

## Actividad antimicrobiana de los extractos de la hoja del zapote blanco (*Casimiroa edulis*)

J. Jesús Vargas Radillo<sup>1</sup>, Mariana Aguayo Ramírez<sup>1</sup>, Gil Virgen Calleros<sup>2</sup>, Hilda Elisa Ramírez Salcedo<sup>1</sup>, Bruno Becerra Aguilar<sup>1</sup>, Lucía Barrientos Ramírez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5 carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México, CP 45100, tel.: (33)-36820110,

<sup>2</sup>Laboratorio de fitopatología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5 carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, CP 45100

\*Correspondencia: Lucía Barrientos Ramírez, [lbarrien@dmcyp.cucei.udg.mx](mailto:lbarrien@dmcyp.cucei.udg.mx)

Recibido: 09-agosto-2017, revisado: 27-septiembre-2017, aceptado 30-septiembre-2017

### Resumen

#### Actividad antimicrobiana de los extractos de la hoja del zapote blanco (*Casimiroa edulis*)

Se determinó la inhibición del crecimiento radial *In vitro* de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* y las bacterias, *Xanthomona campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*, conocidos patógenos de plantas y frutos de interés alimenticio, al aplicar extractos crudos, fracciones de extractos crudos y péptidos obtenidos a partir de hoja de *Casimiroa edulis*. Los metabolitos fueron extraídos con metanol, hexano y diclorometano, mientras que los péptidos con sistemas acuosos específicos buffer. A 10000 ppm se lograron los mayores valores de supresión sobre *S. cepivorum*, con 9% crecimiento micelial (81% Inhibición) al utilizar el extracto en diclorometano; 43% C con extractos en hexano; 40% C con extractos en metanol; 21% C con extractos Buffer 1; 30% C con extractos Buffer 2 y 22% C con extractos buffer 3, mientras que *F. oxysporum* presentó mayor resistencia. *X. campestris* fue la bacteria con mayor inhibición, 35% C, al ser tratada con 5000 ppm de extractos en hexano. *P. aeruginosa* presentó mayor resistencia al efecto inhibitorio. Los extractos crudos mostraron mayor actividad que las fracciones y que los péptidos.

**Palabras clave:** Bioactividad, control biológico, *Casimiroa edulis*, fitopatógenos, crecimiento micelial, péptidos bioactivos

### Summary

#### Antimicrobial activity of extracts of the leaf of the white sapote (*Casimiroa edulis*)

It was measured the inhibition *In vitro* over the radial growth of the fungi *Fusarium oxysporum*,

*Sclerotium cepivorum* and the bacteria *Xanthomona campestris* and *Pseudomonas aeruginosa*, which are pathogens of plant and fruits of alimentary interest, applying crude extracts, fractions of crude extracts and peptides, obtained from *Casimiroa edulis* leaves. The metabolites were obtained with methanol, hexane and dichloromethane, while peptides with specific aqueous buffer systems. At 10,000 ppm the highest suppression values were obtained on *S. cepivorum* with 9% mycelial growth (81% inhibition) using the extract in dichloromethane. Other values were; 43% C with hexane extracts; 40% C with extracts in methanol; 21% C with the peptides extracted on the Buffer 1; 30% C with peptides of the Buffer 2; and 22% C with extracts in buffer 3. *F. oxysporum* presented greater resistance. *X. campestris* was the most inhibited bacterium, with 35% C (75% inhibition), when treated with 5000 ppm extracts in hexane. *P. aeruginosa* presented greater resistance to the action of the extracts. The crude extracts showed higher activity than the fractions and the peptides.

**Key words:** Biological control, *Casimiroa edulis*, metabolites, phytopathogens, mycelial growth, bioactive peptides.

### Introducción

El zapote es un árbol de hasta 10 m de altura originario de México y Centroamérica de la familia de las *Rutaceae*. Su fruto es comestible, de agradable sabor. Se usa este árbol en la medicina tradicional desde tiempos prehispánicos, por sus efectos sedantes, antihipertensivos, anticonvulsivos [25]. Se han hecho múltiples estudios en semillas, frutos, hojas y corteza determinando la presencia de diversos alcaloides del tipo Imidazole, cumarinas, y flavonoides como el zapotin (5,6,2',6'-tetramethoxyflavona)

y limonoides [5]. En relación a las hojas, sus extractos alcohólicos y acuosos tienen efectos sedativos, anticonvulsivos y antihipertensivos [25], debido a la presencia de los metabolitos mencionados. El propósito más frecuente de las investigaciones sobre *C. edulis* ha sido la identificación de las moléculas activas y su efecto sobre microorganismos patógenos que afectan la salud [6]. Por otro lado, las plagas que afectan cultivos y frutos comestibles ocasionan pérdidas millonarias en el sector productivo y se busca su control por medios naturales. Debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos de *C. edulis*, sería factible su uso para este fin. El objetivo de este trabajo es obtener extractos con sistemas de diferente polaridad, así como péptidos bioactivos acuosos a partir de las hojas de *C. edulis*, y evaluar su efecto microbicida sobre los hongos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* y de las bacterias *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*, que afectan cultivos importantes como cebolla, melón y jitomate.

### Material y métodos

El proceso experimental se muestra en el diagrama de la Figura 1.

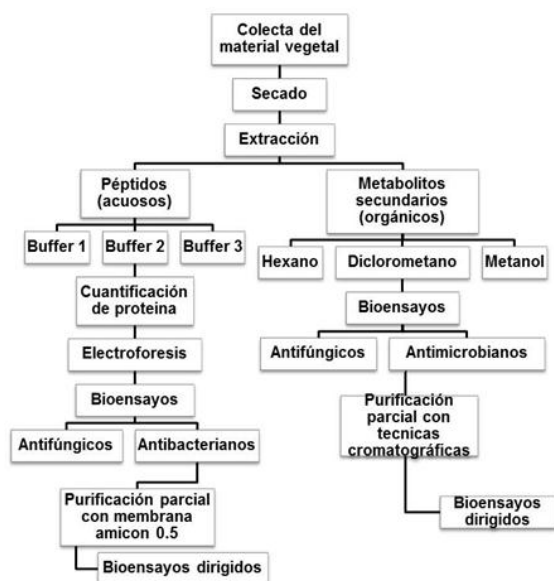


Figura 1. Secuencia experimental con los ensayos principales desarrollados durante el proceso

### Material vegetal

Las hojas, libres de plagas y enfermedades, se recolectaron de 5 árboles silvestres de zapote blanco, localizados en Ixtlahuacán del Río, Jalisco, México, a una altura aproximada de 1,655 metros sobre el nivel del mar, en Junio de 2013. La identificación botánica fue hecha en el Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara. Una muestra compuesta fue pulverizada en un molino de cuchillas (Restsch-GNBH) para posteriormente

tamizarse por malla No. 60.

La muestra molida fue tratada con hexano (1:3, w/v) en un baño de hielo a 4 °C con agitación mecánica durante 2 horas, para eliminar las grasas por su interferencia con los extractos. Se centrifugó por 20 minutos a 1000 rpm, desechando la fase líquida, mientras que la muestra sólida se secó a temperatura ambiente, y se guardó en refrigeración para posterior uso.

### Extracción de Péptidos.

Se utilizaron 100 g del material molido y libre de grasas, que fueron tratados con 600 mL de 3 sistemas acuosos diferentes de buffers, de forma no secuencial para la optimización de la extracción, de acuerdo al método propuesto por Regente et al. (1997) [24] y Terras et al. (1992) [28], utilizando 3 sistemas acuosos diferentes (buffer1, buffer 2, buffer 3), en baño maría a temperatura específica para cada sistema (4 °C ó 50 °C), durante 20 minutos y 1000 rpm. Posteriormente, los extractos crudos obtenidos fueron caracterizados, determinándoles proteína total mediante espectrofotometría y concentración empleando el método de Bradford (1976) [9], utilizando como estándar para las curvas de calibración albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones de 2.5 a 20 µg/mL y azul de Coomassie G-250. Se determinó el peso molecular de los péptidos por electroforesis SDS-PAGE [8], empleando como marcador Invitrogen (170 kDa-8.57 kDa). A continuación se evaluó su actividad antifúngica y antibacteriana y posteriormente 500 µL de péptidos extraídos con Buffer 1, el cual mostro la mayor inhibición, fueron purificados a 4000 rpm por 20 minutos empleando membranas Amicon ultra 0.5 marca millipore de 10 kDa, las cuales son filtros centrifugos que permiten la purificación, concentración y desalación de proteínas, con el propósito de evaluar nuevamente su actividad antifúngica y antibacteriana *In vitro*.

### Extracción de metabolitos secundarios.

La muestra (500 g de material molido libre de grasa) fue extraída secuencialmente con 1.2 Lt (2.4/1, v/w) de hexano, diclorometano y metanol, en ese orden, a 130 rpm durante 7 días en un agitador (Hinotek) a temperatura ambiente [14]. En cada etapa la muestra fue filtrada a través de papel filtro. El material sólido se secó al ambiente, mientras que la fase líquida, con los extractos, fue concentrada a presión reducida en un rotavapor a temperatura inferior a 40 °C y filtrada para eliminar las partículas suspendidas. Se evaluó el rendimiento [4]. Se midió la capacidad antimicrobiana de los extractos crudos en los diferentes solventes por inhibición del crecimiento diametral *In vitro*. Posteriormente se purificaron los extractos en hexano y

diclorometano, que fueron los de mayor inhibición, por medio de la técnica combinada cromatografía de capa fina (TLC)-Cromatografía en columna, obteniendo fracciones a las que se analizó su capacidad inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos. La cromatografía en capa fina fue hecha en placas de aluminio de 5 x 10 cm con gel de sílice (60F264), probando 11 diferentes sistemas como fase móvil, encontrando que el sistema tolueno-acetato de etilo (85:15) fue el de mejor resolución, por lo que se aplicó como fase móvil en las etapas posteriores, columna y placa cromatográfica. Para ello, 1 gramo de extracto crudo en hexano y 2 gramos de extracto en diclorometano fueron tratados en columna de vidrio (2 cm x 25 cm) empacada con gel de sílice (200-400 mesh, Ø 60A). De las fracciones obtenidas se realizó un análisis por cromatografía de capa fina [2], utilizando como fase móvil tolueno-acetato de etilo (85:15), visualizadas con luz a 254 nm y 365 nm y las fracciones con patrones cromatográficos similares se agruparon siendo sometidas nuevamente a TLC, raspando y juntando las muestras con similar factor de retención (Rf).

#### *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*

Para medir las propiedades inhibitorias, se utilizaron 4 microorganismos: *Sclerotium cepivorum* obtenido a partir de cebolla, *Fusarium oxysporum* a partir de melón y *Xanthomona campestris* a partir de jitomate. Se hicieron cortes de finos de tejido infectado con micrótopo, los cuales se trataron con agua-hipoclorito de sodio (1:1) por 30 segundos, lavando el exceso de hipoclorito, y se incubaron a 28 °C en agar papa dextrosa (PDA) durante 7 días [23], excepto para *Sclerotium cepivorum*, en que la incubación fue a 18 °C ± 2 °C. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, proveniente de cepario (número de registro 0693-P), se inoculó y cultivo por 24 h a 60 °C, en tubos de ensayo.

#### *Evaluación de la actividad antifúngica.*

Se evaluó por el método de inhibición del desarrollo micelial de cada una de las 2 especies en condiciones In vitro [17]. Con el propósito de secar el material se tomaron alícuotas de cada solvente fueron tratados con aire, y luego llevadas hasta sequedad a 30 °C. A continuación se prepararon concentraciones a 1, 10, 100, 1000 y 10,000 mg/L (ppm), en agua con 4 repeticiones, para lo cual fue necesario hacer emulsión con dimetilsulfóxido (DMSO) 1% y Tween 20 para los extractos secos para facilitar su solubilidad en agua. Se preparó un testigo con las mismas condiciones pero sin muestra. Posteriormente se pasteurizaron a 50°C durante 30 min, y enseguida se colocaron en un baño de hielo a 4 °C por 10 min, y finalmente se filtraron en membrana de

nylon millipore de 0.22 µm [18]. Los extractos se incorporaron en agar papa-dextrosa e incubadas en cajas Petri (Ø 60 mm) con discos de micelio de 0.3 mm de diámetro y se incubaron en la oscuridad a 18 °C ± 2 °C, para *S. cepivorum* y 28 °C ± 2 °C para *F. oxysporum* hasta que el testigo presentara lleno total de micelios en la caja Petri. Las fracciones de los extractos en diclorometano (la de mayor actividad antifúngica) fueron probadas de la misma forma, aplicando diferentes concentraciones, con 3 repeticiones. En el caso de los péptidos tratados con membrana Amicon, se evaluaron las concentraciones 200, 100, 50 y 25 mg/L y un testigo (0 mg/L). Se añadió tripsina con incubación por 2 horas a 37 °C [3].

Los porcentajes de crecimiento (% C) se determinaron según la formula [1]: % C=(Ø crecimiento de la muestra con extracto (cm))/(Ø crecimiento del testigo (cm)) x100

El porcentaje de inhibición (% In) se calculó restando de 100 el % C

#### *Evaluación de la actividad antibacteriana.*

Se aplicó el método de dilución con medio de cultivo líquido de Mueller-Hinton (1941) [21]. Para los extractos crudos se prepararon 8 diluciones secuenciales, por duplicado, a partir de una muestra original con 20,000 mg/L, tomando alícuotas de este extracto y adicionando caldo de cultivo, obteniendo concentraciones de 0,61 mg/L a 5000 mg/L. Se utilizó 1 testigo sin extracto. En relación a las fracciones purificadas en hexano y diclorometano se proyectaron 5 diluciones y un testigo sin extracto, por duplicado, con concentraciones finales de 9.76 mg/mL a 2500 mg/mL, utilizando en su preparación DMSO 1% y Tween 20 para realizar la emulsión. En el caso de los péptidos purificados con membrana Amicon se elaboraron 2 series de 10 diluciones, por duplicado, para obtener concentraciones de 1.9x10<sup>-5</sup> mg/L a 50.00 mg/L. una de estas series se trató con tripsina (incubación por 2 horas a 37 °C) [3].

Los microorganismos a probar se ajustaron a la concentración 0.5 en la escala de McFarland (1907) [19], que corresponde a 1x10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colonias/mililitro (UFC/mL), ajustándose por dilución a 1x10<sup>4</sup> UFC/mL. Se adiciono 1 mL de suspensión del microorganismo al caldo de cultivo con extracto, y se incubo por 24 horas a 37 °C para *P. aeruginosa*, y 28 °C para *X. campestris*. A continuación 10 µL de las muestras incubadas se diluyeron secuencialmente 2 veces a 10 mL con agua esterilizada. Se tomaron 10 µL y se cultivaron en placas Petri con agar nutritivo por 24 horas a 37 °C para *P. aeruginosa* y 28 °C para *X. campestris*, y posteriormente se realizó el recuento de UFC/mL utilizando la fórmula [29]: %C=(UFC totales en la muestra / UFC totales en testigo) x100.

Mientras que el porcentaje de inhibición (% In) se calculó restando % C de 100.

#### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar [22]. Los datos obtenidos fueron evaluados por análisis de varianza. En el caso de diferencias significativas se utilizó el test de comparación de medias DMS (diferencia mínima significativa), con nivel de confianza de un 95%.

### Resultados

#### Rendimiento de extractos crudos.

En la Tabla I se muestran los resultados del rendimiento de los extractos crudos. Los péptidos bioactivos (Buffer 1, y 3) tuvieron mayor rendimiento que los extractos con solventes, en los que por su parte, el extracto en metanol fue el de mayor rendimiento. en los extractos con solventes orgánicos.

Tabla I. Rendimientos de extractos crudos.

	Extracto	% Rendimiento
<b>Acuosos</b>	Buffer 1	14.1
	Buffer 2	18.2
	Buffer 3	16.0
<b>Orgánicos</b>	Metanol	8.6
	Diclorometano	2.9
	Hexano	3.5

#### Rendimiento y peso molecular de los péptidos

Adicionalmente y con el propósito de caracterizar con mayor precisión los péptidos extraídos, se cuantificó la concentración y peso molecular (Tabla II) en los 3 sistemas buffer utilizados (péptidos).

Tabla II

Concentración de proteína total de los extractos crudos.

Buffer	μL muestra	Absorbancia	μg/μL
1	5	0.156	1.13
2	5	0.135	0.97
3	5	0.183	1.35

$$\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} = \frac{\mu\text{g obtenidos de la curva de calibración}}{\mu\text{L de muestra}}$$

El extracto del buffer 3 presento la mayor concentración de proteína 1.35 μg/μL. Shahidi and Zhong (2008) [27] reportaron concentraciones con rangos de 0.68 a 3.57 μg/μL, lo cual coincide con la concentración de los péptidos aquí presentada. En relación al peso molecular, la electroforesis en gel de poliacrilamida mostro patrones de bandas con pesos diversos de 170.8, 109.5, 78.9, 60.4, 35.1, 18.3 y 13.7 kDa. La mayor densidad se manifiesta en la banda de 13.7 kDa (al compararse con el marcador estándar) y pesos menores. Los péptidos son fragmentos específicos de proteínas con pesos moleculares menores de 10 kDa y secuencias de 2 a 20 aminoácidos [15]. Se caracterizan por sus propiedades antimicrobiana, antioxidativa, antihipertensiva, inmuno moduladoras, antitrombóticas, entre otras [27].

#### Actividad antifúngica

En la Figura 2 se muestra los resultados de la inhibición *In vitro* del crecimiento de los hongos *S. cepivorum* y *F. oxysporum* al probar los extractos crudos y péptidos bioactivos de la hoja de zapote blanco. Los péptidos tratados por las membranas Amicon se evaluaron contra *S. cepivorum*. Se eligió este microorganismo ya que fue el que presento la mayor inhibición al ser tratado con péptidos crudos. Se probaron concentraciones de 25 a 200 ppm, obteniendo los siguientes valores: Utilizando 200 ppm se obtuvo 60% C (40% inhibición); 100 ppm 84% C, y 50 ppm 90% C. Estos valores muestran que la purificación a través de la membrana mejora el efecto de inhibición sobre este hongo en particular, ya que el efecto de los péptidos crudos sobre *S. cepivorum* fue a partir de una concentración mayor de 1000 ppm. Por otro lado, las muestras tratadas en membrana Amicon Ultra-0.5, no evidenciaron inhibición contra las bacterias en estudio.

#### Formación de las fracciones a partir de los extractos crudos

Las 17 fracciones obtenidas por columna fueron monitoreadas por capa fina (Figura 4). Las fracciones similares se juntaron para medir su actividad antimicrobiana. Se agruparon las fracciones con similar factor de retención (*R<sub>f</sub>*). Los extractos crudos de hexano produjeron 9 fracciones, etiquetadas como fracción 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 15, 17, mientras que de los extractos en diclorometano resultaron 8 fracciones, denominadas fracción 2, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 17.

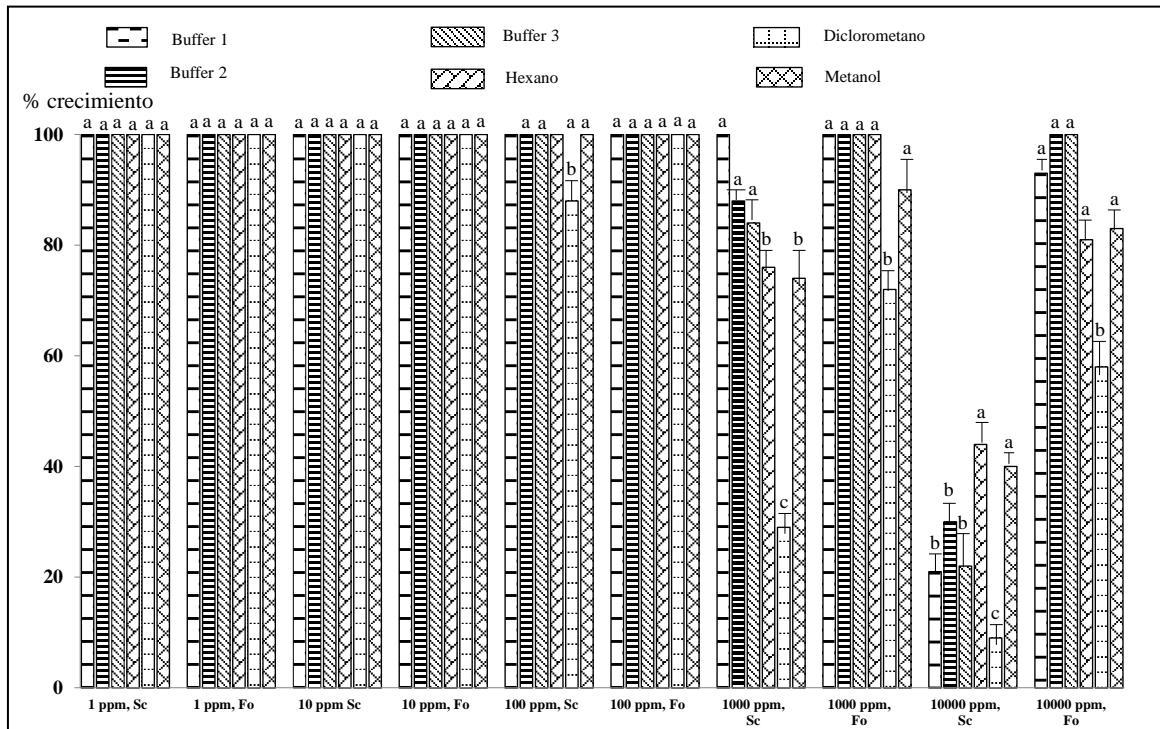


Figura 2. Actividad antifúngica de los extractos bufferizados y extractos crudos orgánicos sobre *Sclerotium cepovirum* (Sc) y *Fusarium oxysporum* (Fo). Se aprecia que tanto metabolitos como péptidos inhiben el crecimiento a concentraciones altas, y la resistencia a los extractos es particular para cada especie fúngica.

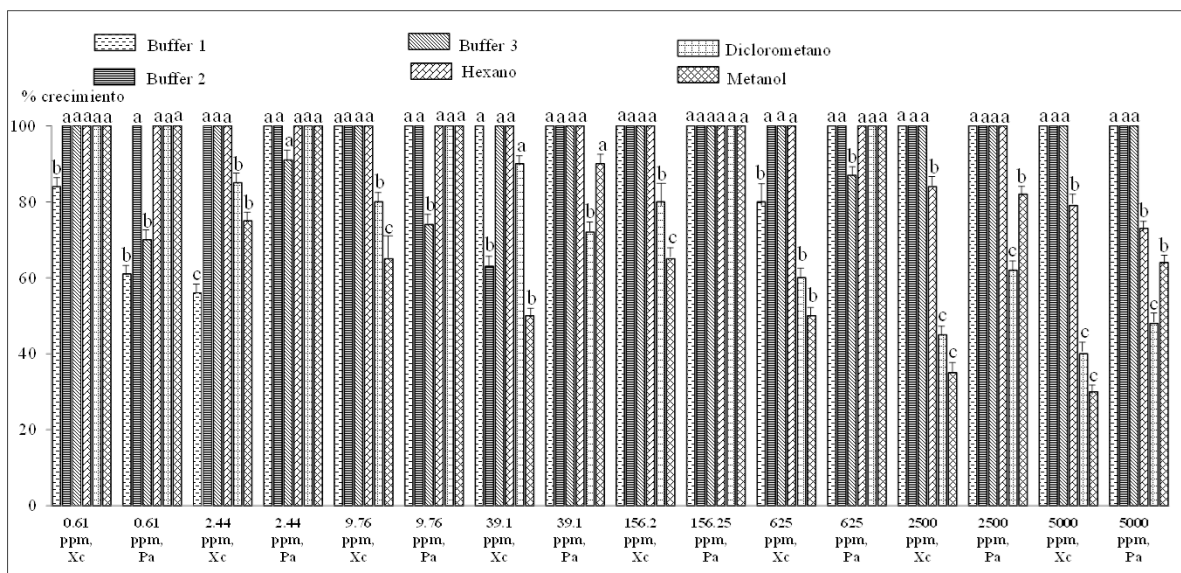


Figura 3. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial *In vitro* de las bacterias *Xantomona campestris* (Xc) y *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), utilizando extractos bufferizados y extractos orgánicos crudos de las hojas de zapote blanco

Figura 4 .

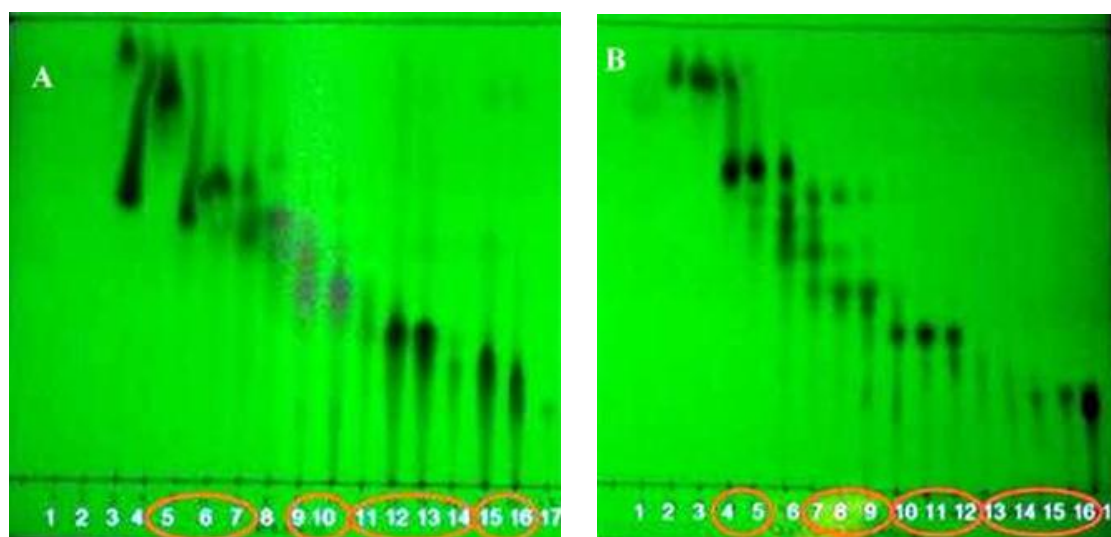


Figura 4. Placa cromatográfica visualizados con luz UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) de las fracciones en A) hexano; B) Diclorometano

Las bacterias presentan una mayor resistencia a la actividad de los extractos crudos. La actividad es específica por tipo de bacteria y extracto crudo.

#### Actividad antifúngica de las fracciones

Se midió la actividad de las fracciones de extractos en diclorometano (el de mayor efecto al probar los extractos crudos) a concentraciones de 100 ppm y 1000 ppm sobre *S. cepivorum* y *F. oxysporum* (Tabla III). Solo 3 de las fracciones expresaron actividad antimicrobial a 1000 ppm.

Tabla III. Porcentaje de crecimiento micelial de *S. cepivorum* y *F. oxysporum* tratadas con las fracciones del extracto en dicloro-metano a 1000 ppm.

No. Fracción	Microorganismo, % Crecimiento diametral	
	<i>S. cepivorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
7	52	74
10	66	75
17	28	60

La fracción más activa fue la fracción 17, el microorganismo más susceptible fue *S. cepivorum* y el más resistente fue *F. oxysporum*.

#### Actividad antibacteriana de las fracciones.

Se determinó la actividad de las fracciones en hexano y diclorometano contra las bacterias en estudio (Tabla IV).

En el 29% (30 de 102) de los tratamientos mostrados en la tabla 4 se aprecia efecto

inhibitorio. El mayor efecto fue a 625 ppm y 2500 ppm. Las fracciones 17, 3 y 4 son las que en un mayor número de ocasiones se oponen al crecimiento bacteriano. La fracción 3 presenta inhibición sobre *X. campestris* tanto en diclorometano como en hexano, pero no tiene efecto sobre *P. aeruginosa*. El caso de mayor inhibición es la fracción 4 a 2500 ppm extraída en hexano sobre *X. Campestris* con 39% de crecimiento.

#### Discusión

Se cuantificó la actividad antimicrobiana de extractos de hoja de *G. ulmifolia*, utilizando sistemas específicos para extraer tanto metabolitos secundarios como péptidos bioactivos con propiedades antimicrobianas. Respecto a los resultados, la actividad antifúngica (figura 2), se inicia a partir de 1000 ppm. A concentraciones inferiores a 1000 ppm, no ocurre ningún efecto, con 100 % crecimiento. La concentración mayor de extractos aplicada, 10000 ppm, fue la de mayor efecto inhibitorio, consiguiendo el valor mayor de toda la prueba (9% C) al aplicar el extracto en diclorometano sobre *S. cepivorum*, mientras que también a esta concentración se aprecia el mejor efecto de los péptidos sobre *Sclerotium cepovirum*, con actividad de los tres sistemas de extracción: Bufer 1 (21% C), Bufer 2 (30% C) y Buffer 3 (22% C). *S. cepovirum* fue más sensible al efecto de los extractos, con represión de su crecimiento a partir de 1000 ppm por los metabolitos secundarios. La inhibición sobre *S. cepivorum* por los extractos de *C. edulis* coincide al reportado, por ejemplo, con aceite esencial de clavo, con el que a 1000 ppm se suprimió su crecimiento, al 100% [20]. De forma contraria *F.*

*oxysporum* (causante de la marchitez del tomate y otros productos agrícolas) exhibió mayor resistencia, ya que solo los extractos en diclorometano a 1000 ppm (72% crecimiento), y a 10000 ppm (58% C) impidieron parcialmente su crecimiento, mientras que por el contrario, los péptidos bioactivos no tuvieron efecto a ninguna concentración. La resistencia de este hongo ha sido registrada en otros estudios y se ha observado que aún los fungicidas tienen poca efectividad en su control, por lo que se han buscado alternativas de control biológico utilizando extractos vegetales [10]. En algunos reportes se describe que se suprimió al 100% el crecimiento de este hongo al aplicar quitosana a dosis altas de 1.5 % (15,000 ppm) [7]; mientras que utilizando aceite de neem (OleoNim 50 CE), obtenido del árbol *Azadirachta indica* A. a 50% de concentración, se inhibió en 51% el crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, en 24 hrs de tratamiento [13].

Asimismo se ha reportado la actividad fungicida de los péptidos defensinas y lectinas [30] y glicoproteínas de 28 kDa (obtenida a partir del tubérculo *Withania somnifera*) contra *Aspergillus flavus* y *Fusarium oxysporum* [16]. El efecto fungicida de los extractos crudos se ha atribuido a la presencia de compuestos lipófilos que al actuar sobre la membrana citoplasmática causan la permeabilización de la misma, lo que afecta el crecimiento de los hongos filamentosos [3]. Un mecanismo similar se propone para los péptidos bioactivos: A bajas concentraciones se absorben paralelamente a la membrana y forman poros o canales transitorios no selectivos, y a medida que se incrementa la concentración, aumenta la permeabilización de la membrana debido a la micelización, que ocasiona la lisis y muerte de las bacterias y hongos [26].

En relación a la actividad antibacteriana, *X. campestris* es el microorganismo más lábil, como se muestra en la Figura 3, ya que la inhibición inicia a 2.44 ppm en diclorometano (85% C) y metanol (75% C). A 2500 ppm, los valores son de 35% C con extractos en metanol, 45% C en diclorometano, incrementando ligeramente este efecto a 5000 ppm, con 30% C (mayor valor) y 40% C, respectivamente. Asimismo, *X. campestris* es suprimido a bajas concentraciones por los péptidos bioactivos: Con Buffer 1 a 0.61 ppm el valor registrado es de 84% C, y a 2.44

ppm es de 54% C. A concentraciones superiores a 2.44 ppm, los péptidos no muestran actividad en la mayoría de los casos, e incluso los extractos en Buffer 3 no afectan el crecimiento de *X. campestris* en ningún caso, mostrando valores de 100% C. Por otra parte, *P. aeruginosa* mostró mayor resistencia, con actividad a partir de 2500 ppm, presentándose el mayor efecto a 5000 ppm con 73% C al probar los extractos en hexano, 48% C del extracto en diclorometano (máxima inhibición sobre *P. aeruginosa*), y 68% C de los extractos en metanol. Los extractos en buffer reprimen el crecimiento de *P. aeruginosa* a concentraciones bajas: El extracto en Buffer 1 a 0.61 ppm tiene 60.9% Crecimiento y el extracto en Buffer 3, permite el 69.6% Crecimiento, mientras que a concentraciones superiores a 0.61 ppm no hay inhibición, o es mínima.

Otros estudios [6], que complementan los resultados aquí presentados, han probado exitosamente la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos crudos en etanol de hoja de *C. edulis* contra diversos microorganismos, como es el caso de las bacterias *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*, y el hongo *Candida albicans*, con valores promisorios al aplicar las pruebas *In vitro*. Existen diversos reportes sobre la actividad biocida de extractos naturales sobre *X. campestris*, entre los cuales se encuentran *Ruta graveolens*, *Jaracanda acutifolia* y *Aloe vera*. Asimismo, *Pseudomonas sp.*, patógena del banano, fue controlada por extracto de cáscara de mamón (*Melicoccus bijugatus*) [11]. Por otro lado, la actividad de las fracciones (tabla 4) es inferior a la actividad de los extractos crudos, lo cual se explicaría por la posible acción sinérgica entre moléculas.

En otros estudios se ha trabajado con extractos a partir de las hojas de *C. edulis* [5,6], fraccionando y purificando los extractos crudos para identificar compuestos tanto en la fase alcohólica como en acetato de etilo y estudiar su actividad antioxidante. Encontraron que los extractos alcohólicos mostraron la mayor actividad atribuida a la presencia de quercetina, 3-O-rutinosido, flavones, cumarinas, umbelliferona, esculetina, imperatorina y xanthoxol, que junto con el resto de metabolitos, mostraron actividad microbicida sobre diversas bacterias y hongos patógenos, y actividad anticoagulante.

Tabla IV. Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones de los extractos en hexano y diclorometano contra *X. campestris* y *P. aeruginosa*

No.	Microorganismo, % Crecimiento diametral											
	Diclorometano, ppm			Hexano, ppm			Diclorometano, ppm			Hexano, ppm		
	156	625	2500	156	625	2500	156	625	2500	156	625	2500
	<i>X. campestris</i>			<i>X. campestris</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
2	100	73	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	67	47	100	100	50	55	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	89	39	100	76	68	100	100	100
5	---	---	---	100	100	100	---	---	---	100	100	87
6	100	100	100	---	---	---	100	80	56	---	--	---
7	100	53	47	---	---	---	100	100	100	---	---	---
8	---	---	---	100	100	100	---	---	---	100	83	70
9	---	---	---	100	100	100	---	---	---	100	78	74
10	100	73	80	---	---	---	100	68	100	---	---	---
11	---	---	---	100	100	100	---	---	---	100	87	83
13	100	100	100	---	---	---	100	100	100	---	---	---
15	---	---	---	72	61	100	---	---	---	87	70	100
17	100	100	53	100	72	50	100	88	56	100	100	100

Desde otra perspectiva, algunos modelos permiten establecer que un árbol de tamaño medio (como es el caso para *C. edulis*) de 26 cm de  $\phi$  tendría una biomasa total de 280 kg, de los cuales aproximadamente 11.46% corresponderían a follaje [12]. Este dato, junto con el rendimiento de extractos y de inhibición de crecimiento aquí presentados, permite estimar por medio de un sencillo balance de masa, que a partir de las hojas de *C. edulis* se obtendría aproximadamente 4.81 kg de extractos, de los cuales 693 g serían en diclorometano, los de mayor actividad, y 2.75 kg de extractos en metanol, que fue el de mayor inhibición vs *X. campestris*. Asimismo, se obtendría 4.52 kg de péptidos bioactivos (buffer 1), que mostraron actividad vs *X. campestris* y *P. aeruginosa* a bajas concentraciones. Los extractos podrían ser considerados para el control de fitopatógenos en frutos que causan pérdidas anuales millonarias.

### Conclusiones

Los extractos orgánicos (metabolitos secundarios) inhibieron mejor el crecimiento de los microorganismos estudiados, que los extractos bufferizados (péptidos), aunque estos últimos fueron los de mayor rendimiento durante la extracción, y actúan a menor concentración sobre las bacterias. Los obtenidos con diclorometano fueron los de mayor actividad, mientras que las bacterias mostraron mayor resistencia que los hongos. Los microorganismos *F. oxysporum* y *P. aeruginosa* fueron los más resistentes a la acción

de los extractos. Los resultados encontrados indican que las hojas pudieran ser usadas para el control de fitopatógenos. El uso de la biomasa foliar implica una disposición mayor que la que ofrece el fruto, y causa mucho menos daño al árbol que la colecta de corteza, por lo que el uso de esta parte aérea promovería su conservación, además de contener una considerable cantidad de extractos con actividad biológica.

### Bibliografía

1. Abdel-Fattah GM, Shabana YM, Ismail AE, Rasha Y. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris Oryzae*. *Mycopathologia*. 2007; 164:81–89.
2. Alltech Associates, Inc. 1998. TLC plate preparation and adsorbent powders. Data sheet D16030. pp.1-2.
3. Amer JMS, Masud-UI-Haq Khan M, Ashraf M. Screening of some medicinal plants for isolation of antifungal proteins and peptides. *Pak J Bot*. 2007; 39(1):211-221.
4. ASTM D5907–13. Standard Test Methods for Filterable Matter (Total Dissolved Solids) and Nonfilterable Matter (Total Suspended Solids) In: Water, ASTM International, West Conshohocken, PA. 2013. [www.astm.org](http://www.astm.org).
5. Awaad AS, El-Sayed NH, Maitland DJ, Mabry TJ. Phenolic antioxidants from *Casimiroa edulis* leaves. *Pharm Biol*. 2006; 44 (4):258–262.
6. Awaad AS, Al-Jaber NA, Soliman GA, Al-Outhman MR, Zain ME, Moses JE, El-Meligy



- R M. New biological activities of *Casimiroa edulis* leaf extract and isolated compound, *Phytother Res.* 2012; 26:452-457.
7. Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2004; 22(2):178-186.
  8. Bollag DM, Edelman SJ. *Protein methods*, Wiley-Liss. New York.1991.
  9. Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *AnalBiochem* 1976; 72(1-2): 248-254.
  10. Celis Á, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca LE. Plant extracts used as biocontrol with emphasis on Piperaceae family. A review. *Agronomía Colombiana* 2008; 26(1):97-106.
  11. Chirinos J, Olivares B, Guevara E. Efectividad biológica de extractos vegetales en el control in vitro de la bacteria fitopatogena *Xanthomona*. *Multiciencias.* 2013; 13(2):115 – 121.
  12. Carrillo Anzúres F, Acosta Mireles M, Flores Ayala E, Juárez Bravo JE, Bonilla Padilla E. Estimación de biomasa y carbono en dos especies arbóreas en La Sierra Nevada, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2014; 5(5):779-793.
  13. Cruz Triana A, Rivero González D. Efecto del OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo in vitro de hongos fitopatogénos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). *Fitosanidad.* 2009; 13(4):271-276
  14. Domínguez XA. *Métodos de Investigación Fotoquímica.* Limusa.México. 1973. 281 p.
  15. Fricker LD, Lim J, Pan H, Che F-Y. Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews.* 2006;25(2):327-344.
  16. Girish K, Machiah KD, Ushanandini S, Harish Kumar K, Nagaraju S, Govindappa M. Antimicrobial properties of a non-toxic glycoprotein (WSG) from *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Journal of Basic Microbiology.* 2006; 46(5), 365-374.
  17. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. *J App Microbiol.* 1999; 86:985-990.
  18. Martínez J, Sulbarán de Ferree B, Ojeda de Rodríguez G. Antibacterial activity of mandarin essential oil. *Rev Fac Agron.* 2003; 20:502-512.
  19. McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc.* 1907; 49:1176-1178.
  20. Montes-Belmont R, Prados-Ligero AM. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. *Plant Pathology Journal.* 2006; 5(3):373-377.
  21. Mueller HJ, Hinton J. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proc Soc Expt Biol Med.* 1941; 48:330-333.
  22. Olivares SE. Paquete de diseños experimentales FAUANL. version 1.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. In Paquete de diseños experimentales FAUANL. version 1.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. 1989.
  23. Plascencia-Jatomea M, Roberto Olayo GV, Castillo-Ortega MM, Shira K. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*, *Macromol Biosci.* 2003; 3: 582-586.
  24. Regente MC, Oliva CR, Feldman M, Castagnaroy A, De la Canal L. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytologia Plantarum.* 1997; 100:178-182.
  25. Romero ML, Escobar LI, Lozoya X, Enríquez RG. High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. *J Chromatogr.* 1983; 281: 245-251.
  26. Salas CE, Badillo-Corona JA, Ramirez-Sotelo G, Oliver-Salvador C. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *BioMed Research International.* 2015;2015:102129; doi:10.1155/2015/102129.
  27. Shahidi, F., & Zhong, Y. 2008. Bioactive Peptides. *J AOAC International*, 91(4):914-31.
  28. Terra FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Leuven FV, Rees SB, Vanderleyden J, Cammuey ABP, Broekaert WF. Analysis of two novel classes of plants antifungal proteins from Radish (*Raphanus sativus*) seeds. *J Biol Chem.* 1992; 265:15301-15309.
  29. Vay CA, Almuzara MN, Rodríguez CH, Pugliese ML, Lorenzo Barba F, Mattera JC, Famiglietti AMR. Actividad "in vitro" de diferentes antibacterianos sobre bacilos gram negativos no fermentadores, excluidos *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. *Rev argent microbiol.* 2005; 37:34-45.
  30. Yan, J, Yuan S-S, Jiang L-L, Ye X-J, Ng TB, Wu Z-J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 2015; 99(12):4961-4981.