

BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE GOBERNADORA (*LARREA TRIDENTATA*) SOBRE LA INHIBICIÓN DE HONGOS POSCOSECHA: *ALTERNARIA TENUISSIMA*, *ASPERGILLUS NIGER*, *PENICILLIUM POLONICUM* Y *RHIZOPUS ORYZAE*

IN VITRO* BIOACTIVITY OF CREOSOTE BUSH EXTRACTS (*LARREA TRIDENTATA*) ON THE INHIBITION OF POSTHARVEST FUNGI: *PENICILLIUM POLONICUM*, *ASPERGILLUS NIGER*, *RHIZOPUS ORYZAE* Y *ALTERNARIA TENUISSIMA

O. Peñuelas-Rubio¹, M. Arellano-Gil¹, I.C. Vargas-Arispuro³, F. Lares-Villa¹, E.U. Cantú-Soto², S.E. Hernández-Rodríguez¹, M.A. Gutiérrez-Coronado², y C. Mungarro-Ibarra¹

¹Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, ²Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, col. Centro CP 85000, Cd. Obregón, Sonora, México. ³Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a La Victoria Km 0.5, Ejido La Victoria, Apdo. Postal 1735. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

Correo electrónico: maritza.arellano@itson.edu.mx

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la eficiencia de extractos vegetales de *Larrea tridentata* obtenidos con diclorometano, etanol, metanol y agua, sobre el crecimiento radial *in vitro* de cuatro hongos fitopatógenos, los cuales primeramente fueron identificados en género y especie empleando claves taxonómicas y técnicas moleculares. Para los bioensayos *in vitro* se aplicaron diseños completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones en cada hongo, utilizando las concentraciones: 0, 250, 500 y 750 ppm para *Alternaria* sp.; 0, 2000, 2500 y 3000 para *Aspergillus* sp.; 0, 1500, 1750 y 2000 para *Penicillium* sp. y 0, 150, 200 y 250 ppm para *Rhizopus* sp. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. El análisis molecular determinó la especie *tenuissima* para *Alternaria*, *niger* para *Aspergillus*,

polonicum para *Penicillium* y *oryzae* para *Rhizopus*. En cuanto a las pruebas *in vitro*, se determinaron inhibiciones del 100% para tres de los hongos en estudio: *Alternaria tenuissima* con extracto EtOH a 750 ppm; *Aspergillus niger* con extracto DCM a 3000 ppm y *Rhizopus oryzae* a partir de 150 ppm y 250 ppm de los extractos DCM y EtOH respectivamente. Se presentó una inhibición del 82% a 2000 ppm para *Penicillium polonicum*. Se concluye que a pesar de las diferencias en susceptibilidad entre las especies fúngicas, los extractos de *Larrea tridentata* obtenidos con etanol y diclorometano son efectivos para el control de los hongos fitopatógenos bajo estudio *in vitro*.

Palabras clave: gobernadora, fitoquímica, diclorometano, metanol, etanol, agua.

ABSTRACT

In the present study was evaluated the efficiency of plant extracts from *Larrea tridentata* extracted with four solvents *in vitro* inhibition of radial growth of *Penicillium polonicum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* y *Alternaria tenuissima*. Fungi were identified using colonial, morphological taxonomic keys and the corresponding molecular techniques identified species each. A design was randomly applied altogether with 16 treatments in each mold, corresponding to four solvents: dichloromethane, ethanol, methanol and water, with four concentrations: 0, 250, 500 and 750 ppm to *Alternaria* sp.; 0, 2000, 2500 and 3000 to *Aspergillus* sp.; 0, 1500, 1750 and 2000 to *Penicillium* sp. and 0, 150, 200 and 250 to *Rhizopus* sp. Each treatment had three replicates. Molecular analysis determined the *tenuissima* specie to *Alternaria*, *niger* to *Aspergillus*, *polonicum* to *Penicillium* and *oryzae* to *Rhizopus*.

About *in vitro* testing, inhibition of 100% for three of the study were determined fungi: *Alternaria tenuissima* EtOH extract to 750 ppm; *Aspergillus niger* with DCM extract and *Rhizopus oryzae* 3000 ppm from 150 ppm to 250 ppm of the DCM and EtOH extracts respectively. 82% inhibition at 2000 ppm for *Penicillium polonicum* was presented. It is concluded that despite the differences in susceptibility between the fungal species, *Larrea tridentata* extracts obtained with ethanol and dichloromethane are effective for the control of postharvest fungi under *in vitro* study.

Key words: creosote bush, phytochemical, dichloromethane, methanol, ethanol, water.

INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos patógenos en la poscosecha de productos hortofrutícolas ocasionan considerables pérdidas económicas: hasta 50% en países como México; el manejo se basa casi exclusivamente en la utilización de fungicidas químicos sintéticos, que generan un gran impacto en los ecosistemas y la salud, provocando a su vez, que los productos agrícolas no sean aceptados para exportación (Sudheer e Indira, 2007).

En los últimos años, la tendencia va hacia la utilización de alternativas más seguras para el control de hongos, y reducir así, la dependencia a los fungicidas artificiales (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2007). Entre las opciones de control se encuentra el empleo de compuestos naturales aislados de plantas, conocidos como extractos vegetales, ya que se consideran biodegradables e inoocuos (Hernández *et al.*, 2007). Las plantas que se desarrollan en zonas áridas son producto de miles de años de adaptación fisiológica para su sobrevivencia y poseen un alto grado de especialización biológica (Lira-Saldivar, 2003). Dentro de las especies vegetales representativas de dichas zonas en el noroeste de México, *Larrea tridentata* conocida como “gobernadora” es una fuente invaluable de moléculas biológicamente activas, tales como diversos metabolitos secundarios que presentan actividad biocida. En la medicina tradicional herbolaria se han utilizado extractos de gobernadora como antídoto para varicela, diabetes, enfermedades venéreas, tuberculosis, resfriados, cálculos renales y biliares (Lü *et al.*, 2010), incluso se ha encontrado que inhibe la replicación y transcripción

del virus de inmunodeficiencia adquirida (García *et al.*, 2010). Este arbusto dominante del desierto sonorense se caracteriza por los compuestos extraídos a partir de la resina que cubre hojas y tallos jóvenes, ya que produce un potente antioxidante: el ácido nordihidroguaiarético (ANDG) que posee actividad fungicida (Arteaga *et al.*, 2005), y compuestos metilados derivados de este ácido que han despertado el interés por su actividad antiviral (Gnabre *et al.*, 1996).

Debido al efecto inhibitorio en numerosos sistemas enzimáticos, *L. tridentata* y ANDG tienen un amplio espectro como agentes antisépticos, que se ha probado al evaluar *in vitro* diversas dosis de los extractos en 45 bacterias fitopatógenas, entre las más importantes: *Erwinia amylovora*, *Erwinia atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum*; como nematocida, se reporta la inactivación de nemátodos colectados de suelo infestado donde se tenía sembrado melón (*Cucumis sativus*), vid (*Vitis vinifera*) y nogal (*Carya illinoensis*) (Lira-Saldivar, 2003); Las propiedades antifúngicas de *L. tridentata* han sido corroboradas con trabajos desde hace aproximadamente 40 años mediante ensayos *in vitro*. Se ha demostrado actividad antifúngica *in vitro* contra *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. y *Alternaria solani* entre otros hongos fitopatógenos (Vargas-Arispuro *et al.*, 1997; López-Benítez *et al.*, 2005; Lira-Saldivar *et al.*, 2002; Lira-Saldivar *et al.*, 2003). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de los extractos vegetales de *L. tridentata* sobre la inhibición del crecimiento radial *in vitro* de los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp, con la finalidad de establecer las dosis mínimas de inhibición para futuros ensayos *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los extractos

Se realizó un muestreo aleatorio a partir de la tercera parte superior de plantas de *L. tridentata* en el poblado de Las Guásimas, municipio de Guaymas, Sonora (27° 56' 16" N y 100° 35' 11" O). Una vez colectadas, las muestras se identificaron en el herbario del DICTUS de la Universidad de Sonora.

Extractos DCM y MeOH

El material fresco se secó en estufa (FELISA) a $62 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta peso constante, y se procesó en un molino para café (BRAUN, KSM-2) hasta obtener un polvo fino que se pasó por tamiz 20 (FIICSA) de 0.84 mm (López-Benítez *et al.*, 2005). 90 g de material pulverizado, se colocaron en un dedal de celulosa (43 mm x 123 mm, Whatman) para realizar la extracción con diclorometano, en un sistema Soxhlet, a 35°C por 15 h. El sobrenadante se evaporó hasta sequedad por evaporación rotatoria (HEIDOLPH, HEID560) a 35°C y 100 rpm (extracto diclorometano "DCM"). El residuo vegetal se secó a temperatura ambiente para eliminar el solvente y se colocó en un extractor Soxhlet con metanol a 40°C por 15 h (Encinas, 1998). El sobrenadante se evaporó en rotavapor a 40°C , 100 rpm y 337-mbar hasta obtener una pasta espesa (extracto metanol "MeOH") (Rivera-Castañeda *et al.*, 2001; Lira-Saldivar *et al.*, 2006).

Extractos EtOH y H₂O

Se maceró (Vargas-Arispuro *et al.*, 2005) 1 kg de muestra fresca en 10 L de etanol-agua 70:30 (v/v) por ocho días a 25°C , en condiciones de oscuridad (Reyes, 1995). Transcurrido el tiempo de maceración, se filtró sobre gasas para eliminar el material

vegetal de mayor tamaño, el líquido se filtró con papel Whatman #5; se evaporó a 40°C, 175 mbar y 100 rpm, la fase sólida se consideró como el extracto etanol (“EtOH”) y el sobrenadante (extracto agua “H₂O”) se congeló a -45°C para someterse a un proceso de liofilización.

Los extractos DCM, MeOH y EtOH se depositaron en baño maría a 55°C hasta sequedad. Todos los extractos se almacenaron a una temperatura de 4°C.

El rendimiento de cada uno de los extractos se determinó tomando en cuenta su peso, en relación con el peso total de la muestra, según la fórmula propuesta por Lira-Saldivar *et al.*, (2006), que es: $Rc = (W2/W1) * 100$, donde Rc es el % de materia contenida en el extracto, W1 es el peso de la muestra antes de la extracción y W2 es el peso de la muestra después de la extracción.

Obtención e identificación de hongos

El laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C) Unidad Hermosillo proporcionó una cepa de *Alternaria* sp. previamente identificada por sus características morfológicas. *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. se aislaron de frutos de papaya del mercado local que presentaban signos de pudrición y *Rhizopus* sp. de frutos de tomate recolectados de un invernadero comercial del Valle del Yaqui, Sonora; se cortaron trozos de 0.5 cm² del área del fruto que presentaba características específicas de cada hongo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio por cinco minutos, y un lavado con agua destilada estéril, para posteriormente colocarse en cajas petri con agar dextrosa de papa (ADP), hasta obtener colonias puras. Todas las especies se resembraron en agar

dextrosa de papa y se incubaron a 28°C por cinco días (Hernández-Castillo *et al.*, 2008).

Caracterización cultural y morfológica

Para la caracterización morfológica se tuvo en cuenta el color de la colonia en el anverso y el revés de la placa, textura y la presencia de crecimiento aéreo (Lezcano *et al.*, 2012). La coloración de la colonia se determinó por la tabla de colores de Rayner (1970). Para observar el tamaño, la forma y el color de las estructuras vegetativas y reproductivas en los cultivos fúngicos se utilizó un microscopio óptico (10-100x) (ZEISS, Primo Star). Para corroborar la clasificación de género y especie, se emplearon claves taxonómicas (Alexopoulos, 1996; Barnett y Hunter, 1972).

Identificación molecular

Para comprobar el género y especie de los hongos aislados, se realizó una identificación molecular empleando la técnica de secuenciación de ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr y dominios D1/D2 del 28S ADNr en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. La identificación molecular se realizó con la comparación de la secuencia obtenida y todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Bioensayos *in vitro* para determinar el efecto de los extractos sobre el crecimiento radial de los hongos

Se utilizó la técnica de medio envenenado (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). El medio ADP se esterilizó durante 15 minutos a 15 lb/pulg² manteniéndose a 45°C (Misra y Saho, 1977). En una campana de flujo laminar, al medio de cultivo se adicionaron los

extractos previamente disueltos en acetona-agua (1:1). La mezcla medio ADP-extracto se homogenizó en un vórtex y se vertió en cajas de Petri (5 cm). Una vez que el medio solidificó a temperatura ambiente, por picadura central (Lira-Saldivar *et al.*, 2006) se inocularon los hongos *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. (Tequida-Meneses *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2004; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). La actividad antifúngica de los extractos se determinó midiendo el crecimiento radial del hongo en dos diámetros cruzados a partir del tercer día de incubación (Bautista-Baños *et al.*, 2002). El porcentaje de inhibición se determinó con la fórmula: % de inhibición = $(dc-dt/dc) * 100$, donde dc es el diámetro promedio en centímetros del crecimiento micelial del control, y dt es el diámetro del crecimiento micelial con los diferentes extractos (Kishore *et al.*, 1996).

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar evaluándose 16 tratamientos para cada hongo, que correspondían a cuatro solventes: diclorometano, etanol, metanol y agua, con cuatro concentraciones: 0, 250, 500 y 750 ppm para *Alternaria* sp.; 0, 2000, 2500 y 3000 para *Aspergillus* sp.; 0, 1500, 1750 y 2000 para *Penicillium* sp. y 0, 150, 200 y 250 ppm para *Rhizopus* sp. Cada tratamiento tuvo tres réplicas. Se utilizó un control negativo que consistió en un fungicida comercial a base de tiabendazol 45.75% (Mertec 340 F, Arysta lifescience). Las concentraciones definidas para los hongos se derivaron de ensayos preliminares (datos no publicados), ajustándolas hasta encontrar la concentración mínima inhibitoria, según lo revisado en Vargas-Arispuro *et al.*, (2005). El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA

y las medias se compararon mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS $p \leq 0.05$) en el software Statgraphics versión 4.1

DISCUSIONES

Rendimiento de los extractos

El rendimiento promedio de los extractos mostró variabilidad con relación a los diferentes solventes utilizados. Con metanol se obtuvo un rendimiento de 95% y 18% con diclorometano, etanol y agua presentaron un rendimiento de 4.71 y 3.24% respectivamente. Estos resultados están relacionados con el grado de polaridad de los solventes (Moreno *et al.*, 2011) y la afinidad que presentan los compuestos presentes en la parte aérea de *L. tridentata*. Los porcentajes del rendimiento de la extracción fueron mayores a los obtenidos por Pérez-Pérez (2003), quien reportó un rendimiento de 0.92 % para diclorometano y 1.13% con metanol, a partir de 400 g de *L. tridentata*. Sin embargo, fueron menores que los reportados por Lira-Saldivar *et al.* (2003), ya que con el empleo de plantas de *L. tridentata* del desierto Sonorense (Norte de San Pedro, Loreto, Cd. Constitución y Sur de Mulegé) a diferentes latitudes (24, 25, 26 y 27°) obtuvieron rendimientos de 37.43% y 27.36% para metanol y etanol respectivamente. Estas diferencias en el rendimiento de extracción, podrían atribuirse a que la producción de metabolitos secundarios en las plantas se realiza en función de las condiciones ambientales del lugar en que se desarrollan (Lira-Saldivar *et al.*, 2003) y a las metodologías de extracción empleadas, ya que las variaciones en cuanto a temperatura tienen un importante papel en la recuperación de los compuestos de interés (Martins *et al.*, 2012). Dado que existe una

variación natural de los constituyentes de las plantas, no es posible establecer una comparación significativa respecto al porcentaje de recuperación obtenido en este trabajo con los descritos en la literatura.

Caracterización cultural y morfológica de hongos

El primer paso de identificación a nivel género está constituido por las características coloniales, y las características morfológicas representan la identificación a nivel especie (Ochoa *et al.*, 2007).

Alternaria tenuissima

Las colonias de *Alternaria* sp. se desarrollaron en un periodo de tres a cuatro días. Presentaron apariencia vellosa, la coloración inicial es gris, seguido de tonos negros o intensos en el centro y de bordes grisáceos (fig. 1-G). La identificación morfológica concuerda con la descripción de la especie *tenuissima* con conidios simples, tabicados, donde en sus extremos forman conidios muriformes de color pardo (fig. 1-H) (Pontón *et al.*, 2002; Dillard y Cobb, 2008). *Alternaria* sp. incluye especies fitopatógenas y saprófitas que pueden causar daño del fruto en campo y deterioro importante durante el almacenamiento y transporte (Bottalico y Logrieco, 1992). Se caracteriza por crecer a bajas temperaturas, por lo que está involucrado en el daño durante el almacenamiento en refrigeración. Según Pose *et al.* (2010), los daños que ocasiona a frutos pueden ser de dos tipos: lesiones que afectan la superficie y lesiones que causan pudrición en el corazón del fruto. Estas especies producen aproximadamente 70 metabolitos secundarios, de los cuales 30 se reconocen por su alta toxicidad (Barkai-Golan y Paster, 2008).

Aspergillus niger

Las colonias de *Aspergillus* sp. mostraron coloración blanca y verde al inicio, aterciopeladas y de verde oscuro al madurar, tienden a presentar una corona radial amarilla (fig. 1-C). Según la morfología, la cepa pertenece a la especie *niger*, y puede ser identificada por sus cabezas conidiales de color negro o café oscuro, son globosas, radiadas o divididas y van formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas (fig. 1-D) (Sáez *et al.*, 2002; Pitt y Hockings 2009).

Penicillium polonicum

En medio PDA los aislamientos de *Penicillium* sp. presentaron crecimiento rápido (de dos a cuatro días), vellosas y aterciopeladas de color verde, tienden a presentar una corona radial ancha y blanca (fig. 1-A). La identificación morfológica mostró que las colonias pertenecen a la especie *polonicum*, ya que es un hongo filamentoso con conidios tabicados de pared lisa, ramificado al final y fialides en forma de botella, de la cual nacen los conidios de color azul o verde-azul en forma de cadenas (fig. 1-B). (Pontón *et al.*, 2002; Pitt y Hockings, 2009).

Rhizopus oryzae

A los cuatro días de incubación, se observó que las colonias en medio PDA cubrieron toda la superficie de la caja con micelio aéreo denso y algodonoso, presentaron coloración blanquizca a gris oscuro (fig. 1-E). Las características morfológicas concuerdan con la especie *oryzae*, presenta esporangióforos delgados erectos, esporangios globosos de paredes delgadas, una columela prominente y esporangios esféricos negros (fig. 1-F) (Pontón *et al.* 2002; Barrera-Necha *et al.*, 2008; Pitt y Hocking, 2009).

Identificación molecular de hongos

El primer paso de identificación a nivel género está constituido por las características coloniales, y las características morfológicas representan la identificación a nivel especie (Ochoa *et al.*, 2007). Dichos procedimientos tradicionales de identificación se basan principalmente en el reconocimiento de las características morfológicas de la colonia. Recientemente las herramientas de biología molecular han conducido al desarrollo de métodos específicos y sensibles para la identificación rápida.

El análisis comparativo de las secuencias (cuadro 1) permitió la identificación de las especies *tenuissima* para el género *Alternaria*, *niger* para *Aspergillus*, *polonicum* para *Penicillium*, y *oryzae* para *Rhizopus*. Estos organismos han sido reportados como patógenos pre y poscosecha, así como causantes de enfermedades durante el almacenamiento de granos. *A. tenuissima* causa reblandecimiento de frutos (Wright *et al.*, 2005) y existe evidencia sobre el deterioro poscosecha que provoca a frutos de tomate (Logrieco *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Pose *et al.*, 2004). Asimismo, es uno de los agentes causales que provoca la pudrición del florete del brócoli (Fraire-Cordero *et al.*, 2010). En estudios recientes se ha demostrado su presencia en lesiones de hojas de cártamo cultivado en el Valle del Yaqui, Sonora (Quintana *et al.*, 2011). Por otro lado, una de las enfermedades poscosecha más comunes en fresa es la podredumbre negra, causada por *A. niger*, que produce micotoxinas importantes desde el punto de vista de salud pública, ya que pueden provocar intoxicaciones por la presencia de aflatoxinas (Guédez *et al.*, 2009).

Efecto *in vitro* de extractos sobre el crecimiento micelial de hongos

Alternaria tenuissima

El efecto de los diferentes extractos de *L. tridentata* sobre el crecimiento micelial de *A. tenuissima* se presenta en el cuadro 2. Se puede observar que el extracto obtenido con etanol a 750 ppm inhibió al 100% el crecimiento de dicho hongo. Seguido por el extracto DCM a 750 ppm que presentó un porcentaje de inhibición de 97.7. Los extractos MeOH y H₂O a 750 ppm, presentaron actividad antifúngica mínima, ya que inhibieron el 16.3 y 10.0% del crecimiento de *A. tenuissima* respectivamente. La inhibición que presentan los extractos de *L. tridentata* con etanol se atribuye a la concentración de compuestos antifúngicos que este contiene, entre éstos el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y otros fitoestrógenos que le otorgan esa capacidad (Lira-Saldivar, 2003), como la quercetina y el kaempferol, que han sido aislados a partir de extractos metanólicos (Martins *et al.*, 2012). Otros estudios *in vitro* donde se ha evaluado el potencial antifúngico de extractos de *L. tridentata* sobre el desarrollo de especies del género *Alternaria*, presentan inhibición en concentraciones mayores que las del presente estudio, como lo expuesto por Jasso de Rodríguez *et al.* (2007), quienes confirman la actividad antifúngica de los extractos de gobernadora al utilizar etanol como solvente de extracción a 4000 ppm con una inhibición del 66.4% del crecimiento radial de *Alternaria alternata*. Lira-Saldivar *et al.* (2003), lograron la inhibición de *Alternaria solani* al 100% con concentraciones de 8000 ppm con etanol; Hernández-Castillo *et al.* (2006) en

una mezcla de extractos etanólicos de *L. tridentata* y quitosano a dosis de 2000-2000 ppm se inhibió el 14% del crecimiento radial de *Alternaria dauci*.

Aspergillus niger

Las diferencias encontradas entre el efecto de los extractos evaluados sobre el crecimiento micelial de *A. niger* son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). En el cuadro 3 se muestra que el extracto DCM 3000 ppm mostró el mejor efecto antifúngico, ya que inhibió el 100% del desarrollo *in vitro* de *A. niger*. Los extractos EtOH presentaron diferencias significativas con resultados de inhibición de 94.0 y 96.0% del crecimiento radial de *A. niger* a concentraciones de 2500 y 3000 ppm respectivamente. Los extractos de MeOH y H₂O a 3000 ppm presentaron inhibición del 9.3 y 10.3%, lo que indica que la presencia de los compuestos inhibidores tiene poca afinidad hacia los solventes polares y/o de polaridad intermedia. Investigaciones como las realizadas por Tequida-Meneses *et al.* (2002), demuestran la efectividad de extractos etanólicos de *L. tridentata* como inhibidor del crecimiento radial, ya que reportaron la inhibición de *A. niger* hasta un 77.3% respecto al testigo. Estos resultados son superados con los obtenidos en este estudio (cuadro 3). En la misma tendencia, Vargas-Arispuro *et al.* (1997) reportan la inhibición del crecimiento radial de *A. niger* en un 92% al utilizar extractos de *L. tridentata* con diclorometano a 500 ppm y un 12.5% con metanol a 500 ppm. Reyes *et al.* (2014) evaluaron el efecto de extractos etanólicos de *L. tridentata*, solos y combinados con sorbato de potasio, con la finalidad de disminuir el crecimiento de *Aspergillus flavus*; encontraron que el mayor porcentaje de inhibición del hongo ocurrió a las 1000 ppm, solo (71.9%) y

combinado (82.8%). De acuerdo con Ríos *et al.* (1998), existen diversos factores que están involucrados e influyen de manera importante en los resultados obtenidos durante los procedimientos del estudio de plantas como antimicrobianos, entre éstos, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, y el microorganismo en cuestión.

Penicillium polonicum

Los diferentes extractos aplicados en *P. polonicum* presentaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$). Se observó que los extractos DCM a 1750 y 2000 ppm presentaron una inhibición de 81 y 82%, comparado con el testigo. Con los extractos EtOH a 1750 y 2000 ppm se obtuvo un 77 y 75% de inhibición del crecimiento de *P. polonicum*. Con MeOH y H₂O se obtuvo una inhibición de 34% a 2000 ppm. Aun cuando los extractos evaluados no inhibieron el 100% del crecimiento micelial de *P. polonicum* (cuadro 4), presentan actividad antifúngica considerable, ya que, en el caso de alimentos, como lo productos hortofrutícolas, no necesariamente deben de ser estériles, sino que se acepta un determinado número de microorganismos; estos resultados cobran importancia cuando se pretende usar nuevas sustancias como conservadores, para prolongar el tiempo de latencia de un microorganismo y mantener al producto dentro de su periodo de vida útil (Reyes *et al.*, 2014). Diversos estudios presentan efectos positivos en la inhibición de este género utilizando extractos de *L. tridentata*. Tal es el caso de Tequida-Meneses *et al.* (2002), quienes reportaron una inhibición del 60% en el crecimiento radial de *Penicillium chrysogenum* con el empleo de extractos etanólicos a 6000 ppm de *L. tridentata*. Por otro lado, Guerrero-

Rodríguez *et al.* (2007), encontraron que a partir de extractos de hojas frescas de *Flourensia cernua* con etanol a 500 ppm se logró inhibir en un 94% el crecimiento de *Penicillium digitatum*. También reportan que los extractos de metanol-cloroformo, hexano, éter y etanol reducen notablemente la producción de conidios.

Rhizopus oryzae

Los resultados presentados para *R. oryzae* con los solventes etanol y agua, presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). La inhibición del crecimiento radial al 100% de *R. oryzae* se obtuvo con los extractos DCM a partir de 150 ppm y con etanol a 250 ppm (cuadro 5). El efecto fue diferente con los extractos MeOH y H₂O, ya que las concentraciones presentaron bajos porcentajes de inhibición. *L. tridentata* contiene alrededor del 10-15% en peso seco de saponinas (Larragenin A y ácido Larréico) y en otros estudios se ha encontrado que el contenido rico de saponinas en extractos vegetales para el control de la pudrición de los frutos por *Rhizopus* sp., muestra resultados favorables en comparación con agentes químicos que se utilizan para este fin (Lira-Saldivar, *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010). Jasso de Rodríguez *et al.* (2007) observaron que la capacidad antifúngica de los extractos de *L. tridentata* y etanol a concentraciones de 4000 ppm inhiben el crecimiento radial de *Rhizopus* sp. Barrera-Necha y Bautista-Baños (2008) realizaron ensayos a partir de extractos de metanol de *Cestrum nocturnum* y obtuvieron porcentajes de inhibición de 46 a 94% en aislados de *Rhizopus stolonifer* a concentraciones de 2, 5 y 10 mg/mL.

CONCLUSIONES

La identificación molecular a nivel especie permitió corroborar los resultados del análisis morfológico de los hongos bajo estudio, por lo que es una alternativa rápida y segura al momento de aislar microorganismos de muestras vegetales. Por otro lado, la presente investigación reafirma el potencial que tiene *L. tridentata* como una fuente de compuestos con actividad biológica, ya que se determinaron inhibiciones del 100% para tres de los hongos en estudio: *Alternaria tenuissima* con extracto EtOH a 750 ppm; *Aspergillus niger* con extracto DCM a 3000 ppm y *Rhizopus oryzae* a partir de 150 ppm y 250 ppm de los extractos DCM y EtOH respectivamente. Los extractos evaluados en este estudio, en la mayoría de los casos, presentaron control del crecimiento de los hongos en concentraciones menores respecto a los reportado por otros autores, por lo que se concluye que *L. tridentata* se puede utilizar en menor proporción. Desde este punto de vista, los resultados obtenidos en este estudio dan la pauta para bioensayos *in vivo* y la posterior obtención de biofungicidas comerciales para controlar los hongos poscosecha evaluados, que podrían prolongar la vida de anaquel de productos hortofrutícolas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Ecología Química del CIAD A.C. unidad Hermosillo, Sonora, por el apoyo técnico brindado.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C.J., C.W. Mimms, and M. Blackwell, 1996. *Introductory Mycology* (4th ed.). Editorial Wiley. EU, 869 pp.
- Andersen, B.; J. Smedsgaard, y J.C. Frisvad, 2004. "Penicillium expansum: consistent production of patulin, chaetoglobosins and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruits products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2421-2429.
- Arteaga, S.; A. Andrade-Cetto, y R. Cardenas, 2005. "Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid". *Journal of Ethnopharmacology*, **98**(3): 231-239.
- Barrera-Necha, L., y S. Bautista-Baños, 2008. "Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **26**(1): 27-31.
- Barkai-Golan, R., y N. Paster, 2008. *Mycotoxins in fruits and vegetables*. First Edition. Academic Press, Elsevier. USA.
- Barnett, H.L., y B.B. Hunter, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, MN. USA.
- Bautista-Baños, S.; M. Hernández-López, y E. Bosquez-Molina, 2004. "Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **22**(2):178-186.
- Bautista-Baños, S., L.L. Barrera-Necha, L. Bravo-Luna, y K. Bermúdez-Torres, 2002. "Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit storage". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **20**(1):8-12.
- Bottalico, A., y A. Logrieco, 1992. "Alternaria plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins". In: Chelkowski J, y A. Visconti (Eds.) *Alternaria: biology plant diseases and metabolites*. Amsterdam. Elsevier. pp. 209-32.
- Dillard, H., y A. Cobb, 2008. *Alternaria alternata* and *Plectosporium tabacinum* on snap beans: pathogenicity, cultivar reaction and fungicide efficacy. Plant health progress. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2008/snap/>
- Fraire-Cordero, M.L.; D. Nieto-Angel, y E. Cárdenas-Soriano, 2010. "Alternaria tenuissima, A. alternata y Fusarium oxysporum hongos causante de la pudrición del florete del brócoli". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **28**: 25-33.
- García, C.L.; A.R. Martínez, J.L.S. Ortega, y F.B. Castro, 2010. "Chemical

- components and their relation with biological activities of some plant extracts”. *Química Viva*, **2**(9).
- Gnabre, J.; Y. Ito, Y. Ma, y R. Huang, 1996. “Isolation of anti- HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography”. *Journal of Chromatography*, **7**(19): 353-364.
- González, N.; B. Martínez, y D. Infante, 2010. “Mildió polvoriento en las cucurbitáceas”. *Revista de Protección Vegetal*, **25**(1): 44-50.
- Guédez, C.; L. Cañizalez, C. Castillo, y R. Olivar, 2009. “Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos patógenos poscosecha de la fresa (*Fragaria* spp)”. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **29**: 34-38.
- Guerrero-Rodríguez, E.; S. Solis-Ganoa, F.D. Hernández-Castillo, A. Flores-Olivas, V. Sandoval-López y D. Jasso-Cantú, 2007. “Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de poscosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr:) Keiss, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc”. *Revista Mexicana de Fito patología*, **25**(1):48-53.
- Hernández-Castillo, F.; A. Aguirre-Aguirre, R.H. Lira-Saldivar, G. Guerrero, y G. Gallegos-Morales, 2006. “Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria”. *International Journal of Experimental Botany PHYTON*, **75**: 91-101.
- Hernández-Castillo, F.; R.H. Lira-Saldivar, L. Cruz-Chávez, G. Gallegos-Morales, F. Galindo-Cepeda, E. Padrón-Corral, y M. Hernández-Suárez, 2008. “Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)”. *Revista Internacional de Botánica Experimental PHYTON*, **77**: 241-252.
- Hernández, L.A.; B.S. Bautista, y V.M. Velázquez, 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades poscosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, **30**(2): 119-123.
- Jasso-de-Rodríguez, D.; R. Rodríguez-García, F. Hernández-Castillo, J. Villarrreal-Quintanilla, y A. Galván-Cendejas, 2007. Antifungal effects *in vitro* of semiarid plant extracts against post-harvest fungi. AAIC Annual meeting: bringing industrial crops into the future. <http://www.aaic.org/07program.htm>
- Kishore, N.; J. Chansouria, y N. Dubey, 1996. “Antidermatophytic action of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* and an ointment prepared from it”. *Phytotherapy Research*, **10**: 453-455.
- Lezcano, J.C.; B. Martínez, y O. Alonso, 2012. “Caracterización cultural y morfológica e identificación de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas”. *Pastos y Forrajes*, **35**(2): 187-196.

- Lira-Saldivar, R.H., 2003. "Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C) Coville]". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **21**(2): 214-222.
- Lira-Saldivar, R.H., G.F. Balvantín-García, F.D. Hernández-Castillo, R. Gamboa-Alvarado, D. Jasso-de-Rodríguez, y F. Jiménez-Díaz, 2003. "Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (SESEE and MOC. Ex D.C.) Coville extracts from two mexican deserts against *Phyitium* sp. Pringsh". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **21**(2):97-101.
- Lira-Saldivar, R.H.; R. Gamboa-Alvarado, L. Villareal-Cárdenas, L. López-Campos, y F. Jiménez-Díaz, 2002. "Hydro-soluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the north of Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*". *PHYTON-International Journal of Experimental Botany*, 167-172.
- Lira-Saldivar, R.H.; M. Hernández, y F. Hernández, 2006. "Activity of *Larrea tridentata* (D.C) COVILLE L. extracts and chitosan against fungi that effect horticultural crops". *Chapingo Serie Horticultura*, **12**(2): 211-216.
- Logrieco, A.; A. Bottalico, G. Mulé, A. Moretti, y G. Perrone, 2003. "Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops". *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 645-667.
- López-Benítez, A.; S. López-Betancourt, M.E. Vázquez-Badillo, S.A. Rodríguez-Herrera, M. Mendoza-Elos, y E. Padrón-Corral, 2005. "Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* SCHLECHTEND f. sp. *lycopersici* (SACC.) SNYDER Y HANSEN. *Rhizotocnia solani* KÜHN y *Verticillium dahliae* KLEB. mediante extractos vegetales acuosos". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **23**(2): 183-190.
- Lü, J.M.; J. Nurko, S.M. Weakley, J. Jiang, P. Kougiaris, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, 2010. "Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaia-retic acid (NDGA) and its derivatives: an update". *Medical Science Monitor*, **16**(5): 93-100.
- Martins, S.; C.N. Aguilar, J.A. Teixeira, y S.I. Mussato, 2012. "Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction". *Separation and Purification Technology*, **88**: 163-167.
- Moreno-Limón, S., L.N. González-Solis, S.M. Salcedo-Martínez, M.I. Cárdenas-Ávila, y A. Perales-Ramírez, 2011. "Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp". *Polibotánica*, **32**: 193-205.
- Ochoa, J.L.; M.L. Hernández, B.H. Latisnere, J.L. León de la Luz, y C.C. Larralde, 2007. "Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Obseck cultivada en Baja California Sur, México". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **5**(5): 352-359.

- Pérez-Pérez, P., 2003. "Actividad antioxidante de extractos, fracciones y compuestos aislados de la planta *Larrea tridentata*". Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Pitt, J., y A. Hocking, 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. 536 pp.
- Pontón, J.; M. Maragues, M. Gené, J. Guarro, y G. Quindós, 2002. "Hongos y actinomicetos alérgicos". *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao, España. 45 pp.
- Pose, G.; V. Ludemann, J. Segura, y V. Fernández-Pinto, 2004. "Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolates from tomatoes affected by Blackmold in Argentina". *Mycotoxin Research*, **20**: 80-86.
- Pose, G.; V. Ludemann, D. Fernández, J. Segura, y V. Pinto, 2010. "*Alternaria* species associated with "moldy heart" on peaches in Argentina". *Tropical Plant Pathology*, **35**(3): 174-177.
- Quintana, O.E.; C.J. López, C.L. Cira, M.D. Sánchez, 2011. "Actividad antifúngica del quitosano contra *Alternaria tenuissima* *in vitro* y en semilla de cártamo". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **29**: 168-171.
- Reyes, A.; M. Aguilar, y M. Carrillo, 2014. "Efecto del uso combinado de extracto de *Larrea tridentata* y sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*". *Revista Iberoamericana de Ciencias*, **1**(2): 263-267.
- Reyes, B.F., 1995. "Comparación de los extractos alcohólico y acuoso de *Anthemis nobilis* y caracterización de un nuevo glicósido diterpénico de *Stevia subpebescens* LAG". Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.
- Ríos, J.; M. Recio, y A. Villar, 1988. "Screening methods for natural products with antimicrobial activity". *Journal of Ethnopharmacology*, **23**(2-3): 127-149.
- Rivera-Castañeda, G.; M.A. Martínez-Téllez, S. Vallejo-Cohen, G. Álvarez-Manilla, I.C. Vargas-Arispuro, P. Moya-Sanz, y Y.E. Primo, 2001. "*In vitro* inhibition of micelial wrought of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, México". *Revista Mexicana de Fitopatología*, **19**(2): 214-217.
- Sáez, V.A.; V.L. Flores, y R.A. Cadavid, 2002. "Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico". *Revista Universidad Eafit*, **128**: 33-41.
- Sudheer, K.P., y V. Indira, 2007. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Horticulture Science series 7. New India Publishing Agency. New Delhi, India. 291p p.
- Tequida-Meneses, M.; M. Cortez-Rocha, E.C. Rosas-Burgos, S. López-Sandoval, y C. Corrales-Maldonado, 2002. "Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*,

- Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium poae* Moulds”. *Revista Iberoamericana de Micología*, **19**: 84-88.
- Troncoso-Rojas, R.; y M.E. Tiznado-Hernández, 2007. “Natural compounds to control fungal postharvest rot in fruits and vegetables”. In: *Recent Advances in Alternative Postharvest Technologies to control Fungal Disease in Fruits & Vegetables*. Research SignPost. Trivandrum-695 023, Kerala, India. 127-156 pp.
- Vargas-Arispuro, I.C.; S. Araujo-Bernal, M.A. Martínez-Téllez, 1997. “Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*”. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **15**(2): 91-96.
- Vargas-Arispuro, I.C.; R. Reyes-Báez, G. Rivera-Castañeda, M. Martínez-Téllez, e I. Rivero-Espejel, 2005. “Antifungal lignans from the creosotebush”. *Industrial crops and products*, **22**(2): 101-107
- Wright, E.R.; P. Beatriz, R.L. Fernández, K. Ascitutto, M.C. Rivera, F. Murillo, P. Vásquez, S. Divo, A. Pérez, H.L. Aguilar, M.F. Rosato, A. Crelier, y A. Baldomá, 2005. “Conocimiento actual sobre enfermedades de arándano”. Simposio Internacional del Arándano. Buenos Aires. Argentina. En: <http://agro.faua.info/files/ul/wright.pdf>

Recibido: 20 febrero 2014. Aceptado: 23 febrero 2015.

Cuadro 1. Identificación molecular de los diferentes hongos evaluados.

Cepa	Identificación molecular	Identidad
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium polonicum</i> (AF033475.1)	99%
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i> (JF521496.1)	98%
<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus orizae</i> (HM753609.1)	99%
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria tenuissima</i> (FJ755240.1)	99%

Cuadro 2. Crecimiento micelial de *Alternaria tenuissima* por acción de los diferentes extractos de *L. tridentata*.

Concentración ppm	DCM ^u	EtOH ^v	MeOH ^w	H ₂ O ^x
	----- cm -----			
0 ^y	5.00±0.0 C ^z	5.00±0.0 D	5.00±0.0 D	5.00±0.0 D
250	0.60±0.1 B	1.30±0.2 C	4.90±0.1 CD	5.00 0.0 D
500	0.10±0.2 A	0.60±0.1 B	4.70±0.2 C	4.70 0.1 C
750	0.10±0.1 A	0.00±0.0 A	4.20±0.3 B	4.50 0.0 B
tiabendazol	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A

^udiclorometano, ^vetanol, ^wmetanol, ^xagua

^y Control negativo (ADP sin extracto)

^z Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (DMS p≤ 0.05). Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones ± desviación estándar.

Cuadro 3. Crecimiento micelial de *Aspergillus niger* por acción de los diferentes extractos de *L. tridentata*.

Concentración ppm	DCM ^u	EtOH ^v	MeOH ^w	H ₂ O ^x
	----- cm -----			
0 ^y	5.00±0.0 C	5.00±0.0 D	5.00±0.0 D	5.00±0.0 D
2000	0.30±0.3 B	1.40±0.1C	5.00±0.1 D	4.90±0.1 D
2500	0.10±0.2 AB	0.30±0.3B	4.70±0.0 C	4.60±0.0 C
3000	0.00±0.1 A	0.20±0.2 AB	4.50±0.1 B	4.50±0.1 B
tiabendazol	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A

^udiclorometano, ^vetanol, ^wmetanol, ^xagua

^y Control negativo (ADP sin extracto)

^z Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (DMS p≤ 0.05). Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones ± desviación estándar.

Cuadro 4. Crecimiento micelial de *Penicillium polonicum* por acción de los diferentes extractos de *L. tridentata*.

Concentración ppm	DCM ^u	EtOH ^v	MeOH ^w	H ₂ O ^x
	----- cm -----			
0 ^y	5.00±0.0 C ^z	5.00±0.0 C	5.00±0.0 D	5.00±0.0 D
1500	0.97±0.1 B	1.28±0.2 B	3.53±0.1 C	3.50±0.1 C
1750	0.95±0.1 B	1.27±0.2 B	3.37±0.1 B	3.60±0.1 C
2000	0.90±0.2 B	1.15±0.0 B	3.30±0.0 B	3.28±0.0 B
tiabendazol	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A

^udiclorometano, ^vetanol, ^wmetanol, ^xagua

^y Control negativo (ADP sin extracto)

^z Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (DMS $p \leq 0.05$). Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Cuadro 5. Crecimiento micelial de *Rhizopus oryzae* por acción de los diferentes extractos de *L. tridentata*.

Concentración ppm	DCM ^u	EtOH ^v	MeOH ^w	H ₂ O ^x
	----- cm -----			
0 ^y	5.00±0.0 B ^z	5.00±0.0 D	5.00±0.0 C	5.00±0.0 C
150	0.00±0.0 A	1.05±0.0 C	4.90±0.0 C	4.70±0.3 C
200	0.00±0.0 A	0.70±0.2 B	5.00±0.2 C	5.00±0.0 C
250	0.00±0.0 A	0.00±0.0 A	4.40±0.4 B	3.20±0.0 B

^udiclorometano, ^vetanol, ^wmetanol, ^xagua

^y Control negativo (ADP sin extracto)

^z Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (DMS $p \leq 0.05$). Cada valor corresponde a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar.