoles por este método se realiza en un espectrofotómetro a 760 nm. Otra forma de estimar la concentración de fenoles es realizando una medición a 280 nm (Madaan *et al.* 2011).

#### **2.8.4 Determinación de flavonoides totales**

Para determinar la presencia o identificar a los flavonoides es necesario apoyarse en sus propiedades químicas y físicas. La identificación de estos compuestos se puede realizar a través de reacciones químicas o por medio de técnicas analíticas.

El método es realizado con la incubación de la mezcla del extracto con cloruro de aluminio y acetato de potasio, pasando a la determinación de los flavonoides, la cual se realiza en un espectrofotómetro a 415 nm (Madaan *et al.* 2011).

#### **2.8.5 Determinación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante es una medida que nos proporciona una referencia de la concentración de compuestos que tienen la capacidad para donar un átomo de hidrógeno, aun compuesto reactivo o radical libre. Existen varios métodos para determinar este parámetro como ORAC (oxygen radical absorbance capacity), FRAP (ferric-reducing antioxidant power), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DMPD (N,N-dimethyl-p-phenyldiamine), TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter), PCL (photochemiluminescence) y DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Este último es ampliamente empleado debido a su sencillez y su reproducibilidad. El DPPH es un radical libre estable, que no forma dímeros, su máxima absorción la presenta a 514 nm, presenta una coloración morada. El DPPH en presencia de donadores de átomos de hidrogeno se reduce provocando un cambio de coloración de morado a amarillo. La decoloración del DPPH es estequiométricamente directa con el número de electrones capturados. El DPPH es un radical libre no específico para un antioxidante, por lo cual se puede aplicar para la detección de un sin número de antioxidantes. Normalmente los resultados de este método se pueden reportar en equivalentes de ácido ascórbico (EAA/g) o en equivalentes de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) (ET/g) (Huang *et al.* 2005).

### **Capítulo 3. Planteamiento del problema**

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (Gutiérrez, 2013) son 5 las enfermedades que más afectan a los mexicanos, todas ellas crónicas degenerativas. El primer lugar de las defunciones se debe a la diabetes, seguida de las enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertensión, obesidad y sobrepeso. Las altas prevalencias de dichas enfermedades afectan a una proporción importante de la población adulta. Pero lo alarmante es que la prevalencia de dichas enfermedades sigue aumentando año con año, por lo que se estima que en una década y media el sistema de salud mexicano colapsará debido a la alta tasa de personas enfermas (Gutiérrez, 2013). Ante este panorama es importante buscar todas las estrategias que permitan poder prevenir o curar los padecimientos de los mexicanos. Una de estas estrategias es buscar metabolitos que puedan ser utilizados en el tratamiento de las enfermedades crónicas degenerativas de la población mexicana. Siendo los hongos una fuente importante de metabolitos, por lo que no debemos escatimar en su estudio.

## Capítulo 4. Justificación

Son diversos los fármacos provenientes del metabolismo de los hongos que la población actual emplea; sin embargo, en las últimas décadas se han incrementado los estudios de exploración en búsqueda de nuevos compuestos químicos bioactivos provenientes de los hongos. Aunque se ha avanzado de forma significativa en el conocimiento del metabolismo y los productos de este, en los hongos, los resultados parecen pobres comparados con la cantidad de especies estimadas, alrededor de 1, 600,000 (Hawksworth, 2006).

En nuestro país la riqueza fúngica con que se cuenta es de 200,000 especies de las cuales se tienen registradas 4,500 de macrohongos y 2,500 de microhongos. Dentro de los microhongos se encuentran los hongos fitopatógenos de los cuales solo 1,500 han sido registrados. (Aguirre-Acosta *et al.* 2014). Se han estudiado solo el 4%, lo que da cuenta del largo camino que se requiere recorrer para conocer de una forma más profunda el metabolismo de los hongos y su influencia en la síntesis de moléculas con actividad farmacológica. Algunos reportes mencionan que los metabolitos o compuestos químicos con actividad farmacológica encontrados en hongos son a nivel de estructura química muy diversos, sin embargo, en México son pocos los estudios elaborados en la búsqueda de moléculas fúngicas bioactivas (Guzmán, 1998; Wasser, 2011).

Dentro del grupo de los hongos existen algunos que son capaces de parasitar microorganismos, insectos, animales y plantas. Los que tienen como hospedero los vegetales se les conoce normalmente como hongos fitopatógenos, tienen una gran importancia debido a que atacan los cultivos agrícolas, han sido ampliamente estudiados para tratar de entender sus procesos patogénicos y su control químico o biológico. Entretanto, es poco lo que conocemos de la biosíntesis de compuestos bioactivos por parte de estos hongos. Algunos autores han encontrado que algunas cepas de hongos fitopatógenas de *Fusarium sp.* y *Sclerotium sp.* son capaces de sintetizar moléculas con actividad antimicrobiana, anticancerígena e inmunoestimuladora. Se cree que la capacidad de producir una cantidad importante de metabolitos por parte de estos organismos es debido a que son habitantes normales del suelo, donde tienen que competir de manera eficaz con un

considerable número de organismos pobladores de dicho ecosistema (Vaz *et al.* 2005).

Por lo antes mencionado tenemos la hipótesis de que la cepa de *Fusarium oxysporum* empleada en el presente estudio es capaz de sintetizar una amplia variedad de compuestos con actividad biológica, además, de que se debe continuar con la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividad farmacológica dentro del grupo de los hongos, que en un futuro permitan en algún momento ser empleados para el tratamiento de las enfermedades crónico degenerativas de la población mexicana.

## Capítulo 5. Objetivos

### 5.1 General

Evaluar el potencial farmacológico del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* aislado del cultivo de frijol.

### 5.2 Particulares

1. Obtener una cepa del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* para llevar a cabo la presente investigación.
2. Realizar la identificación molecular a través de ADN de la cepa de *Fusarium oxysporum* empleada en esta investigación.
3. Estandarizar las condiciones de cultivo sólido y líquido para el hongo *Fusarium oxysporum*.
4. Extraer y caracterizar químicamente los metabolitos a partir del micelio de *Fusarium oxysporum* cultivado en medio PD, mediante técnicas espectrofotométrica (colorimétricas) y cromatográficas (cromatografía en capa fina).
5. Evaluar el potencial de farmacológico *in vitro* de los extractos de acetona, acetato de etilo, hexano, acuoso, metanol y caldo de cultivo del hongo *Fusarium oxysporum*.

## **Capítulo 6. Metodología**

### **6.1 Diseño de la investigación**

Esta investigación se realizó a partir de la obtención del micelio de *Fusarium oxysporum*, una vez obtenido el micelio en medio sólido PDA, se realizó la primera parte que consistió en el cultivo de la cepa obtenida en medio líquido PD, siguiendo con la obtención de los extractos en diferentes solventes y finalizando con la caracterización química y farmacológica de los extractos. La segunda parte consistió en el cultivo de la cepa en medio líquido PD, para posteriormente realizar la extracción de ADN, concluyendo con la identificación molecular del hongo (figura 5).

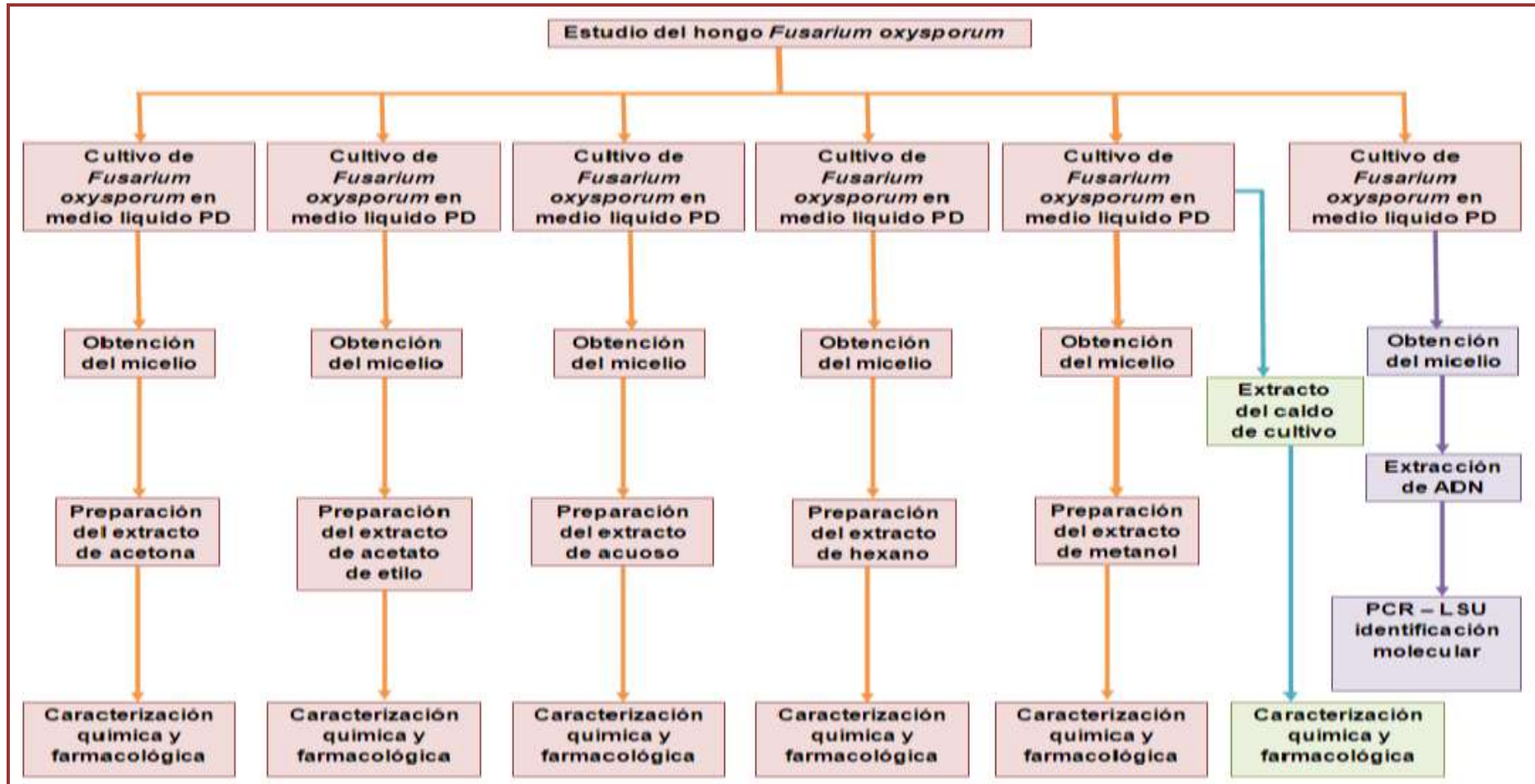


Figura 5. Diagrama del diseño experimental de la evaluación química y farmacológica de *Fusarium oxysporum*

## **6.2 Adquisición del material biológico**

El hongo utilizado en este estudio fue proporcionado por el Dr. Marcelo Acosta Ramos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). La cepa de *Fusarium oxysporum* estudiada fue aislada de un cultivo de frijol infectado por *Fusarium sp.* en el municipio de Texcoco, Estado de México.

## **6.3 Cultivo del hongo *Fusarium oxysporum***

### **6.3.1 Medio sólido papa-dextrosa-agar (PDA)**

Se pesaron 3.9 g de medio comercial PDA, enseguida fueron disueltos en 96 ml de agua destilada. El medio fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos, posteriormente fue colocado en cajas de Petri de 15x100 mm, adicionando en cada caja de Petri aproximadamente 30 ml de medio de cultivo. Una vez sembradas las cajas de Petri se incubaron durante 8 días a una temperatura de 25°C (Villicaña, 2015).

### **6.3.2 Medio líquido papa-dextrosa (PD)**

Se prepararon 12 litros de medio de cultivo líquido PD. Para cada litro se pesó 200 g de papas peladas y cortadas, colocándolas a hervir en agua destilada durante 20 minutos. Posteriormente se recuperó solo la parte líquida, a la cual se le agregó 20 g de dextrosa, manteniendo en agitación constante durante 5 minutos, el pH se ajustó a 5.0 con ácido clorhídrico y por último se aforó a un litro con agua destilada.

A cada uno de los reactores se le adicionó 1 L de medio de cultivo, posteriormente cada reactor fue esterilizado a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizados los reactores se inocularon con 10 cm<sup>2</sup> de micelio de *Fusarium oxysporum* cada uno y fueron incubados a una temperatura de 25°C por un período de 30 días, oxigenándolos dos veces al día (Villicaña, 2015).

#### **6.4 Obtención de los extractos del hongo *Fusarium oxysporum***

Para la obtención de los extractos del hongo *Fusarium oxysporum* se utilizó un promedio de 196 a 240 g de micelio húmedo, procedente de dos reactores, para cada uno de los solventes (acetona, acetato de etilo, metanol, agua destilada y hexano). El micelio fue separado del caldo de cultivo y después molido con 350 mL del solvente. A continuación, el extracto se dejó en maceración durante 15 días a temperatura ambiente.

Después de haber transcurrido el tiempo de maceración, el extracto fue filtrado dos veces, la parte líquida fue colocada en un rotavapor a presión reducida para separar el solvente del extracto. La temperatura de destilación estuvo en función del punto de evaporación de cada uno de los solventes utilizados. Los extractos obtenidos fueron utilizados para realizar la evaluación química (presencia de antraquinonas, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas) y farmacológica (cuantificación de flavonoides totales, fenoles totales, DPPH y toxicidad en el modelo de *Artemia salina*) (Villicaña, 2015).

#### **6.5 Extracción de ADN del hongo *Fusarium oxysporum***

Para realizar la extracción de ADN se utilizó el kit comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep. El micelio de *Fusarium oxysporum* fue crecido en medio PD líquido, posteriormente separado del caldo de cultivo y molido en un mortero, en presencia de 2 ml de buffer de fosfato (PBS), tomando un ml de la suspensión celular y centrifugando a 5,000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se colocó 350µL de buffer de fosfatos salinos.

A continuación se agregó 0.9 µL de RNasa A, mezclando con el vórtex durante 30 segundos. Enseguida se adicionó 20 µL de proteinasa K y 150 µL de buffer de lisis de tejido A; se mezcló por 1 minuto y se incubó a 56°C por 10 minutos en el termoblock. Transcurrido el tiempo, se agregó 350 µL de buffer de lisis tejido B, se mezcló durante 30 segundos y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 minutos.

Se recuperó el sobrenadante y se colocó en una columna de purificación. A continuación se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y se agregó a la columna 500 µL de buffer de lavado A, se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto y se desechó el filtrado.

Inmediatamente después se agregó 700 µL de buffer de lavado B a la columna, se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto. Este último paso se repitió una vez más. Después la columna fue centrifugada a 12,000 x g durante 1 minuto para eliminar los residuos de alcohol.

Por último se agregó 120 µL de la solución de elución de ADN, se dejó incubar durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto. El ADN recuperado fue almacenado a -20°C hasta su uso.

## 6.6 Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de agarosa en los geles depende del tamaño de los fragmentos de ADN que se quieran separar (tabla 2). En este trabajo se elaboraron geles de 2.0% (p/v) para los productos de PCR y 0.8% (p/v) para el ADN genómico de alto peso molecular.

❖ **Tabla 2.** Concentraciones de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN a separar<sup>7</sup>.

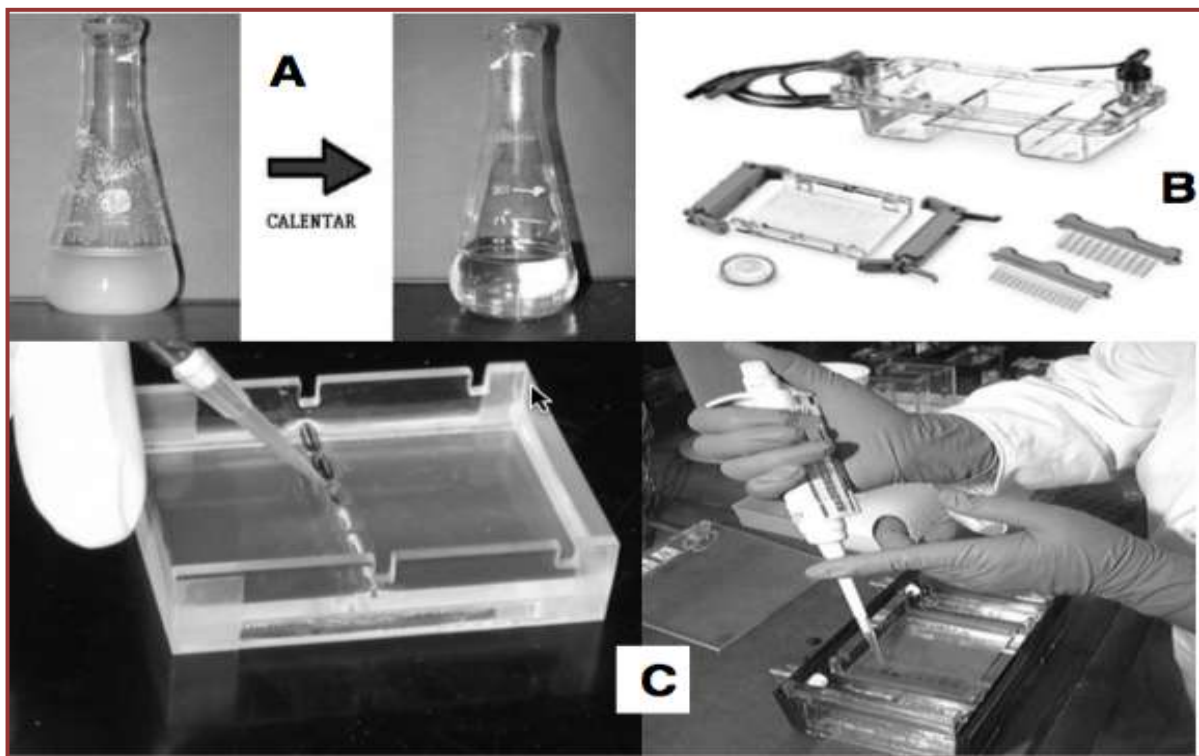
Concentración de Agarosa (% p/v)	Tamaño de los fragmentos de ADN
0.3	5-60kpb
0.5	1-30kpb
0.7	0.8-12kpb
1.0	0.5-10kpb
1.2	0.4-7kpb
1.5	0.2-3kpb
2.0	0.05-2kpb

<sup>7</sup> Fuente: Sierra-Palacios, 2005.

Se pesó una cantidad adecuada de agarosa dependiendo de los fragmentos de ADN a visualizar. Posteriormente se agregó 40 ml de buffer TAE 0.5X<sup>8</sup>. A continuación, se calentó hasta punto de ebullición en un horno de microondas durante un tiempo aproximado de 1 minuto.

Después se adicionó 0.3 µL de una solución de GelRed<sup>MR</sup> (dilución 1:6), se mezcló y se dejó que alcanzará una temperatura de 45°C. Posteriormente la agarosa disuelta fue vertida en la cubeta de electroforesis (figura 6). Una vez solidificado el gel se procedió a cargar las muestras. Las muestras fueron preparadas con 3 µL de buffer de carga 6X<sup>9</sup> y 5 µL de ADN.

Una vez cargadas las muestras en el gel, se realizó el corrimiento electroforético con buffer TAE 0.5X a 85 volts durante 2.5 horas. El ADN fue visualizado en un fotodocumentador Multi Doc de la marca UVP (Sambrook y Russell, 2001).



**Figura 6.** Preparación de un gel de agarosa. A) Disolución de la agarosa por calentamiento hasta ebullición. B) Cámara de electroforesis. C) Cargado de las muestras de ADN en gel de agarosa

<sup>8</sup> TAE 0.5X. Buffer compuesto por 10 mM de tris, 0.01 mM de acético y 1 mM de EDTA.

<sup>9</sup> Buffer de carga 6X. 40 % (v/v) de glicerol y 0.25 mL de orange G en 100 ml.

### 6.7 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Para poder llevar a cabo la identificación molecular del hongo *Fusarium oxysporum* se realizó la amplificación del marcador LSU ó 28S del ADNr. Para ello se utilizaron los primers LSU-F: 5'-acc cgc tga act taa gc-3' y LSU-R: 5'-tcc tga ggg aaa ctt cg-3 junto con otros reactivos (Villicaña. 2015). La reacción se diseñó de la siguiente manera (tabla 3):

❖ **Tabla 3.** Reacción de PCR para 25 µL (fragmento LSU).

Reactivo	Tubo 1	Tubo 2
Muestra	<i>Fusarium oxysporum</i>	Control negativo
dH <sub>2</sub> O	14.3 µL	15.3 µL
Buffer de la enzima 10X	2.5 µL	2.5 µL
dNTP's (10 mM)	1 µL	1 µL
Primer F (10 mM)	1 µL	1 µL
Primer R (10 mM)	1 µL	1 µL
ADN (Dilución 1:25)	1 µL	-
Enzima Vent (5 U/ µL)	0.2 µL	0.2 µL
Volumen final	25 µL	25 µL

Una vez elaborada la reacción, esta fue puesta en un termociclador MaxyGene II<sup>MR</sup>, bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial 94°C/3 minutos, 30 ciclos: desnaturalización 94°C/30 segundos; hibridación 54°C/45 segundos; polimerización 72°C/1.5 minutos y una última polimerización a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (p/v) (Sambrook y Rusell, 2001).

## **6.8 Identificación taxonómica y molecular del hongo *Fusarium oxysporum***

Para la identificación molecular de cualquier organismo, es necesario conocer la secuencia nucleotídica de algún marcador de ADN, por lo que el producto obtenido por PCR del marcador molecular LSU fue enviado a la unidad de secuenciación del IBT-UNAM. La secuencia fue analizada en tres bases de ADN, GenBank (NCBI), ENA-EMBL y DDBJ. Para el análisis se utilizó el algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1990), el resultado de este programa informático nos proporcionó la identificación del hongo.

## **6.9 Caracterización química de los extractos de *Fusarium oxysporum***

### **6.9.1 Obtención de los extractos**

Cada extracto fue preparado por maceración directa con 210 g micelio húmedo obtenido del cultivo del hongo en medio líquido PD. El micelio fue molido en una licuadora con 350 mL de solvente de diferente polaridad (acetona, acetato de etilo, agua destilada, hexano y metanol) y puesto en maceración durante 15 días. Posteriormente se filtró y se obtuvo el extracto final a presión reducida en un rotavapor. Finalmente con el concentrado obtenido se realizaron las pruebas químicas y farmacológicas posteriores (Villicaña, 2015).

### **6.9.2 Espectro de absorción de ultravioleta/visible**

Para obtener el espectro de absorción de los extractos de *Fusarium oxysporum* se colocaron alrededor de 1,500 ppm de cada uno de los extractos. De cada extracto se colocó 0.015 g disuelto en 10 ml del solvente correspondiente. Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis Jenway modelo 6705. Se evaluó el espectro en un rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm (Parra, 2013).

### **6.9.3 Determinación de antraquinonas**

Para esta determinación se empleó la cromatografía en placa fina (silica gel 60 F<sub>254</sub>). Con ayuda de un aplicador se colocó una porción de los diferentes extractos y caldo de cultivo obtenidos del hongo *Fusarium oxysporum* en placas de silica gel 60 F<sub>254</sub> (5x1cm), las cuales se corrieron en un disolvente (mezcla de 125 µL de metanol y 2,375 µL de diclorometano), una vez terminada la corrida, las placas se dejaron

secar por 1 minuto. Posteriormente se observaron en la cámara de ultravioleta, identificando como antraquinonas las marcas con fluorescencia violeta o rojo marrón (Peralta *et al.* 2013).

#### **6.9.4 Determinación de alcaloides.**

Para determinar la presencia de alcaloides se empleó la cromatografía en placa fina (silica gel 60 F<sub>254</sub>) con ayuda de un aplicador se colocó una porción de los diferentes extractos y caldo de cultivo, obtenidos del hongo *Fusarium oxysporum*. La aplicación se realizó en placas de silica gel 60 F<sub>254</sub> (5x1cm), las cuales se corrieron en un disolvente (mezcla de 125 µL de metanol y 2,375 µL de diclorometano). Terminado la corrida, se dejó secar las placas por 1 minuto (Peralta *et al.* 2013). Posteriormente se observaron bajo luz ultravioleta (UV) y enseguida se revelaron con el reactivo de Dragendorff (Palomino, 2012). La aparición de una coloración roja-marrón indicó la presencia de alcaloides.

#### **6.9.5 Determinación de taninos**

Esta determinación se realizó en tres tubos de ensaye. Se disolvió 0.050 g del extracto o caldo de cultivo en 10 mL de agua destilada; posteriormente, se le adicionó a los tubos los siguientes reactivos:

- a) tubo de ensaye 1: 0.01g de grenetina en polvo.
- b) tubo de ensaye 2: 0.01g de grenetina y 0.1 g de sal.
- c) tubo de ensaye 3: 0.1 g de sal.

A continuación los tubos fueron vigorosamente mezclados. La aparición de un precipitado blanco en los tubos A y/o B indicó la presencia de taninos en el extracto o caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* (Peralta *et al.* 2013).

#### **6.9.6 Determinación de saponinas**

Para la determinación de saponinas se utilizó el tubo de ensaye del inciso C del apartado 6.9.5, el tubo se agitó vigorosamente y se dejó reposar 20 minutos, la aparición de espuma y su estabilidad durante más de dos minutos, nos indicó la presencia de saponinas en los extracto o caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* (Peralta *et al.* 2013).

### 6.9.7 Determinación de cumarinas volátiles

Para determinar cumarinas volátiles se utilizó el tubo de ensaye del inciso C del apartado 6.9.5. El tubo se colocó en baño maría hasta punto de ebullición, se tapó con un trozo de papel filtro humedecido en una solución de sosa (1 g de hidróxido de sodio en 15 mL de agua). Posteriormente el papel filtro fue retirado y se dejó secar. Enseguida el papel filtro se expuso en una cámara de luz ultravioleta. La aparición de fluorescencia amarilla indicó la presencia de cumarinas volátiles (Peralta *et al.* 2013).

### 6.10 Evaluación farmacológica *in vitro* de los extractos de *Fusarium oxysporum*

#### 6.10.1 Contenido de flavonoides totales

Para determinar flavonoides totales, se colocó de manera directa en un tubo de ensaye de 0.05 a 0.3 g de extracto de *Fusarium oxysporum*, 1.5 ml de metanol, 100  $\mu$ L de cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) al 10% (p/v), 100  $\mu$ L de acetato de potasio ( $CH_3CO_2K$ ) 1 M y 2,800  $\mu$ L de agua destilada. Se dejó reposar por 30 minutos, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 415 nm, los datos de absorbancia se tomaron en un rango de 0.3 a 0.8, reportando los resultados en mg de quercitina/g de extracto.

En el caso del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*, se pesó 1 g del medio de cultivo concentrado y se resuspendió en 2 mL de metanol al 80% (v/v). Se tomaron 500  $\mu$ L de solución y se le agregó 1.5 mL de metanol y 100  $\mu$ L de cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) al 10% (p/v) y 100  $\mu$ L de acetato de potasio ( $CH_3CO_2K$ ) 1M y 2,800  $\mu$ L de agua destilada ( $dH_2O$ ). Se dejó reposar por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 415 nm, los valores obtenidos estuvieron en un rango de 0.3 a 0.8, reportando los resultados en mg de quercitina/g de extracto (Peña, 2014).

### 6.10.2 Contenido de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron usando el reactivo de Folin–Ciocalteu mediante la técnica descrita por Singleton y Rossi, (1965). Se colocaron en un tubo de ensaye de 0.03 a 0.1 g de extracto de *Fusarium oxysporum* y 2 mL de metanol al 80% (v/v), se mezclaron por 1 minuto. Posteriormente se tomó 200 µl de la mezcla y se colocó en un segundo tubo con 1,000 µL de reactivo de Folin–Ciocalteu (diluido 1:10 (v/v) en agua) y se dejó reposar por 1 minuto. Pasado el tiempo se agregó 800 µL de carbonato anhidro 7.5% (p/v), se mezcló y se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Jenway® a una longitud de onda de 715 nm y en un rango de densidad óptica de 0.3 a 0.7. El contenido de compuestos fenólicos totales se reportó como mg de ácido gálico (EAG) en un g de extracto (Singleton y Rossi, 1965).

En el caso del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* se utilizó 0.050 g y se hizo el mismo procedimiento que con los otros extracto. Los resultados fueron reportados como mg de ácido gálico (EAG) en un g de caldo de cultivo concentrado (Singleton y Rossi, 1965).

### 6.10.3 Evaluación de la capacidad antioxidante del 2,2 difenil-1-picrilhidrazil

La capacidad antioxidante se determinó mediante un método colorimétrico, (Brand-Williams *et al.* 1995.) usando el radical comercial DPPH.

Se preparó una solución stock con 0.012 g de reactivo DPPH, se disolvió en 50 mL de metanol y su absorbancia se ajustó a 1.1, a una longitud de onda de 515 nm. A partir de la solución stock se preparó la solución de trabajo del diario, para ello se realizó una dilución 1:5 con metanol.

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se pesó de 7 a 52 mg del extracto de *Fusarium oxysporum*, adicionando 950 µL de la solución diaria DPPH, se dejó incubar durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados se reportaron como mg ácido ascórbico/g de extracto (Parra, 2014).

Para la determinación del potencial antioxidantes del caldo del cultivo de *Fusarium oxysporum*, se pesó 23.5 mg del extracto y 975 µL de la solución diaria DPPH, se dejó incubar durante 30 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados se reportaron como mg de ácido ascórbico/g de caldo de cultivo concentrado (Parra, 2014).

#### 6.10.4 Evaluación de la toxicidad *in vitro* en *Artemia salina*

La evaluación de la toxicidad *in vitro* en *Artemia salina* se realizó de la siguiente forma, se colocaron en un cristalizador 185 mg de quistes de *Artemia salina*, posteriormente fueron hidratados con agua destilada por 1 hora con aireación. Transcurrido el tiempo se retiró la aireación y se dejaron reposar unos minutos. Los quistes que flotaron se retiraron de la superficie con la ayuda de papel filtro. Los quistes que permanecieron en el fondo del cristalizador pasaron a la solución descapsulante<sup>10</sup> donde se mantuvieron de 7-10 minutos. Enseguida se lavaron los quistes con agua destilada. Después los quistes fueron depositados en un contenedor de 20x20x30 cm con 500 ml de salmuera pH 8 (10 g de sal de mar en 500 mL de dH<sub>2</sub>O) a 28°C, luz y oxígeno durante 24 horas, situación que permitió la eclosión de los quistes (Sorgellos, 1982). En esta prueba se emplearon el extracto acuoso, metanólico y el caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*.

Se empleó un blanco y tres repeticiones por cada extracto, se colocaron en tubos de ensaye diferentes concentraciones de cada extracto, cada tubo contenía 200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL, 10 ml de salmuera con 10 nauplios de *Artemia salina*. Estos se incubaron por 24 horas, bajo oxigenación y presencia de luz a una temperatura de 28°C. Pasadas las 24 horas se contaron el número de nauplios muertos, calculando así el porcentaje de concentración letal (CL<sub>50</sub>) en el programa Sigma Plot, es decir, la dosis mínima de extracto que mata al 50% de los nauplios de *Artemia salina* (Palomino, 2012).

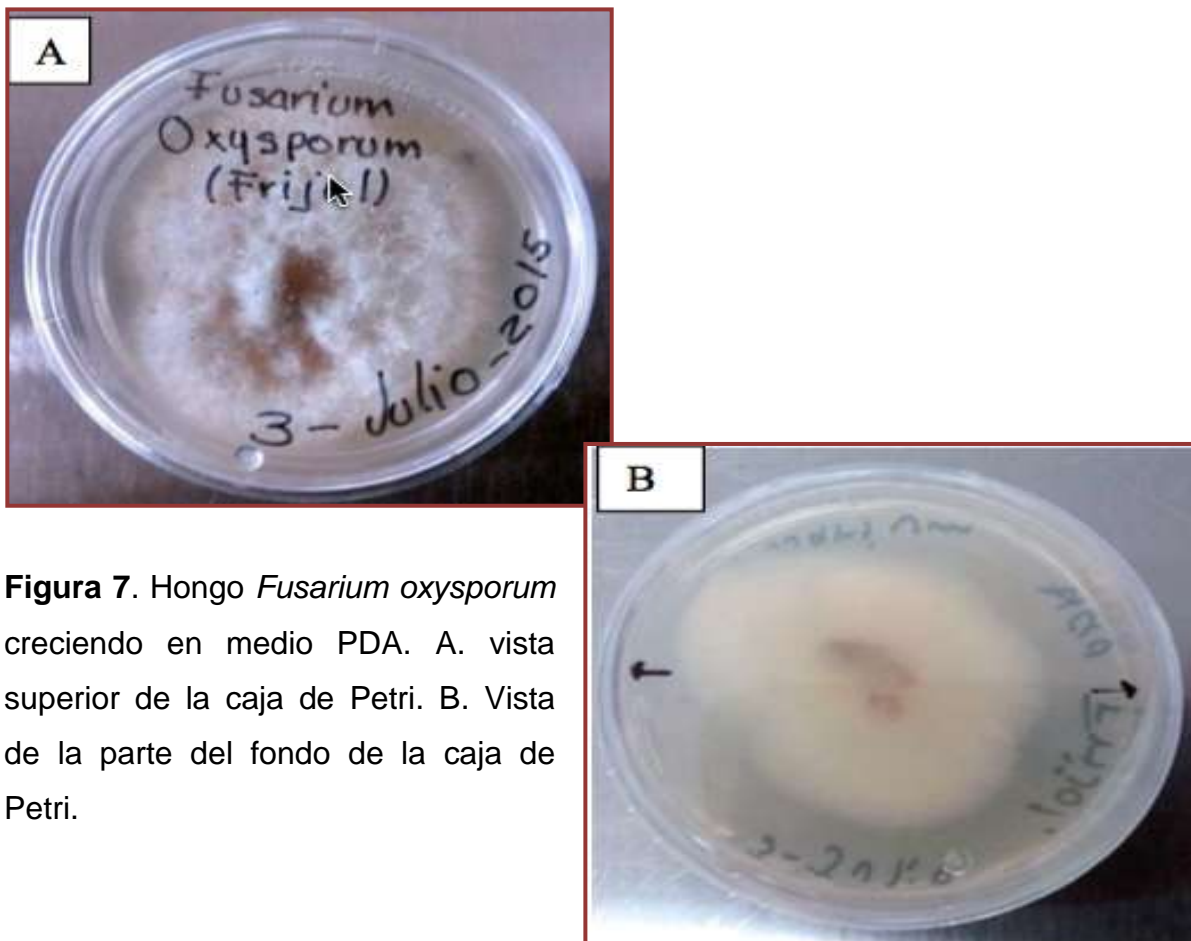
---

<sup>10</sup> Solución descapsulante: 1.3 ml salmuera (10 g de sal de mar en 500ml de dH<sub>2</sub>O) con 0.0277 g de NaOH y 1.26 ml de hipoclorito de sodio (cloro comercial)

## Capítulo 7. Resultados y discusión

### 7.1 Obtención de la cepa de *Fusarium oxysporum*.

La cepa del hongo *Fusarium oxysporum* utilizada en este estudio fue proporcionada por el Dr. Marcelo Acosta Ramos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Se creció en medio PDA durante una semana a 25°C (figura 7). Al mismo tiempo fueron tomadas las medidas del crecimiento radial, obteniendo una tasa promedio de crecimiento de 7.9 mm por día, encontrando el mayor crecimiento en el primer día (figura 8). Este resultado contrasta con el reportado por Vanmathi y Sivakumar, (2013); donde observaron tasas de crecimiento promedio máximas de 13.83 mm/día en una cepa de *Fusarium oxysporum* en medio PDA aislada en la India y un poco más alto a lo reportado por Singh y Vijay, (2011); de 6.14 mm/día.



**Figura 7.** Hongo *Fusarium oxysporum* creciendo en medio PDA. A. vista superior de la caja de Petri. B. Vista de la parte del fondo de la caja de Petri.

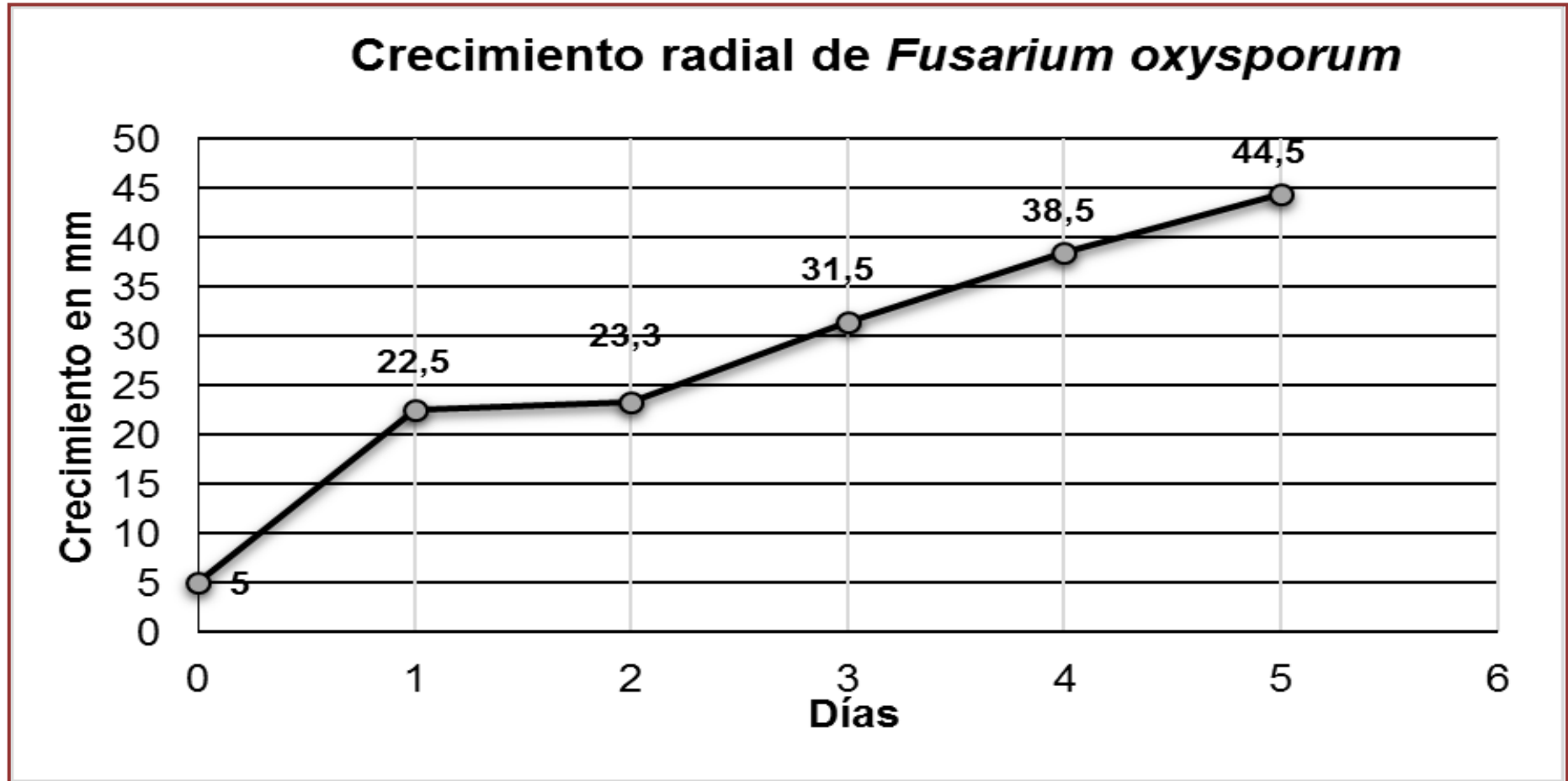


Figura 8. Gráfica del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* cultivado en medio PDA

## 7.2 Obtención de biomasa

Los reactores con medio PD líquido inoculados con micelio del hongo *Fusarium oxysporum*, tuvieron un crecimiento acelerado durante los primeros cinco días, posteriormente el crecimiento disminuyó (figura 8). Transcurrido el tiempo de cultivo se obtuvieron en promedio 214.16 g de micelio húmedo, cantidad de micelio puesto en maceración con cada uno de los solventes (figura 9; tabla 4).



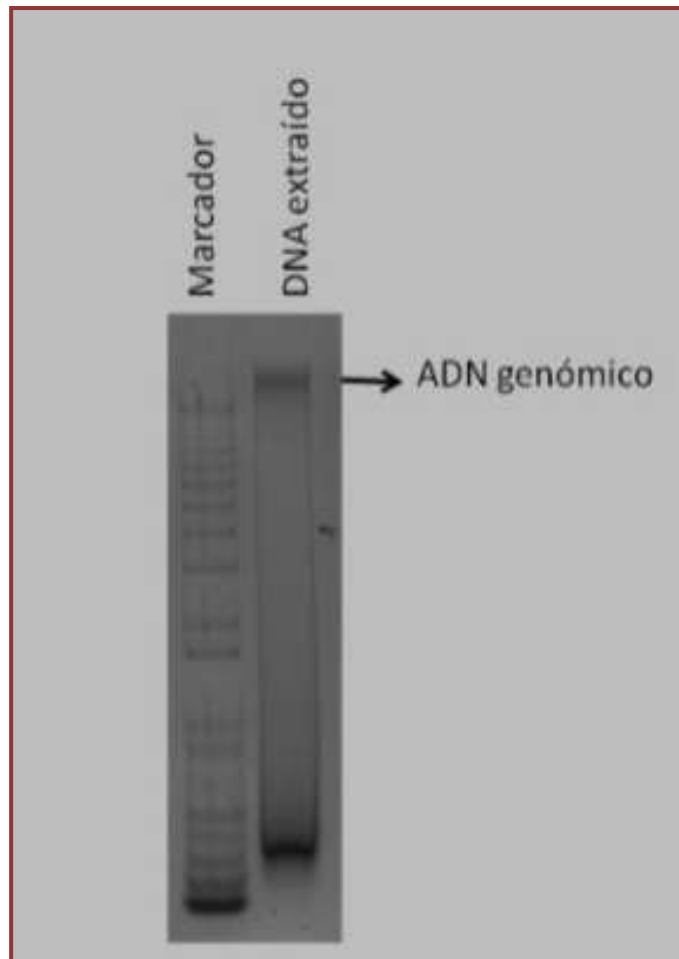
**Figura 9.** Crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en reactores de cultivo. Cada reactor contenía 1 litro de medio líquido PD a pH 5, una de entrada de aire estéril y una salida de CO<sub>2</sub>.

❖ **Tabla 4.** Micelio obtenido de *Fusarium oxysporum* y empleado en la elaboración de los extractos de acetato de etilo, acetona, agua, hexano y metanol.

Extracto	Cantidad de solvente (mL)	Cantidad de micelio húmedo (g)
Acetato de etilo	300	196
Acetona	400	200
Agua destilada	300	240
Hexano	300	238
Metanol	400	199

### 7.3 Extracción de ADN

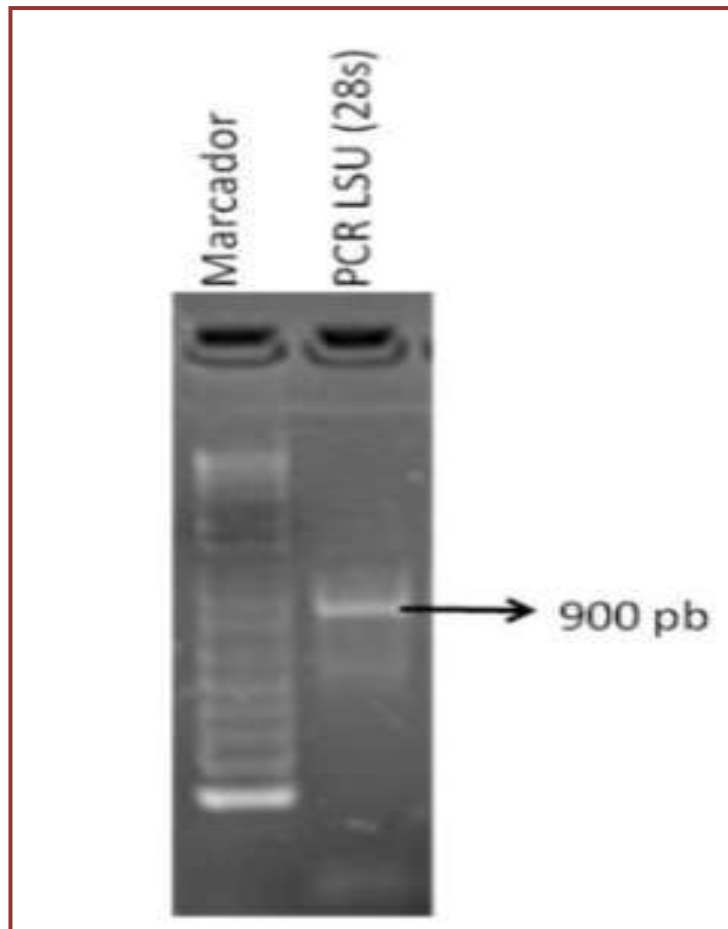
De la extracción de ADN se obtuvieron 22.5 µg a partir de 1 mL de una suspensión celular de micelio (aproximadamente 20 mg de micelio fresco). El ADN extraído fue corrido en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) con buffer TAE 0.5X, a un voltaje de 85 volts, durante 2.5 hora. Gran parte del ADN extraído tiene un alto peso molecular (figura 10). La extracción de ADN se puede considerar como buena ya que el rendimiento obtenido fue de alrededor de 1,125 µg/mg de micelio fresco, similar a la reportado por González-Mendoza *et al.* 2010.



**Figura 10.** Electroforesis del ADN genómico de *Fusarium oxysporum* en gel de agarosa al 0.8 % (p/v).

#### 7.4 Amplificación por PCR del marcador LSU

La amplificación del fragmento del gen 28S ó LSU fue comprobada en un gel de agarosa al 2% (p/v), la amplificación fue específica, ya que solo se observa una banda de aproximadamente 900 pb, tamaño de fragmento similar a lo encontrado por Nurbaya *et al.* (2014); en el género *Fusarium sp.* Dicha banda fue purificada y enviada a secuenciar para elaborar la identificación molecular de *Fusarium oxysporum* (figura 11).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) del fragmento de PCR del marcador LSU de *Fusarium oxysporum*.

### **7.5 Identificación molecular del hongo *Fusarium oxysporum***

El producto de la amplificación parcial por pcr del gen 28S ó LSU fue purificado con el kit Qiaex II y enviado a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia nucleotídica obtenida tiene 881 pb (figura 12). Con la secuencia conocida se realizó una búsqueda en distintas bases de datos de ADN (GenBank, ENA-EMBL y DDBJ), los resultados indican una similitud de la secuencia obtenida con las reportadas en las distintas bases de datos de ADN del 96-97% y con valores E de 0.0 con la secuencia número KF181210 correspondiente a un *Fusarium oxysporum*. Con los datos mencionados no existe duda alguna que el hongo que se empleó en este estudio es *Fusarium oxysporum* (figura 12 y tabla 5).

```
gattacagggattgccctagtaacggcgagtgaagcggctcgctcaaattgaaatctggctctcgggcccagttgtaattgtagaggatactttgatgcggtgcctcc  
gagttccctggaacgggacgccatagaggggtgagagccccgtctggtggatgccaaatctctgtaaagttccttcaacgagtcgagtagttgggaatgctgctctaaa  
tgggaggtactgatcttctaaagctaaataccggccagagaccgatagcgcacaagtagagtgatcgaagatgaaaagcactttgaaaagagagttaaaaagtac  
gtgaaattgtgaaaggaagcgttatgaccagactgggcttggttaatcatctggggtctcccagtgcactttccagtccaggccagcatcagtttccccgggggat  
aaaggcggcgggaatgtggctctctcggggagtgttatagcccaccgtgtaataccctgggggggactgaggtcgcgcatctgggaagatgctggcgtaatggtcatc  
aacgaccgtcaactttagccggaccaaggagtcgtcttcgatgagtggtcgggtgtcaaaccctacncgtaatgaaagtgaacgcaggtgagagcttcggcgca  
tcatcgaccgatcctgatgttctcggatggattgacattcacaccatacggggccggaccgaaaganggtgancatgcntgtatagggatgaagccagaggaaactct  
ggtggaggctcgcagcggttntgacgtgcaaatcgatcgtcaantatgggcatgggggcgaaagactaatcgaaccttctagtgctggactactagcgtagctgaaat
```

**Figura 12.** Secuencia parcial del gen 28S (LSU) de *Fusarium oxysporum* obtenida por PCR

❖ **Tabla 5.** Análisis de la secuencia nucleotídica del marcador LSU o 28S de *Fusarium oxysporum*

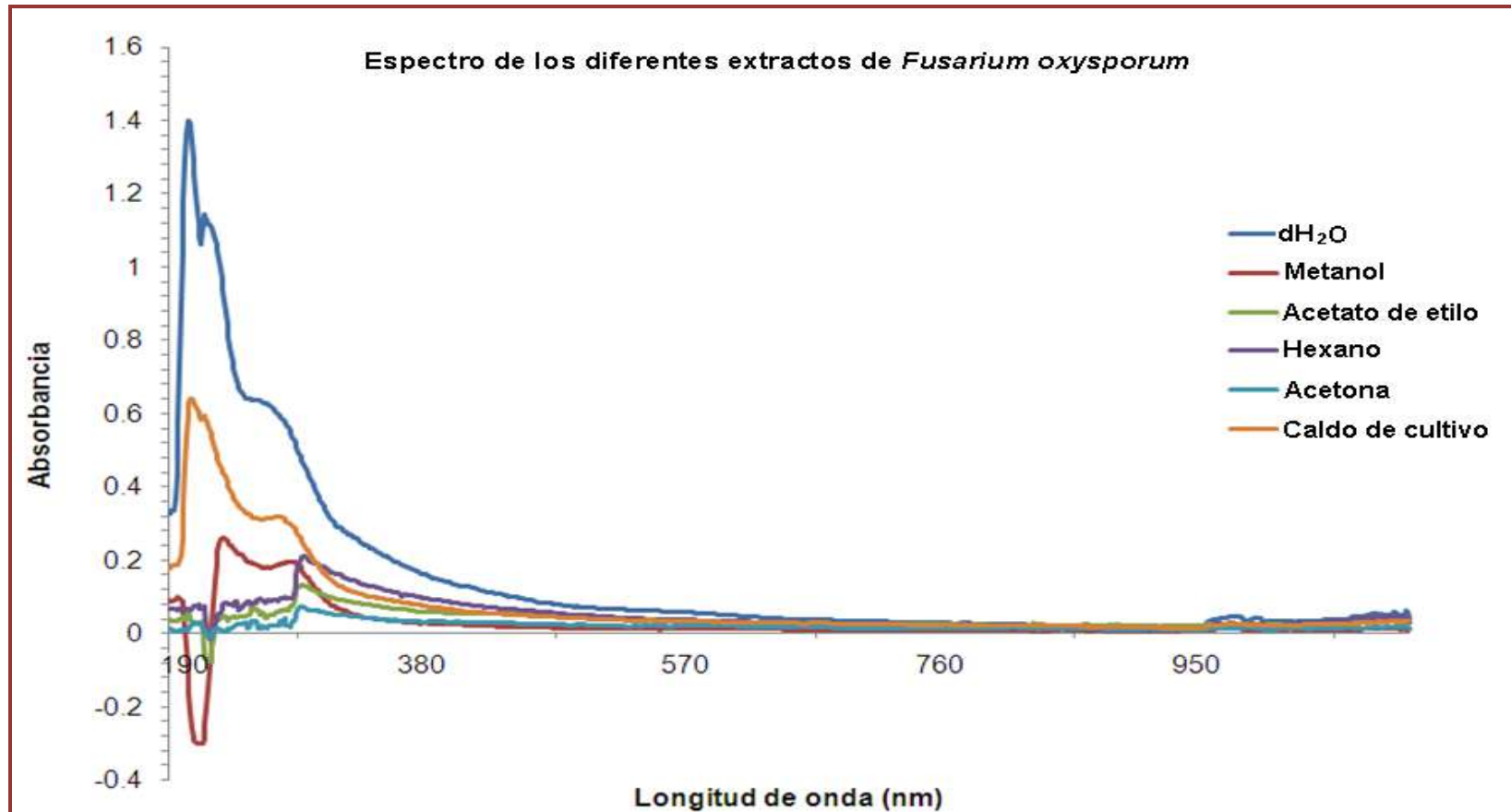
Hongo	Base de datos NCBI		Base de datos DDBJ		Base de datos ENA-EMBL		Código de la secuencia utilizada para realizar la comparación
	% de similitud*	Valor E <sup>a</sup>	% de similitud*	Valor E	% de similitud*	Valor E	
<i>Fusarium oxysporum</i>	97	0.0	96	0.0	96.4	0.0	KF181210

(\*) Con secuencias almacenadas en cada una de la bases de datos empleadas. (a) Valor que indica que la secuencia encontrada para la comparación se realizó de forma aleatoria, entre más pequeño es el valor e, mayor similitud estadística existe entre las secuencias.

## 7.6 Caracterización química

### 7.6.1 Espectro de UV/visible

Para obtener el espectro de absorción de los extractos del hongo *Fusarium oxysporum*, se utilizó el espectrofotómetro en un intervalo de longitud de onda de 190 a 1,100 nm. Los extractos evaluados fueron de metanol, agua, acetona, acetato de etilo, hexano y el caldo de cultivo (figura 13). A primera vista todos los extractos presentan un perfil parecido, sin embargo, las curvas demuestran que el extracto acuoso tiene la mayor concentración de metabolitos, seguido del caldo de cultivo y el extracto metanólico. El resto de los extractos presentaron una baja concentración de metabolitos. En el extracto acuoso la mayor absorción de luz se registró aproximadamente a 210 nm, un segundo pico menos intenso se observó a 230 nm y un tercero a 270 nm. En el caso del caldo de cultivo presentó dos picos de absorción, el mayor a 210 nm y el segundo a 280 nm; mientras que en el metanol los picos se presentaron a 230 y 280 nm, el primero con mayor intensidad. Entretanto el extracto de acetato de etilo presentó un sólo pico alrededor de los 290 nm, situación similar resultó con el extracto de hexano y por último el extracto de acetona fue similar a los dos anteriores.



**Figura 13.** Espectro Uv/vis de los extractos de metanol, agua, acetona, acetato de etilo, hexano y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* cultivado en medio líquido PD pH 5.0

### 7.6.2 Evaluación química cualitativa de los extractos de *Fusarium oxysporum*

El análisis químico cualitativo mostró que en el extracto de acetato de etilo existe una concentración moderada de antraquinonas y taninos, escasa porción de alcaloides, ausencia de cumarinas y saponinas. En el extracto de hexano se encontró que existe una cantidad moderada de taninos, una escasa proporción de antraquinonas y alcaloides, no detectándose la presencia de cumarinas y saponinas. Para el caso del extracto acuoso se registró que existe una concentración abundante de taninos, una moderada cantidad de saponinas, una escasa concentración de antraquinonas y alcaloides, sin existencia de cumarinas. En lo relacionado al extracto de metanol se contempló una escasa proporción de taninos y saponinas, y ausencia de antraquinonas, alcaloides y cumarinas.

En el extracto de acetona se detectó moderada concentración de antraquinonas y taninos, escasa porción de alcaloides y ningún rastro de cumarinas volátiles y saponinas. El caldo de cultivo registró abundante existencia de taninos, moderada cantidad de saponinas y ausencia de antraquinonas, alcaloides y cumarinas volátiles (tabla 6).

Los resultados de la evaluación química cualitativa coinciden con lo encontrado por Li *et al.* (2015); en una de las cepas del género *Fusarium sp.* estudiadas, donde sólo encontró taninos y terpenoides. Sin embargo, el mismo autor en una segunda cepa de *Fusarium sp.* reveló la presencia de saponinas, terpenoides, esteroides, antraquinonas y alcaloides. Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con otros resultados de *Fusarium sp.* donde se registro la presencia de antraquinonas como 8-O-metilbostricoidina, 9-O-metilfusarubina, 9-O-metilanhidro-fusarubina, 5-O-metiljavanicina, 5-O-metilsolaniol, 1,4-naptalenodiona-3,8-dihidroxi-5,7-dimetoxi-2-(2-oxopropil); 2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona (Tatum *et al.* 1985; Baker *et al.* 1990; Nagiaa y EL-Mohamedyb, 2007), mientras que en otro reporte se menciona el hallazgo de alcaloides como vinblastina y vincristina en una cepa endófito de *Fusarium sp.* (Kumar *et al.* 2013; Tung *et al.* 2002).

❖ **Tabla 6.** Evaluación química cualitativa de los extractos y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*.

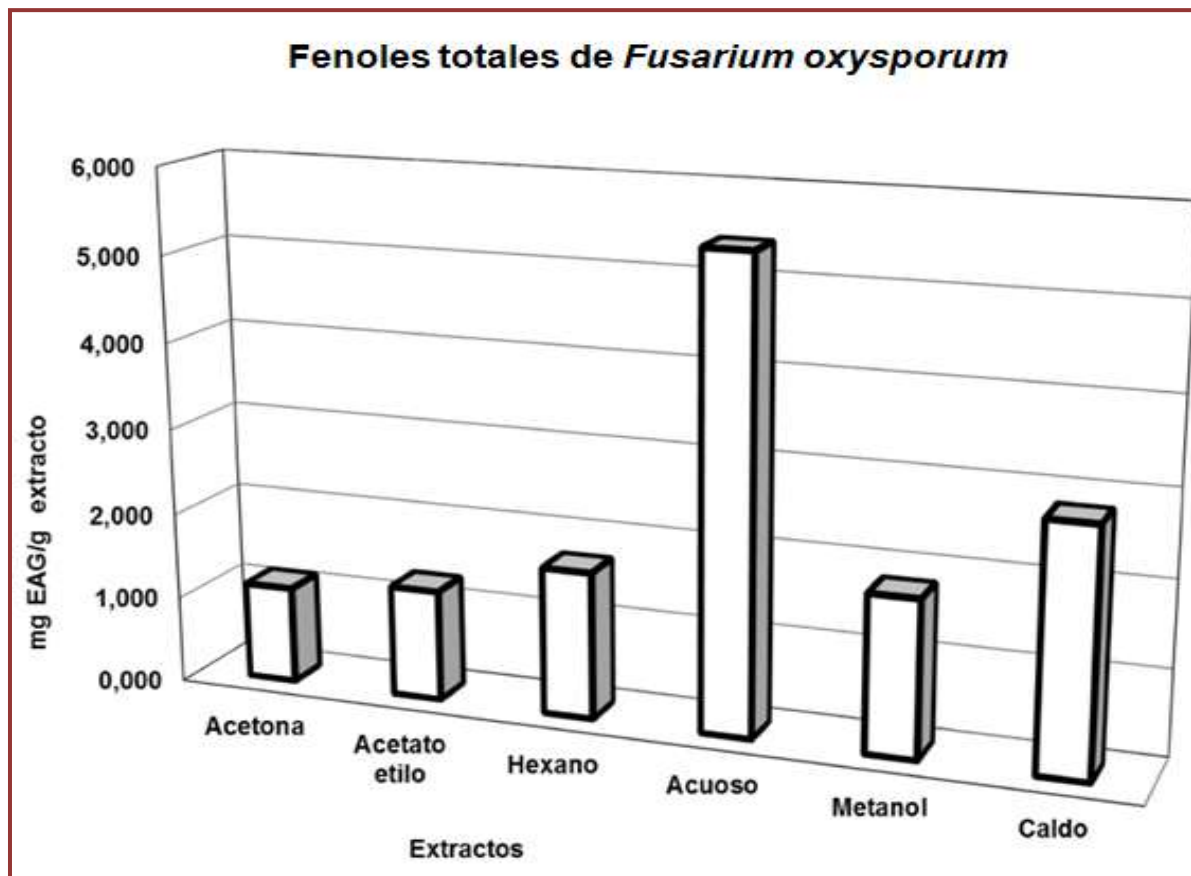
Extracto	Antraquinonas	Alcaloides	Taninos	Cumarinas	Saponinas
Acuoso	+	+	+++	-	++
Metanol	-	-	+	-	+
Acetato de etilo	++	+	++	-	-
Hexano	+	+	++	-	-
Acetona	++	+	++	-	-
Caldo de cultivo	-	-	+++	-	++

Escala cualitativa: (-) No se observó presencia, (+) escasa, (++) moderada, (+++) abundante.

### 7.6.3 Evaluación farmacológica *In vitro* de los extractos de *Fusarium oxysporum*

#### 7.6.3.1 Fenoles totales

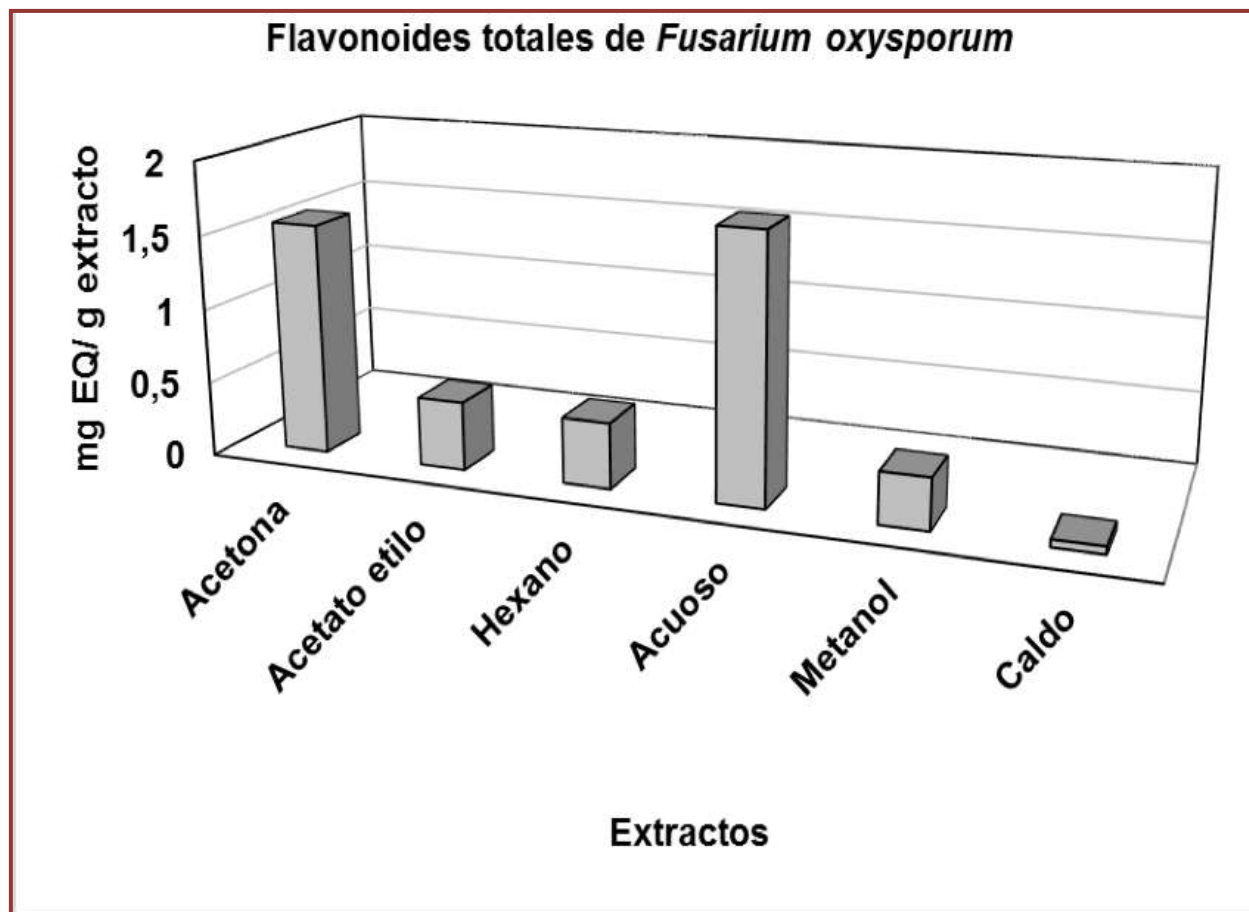
Las mayores concentraciones de estos compuestos se presentaron en los extractos de metanol, caldo de cultivo y agua con valores de 1.8, 2.8 y 5.4 mg EAG/g de extracto, respectivamente. Entretanto los valores más bajos fueron el extracto de acetona, acetato de etilo y hexano con valores de 1.1, 1.3 y 1.7 mg EAG/g de extracto, individualmente (figura 14). Estos resultados no se corresponden con la cantidad de micelio utilizado para la elaboración de cada extracto, que significa esto, el extracto de hexano se elaboró con 238 g de micelio húmedo, mientras el extracto acuso se realizó con una cantidad similar (240 g). Los fenoles sintetizados por *Fusarium oxysporum* en su mayoría son de carácter polar. Los valores obtenidos de fenoles totales son inferiores a los reportados para otros hongos como *Fusarium proliferatum* (21.75 mg EAG/g), *Alternaria alternata* (20.53 mg EAG/g), *Lentinula edodes* (11.7mg EAG/g), *Hericiium erinaceum* (7.8 mg EAG/g), *Agrocybe aegerita* (23.1mg EAG/g), *Boletus edulis* (41.8 mg EAG/g) y *Boletus auranticus* (36.4 mg EAG/g) (Li *et al.* 2015; Mujic *et al.* 2010; Vidovic *et al.* 2010).



**Figura 14.** Gráfica de la concentración de fenoles totales en los extractos de acetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*.

### 7.6.3.2 Flavonoides totales

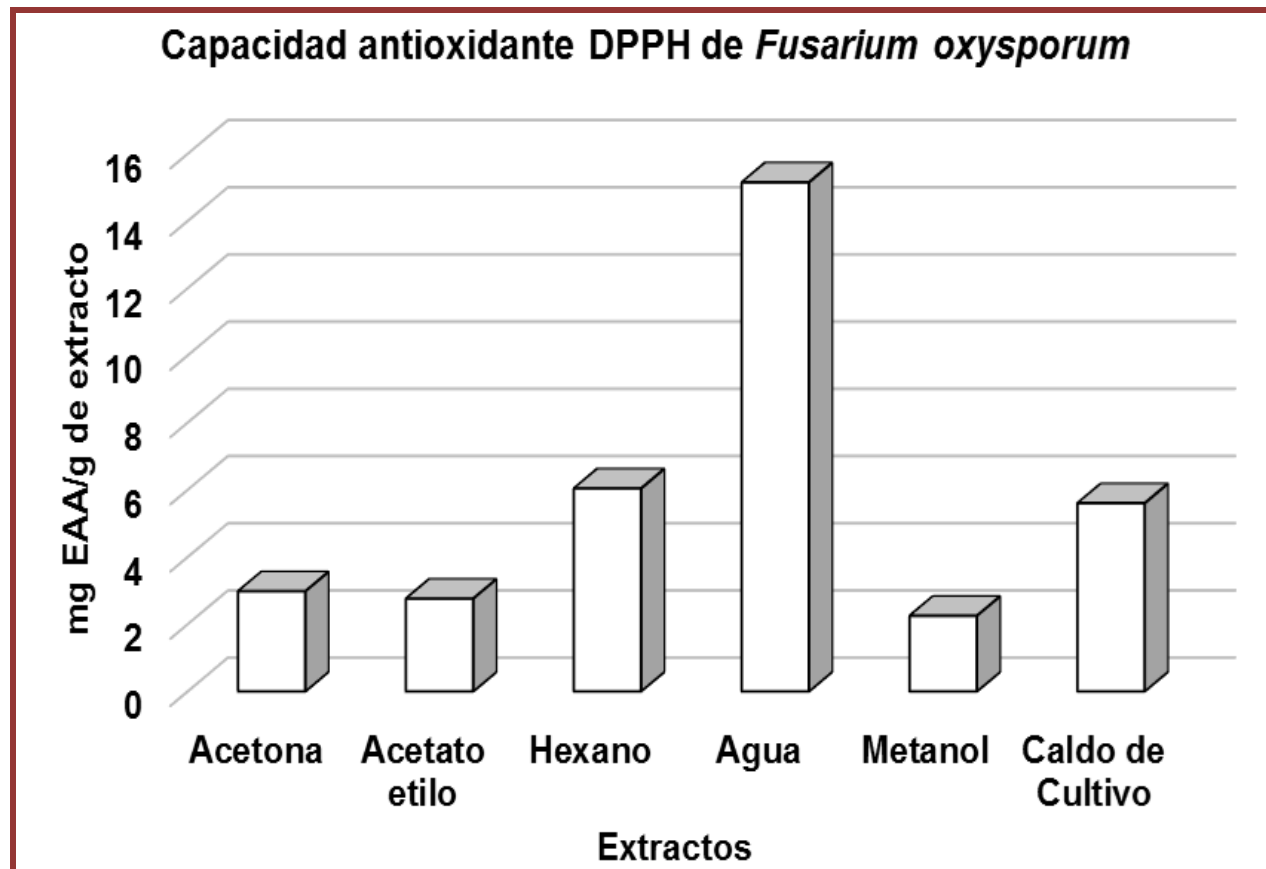
Los extractos donde se encontró altas concentraciones de flavonoides totales fueron en agua y acetona con valores de 1.77 y 1,56 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto, respectivamente. El resto de los extractos presentó valores muy inferiores a los antes referidos, 0.46; 0.44; 0.34 y 0.05 mgEQ/g para los extractos de acetato de etilo, hexano, metanol y caldo de cultivo, respectivamente (figura 15). Los datos obtenidos con la cepa de *Fusarium oxysporum* estudiada fueron inferiores a los reportados para algunos hongos como *Fusarium proliferatum* (8.27 mg EQ/g) y *Alternaria alternata* (7.36 mg EQ/g) (Li et al. 2015).



**Figura 15.** Gráfica de la concentración de flavonoides totales presentes en los extractos de cetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum*.

### 7.6.3.3 Capacidad antioxidante DPPH

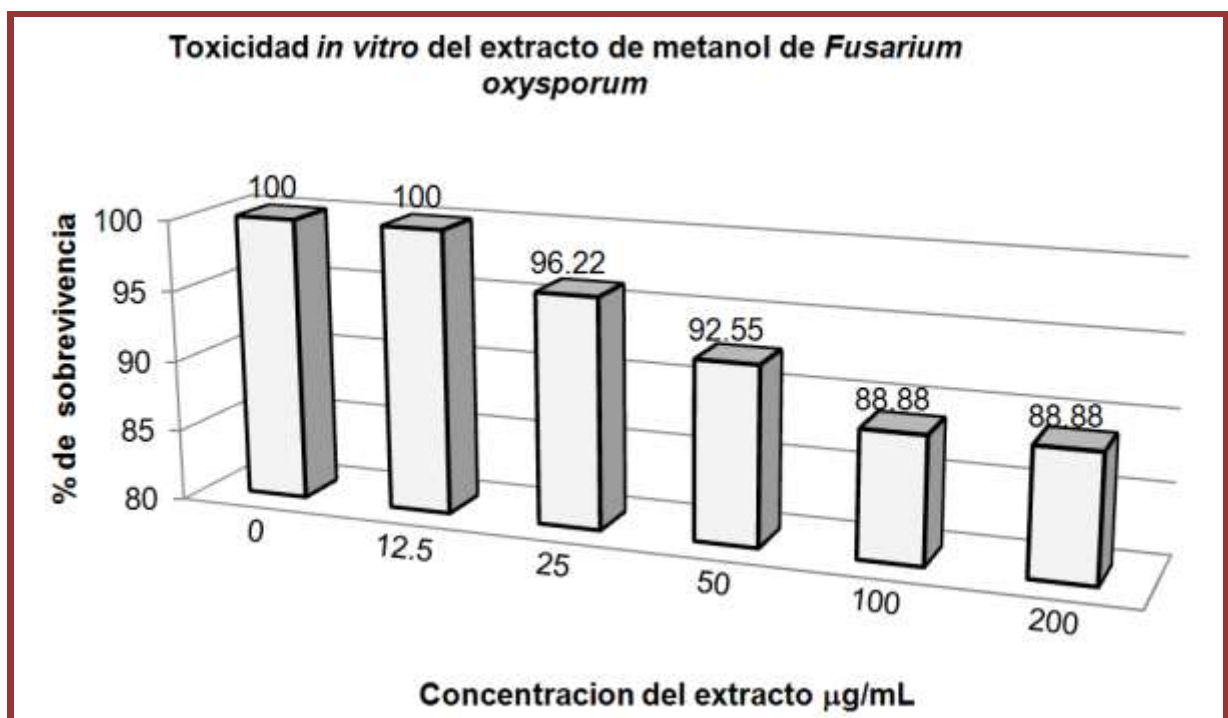
De acuerdo a los resultados el extracto acuoso es el que presentó una alta capacidad antioxidante de 15.15 mgEAA/g, superior en dos veces al siguiente valor proporcionado por el extracto de hexano que fue de 6.04 mgEAA/g. Se obtuvieron valores de 5.6; 2.98; 2.76 y 2.25 de mgEAA/g de extracto correspondientes a los extractos de caldo de cultivo, acetona, acetato de etilo y metanol, respectivamente (figura 16). El valor obtenido de capacidad antioxidante en mgEAA/g en el extracto acuoso es superior a lo reportado en otros estudios para *Fusarium sp.* (10 mgEAA/g), similar a lo encontrado en *Aspegillus sp.* (15 mgEAA/g), pero inferior a lo obtenido en extractos de *Mucor sp.* (20 mg EAA/g) y *Penicillium sp.* (25 mg EAA/g) (Pushpalatha *et al.* 2011).



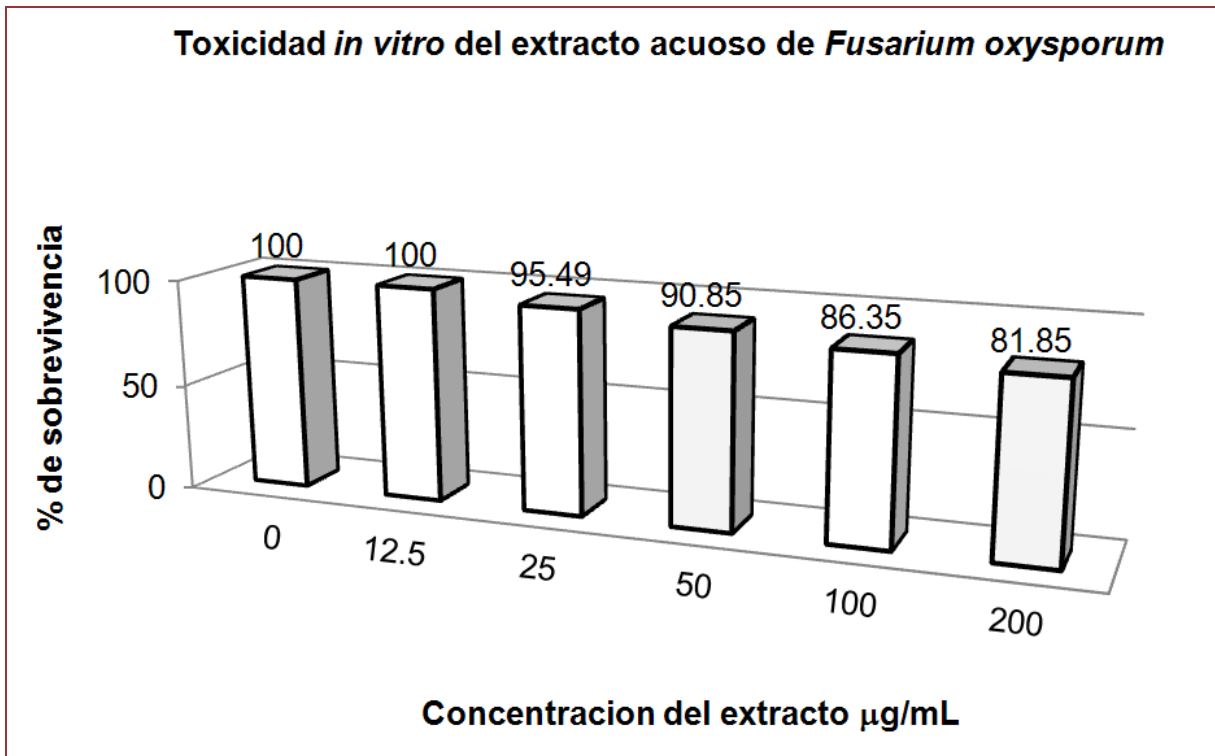
**Figura 16.** Gráfica de la capacidad antioxidante de los extractos acetona, acetato de etilo, hexano, agua, metanol y caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* cultivado en medio líquido PD.

#### 7.6.3.4 Evaluación *in vitro* de la toxicidad en el modelo de *Artemia salina*

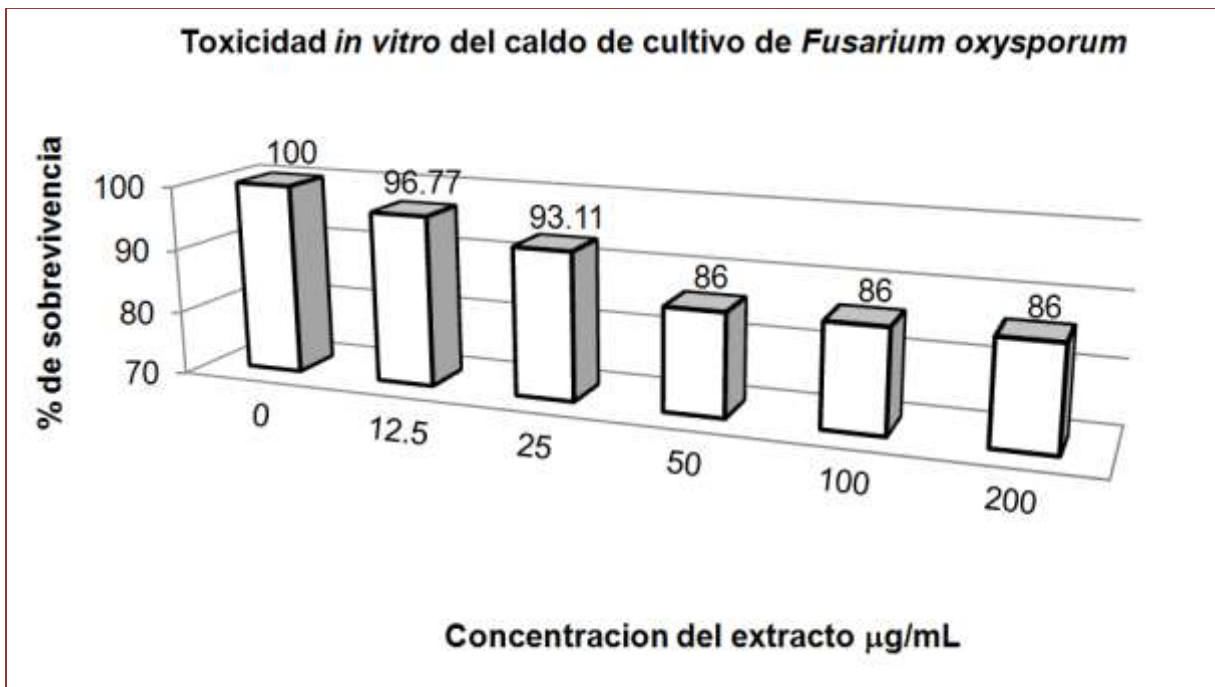
El ensayo de la toxicidad *in vitro* para calcular la  $LC_{50}$  de los extractos evaluados no pudo ser calculada con el software Sigma Plot, debido a que ningún extracto logró matar a un número cercano al 50% de los nauplios de las artemias, ya que lograron sobrevivir más del 81%. Por lo que podemos decir que la  $CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$  lo que demuestra que los extractos de *Fusarium oxysporum* no son tóxicos (figuras 17; 18 y 19).



**Figura 17.** Toxicidad del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia Salina*.



**Figura 18.** Toxicidad del extracto acuoso de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina*.



**Figura 19.** Toxicidad del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina*.

## Capítulo 8. Conclusiones

1. El medio de cultivo PDA comercial y el medio PD a pH 5.0 junto a una temperatura de 25°C fueron idóneos para el crecimiento de la cepa de *Fusarium oxysporum* empleado en este estudio.
2. El marcador de ADN LSU mostró ser eficaz para la identificación molecular del hongo *Fusarium oxysporum*.
3. Bajo las condiciones de cultivo probadas en la presente investigación el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* es capaz de sintetizar compuestos como antraquinonas, alcaloides, taninos y saponinas.
4. La caracterización química y farmacológica de *Fusarium oxysporum* arrojó que los extractos acuoso y acetona presentaron la mayor cantidad de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante DPPH.
5. La evaluación *in vitro* de los extractos acuoso, metanol y caldo de cultivo del hongo *Fusarium oxysporum* en el modelo de *Artemia salina* confirmó la nula toxicidad de dichos extractos.

## **Capítulo 9. Perspectivas**

- 1.** Identificar aquellos compuestos que se encuentran en mayor concentración en los extractos, esto con el objetivo de poder buscar su probable actividad terapéutica.
- 2.** Buscar los compuestos específicos dentro de los fenoles que tienen mayor actividad antioxidante.
- 3.** Elaborar una mayor cantidad de pruebas farmacológicas a los extractos, como actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, antimicrobiana, inmunoestimuladora, etc.

## **Capítulo 10. Relevancia del presente estudio en la promoción de la salud**

Ante la aparición de los múltiples problemas de salud que se presentan en la sociedad moderna, se han desarrollado nuevos enfoques que permitan abordar de una manera eficiente y eficaz la solución a dicha situación. Una de esas estrategias es la promoción de la salud. Dicho concepto data de mediados del siglo pasado, específicamente del año 1945 cuando el Dr. Henry E. Sigerist lo propuso, poniendo en conocimiento los ejes sobre los cuales se tendría que trabajar para poder hacer que la salud permeará a todos los estratos sociales.

Dentro de las tareas a desarrollar propuestas por el Dr. Sigerist está la prevención de la enfermedad, educación gratuita para toda la población e inclusive la educación para la salud, mejores condiciones de vida, laborales, recreación, esparcimiento y descanso, sistemas e instituciones de salud y personal médico capacitado, con un alto sentido humano y centros médicos de investigación y capacitación. Pero fue hasta 1974 cuando Marc Lalonde describe de manera detallada un enfoque más dirigido de la promoción de la salud hacia el cuidado de la misma. Es en el año de 1978 cuando la promoción de la salud se conoce de forma global con la primera reunión en Alma Ata, enfocada a la atención primaria de la salud. Sin lugar a dudas es la conferencia de Ottawa de 1986, donde la promoción de la salud se oficializa y comienza a ser reconocida como una parte importante en el área de la salud, bajo la siguiente definición: *“La Promoción de la Salud consiste en proporcionar a los pueblos los medios necesarios para mejorar su salud y ejercer un mayor control sobre la misma. Para alcanzar un estado de bienestar físico, mental y social de un individuo o de un grupo, y a su vez ser capaz de identificar y realizar sus aspiraciones, de satisfacer sus necesidades y de cambiar o adaptarse al medio ambiente. La salud se percibe como el objetivo, y no como la fuente de riqueza de la vida cotidiana”* (Peña, 2014). El estudio y la investigación en promoción de salud nos han llevado a comprender que un factor importante en la salud de las personas está relacionado con el medio ambiente y con los recursos naturales. Los hongos son un recurso natural que ha sido utilizado por diferentes culturas para tratar ciertos padecimientos médicos, sin embargo, este recurso puede ser utilizado con otros enfoques como el de recreación, esparcimiento si los conservamos en el bosque o si los empleamos como actividad lúdica durante su cultivo o como alimento. Pero sin

lugar a dudas, los hongos pueden aportar nuevas fuentes de alimentos o suplementos funcionales que permitan un mejor bienestar de las personas. Por lo que es imprescindible realizar investigaciones que nos proporcionen un mayor conocimiento sobre este recurso natural que son los hongos y que bajo dicho conocimiento los podamos utilizar en actividades de la promoción de la salud.

## Capítulo 11. Bibliografía

1. **Aguirre AE; Ulloa M; Aguilar S; Cifuentes J; Valenzuela R.** 2014. Biodiversidad de los hongos en México. Revista mexicana de Biodiversidad. (85). Pp. 76-81.
2. **Agrios GN.** 1988. Plant Pathology, 3rd. Ed. Academic Press. New York, EUA. Pp. 803.
3. **Alfaro MC.** 1996. Los hongos comestibles y su uso en arreglos decorativos. Ed. Revista de Geografía Agrícola. Enero-Julio. Pp. 273.
4. **Altschul S; Gish W; Miller W; Myers E; Lipman D.** 1990. "Basic local alignment search tool". Ed. Journal of Molecular Biology; 215 (3). Pp. 403–410.
5. **Arauz CLF.** 1998. Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico. Ed. Universidad de Costa Rica. Pp. 105-108.
6. **Baker RA; Tatum JH; Nemeč SJr.** 1990. Antimicrobial activity of naphthoquinones from Fusaria. Mycopathologia. Pp. 9–15
7. **Bertelsen CD.** 2013. Mushroom: A Global History. Ed. Reaktion Books. London, UK. Pp. 15.
8. **Breitmaier B.** 2006. Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. Pp. 1
9. **Boa ER.** 2005. Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de su uso e importancia para la población. Ed. FAO. Roma, Italia.
10. **Claramunt VRM; Farrán MA; López GC; Pérez TM; Santa María GMD.** 2013. Química bioorgánica y productos naturales. Ed. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, España.
11. **Contreras–Ramos A; Cuevas CC; Goyenechea I; Iturbe U.** 2007. La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México
12. **De Diego CF.** 2011. Hongos medicinales. Ed. Mundi-Prensa. México. Pp. 14-15.
13. **Delmulle L; Demeyer K.** 2010. Anthraquinones in Plants: Source, safety and applications in gastrointestinal health. Ed. Nottingham University Press. U. K. Pp. 63-65.

14. **Dugan FM.** 2008. Fungi in the Ancient World: How Mushrooms, Mildews, Molds, and Yeast Shaped the Early Civilizations of Europe, the Mediterranean, and the Near East. Ed.Washington State University, Pullman, WU.
15. **El Enshasy HA; Hatti-Kaul R.** 2013. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. Trends Biotechnol. 31 (12). Pp. 668-77.
16. **Garcés de Granada E; Orozco de Amézquita M; Bautista HG; Valencia H.** 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. 6 (1). Pp. 7-21.
17. **Garzón GN.** 2013. Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca–Colombia. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia
18. **Gómez PM; Gómez RVM.** 2015. Mitos y realidades de los hongos silvestres comestibles y tóxicos. Revista saber más. Ed.Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Septiembre- Octubre.(17). México. Pp. 6-8.
19. **González-Espinosa M; Ramírez MN; Ruíz ML.** 2005. Diversidad biológica en Chiapas. Ed.Plaza y Valdés S.A de C.V. México. Pp. 33-49.
20. **González-Mendoza D; Argumedo-Delira R; Morales-Trejo A; Pulido-Herrera A; Cervantes-Díaz L; Grimaldo-Juarez O; Alarcón A.** 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genet Mol Res. Ed.Universidad Autónoma de Baja California. Baja California, México. 9 (1).Pp. 162-166.
21. **Gutiérrez JP; Rivera-Dommarco J; Shamah-Levy T; Villalpando-Hernández S; Franco A; Cuevas-Nasu L; Romero-Martínez M; Hernández-Ávila M.** 2013. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales. 1a. Ed.Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 21.
22. **Guzmán, G.** 1998. Inventorying the fungi of Mexico. Biodiversity and Conservation. Ed.Springer Link. 7 (3). Pp. 69-384.
23. **Hassanpour S; Maherisis N; Eshratkhah B; Baghbani mehmandar F.** 2011. Plants and secondary metabolites. Ed.International Journal of Forest, Soil and Erosion. Shabestar, Iran. 1 (1). Pp. 1-7.
24. **Hawksworth, DL.** 2006. "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation". Ed.Mycological Research 95 (6). Pp.641–655.

25. **Huang D; Ou B; Prior RL.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Ed. *J Agric Food Chem.* 53 (6). Pp. 1841-56.
26. **Keller NP; Turner G; Bennett JW.** 2005. Fungal secondary metabolism— from biochemistry to genomics. Ed. *Nature Reviews Microbiology* 3 (12). Pp. 937–47.
27. **Kikot GE.** 2012. Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. Pp. 15-25.
28. **Kumar A, Patil D, Rajamohanan PR, Ahmad A.** 2013. Isolation, Purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. Ed. Rmit University. Melbourne, Victoria, Australia. 8 (9).
29. **Kumar S; Pandey AK.** 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Ed. *Scientific World Journal.*
30. **Li YL et al.** 2015. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f.alba are a potential source of natural antioxidants. Ed. *Botanical Studies* (56). Pp. 5.
31. **López JE.** 2007. Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección Plinthine del género *Arenaria* (*Caryophyllaceae*). Tesis doctoral. Ed. Universidad de Granada. España. Pp. 36-80.
32. **Madaan R; Bansal G; Kumar S; Sharma A.** 2011. Estimation of total phenols and flavonoids in extracts of *actaea spicata* roots and antioxidant activity studies. Ed. Panjab University. Chandigarh, India. 73 (6). Pp. 666–669.
33. **Marcano D; Hasegawa M.** 2002. Fitoquímica orgánica. Ed. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.
34. **Mata G; Trigos A; Salmones D.** 2005. Aportaciones de Gastón Guzmán al conocimiento de los hongos alucinógenos. Ed. *Revista Mexicana de Micología*, México.(21). Pp. 5-9.
35. **Molitoris HP.** 1994. Mushrooms in medicine. *Folia Microbiol.* Ed. Universidad de Regensburg, Alemania. 39 (2). Pp. 91-98.
36. **Mujic I; Zeković Z; Lepojević Z; Vidović S; Živković J.** 2010. Antioxidant properties of selected edible mushroom species. Ed. *Journal Central European Agriculture.* 11 (4). Pp. 387-392.

37. **Nagiaa FA; EL-Mohamedyb RSR.** 2007. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. Ed. Dyes and Pigments. (75)(3). Pp. 550–555
38. **Nijveldt JR; van Nood E; van Hoorn DEC; Boelens GP; van Norren K; van Leeuwen PAM.** 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Ed. Am J Clin Nutr. 74 (4). Pp. 418-425.
39. **Nurbaya; Tutik Kuswinanti; Ade Rosmana; Baharuddin; Syamsuddin Millang.** 2014. Growth rate and identification of *Fusarium spp.* associated with *Aquillaria spp.* from Nunukan regency, North Kalimantan. Ed. International Journal of Current Research and Academic. 2 (11). Pp. 33-40.
40. **Palomino MC.** 2012. Estudio fitoquímico y farmacológico de la planta *Solanum cervantesii* Lag., recolectada en el área natural protegida del Centro de Educación Ambiental Yautlica. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F.
41. **Pardavé DLM; Callejas HVL.; Flores PL; Ruiz EF.** 2006. Distribución de los hongos venenosos conocidos en el Estado de Aguascalientes Investigación y Ciencia. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, México. 14 (35). Pp. 31-36
42. **Parra BF.** 2013. Estudio farmacológico de las plantas, cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), chaparro amargo (*Castela erecta ssp.*), gobernadora (*Larrea tridentata* (dc) Cav), guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol), guazima (*Ulmifolia* Lam), empleadas para el tratamiento de la diabetes en el Mercado de Sonora. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F.
43. **Patel N; Purvi D; Patel N; Jha A; Hemant KG.** 2014. Agronanotechnology for plant fungal disease management: A Review. Ed. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 3 (10). Pp. 71-84.
44. **Peña MI.** 2014. Estudio del potencial antioxidante de plantas colectadas en Amecameca en el período de febrero a mayo de 2013. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F.
45. **Peralta GS; Aarland CR; Lara MGC; Mendoza EJA.** 2013. Toxicity analysis, phytochemical and pharmacological study of the plant known as mora herb,

- collected at the environmental education center of Yautlica (CEA Yautlica). Ed. Asian J. Plant Sci. (12). Pp.159-164.
46. **Pérez García A; Romero D; Zeriuoh H; De Vicente A.** 2011. Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. N.A. Logan and P. De Vos. Eds. Endospore-forming Soil Bacteria, Soil Biology 27.
  47. **Poppe J; Heungens K.** 1991. First commercial growing of ornamental mushrooms. Science XIII. (2). Proceedings of the 13th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Dublin, Irish Republic. Pp. 1-6.
  48. **Pushpalatha KC; Murthy KN; Chandrashekhar GJ.** 2011. Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *Lobelia nicotianifolia*. Ed. J. Chem. Pharm. Res. 3 (5). Pp. 218-225.
  49. **Ravishankar RV.** 2016. Advances in Food Biotechnology. Ed. Wiley Blackwell. U. K. Pp. 752.
  50. **Rivera CG.** 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. Ed. Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Pp. 25-73.
  51. **Rodríguez GMP.** 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zoológica Mexicana. Ed. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México. (1). Pp. 53-78
  52. **Romeo TJ.** 1999. Phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense. Ed. Springer. U. K.
  53. **Romo de VA.** 2006. Química de la Flora Mexicana. Ed. Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. D, F. México. Pp. 63-83.
  54. **Saikia R; Kadoo N.** 2010. Molecular detection and identification of *Fusarium oxysporum*. En: Molecular Identification of Fungi. Eds. Youssuf Gherbawy, Kerstin Voigt. Springer Berlin Heidelberg. Germany
  55. **Sambrook J; Russell D.** 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press. New Yor. USA.
  56. **Serrato DA; Flores RL; Aportela CJ; Sierra PE.** 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Eds. Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz, Beatriz Rendón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF. Pp. 53-68

57. **Sherma BJ.** 2003. Handbook of thin-layer chromatography. Ed. Marcel Dekker. New York. USA. Pp. 24-69.
58. **Sierra-Palacios E.** 2005. Construcción de un cósmido para la clonación y expresión de genes fúngicos. Tesis maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
59. **Singh P.K; Vijay K.** 2011. Variability among Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* pathogenic to chrysanthemum. Ed. International Journal of Plant Pathology. 2 (3). Pp. 136-143.
60. **Singleton VL; Rossi AJ.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Ed. Am. J. Enol. Vitic. 16 (3). Pp. 144-158.
61. **Skoog DA; Holler FJ; Crouch SR.** 2007. Principles of instrumental analysis 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. Pp. 169–173.
62. **Sorgellos P.** 1982. Curso *Artemia* sp. en la investigación, la enseñanza y la acuicultura. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
63. **Synytsya A; Míčková K; Synytsya A; Jablonský I; Spěváček J; Erban V; Kovářiková EČJ.** 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Ed. Carbohydr Polym. (76). Pp. 548–556.
64. **Tapia C; Amaro J.** 2014. Género *Fusarium*. Rev Chilena Infectol. 31 (1). Pp. 85-86.
65. **Tatum JH; Baker RA; Berry RE.** 1985. Naphthoquinones produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. Ed. Phytochem. (24). Pp. 457–459.
66. **Tung CY, Yang DB, Gou M.** 2002. A preliminary study on the condition of the culture and isolate of endophytic fungus producing vincristine. Ed. J Chuxiong Normal Univ (6). Pp. 39.
67. **Vanmathi SK; Sivakumar T.** 2013. Isolation, identification and Characterization of *Fusarium* species from mangrove habitat of Pichavaram, Tamil Nadu, India. Ed. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2 (1). Pp. 33-49
68. **Vaz AB; Mota RC; Bomfim MR; Vieira ML; Zani CL; Rosa CA; Rosa LH.** 2005. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. Ed. Can J Microbiol. 55 (12). Pp. 1381-91.

69. **Vidovic SS; Mujić LO; Zeković ZP; Lepojević ZD; Tumbas VT; Mujić IA.** 2010. Antioxidant properties of selected *Boletus* mushrooms. Ed. Food Biophysics. (5). Pp. 49–58.
70. **Villares A; García-Lafuente A; Guillamón E; Ramos Á.** 2012. Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. truffles. Ed. J Food Compos Anal. (26). Pp. 177-182.
71. **Villicaña SI.** 2015. Estudio químico y evaluación farmacológica del hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc cultivado en dos distintos medios de cultivo. Tesis Licenciatura. Universidad Autonoma de la Ciudad de México, México D.F.
72. **Waksmundzka-Hajnos M; Sherma J; Kowalska T.** 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry. Ed. CRC press. New York, USA.
73. **Wang S; Marcone MF.** 2011. The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: truffles. Ed. Food Res. (44). Pp. 2567–2581.
74. **Wasser S** 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, Advances, Evidences, and Challenges. Ed. Biomedical journal. 37 (6). Pp. 345-356.
75. **Wasser SP.** 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Ed. Appl Microbiol Biotechnol. 89 (5). Pp. 1323-32.
76. **Ya-Jun G; Gui-Fang D; Xiang-Rong X; Shan W; Sha L; En-Qin X; Fang L; Feng C; Wen-Hua L; Hua-Bin L.** 2012. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. Ed. Food Funct. (3). Pp. 1195-1205.
77. **Zulueta RR; Trejo AD; Trigós LAR.** 2007. El maravilloso mundo de los hongos. Ed. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México. Pp. 19-29.

## Anexo 1. Reactivos, materiales y equipos

### A. Reactivos

<u>Reactivo</u>	<u>Marca</u>
Acetato de etilo	Ferm.nt
Acetato de potasio	J.T.Baker
Acetona	J.T.Baker
Acido clorhídrico	J.T.Baker
Agar dextrosa y papa	Bioxon
Agarose, LE, Analytical Grado	Promega
Agua destilada	-----
Buffer de fosfato salino	Baker
Buffer Orange 6x	Amresco
Carbonato de Sodio	Baker
Cloruro de aluminio	Baker
Dextrosa	Meyer
Diclorometano	J.T.Baker
DPPH	Sigma
Estándares de pH (4, 7 y 10)	Baker
Etanol	J.T.Baker
Folín Ciocalteu 2N	Sigma
Metanol	J.T.Baker
Gel Red	Biotium
Grenetina pura	Soriana
Hexano	J.T.Baker
Hidróxido de sodio lentejas	Meyer
Hipoclorito de sodio	Clorox
Placas de silica Gel60 F <sub>254</sub>	Merck
Quistes de artemia	Eclosionazol
Reactivo Dragendorff	Sigma
Cloruro de sodio	La Fina
Sal para acuario	Aquarium
TAE 50X	BIO-RAD
Marcador de ADN	Axygen
Kit extracción ADN	Axygen
Kit de purificación de ADN	Qiagen

## B. Equipos

### Equipo de laboratorio

<u>Equipo de laboratorio</u>	<u>Marca</u>
Autoclave vertical	Yamato
Agitador magnético	Thermo scientific
Baño María	Buche
Báscula analítica	Adventure
Báscula analítica	Camry
Cámara de electroforesis 7x8 cm	Galileo bioscience
Cámara UV	UVP Upland
Campana de extracción	-----
Campana de flujo laminar	Veco
Centrífuga	Labnet
Computadora	Dell
Congelador de – 20°C	Thermo scientific
Espectrofotómetro	Jenway
Fuente de poder de electroforesis	Labnet
Horno de microondas	Mabe
Horno para secado	Felisa
Incubadora	Felisa
Licuada	American
Medidor de pH de mesa	Oakton
Microcentrífuga	Thermo scientific
Micropipetas de volumen variable P2; P20; P200 y P1000	BioPette
Parrilla de agitación y calentamiento	Thermo scientific
Reloj	Bio-elec
Refrigerador	Mabe
Rotavapor Básico R-3	Buchi
Termoblock	Dry-Bath
Termociclador digital	Maxygene II
Vórtex	Labnet

### C. Materiales de vidrio

<u>Materiales de vidrio</u>	<u>Marca</u>
Cajas de Petri 15x100mm	S y M Laboratorios
Cajas de Petri 15x30mm	S y M Laboratorios
Frascos de vidrio c/ tapa 500mL	Pirex
Frasco para el crecimiento del hongos	Pirex
Matraz de 250, 500 y 1000 ml	Pirex
Mortero	Pirex
Perlas de vidrio	Pirex
Pipeta Pasteur con bulbo	Pirex
Probeta de vidrio	Pirex
Tubos de ensaye	Pirex
Termómetro	Pirex
Vaso precipitado de vidrio de 40 a 1000 ml	Pirex
Viales	Pirex
Cubetas de espectrofotómetro	Pirex

### D. Materiales de plástico

<u>Materiales de plástico</u>	<u>Marca</u>
Charolas para pesado	Corning
Coladera de plástico	-----
Cucharas	-----
Embudo de filtración	-----
Espátula de doble cuchilla	-----
Frascos de color ámbar 50mL	America
Gradillas de plástico y metal	Corning
Pinzas de disección	-----
Pisetas	Brand
Probeta de 10, 15, 500 y 1000 ml	Corning
Tina de plástico de 3 Lt	-----
Tubo microcentrífuga	Neptune
Tubo Falcón	Corning
Vaso precipitado de plástico de 1000 ml	Corning
Puntas p/ pipetas de 2 a 1000	Neptune

**E. Otros**

**Material**

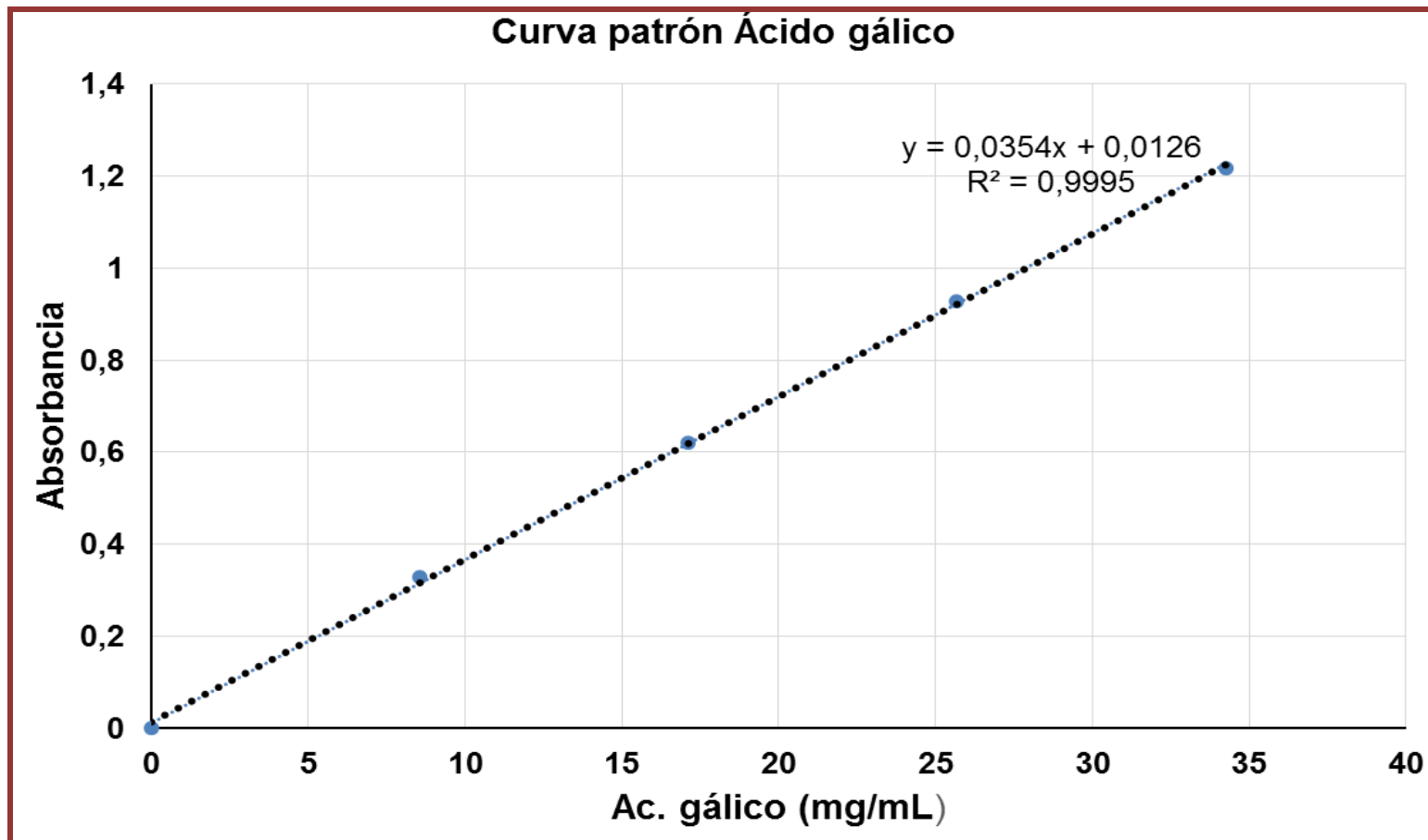
Algodón  
Bolsas de polipapel  
Cinta (PARAFIL "M")  
Cúter  
Etiquetas adherirles  
Gasa simple  
Guantes de látex  
Marcador  
Masking  
Palillos tipo brocheta  
Papel aluminio

**Marca**

Soriana  
Reyma  
Parafil  
Barrilito  
Lesá  
Dibar  
Pro-Derma  
Standtler  
Tape  
Usero  
Alupack

## Anexo 2. Cálculos de fenoles totales

### A. Curva patrón



Evaluación del potencial farmacológico del hongo *Fusarium oxysporum*.

Con. Gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia			Promedio
0	0	0	0	0
8.56	0.362	0.31	0.319	0.330
17.12	0.623	0.622	0.619	0.621
25.68	0.927	0.924	0.934	0.928
34.24	1.217	1.229	1.208	1.218

Conc. Gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio Abs.
0	0
8.56	0.330
17.12	0.621
25.68	0.928
34.24	1.218

**B. Fenoles del extracto de acetona de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.1004	0.514	14.16	14.16	1416.384181	1.416
	0.334	9.08	9.08	907.9096045	0.908
	0.376	10.27	10.27	1026.553672	1.027
<b>Promedio</b>					1.117
<b>Des-Std.</b>					0.094
<b>C.V.</b>					

**C. Fenoles del extracto de acetato de etilo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.1005	0.391	10.69	10.69	1068.93	1.069
	0.502	13.82	13.82	1382.49	1.382
	0.8502	13.82	13.82	1382.49	1.382
<b>Promedio</b>					1.278
<b>Des-Std.</b>					0.064
<b>C.V.</b>					

**D. Fenoles del extracto de hexano de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.1004	0.509	14.02	14.02	1402.26	1.402
	0.635	17.58	17.58	1758.19	1.758
	0.696	19.31	19.31	1930.51	1.931
<b>Promedio</b>					1.697
<b>Des-Std.</b>					0.095
<b>C.V.</b>					

**E. Fenoles del extracto de acuoso de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.0304	0.584	16.14	53.27	5326.61	5.327
	0.558	15.41	50.84	5084.24	5.084
	0.632	17.50	57.74	5774.07	5.774
<b>Promedio</b>					5.395
<b>Des-Std.</b>					0.038
<b>C.V.</b>					

**F. Fenoles del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum***

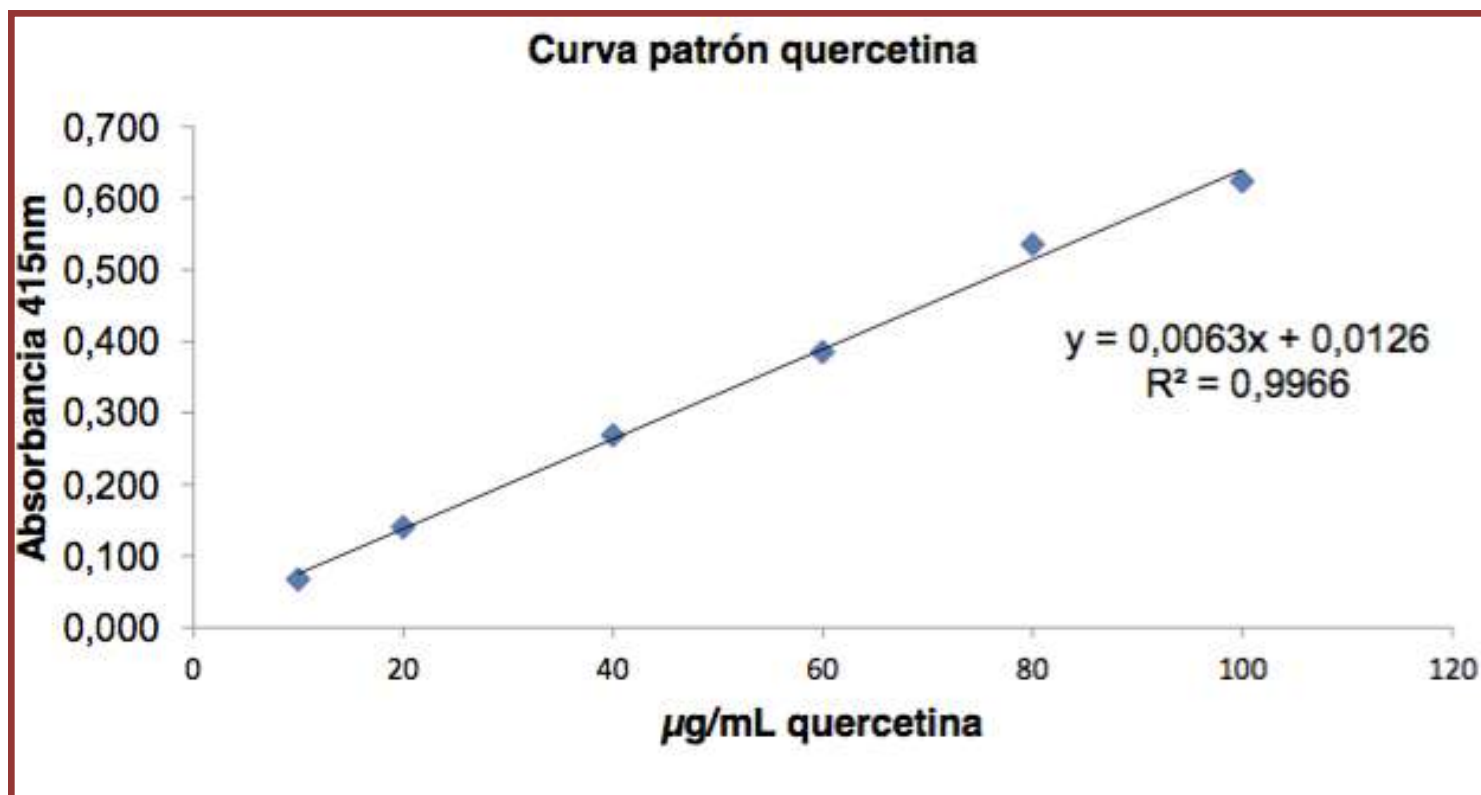
Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.1000	0.696	19.31	19.31	1930.51	1.931
	0.603	16.68	16.68	1667.80	1.668
	0.660	18.29	18.29	1828.81	1.829
<b>Promedio</b>					1.809
<b>Des-Std.</b>					0.047
<b>C.V.</b>					

**G. Fenoles del extracto de caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	en 200 $\mu$ L	$\mu$ g A.G/g Extracto	mg A.G/g Extracto
0.0500	0.456	12.53	25.05	2505.08	2.505
	0.509	14.02	28.05	2804.52	2.805
	0.565	15.60	31.21	3120.90	3.121
<b>Promedio</b>					2.810
<b>Des-Std.</b>					0.055
<b>C.V.</b>					

### Anexo 3. Cálculos de flavonoides totales

#### A. Curva patrón



Evaluación del potencial farmacológico del hongo *Fusarium oxysporum*.

Querc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia			Promedio
10	0.056	0.07	0.076	0.067
20	0.133	0.138	0.149	0.140
40	0.267	0.27	0.268	0.268
60	0.379	0.385	0.391	0.385
80	0.534	0.528	0.544	0.535
100	0.604	0.649	0.618	0.624
	Querc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs. (n=3)		
	10	0.067		
	20	0.140		
	40	0.268		
	60	0.385		
	80	0.535		
	100	0.624		

**B. Flavonoides totales del extracto de acetona de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
0.0502	0.442	68.16	1357.74	1.36
0.0502	0.516	79.90	1591.73	1.59
0.0504	0.553	85.78	1701.94	1.70
<b>Promedio</b>				1.55
<b>Des-Std.</b>				0.057

**C. Flavonoides totales del extracto de acetato de etilo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
0.2035	0.762	118.95	584.53	0.58
0.203	0.495	76.57	377.20	0.38
0.203	0.562	87.21	429.59	0.43
<b>Promedio</b>				0.46
<b>Des-Std.</b>				0.139

**D. Flavonoides totales del extracto de hexano de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
0.2061	0.564	82.76	401.56	0.40
0.2064	0.571	88.63	429.43	0.43
0.2065	0.641	99.75	483.03	0.48
<b>Promedio</b>				0.44
<b>Des-Std.</b>				0.054

**E. Flavonoides totales del extracto acuoso de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
0.0519	0.534	82.76	1594.64	1.59
0.0518	0.571	88.63	1711.10	1.71
0.05	0.641	99.75	1994.92	1.99
<b>Promedio</b>				1.77
<b>Des-Std.</b>				0.054

**F. Flavonoides totales del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum***

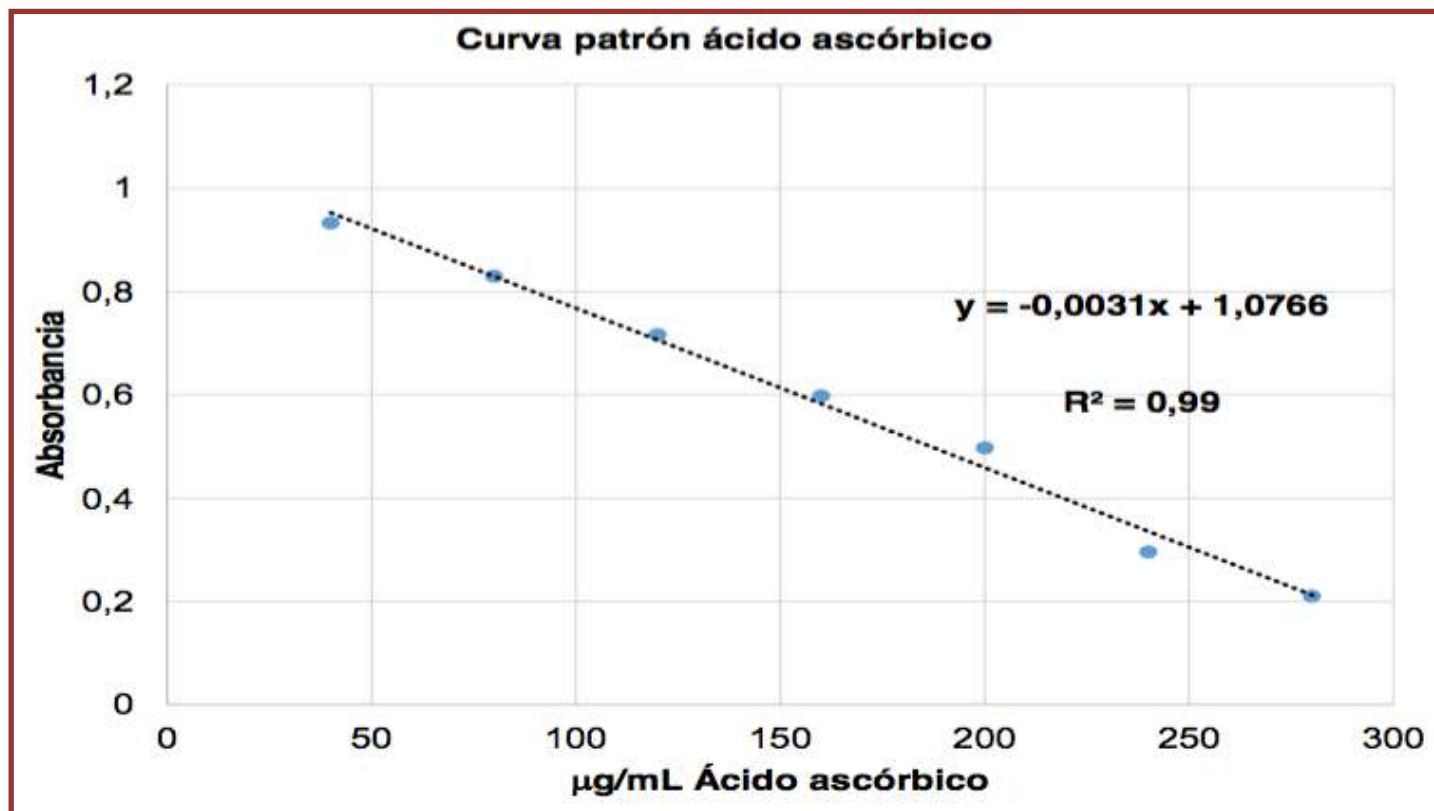
Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
0.3004	0.629	97.84	325.70	0.33
0.3008	0.669	104.19	346.38	0.35
0.3001	0.651	101.33	337.67	0.34
<b>Promedio</b>				0.34
<b>Des-Std.</b>				0.020

**G. Flavonoides totales del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (g)	Absorbancia	$X=(y-b)/a$	$\mu\text{g}$ Quercetina/g p.s	Mg Quercetina/g 1 g p.s
1	0.305	46.41	46.41	0.05
0.98	0.415	63.87	65.18	0.07
1.02	0.353	54.03	52.97	0.05
<b>Promedio</b>				0.05
<b>Des-Std.</b>				0.055

#### Anexo 4. Cálculos de la capacidad antioxidante DPPH

##### A. Curva patrón



Evaluación del potencial farmacológico del hongo *Fusarium oxysporum*.

Ácido ascórbico (µg/mL)	Abs. 1	Abs. 2	X Abs.	Desv. Std.
40	0.9274	0.9384	0.93	0.0078
80	0.8299	0.83	0.83	0.0001
120	0.7142	0.7188	0.72	0.0033
160	0.5956	0.5996	0.60	0.0028
200	0.5048	0.4903	0.50	0.0103
240	0.2711	0.32	0.30	0.0346
280	0.2959	0.1247	0.21	0.1211
	Conc. AA	Abs. Prom.		
	40	0.9329		
	80	0.82995		
	120	0.7165		
	160	0.5976		
	200	0.49755		
	240	0.29555		
	280	0.2103		

**B. Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acetona de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
38.15	0.727	112.77	2.96
	0.709	118.581	3.11
	0.735	110.194	2.89
<b>Promedio</b>			<b>2.98</b>
<b>Des - Std.</b>			<b>0.013</b>

**C. Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acetato de etilo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
52.44	0.636	142.13	2.71
	0.618	147.94	2.82
	0.628	144.71	2.76
<b>Promedio</b>			<b>2.76</b>
<b>Des - Std.</b>			<b>0.009</b>

**D. Capacidad antioxidante DPPH del extracto de hexano de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
19.8	0.615	148.90	7.52
	0.726	113.10	5.71
	0.777	96.65	4.88
		<b>Promedio</b>	<b>6.04</b>
		<b>Des – Std.</b>	<b>0.083</b>

**E. Capacidad antioxidante DPPH del extracto de acuoso de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
7.84	0.715	116.65	14.88
	0.775	97.29	12.41
	0.635	142.45	18.17
		<b>Promedio</b>	<b>15.15</b>
		<b>Des – Std.</b>	<b>0.070</b>

**F. Capacidad antioxidante DPPH del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
47	0.764	100.84	2.15
	0.7	121.48	2.58
	0.783	94.1	2.02
		<b>Promedio</b>	<b>2.25</b>
		<b>Des – Std.</b>	<b>0.043</b>

**G. Capacidad antioxidante DPPH del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum***

Muestra (mg)	Abs.	Mg EAA	Mg EAA
23.5	0.714	116.97	1.9
	0.626	145.35	6.19
	0.665	132.77	5.65
		<b>Promedio</b>	<b>5.60</b>
		<b>Des – Std.</b>	<b>0.044</b>

**Anexo 5. Datos y cálculos de toxicidad *in vitro* con el modelode *Artemia salina***

**A. Datos del extracto de metanol de *Fusarium oxysporum* en *Artemia salina***

<b>Tubo</b>	<b>N° Vivas Con. 0 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 12.5ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 25 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 50 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 100 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 200 ppm</b>
<b># de Nauplios/Tubo</b>	10	10	10	10	10	10
<b>A</b>	9	9	8	8	8	8
<b>B</b>	9	9	9	9	8	8
<b>C</b>	9	9	9	8	8	8
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>24</b>
<b>Promedio</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>8.66</b>	<b>8.33</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>% Supervivencia</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>96.22</b>	<b>92.55</b>	<b>88.88</b>	<b>88.88</b>

**B. Datos del extracto acuoso de *Fusarium oxysporum* en *Artemia salina***

<b>Tubo</b>	<b>N° Vivas Con. 0 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 12.5ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 25 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 50 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 100 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 200 ppm</b>
<b># de Nauplios/Tubo</b>	10	10	10	10	10	10
<b>A</b>	8	8	7	7	7	6
<b>B</b>	7	7	7	7	6	6
<b>C</b>	7	7	7	6	6	6
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>18</b>
<b>Promedio</b>	<b>7.33</b>	<b>7.33</b>	<b>7</b>	<b>6.66</b>	<b>6.33</b>	<b>6</b>
<b>% Supervivencia</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>95.49</b>	<b>90.85</b>	<b>86.35</b>	<b>81.85</b>

**C. Datos del extracto del caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* en *Artemia salina***

<b>Tubo</b>	<b>N° Vivas Con. 0 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 12.5ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 25 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 50 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 100 ppm</b>	<b>N° Vivas Con. 200 ppm</b>
<b># de Nauplios/Tubo</b>	10	10	10	10	10	10
<b>A</b>	10	9	8	8	8	8
<b>B</b>	9	9	9	8	8	8
<b>C</b>	9	9	9	8	8	8
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>24</b>
<b>Promedio</b>	<b>9.33</b>	<b>9</b>	<b>8.66</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>% Sobrevivencia</b>	<b>100</b>	<b>96.77</b>	<b>93.11</b>	<b>86.02</b>	<b>86.02</b>	<b>86.02</b>