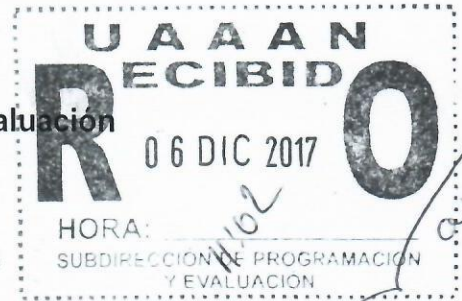




# Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



## Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Fitoquímicos				
Título del proyecto:	Actividad antifúngica y mecanismos de acción de compuestos presentes en extractos de productos y subproductos de origen vegetal.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	X Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable	fdanielhc@hotmail.com
Vinculación:	Si	No	X	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:					
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				
Participantes			Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo		0202	2022	
Colaborador:	Dr. Melchor Cepeda Siller		0202	1160	
Colaborador:	Dra. Diana Jasso Cantú		3615	392	
Colaborador:	Dr. Cristóbal Noé Aguilar González		Externo	Externo	
Colaborador:	Dr. Raúl Rodríguez Herrera		Externo	Externo	
Colaborador:					
			Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	Saira Rocío Martínez Alemán		Doctorado	71161452	
Programa Docente:	Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Actividad antifúngica y mecanismos de acción de compuestos presentes en extractos de productos y subproductos de origen vegetal.

\$75,000

2.- Introducción

A nivel mundial, los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades tanto en cultivo como en postcosecha, ocasionando principalmente pérdidas de producción biológica, es decir, las alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas huésped que son atacadas por estos microorganismos (Agris, 2005); pero también ocasionan pérdidas de producción económica, las cuales están estimadas de un 5 a 25% en países desarrollados y de 20 a 50% en países en desarrollo; mientras que en México, el valor estimado para la pérdida de la producción en los principales cultivos asciende a poco más de 70 millones de pesos, destacando las pérdidas en cultivos importantes como chile, tomate y fresa (SIAP, 2015). Dentro de las enfermedades fúngicas que afectan al cultivo de chile se encuentran la marchitez y antracnosis, el cultivo de tomate es perjudicado por tizón temprano y cenicilla, mientras que las fresas son dañadas a causa del moho gris (SIAP, 2011; SAGARPA, 2017); debido a esto, por muchos años el control químico a través de los fungicidas sintéticos ha sido utilizado para controlar las enfermedades de las plantas, sin embargo, a pesar de ser altamente eficaces, su uso ha dado lugar a diversos problemas como la contaminación ambiental, la presencia de efectos no deseados sobre otros microorganismos, el desarrollo de resistencia a los propios fungicidas, la toxicidad residual en alimentos e incluso problemas en la salud humana como el desarrollo del cáncer (Méndez et al., 2012; Yoon et al., 2013). Actualmente se busca el empleo de técnicas alternativas al uso de productos sintéticos para el control de los hongos fitopatógenos, siendo una opción la aplicación de productos naturales como los extractos de plantas, los cuales son fuente de biocompuestos con una amplia aplicación terapéutica, su uso potencial ha sido reportado en laboratorio, invernadero y campo, no afectan al medio ambiente y sus residuos son fáciles de degradar (Saldívar et al., 2003; Basanta et al., 2007; Barragán, 2012). Previamente se ha reportado el uso de extractos de plantas del semi-desierto Chihuahuense, a través de la actividad antifúngica de distintas fuentes vegetales frente a diferentes hongos fitopatógenos, encontrándose compuestos como flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Saldívar et al., 2003; Méndez et al., 2012; Granados-Sánchez et al., 2013; Hernández et al., 2016). Existen otras fuentes vegetales que son consideradas como productos y subproductos poco valorados que tienen un gran número de compuestos de interés, con múltiples propiedades biológicas; sin embargo las plantas han sido apenas explotadas como fuentes de agentes con propiedades biológicas, debido a la falta de información sobre la estructura y modo de acción de algunos fitoquímicos.

Objetivos

*Objetivo General*

Determinar la actividad antifúngica y elucidar los mecanismos de acción de compuestos fitoquímicos presentes en extractos de partes poco valoradas de cultivos.

*Objetivos Específicos*

- Obtener extractos a partir de partes poco valoradas de cultivos mediante técnicas alternativas.
- Caracterizar los compuestos fitoquímicos de los extractos.
- Evaluar la efectividad biológica *in vitro* de los extractos frente a hongos fitopatógenos.
- Realizar estudios de efectividad biológica de los extractos bajo condiciones de invernadero.
- Elucidar el mecanismo de acción por el cual los extractos vegetales inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

Hipótesis

Algunos compuestos fitoquímicos presentes en extractos de partes poco valoradas de cultivos poseen capacidad antifúngica, los que mediante uno o más mecanismos de acción inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos.

3.-Revisión de Literatura

Dentro de los productos y subproductos de origen vegetal poco valorados se incluyen las hojas de moringa, las cuales se pueden encontrar en México abundantemente en toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas; son comestibles, ricas en proteínas y con un perfil de aminoácidos esenciales muy balanceado, además se usan como materia prima en la producción de aceites, alimentos, condimentos y fármacos, ya que poseen propiedades

antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias, diuréticas e hipotensoras (Peixoto et al., 2011). Aparte, la guanábana es un fruto altamente apreciado en la industria de los jugos, produciéndose alrededor de 21 mil toneladas por año tan solo en México; y su hojas son utilizadas en la industria farmacéutica como antifúngicos, bacteriostáticos y citostáticos de algunos componentes químicos como flavonoides, alcaloides y acetogeninas, los cuales proporcionan propiedades antibacterianas y se han utilizado para tratamientos médicos (Vit et al., 2014; SAGARPA, 2014). Por otro lado, en México se producen anualmente 8 mil toneladas de residuos de café, de los cuales se estima que de 2 a 3 ton/ha por año equivalen únicamente a residuos de pulpa de café, y entre sus componentes se encuentran carbohidratos, fibra, proteínas, cafeína y polifenoles, siendo estos dos últimos considerados como agentes antinutricionales; además, la degradación parcial de este material requiere de semanas a meses de la acción microbiana nativa, por lo que al acumularse se incrementan los problemas de contaminación (López-Altunar et al., 2011; Paz et al., 2013). Además, la producción de sorgo en México equivale a 8.4 millones de toneladas, y existen algunos cultivares de sorgo utilizados como control de plagas de pájaros debido a que los granos contienen altas cantidades de taninos, y estos forman complejos con las proteínas por lo que el sorgo no puede ser aprovechado para consumo animal, sin embargo, se ha reportado que posee propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas (Clara and Rooney, 2009; Wu et al., 2012; FAOSTAT, 2017).

Para la obtención de extractos vegetales se utilizan técnicas como Soxhlet o destilación, pero existen técnicas alternativas conocidas como técnicas verdes, donde se incluye la extracción asistida por ultrasonido (EAU) y la extracción asistida por microondas (EAM), que proporcionan mayor cantidad de compuestos bioactivos de interés, utilizan periodos más cortos de extracción, aumentan la calidad de los extractos, se pueden extraer compuestos que son difíciles de obtener a través de técnicas convencionales, utilizan menos solventes y energía, hay menor degradación de compuestos termolábiles, mejores productos y mayores rendimientos (Ballard et al., 2010; Martins et al., 2010).

Previamente se ha reportado el mecanismo de péptidos antimicrobianos (AMPs), como daño a la membrana celular, destrucción del citoesqueleto, e inhibición de la síntesis macromolecular biológica. Además, los AMPs pueden romper la célula fúngica y unirse al ADN para inhibir el desarrollo del hongo; por lo que el mecanismo de apoptosis celular del hongo se puede desencadenar. Se ha reportado que el gen GRP78 desempeña un papel anti-apoptótico importante y controla la liberación de citocromo c de la mitocondria; el gen MET3 está implicado en el metabolismo de la metionina al catalizar la reducción de sulfato a sulfito, por lo que tiene un papel importante en la fisiología celular; los genes RTG regulan el estado de la mitocondria en células y las funciones de la vía de señalización como homeostasis o mecanismos de respuesta al estrés para regular varias actividades biosintéticas y metabólicas cuando ocurre disfunción mitocondrial; y el gen RLM1 es un factor de transcripción asociado con la biogénesis de la pared celular, el cual es un factor vital en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, particularmente en el control del flujo de polisacáridos en la biosíntesis de la pared celular (Kong et al., 2016).

#### 4.- Procedimiento Experimental

##### Primera parte

Para obtener los extractos, se tendrán las fuentes vegetales donde se incluyen hojas de moringa, hojas de guanábana, pulpa de café y sorgo con alto contenido de taninos, este material será deshidratado y molido para después ser tamizado hasta obtener un tamaño de partícula entre 0.6 a 0.8 mm, y se almacenará en frascos ámbar hasta su utilización en los equipos de extracción asistida por ultrasonido y microondas. Posteriormente, los extractos serán separados en una columna de cromatografía con agua y etanol como solventes y amberlita XAD-16 como fase estacionaria, y el etanol será evaporado utilizando un rotavapor. Después se llevará a cabo la caracterización de los compuestos fitoquímicos: taninos hidrolizables por el método Folin-Ciocalteu, taninos condensados utilizando HCl-Butanol y reactivo férrico, saponinas por índice de espuma, terpenos mediante anhídrido acético y ácido sulfúrico, y alcaloides por prueba de Wagner.

##### Segunda parte

Se aislarán los hongos *Phytophthora*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizopus* y *Alternaria*, y se identificarán morfológicamente empleando claves taxonómicas específicas para cada género, además se identificarán a nivel molecular, mediante la extracción de ADN, amplificación de la región ITS, secuenciación y comparación con bases de datos. Posteriormente, se evaluarán distintas concentraciones de los extractos empleando la técnica de microdilución en placa para determinar la mejor concentración a la cual los extractos inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos, para esto se colocará por pozo el medio de cultivo estéril, más un propágulo definido del micelio de los hongos y los extractos a diferentes concentraciones, se incubarán durante un periodo de 24 h a 28° C, para después realizar lecturas a las 0, 6,

12, 18 y 24 h a una longitud de onda de 630 nm, e determinará la CI<sub>50</sub> y se realizará un análisis Probit.

#### Tercera parte

Se realizará un estudio de efectividad biológica de los extractos en condiciones de invernadero, para lo cual se utilizarán chiles inoculados con *Phytophthora* y *Fusarium* por el método de herida de raíz, inmersión en suspensión de esporas (1x10<sup>8</sup> esporas/mL) y trasplante; también se tendrán tomates inoculados con *Alternaria* por el método de aspersión al follaje (1x10<sup>8</sup> esporas/mL), y las fresas serán inoculadas con *Botrytis* y *Rhizopus* por punción, inmersión en suspensión de esporas (1x10<sup>8</sup> esporas/mL) e incubación.

#### Cuarta parte

Se determinará la expresión diferencial de proteínas en células fúngicas tratadas y no tratadas con los extractos mediante separación en 1ª y 2ª dimensión, después se obtendrá el ARN total de los hongos de estudio, y se añadirá la enzima RNAasa H transcriptasa reversa, además de los iniciadores para los genes GRP78, RTG1, RTG3, RLM1 Y MET3, con condiciones establecidas en el termociclador, para finalmente observar los productos esperados en un gel de agarosa al 0.8%, y de acuerdo a la expresión de los distintos genes se realizará la técnica de qPCR.

#### Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caracterización de compuestos fitoquímicos por el método Folin-Ciocalteu, índice de espuma, prueba de Wagner, entre otros.	X	X	X	X	X							
Evaluación de la efectividad biológica de los extractos por técnica de microdilución en placa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Estudios de efectividad biológica en invernadero						X	X	X	X	X	X	X
Elucidación de los mecanismos de acción de los genes GRP78, RTG1, RTG3, RLM1 Y MET3 por técnicas moleculares							X	X	X	X	X	X
Congresos							X			X		
Envío de manuscritos para artículos científicos					X					X		

#### Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Caracterización de compuestos fitoquímicos por el método Folin-Ciocalteu, índice de espuma, prueba de Wagner, entre otros.	4%	4%	4%	4%	4%							
Evaluación de la efectividad biológica de los extractos por técnica de microdilución en placa	2.4%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%
Estudios de efectividad biológica en invernadero						3.2%	2.8%	2.8%	2.8%	2.8%	2.8%	2.8%
Elucidación de los mecanismos de acción de los genes GRP78, RTG1, RTG3, RLM1 Y MET3 por técnicas moleculares							4.5%	4.3%	4.3%	4.3%	4.3%	4.3%
Congresos							7%			7%		

#### Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

## 5.-Productos Esperados

Tres artículos científicos.

Presentaciones en congresos Nacional e Internacional.

Manual para la obtención de extractos a partir de productos y subproductos de origen vegetal poco valorados mediante el empleo de extracción asistida por ultrasonido y microondas.

Ficha técnica sobre la composición y actividad química de extractos de las cuatro fuentes vegetales.

Ficha técnica sobre la actividad biológica de extractos de las cuatro fuentes vegetales.

## 6.-Literatura Citada

Agrios GN. Fitopatología. J Chem Inf Model. 1995;53(9):838.

Alvarado Hernández AM, Barrera Necha LL, Hernández Lauzardo AN, Velázquez del Valle MG. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. Rev Colomb Biotechnol. 2011;13(2):127–34.

Bandow JE, Brötz H, Ole LI, Labischinski H, Hecker M, Bro H, et al. Proteomic Approach to Understanding Antibiotic Action. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(3):948–55.

Barragán DC. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Rev Mex Ciencias Farm. 2012;43:81–6.

Kong Q, Liang Z, Xiong J, Li H, Ren X. Overexpression of the Bivalent Antibacterial Peptide Genes in *Pichia pastoris* Delays Sour Rot in Citrus Fruit and Induces *Geotrichum citri-aurantii* Cell Apoptosis. Food Biotechnol [Internet]. 2016;30(2):79–97.

Méndez M, Rodríguez R, Ruiz J, Morales-Adame D, Castillo F, Hernández-Castillo FD, et al. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. Ind Crops Prod [Internet]. 2012;37(1):445–50.

Paz JEW, Guyot S, Herrera RR, Sánchez GG, Juan C, Esquivel C, et al. Alternativas Actuales para el Manejo Sustentable de los Residuos de la Industria del Café en México Current Alternatives for Sustainable Management of Coffee Industry By- By - Products in Mexico. 2013;(10):33–40.

Peixoto JRO, Silva GC, Costa RA, de Sousa Fontenelle J res L, Vieira GHF, Filho AAF, et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. Asian Pac J Trop Med. 2011;4(3):201–4.

Saldívar L, Hugo R, Lira-Saldívar RH, Biopolímeros G De, Investigación C De, Aplicada Q, et al. Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D. C.) Coville]. Rev Mex Fitopatol [Internet]. 2003;21(2):214–22.

Vit P, Santiago B. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. Interciencia. 2014;39(5):350–3.

Wu Y, Li X, Xiang W, Zhu C, Lin Z, Wu Y, et al. Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin1. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2012;109(26):10281–6.

Yoon MY, Cha B, Kim JC. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. Plant Pathol J. 2013;29(1):1–9.