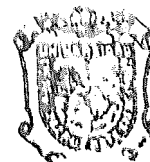




UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Estudio Químico del Hongo *Sclerotium cepivorum* Berk



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD VERACRUZANA
BIBLIOTECA

Tesis que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS

Presenta
Q. C. Ana Rosa Castillo Guerrero

Asesor
Dr. Ángel Rafael Trigos Lándá

Xalapa, Ver.

2004 Diciembre

AGRADECIMIENTOS

A Dios, nuestro señor, por haberme puesto en este camino el cual he recorrido con ahínco y tesón, gracias por todo lo que me has dado y por el logro alcanzado.

A mí amado esposo Arturo Rafael, por todo tu apoyo, infinita paciencia y por tu amor gracias.

A mis adoradas hijas Pamela y Elizabeth, por todo el tiempo robado para la realización de este proyecto mío, las amo.

A mis amados padres Ana María y Daniel, a mi querida suegra María Teresa, a mis hermanos Jesús, Daniel y Ma. del Carmen gracias por todo su apoyo.

A todos mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. de Jesús Yáñez Morales, encargada del cepario del Colegio de Posgraduados de Montecillos, por haber donado una de las cepas para este estudio.

Al M. C. Alejandro Salinas Castro, encargado del departamento de fitopatología de LATEX, Por haber donado otra de las cepas y por toda la ayuda prestada para la realización de esta investigación.

Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa por todas sus atenciones.

En especial quiero agradecer a mis amigos Olaya P., Olivia y René, ya que sin su ayuda y recomendaciones no hubiese llegado a buen término.

RECONOCIMIENTO

A mi asesor y director de tesis, Dr. Ángel Rafael Trigos Lánda, ya que su apoyo y sabias propuestas sirvieron de guía para la realización de este trabajo y por ende llegado a finalizar uno de mis grandes anhelos.

Gracias Dr. Trigos.

RECONOCIMIENTO

A mi Honorable Jurado, ya que sus indicaciones y consejos ha dado vida a esta investigación.

Dr. Jesús Samuel Cruz Sánchez
Profesor-Investigador. Unidad S. A. R. A
Universidad Veracruzana

Dr. Oscar García Barradas
Profesor-Investigador Unidad. S. A. R. A
Universidad Veracruzana

M. en C. Patricia G. Mendoza García
Profesor-Investigador
Instituto Tecnológico de Veracruz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE REFERENCIA	5
2.1 ANTECEDENTES.....	5
2.2 DESCRIPCIÓN DEL <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> BERK	9
2.3 TAXONOMÍA.....	9
2.4 METABOLISMO DE LOS HONGOS	10
2.4.1 Metabolismo secundario.....	11
2.5. METABOLITOS DEL GÉNERO <i>SCLEROTIUM</i>	18
2.6. IMPORTANCIA DEL <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> BERK.....	20
3. PLANTEAMIENTO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN....	22
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
4.3 HIPÓTESIS	24
5. PLAN DE TRABAJO.....	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 MATERIAL	28
6.2 MÉTODOS	30
6.2.1 Descripción general del trabajo experimental.....	30
6.2.1.1 Aislamiento de la cepa	30
6.2.2 Elección de la cepa	31
6.2.3 Elección de las condiciones de cultivo	31
6.2.3.1 Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	31
6.2.3.2 Determinación del medio de cultivo	32
6.2.4 Cultivo del hongo.....	33
6.2.5 Preparación del medio.....	33
6.2.6 Extracción de metabolitos	34
6.2.6.1 Extracción de compuestos.....	34
6.2.6.2 Purificación de compuestos.....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1 SELECCIÓN DE LA CEPA A ESTUDIO	39
7.2 ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO	39
7.2.1 Temperatura.....	39
7.2.2 Medio de cultivo	41
7.3 CURVA DE CRECIMIENTO DEL <i>SCLEROTIUM CEPIVORUM</i> BERK	43
7.4 CULTIVO DEL <i>S. CEPIVORUM</i> BERK	43
7.5 MATERIAL FÚNGICO.....	44
7.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS.....	44

Compuesto 1	44
Compuesto 2	48
Compuesto 3	53
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
9. APÉNDICE	66
9. 1 MEDIOS USADOS.....	66
9. 1. 1 Medios sólidos.....	66
9. 1. 1. 3 Medio Czapec-Dox.	67
9. 1. 1. 4 Medio agar cebolla.....	68
9. 1. 2 Medios líquidos	68
9. 1. 2. 1 Infusión papa dextrosa.....	68
9. 1. 2. 2 Infusión de cebolla.....	69
9. 1. 3 Colorante Azul de Lactofenol	70
10. COMPOSICIÓN DE LA CEBOLLA.....	72
11. BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bulbo de cebolla.....	8
Figura 2. Bulbo de ajo.....	8
Figuras 3 y 4. Formas esclerociales de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk, observado en estereoscopio y microscopio de barrido.....	9
Figura 5. Penicilina G.....	12
Figura 6. Penicilina N.....	12
Figura 7. Cefalosporina C.....	13
Figura 8. Griseofulvina.....	13
Figura 9. Eniatina B.....	14
Figura 10. Estructura básica del ergot.....	15
Figura 11. Fusicocina A.....	15
Figura 12. Ergosterol.....	16
Figura 13. Aflatoxina B1.....	17
Figura 14. Aflatoxina G1.....	17
Figura 15. Melein-(-)-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina.....	18
Figura 16. Ocratoxina A.....	18
Figura 17. Tricodermina.....	18
Figura 18. Estructura del β -D glucopiranosido.....	19
Figura 19. Ácido (2S, 3R)-2-amino-3-hidroxipenten-4-inoico.....	20
Figura 20. Evaporador de efecto simple a presión reducida.....	34
Figura 21. Extractor de flujo continuo para disolventes más densos que agua.....	35
Figura 22. Diferentes tipos de crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> en los distintos medios de cultivo.....	41
Figura 23. Estructura del β -sitosterol.....	43
Figura 24. Estructura del $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol (peróxido de ergosterol).....	47
Figura 25. Estructuras de la α y β glucopiranososa.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de los monitoreos de temperaturas realizados por triplicado en medio PDA.....	39
Tabla 2. Diámetro de crecimiento radial en centímetros del <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en 3 diferentes medios de cultivo.....	41
Tabla 3. Datos de RMN ^1H para el β -sitosterol.....	44
Tabla 4. Principales datos espectroscópicos en RNM para peróxido de ergosterol.....	48
Tabla 5. Principales señales de RMN del ^{13}C para glucopiranososa α y β	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Crecimiento micelial del *Sclerotium cepivorum* Berk a distintas temperaturas en medio PDA..... 42
- Gráfico 2. Curva de crecimiento de biomasa en medio de agar-cebolla a temperatura entre 17-22° C del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.....44

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio químico del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, el cual es un fitopatógeno que afecta frecuentemente ajos y cebollas. A partir de una cepa, aislada de cebollas infestadas, se realizó el cultivo usando un medio de infusión de cebolla, el cual se incubó durante 24 días a una temperatura entre 17-23° C. Los extractos obtenidos con cloroformo y metanol, a partir de este cultivo fueron purificados por cromatografía en columna, obteniéndose β -sitosterol y peróxido de ergosterol, así como α y β -glucopiranosas. Estos compuestos fueron identificados por medio de técnicas de RMN ^1H y ^{13}C . El β -sitosterol ha sido reportado como útil en el tratamiento de hipercolesterolemia e hipertrofias prostáticas, mientras que al peróxido de ergosterol se le han atribuido propiedades antioxidantes y antitumorales.

Palabras clave: *Sclerotium*, esteroides y glucopiranosas.

SUMMARY

In this work, a chemical study the *Sclerotium cepivorum* Berk was carried out. This fungus is phytopathogen that frequently affects garlics and onions. Starting from a stock, it was isolated from infested onions and cultivated by means of onion infusion. This was incubated during 24 days at a temperature between 17-23° C. The extracts obtained by means chloroform and methanol, were purified by chromatography in column, obtaining β -sitosterol and ergosterol peroxide, as well as α and β -D-glucopyranose. These compounds were identified by means of technical of RMN ^1H and ^{13}C . The β -sitosterol has been reported as useful in the hypercholesterolecic treatment and prostatic hypertrophy, while the ergosterol peroxide has been attributed antioxidants and antitumorals properties.

Keys words: *Sclerotium*, sterols and glucopyranose.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos forman un amplio grupo de organismos que se clasifican dentro del reino Fungi y se caracterizan por ser eucariontes, multinucleados, con estructuras somáticas filamentosas, paredes celulares de quitina, celulosa o ambas, presentan nutrición por absorción, con diferenciación de tejidos limitada o ausente, la mayoría se reproduce por medio de esporas y con ciclos reproductivos sexuales o asexuales (Alexopoulos, 1982; Guzmán, 1997).

Los científicos han descrito aproximadamente setecientas mil especies de seres vivos utilizando una gran variedad de métodos, hipótesis o argumentos y se calcula que faltan por describir de cinco a quince veces este número. En promedio, en México encontramos 10 a 20% de las especies que hay descritas en cada grupo (Dirzo, 1996).

Especialistas en nutrición humana, ciencia y tecnología de los alimentos, investigan activamente el área de los alimentos funcionales y se encuentran formulando nuevos productos que permitan un futuro más saludable para la humanidad. Esto implica el estudio de componentes que se encuentren en el alimento o sean adicionados por algún organismo que viva en forma parásita, saprófita o simbiote (Alexopoulos, 1982; Aldrich and Baker, 1970).

Los hongos se han estudiado desde hace mucho tiempo y seguirán siendo estudiados debido a que son una fuente nutricional ya que poseen un alto contenido proteico, vitaminas, minerales, etcétera; además, otros son productores de insecticidas, fitohormonas y antibióticos. Por otro lado, también son causantes de múltiples enfermedades y problemas debido probablemente entre otras cosas a las toxinas que producen (Alexopoulos, 1982; Dirzo, 1996).

Las plantas u organismos que infestan los hongos producen agentes químicos, los cuales se encuentran en concentraciones lo suficientemente altas como para inhibir el desarrollo de otros hongos o bacterias. Esto trae como consecuencia daño al vegetal lo que conduce a la disminución en la calidad del producto y por consiguiente a graves pérdidas económicas. (Jiménez-Díaz, 2001).

Jiménez (1997, 1998) indicó que las pérdidas resultan de la acción de las enfermedades según su naturaleza y etiología, al reducir la densidad final de plantas establecidas, la absorción y translocación de agua y nutrientes, la permeabilidad de radiación solar así como la tasa de asimilación y redistribución de fotosíntesis. Como consecuencia de dichas acciones, las enfermedades, junto con las infestaciones de malas hierbas y de agentes fitófagos (plagas), continúan siendo un factor significativo en la reducción del rendimiento alcanzable de los cultivos.

Existe un grupo de hongos fitopatógenos del género *Sclerotium* que afectan diversos cultivos agrícolas. Entre esta amplia variedad de estirpes fúngicas, tenemos al *Sclerotium glucanicum*, *S. rolfsii*, *S. hydrophilum* y *S. cepivorum*.

El *Sclerotium rolfsii* es patógeno de más de 180 especies de plantas y posee una distribución mundial. Atacando diversas fases del desarrollo de sus hospederos, desde la semilla hasta los productos agrícolas a nivel post cosecha. De igual forma tenemos al *S. hydrophilum*, parásito débil con características de saprofito facultativo, de aparición frecuente en plantas acuáticas y semiacuáticas de las regiones templadas y tropicales, y al *S. cepivorum* Berk que ataca ajos y cebollas es causal de la enfermedad llamada pudrición blanca, en México se ha reportado que este hongo

causa pérdidas de las cosechas entre un 20-40% y se encuentran infestadas la zona central el así, provocando así en un momento dado por la falta de un control fitosanitario la ingesta involuntaria de estos productos infestados con esta especie (Aldrich and Baker, 1970; González y Renand, 1968; Pérez *et al.*, 1994; Webster y Gunnell, 1992).

No obstante a lo anterior no se encuentran reportes en la literatura sobre el tipo de sustancias que *Sclerotium cepivorum* Berk produce.

La abundancia de hongos en nuestro país y el poco conocimiento químico que de estos tenemos, ha motivado a nuestro grupo de investigación a la búsqueda de nuevos metabolitos a partir de los hongos fitopatógenos, ya que su conocimiento puede dar información sobre los posibles beneficios añadidos ó efectos tóxicos de la presencia de éste hongo en los alimentos (Trigos y Zambrano, 1992; Trigos y Martínez-Carrera, 1994; Trigos, 1999).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo es: el estudio químico del cultivo en infusión de cebolla del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.

CAPÍTULO II

MARCO DE REFERENCIA

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Antecedentes

Los organismos pertenecientes al reino Fungi son seres microscópicos o macroscópicos (micromicetos y macromicetos) que pueden ser saprofitos, parásitos y simbioses; viven sobre diversos materiales orgánicos, a los cuales descomponen para así alimentarse. Estos organismos están generalmente formados por masas algodonosas, de las cuales brotan pequeños o grandes botones, que son las estructuras aéreas que producirán esporas, a través de las cuales se reproducen (Guzmán, 1994; Hawksworth, 1997).

Los hongos son organismos con núcleo, algunos portadores de esporas, aclorofílicos, que por lo general se reproducen sexual o asexualmente, en cuyas estructuras somáticas, por lo común filamentosas y ramificadas, están típicamente rodeadas por una pared celular que contiene hemicelulosa, quitina o ambas, y absorben su alimento por digestión enzimática externa (Alexopoulos, 1982).

Estos seres, proporcionan componentes vitales en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, ya que desempeñan diversas funciones de tipo ecológico y fisiológico; además, pueden ser mediadores e integradores que contribuyen al desarrollo de las poblaciones vegetales, particularmente las especies arbóreas. Entre sus principales funciones destacan las siguientes: intervienen en los ciclos y transferencia de nutrientes degradando materia orgánica, al participar de manera activa en la regulación de la tasa fotosintética; a través del crecimiento de sus hifas modifican la permeabilidad y estructura del suelo; estos organismos representan una fuente de alimento para algunos vertebrados (incluyendo mamíferos) e invertebrados, son hábitat de invertebrados, algas y otros hongos; participan en la creación y alteración de nichos, sobre todo para invertebrados; establecen asociaciones mutualistas con plantas, termitas, hormigas y con algunas especies de algas (Guzmán, 1994; Hawksworth, 1997).

Con respecto a la biodiversidad fúngica, Hawksworth (1997) estima que en nuestro planeta existen 1.5 millones de especies, para México las estimaciones indican la cifra de 200 mil especies, de las cuales se ha registrado sólo el 3.5 por ciento.

De la amplia dispersión de los hongos en todos los estratos bióticos e inertes se desprende su fácil y frecuente aparición como contaminantes en productos alimentarios, ya que éstos, están constituidos por sustancias orgánicas e inorgánicas más o menos complejas, son excelentes medios para la sustentación y reproducción de un gran número de especies fúngicas. Además, como sucede con las bacterias diversos factores (pH, humedad, oxígeno, temperatura, concentración y tipo de sustrato, etc.) influyen en su proliferación sobre los alimentos (Alexopoulos, 1982; Pascual-Anderson *et al.*, 2001).

Los hongos, tienen la capacidad de producir una gran variedad de compuestos útiles tales como antibióticos, enzimas, fármacos, vitaminas o bien micotoxinas a las que el hombre tiene susceptibilidad, así mismo estos organismos parásitan animales y vegetales de importancia económica (Pascual-Anderson *et al.*, 2001).

Pascual-Anderson *et al.*, (2001) indicaron que existe un gran número de micotoxinas conocidas las cuales son de interés como contaminantes de diversos alimentos, entre estas tenemos a las aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, patulina, searalenona, tricotecenos, tremórgenios, ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, entre otras. La determinación analítica se lleva a cabo mediante métodos químicos especiales entre las que se encuentran: cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, métodos espectrofotométricos, resonancia magnética nuclear y por inmunoensayo. Sin embargo, el número de hongos que parasitan alimentos y los contaminan es muy grande y aun se desconocen muchas micotoxinas producidas por estos organismos.

En este sentido, estudios en Venezuela localizaron 17 géneros de hongos que infectan al ajo, puerros y cebolla, unos habitando solo la parte superficial del bulbo y otros internamente. Los agentes causales de enfermedades en el cultivo de estos

vegetales en el campo, son: *Stemphylium sp.*, *Fusarium sp.*, *Pyrenochaetae terrestri*, *Alternaria porri*, *Sclerotium cepivorum*, y en el ámbito de almacenamiento se han encontrado *Aspergillium niger*, *Penicillium sp.*, y *Clodosporium sp.* *Ditylenchus dipsaci*, agente causal de la hinchazón del ajo o cachera blanca y *Fusarium sp.*, causante de la pudrición seca de los bulbos (Martínez, 1993).

Un género de interés es el *Sclerotium* el cual ataca frecuentemente una gran variedad de leguminosas, crucíferas, zanahorias, apio, maíz, berenjenas, lechugas, papas, cacahuates, tabaco, cebolla, ajos y puerros, produciendo el ahogamiento de las plántulas, la cancrrosis del talo, tizón de la corona y la pudrición de la raíz, corona, bulbo, tubérculos y frutos (Ramos, 1988; Herrera, 1990).

Dentro de ese grupo se encuentra el *Sclerotium cepivorum* Berk (Berkeley F., Inglaterra 1841), que es causante de la pudrición blanca en ajos, cebollas y puerros; y del cual no se tiene antecedentes químicos hasta la fecha, sin embargo cuenta con un sinnúmero de estudios para su control. Recientemente, se ha encontrado infestando grandes zonas de nuestro país donde se cultivan estos alimentos como son los Estados de Guanajuato, Aguascalientes, Querétaro, Zacatecas, Tlaxcala y Morelos, entre otros (Pérez et al., 1994, 1998, 2000; SEMARNAT. <http://www.semarnat.gob.mx> <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/nom/noms/Doc33/>)

Actualmente este hongo ocasiona graves daños y pérdidas en todo el mundo (podredumbre). Los daños característicos del ataque de este hongo son el amarillamiento de plantas y la caída de las hojas. También se observa en las raíces, bulbo y la base de las hojas micelio blanco, lo que dio origen al nombre de pudrición blanca (Figura 1); así mismo, se pueden notar escamas de color negro (Figura 2), lo cual se debe a que el micelio de inmediato tiende a formar los esclerocios, pequeños, esféricos de color negro. La pudrición del bulbo es suave y acuosa y con el tiempo sobreviene la deshidratación y muerte. Su disseminación depende del agua de riego y de plántulas que se mueven de un lugar a otro, hasta donde se sabe no hay reproducción sexual (Domínguez, 1993; Latorre, 1999 y Turner, 1971).

Este patógeno ataca directamente a los tejidos. Sin embargo, produce una masa algodonosa abundante de micelio que mata y desintegra a dicho tejido al secretar ácido oxálico, así como también enzimas proteolíticas, celulolíticas y otras enzimas antes de que penetre en el hospedante. Puede permanecer en el suelo por largo tiempo (3 a 8 años). La temperatura óptima para su desarrollo se encuentra entre los 18° C y 20° C, aunque puede comenzar la reproducción a partir de los 2° C. El desarrollo decrece al aumentar la temperatura sobre los 20° C (El cultivo de la cebolla, <http://www.nortecastilla.es/canalagro/>).



Figura 1. Bulbo del cebolla, afectado por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.

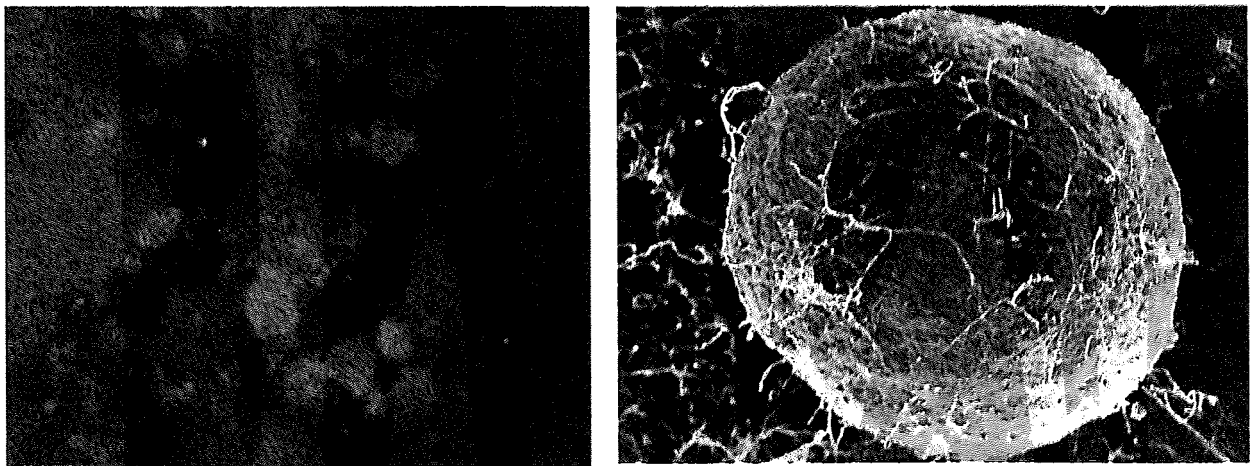


Figura 2. Bulbo del ajo, afectado por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk

Otros factores que intervienen son la edad del cultivo en que se realice la infestación, la densidad del inóculo en el suelo, condiciones climáticas prevalentes y el genotipo de la planta. Los daños pueden producirse inmediatamente después del trasplante, dificultan la germinación, las hojas adquieren color amarillento que puede comenzar por la unión con el tallo, podredumbre blanca interior de las plantas afectadas, las plantas afectadas carecen casi por completo de raíces, teniendo presente las condiciones para su desarrollo y, los ataques más graves suelen presentarse al final del ciclo vegetativo. (El cultivo de la cebolla, <http://www.nortecastilla.es/canalagro/>; Pérez *et al.*, 1994)

2. 2 Descripción del *Sclerotium cepivorum* Berk

La organización celular del hongo y las estructuras esclerósales del *Sclerotium cepivorum* Berk, pueden observarse por microscopio electrónico de barrido y de transmisión, encontrándose agregaciones de hifas, que inicialmente se engruesan e irregularizan la trayectoria de sus talos y posteriormente se diferencian para constituir la corteza y la médula. La porción más externa de los esclerocios se apreció recubierta por un material denso en electrones, de probable naturaleza glicoprotéica (Figuras 3 y 4). Las células corticales mostraron en su interior grandes vacuolas vacías, que generalmente aparecieron rodeadas por partículas de elevada densidad. Las células hifales tienen un citoplasma denso y provisto de abundantes ribosomas, lisosomas y membranas correspondientes a aparato de Golgi y retículo endocitoplásmico liso y rugoso. Ocasionalmente, varios núcleos fueron observados atravesando simultáneamente el mismo poro septal, sin presentar alteración en la envoltura nuclear. En las proximidades del poro septal, que está constituido por un material denso en electrones con un orificio central, se visualizaron membranas de retículo endocitoplásmico liso y rugoso, mitocondrias, polirribosomas y los cuerpos de Woronin (Cedeño y Palacios, 1992; Leyva, *et al.* 1999).



Figuras 3 y 4. Formas esclerósales del *Sclerotium cepivorum* Berk, observadas en estereoscopio y microscopio electrónico de barrido.

2. 3 Taxonomía (Alexopoulos y Mims. 1985; Frisvad et al., 1995)

REINO: Fungi (hongos)

DIVISIÓN: *Eumycota*

SUBDIVISIÓN: *Deuteromycotina* (hongos imperfectos)

CLASE: *Agonomycetes*

ORDEN: *Agonomycetales*

FAMILIA: *Sclerotiacea*

GÉNERO: *Sclerotium*

ESPECIE: *cepivorum* Berk

2. 4 Metabolismo de los hongos

El metabolismo se puede definir como un mecanismo complejo de reacciones bioquímicas, catalizadas y reguladas por enzimas. Estas reacciones se organizan en secuencias enzimáticas denominadas vías metabólicas que comprenden el anabolismo y el catabolismo.

Los hongos son incapaces de sintetizar su propio alimento y cualquier sustancia puede ser considerada como tal, la cual es usada como fuente de energía, crecimiento o para el desarrollo de sus propios procesos metabólicos. La formación y metabolismo de los ácidos nucleicos, la mayoría de los carbohidratos, aminoácidos, proteínas y ciertos ácidos carboxílicos son en principio similares en todos los organismos. Las reacciones vitales involucradas en estos procesos pueden clasificarse como reacciones metabólicas primarias, las cuales involucran procesos metabólicos básicos para la sobrevivencia del organismo; sin embargo, también existe un gran número de reacciones las cuales no son vitales, pero de igual importancia llamadas reacciones

metabólicas secundarias y los productos formados a partir de ellos se les denomina metabolitos secundario (Burnett ,1976; Lucker, 1972).

Por otro lado los hongos necesitan de una fuente de carbono, esta puede provenir casi de cualquier compuesto orgánico el cual pueda ser degradado por las enzimas que producen; la incapacidad para utilizar un compuesto de carbono puede reflejarse en la incapacidad de absorción del compuesto debido a factores genéticos o ambientales. Diferentes especies pueden variar su capacidad para utilizar cierta clase de compuestos de carbono o usar los mismos compuestos por rutas metabólicas distintas.

También necesitan de fuentes de nitrógeno, fósforo, azufre y pequeñas cantidades de minerales, para la formación de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y vitaminas; la cual puede ser tomada de compuestos inorgánicos y sales minerales. Algunos hongos necesitan para su crecimiento y desarrollo adicionalmente de vitaminas (tiamina y biotina) y de factores de crecimiento (Burnett, 1976; Isaac, 1992).

2. 4. 1 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios son productos de diversas rutas metabólicas, que no son necesariamente vitales y al parecer no tienen una utilidad para el hongo; no están involucrados en la economía del organismo, ni son materiales de almacenamiento y muchos son intermediarios de rutas metabólicas primarias; estos compuestos difieren entre especies por lo que puede decirse que cada especie de organismo posee una identidad química individual y están caracterizados por estructuras complejas las cuales pueden provenir de la unión de moléculas como acetil CoA, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, entre otros (Decon, 1988; Mann, 1987; Horborne, 1982).

Los hongos producen una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas estructuras y acción biológica, algunos de estos metabolitos son de gran utilidad como son los antibióticos, antivirales, fungicidas, también encontramos vitaminas, aminoácidos y, además pueden producir sustancias tóxicas.

- Cefalosporinas.

De hongos como el *Acremoium strictum* (*Cefalosporium acremonium*) se aisló (Figura 7) la cefalosporina C, (Muntañola, 1999; Turner, 1971).

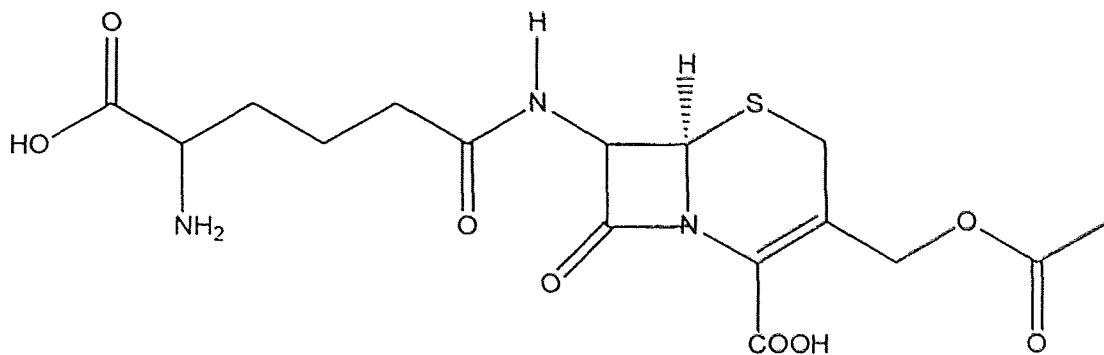


Figura 7. Cefalosporina C.

- Fungicidas.

La griseofulvina, es un fungicida tricíclico que se obtiene principalmente del género *Penicillium* (Figura 8), *P. griseofulvum*, (Muntañola, 1999; Turner, 1971; <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/images/griseofulvina.gif>)

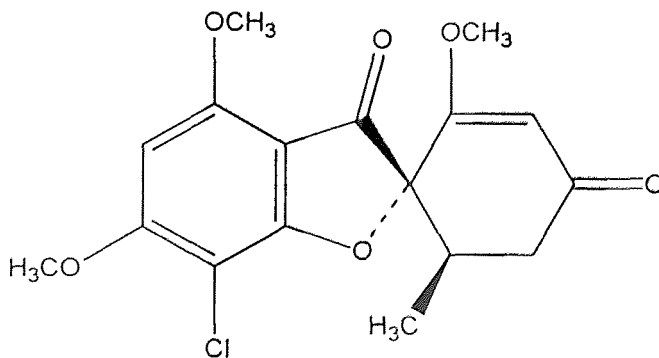


Figura 8. Griseofulvina.

- Antivirales.

Se han aislado del género *Fusarium* tres depsipéptidos conocidos como eniatina A, B, y C los cuales presentan actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Además la eniatina B (Figura 9), se está probando ya que presenta actividad anti-VIH (Plattner, 1988).

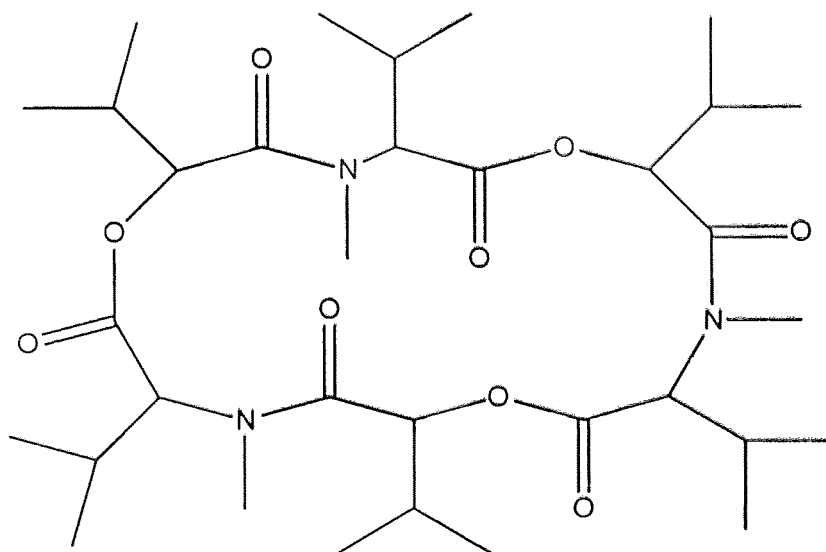


Figura 9. Eniatina B.

- Vasodilatadores

Existen sustancias como el Ergot (Figura 10), el cual es un alcaloide vasodilatador y se obtiene del *Cavisepsis purpurea* (Craig, 1982; Nogrady, 1988).

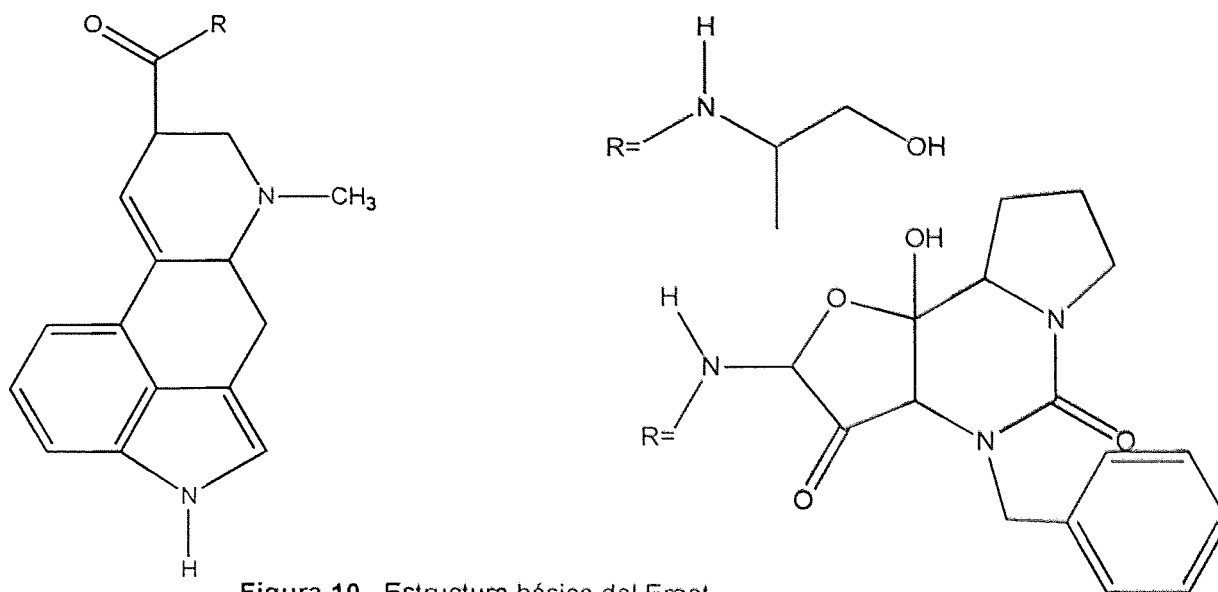


Figura 10. Estructura básica del Ergot
http://www.vetpharm.unizh.ch/giftdb/pflanzen/0021_vel.htm

- Reguladores de crecimiento en plantas.

Algunos compuestos obtenidos a partir del cultivo de *Fusicoccum amygdalis*, pueden ser utilizados como reguladores del crecimiento en plantas, así encontramos a las Fusicoccinas como la Fusicoccianina A (Figura 11), (Bushell, 1989; Donaire, 1999).

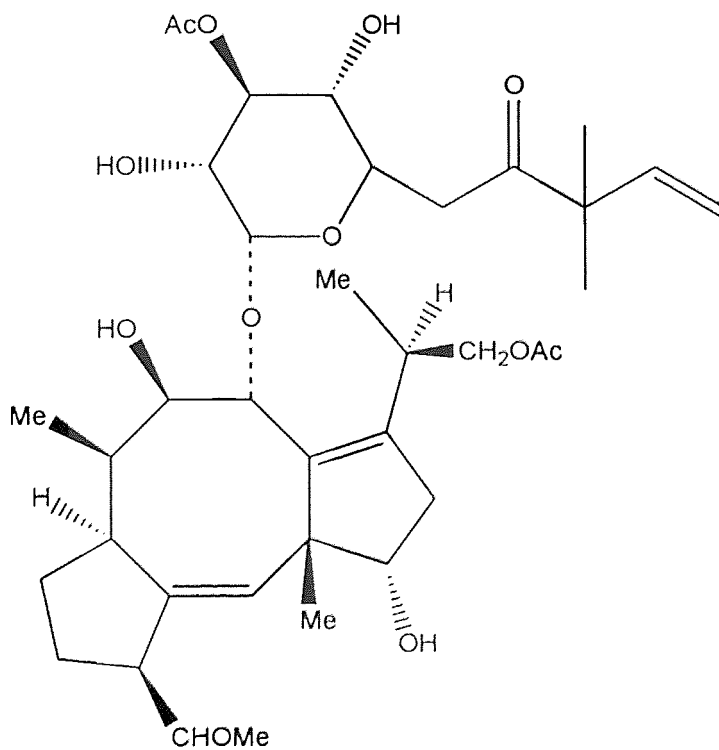


Figura 11. Fusicoccianina A.

- Esteroles

El principal esterol presente en los hongos es el ergosterol (Figura 12), el cual tiene un sinnúmero de funciones celulares, además de ser precursor de la vitamina D₂, se puede obtener del cultivo de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y de *Pleurotus ostreatus* entre otros hongos (Trigos y Martínez-Cabrera, 1994).

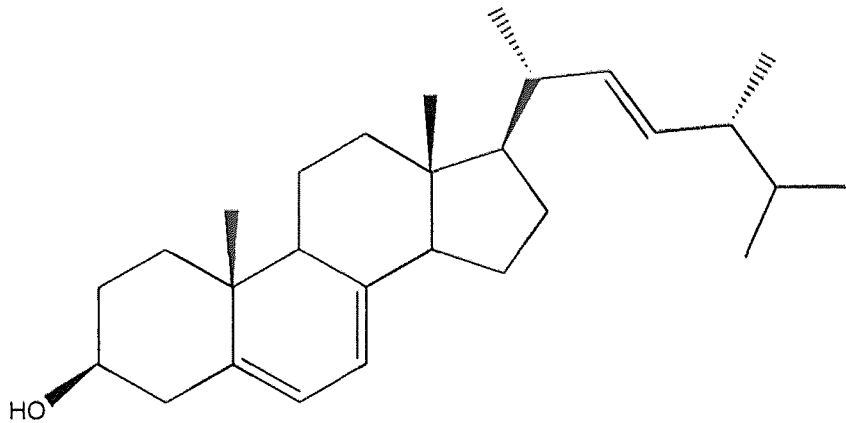


Figura 12. Ergosterol.

- Micotoxinas:

- Entre las toxinas producidas por hongos encontramos a las aflatoxinas, así encontramos a la aflatoxina B1 (Figura 13), producida por *Aspergillus flavus* Link y *A. parasiticus* Speare; la aflatoxina G1 (Figura 14), producida por *A. flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus* (Keeler, 1983; Cole et al., 2003).

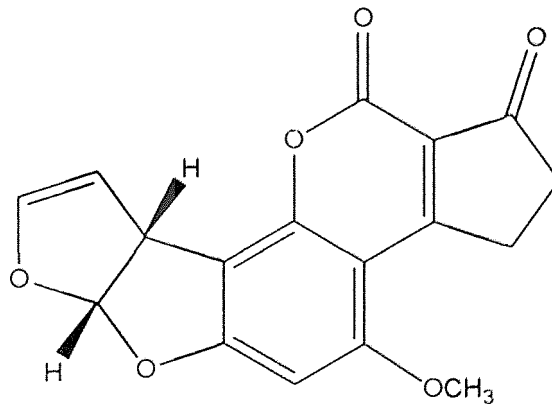


Figura 13. Aflatoxina B1.

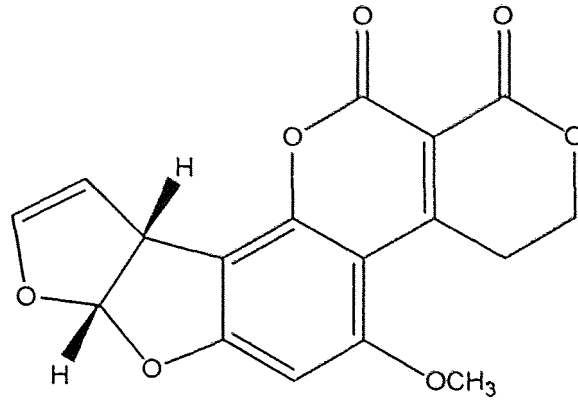


Figura 14. Aflatoxina G 1.

- o Las ocratoxinas, son toxinas producidas por *Aspergillus melleus* Yakawa y el *A. ochraceus* Wilh como la melein (Figura 15 y 16 respectivamente) y la ocratoxina A producida por el *A. ochraceus* Wilh, *A. sulfureus* y el *A. melleus* (Cole et al., 2003).

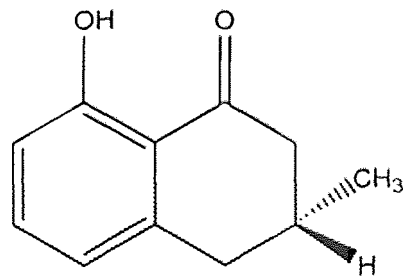


Figura 15. Melein (-) 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina.

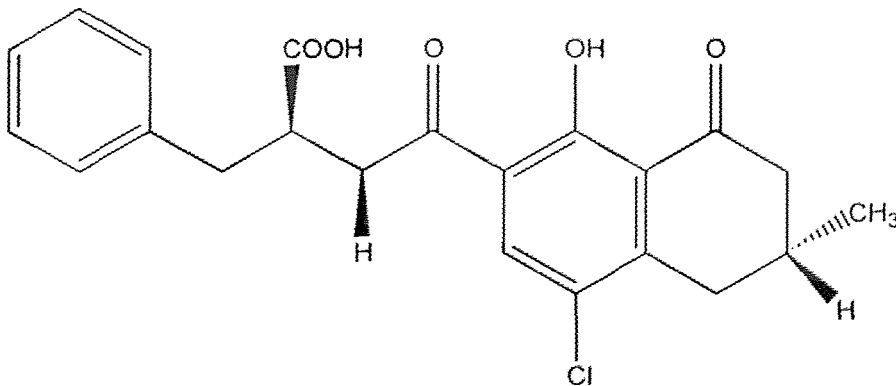


Figura 16. Ochratoxina A.

- o Tricotecenos como el Tricodermina (4β -Acetoxy-12,13-epoxytricotec-9-eno), proviene del hongo *Trichoderma lignorum* (Figura 17), y *T. viride* (Cole et al., 2003).

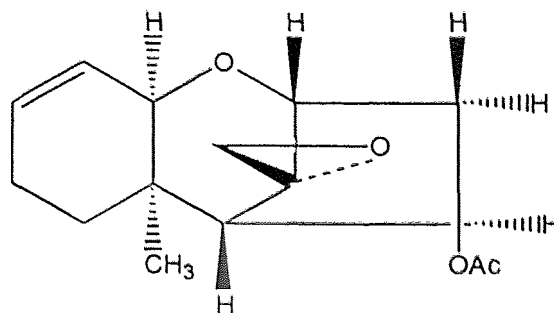


Figura 17. Tricodermina.

2. 4. 2 Metabolitos del género *Sclerotium*

No se tienen referencias de producción de metabolitos sobre *Sclerotium cepivorum* Berk, sin embargo, en otras especies de este género se encontró que *S. glaucanum* produce un exopolímero polisacárido el cual está siendo probado como inhibidor de la replicación del virus que produce el herpes simple tipo I (Orsi, et al., 1996).

S. rolsfii y otras especies del mismo género como el *S. glaucanum* producen un biopolímero compuesto por unidades β -D-glucopiranososa (Figura 18), el cual es utilizado a nivel industrial; su principal aplicación es en la recuperación asistida de petróleo y aceites, además se espera utilizarlo en la industria alimentaria, ya que tienen el mismo poder calórico que el almidón, también se ha demostrado que disminuye el colesterol en ratas y pollos (Agrios, 1999; Orsi, et al., 1996).

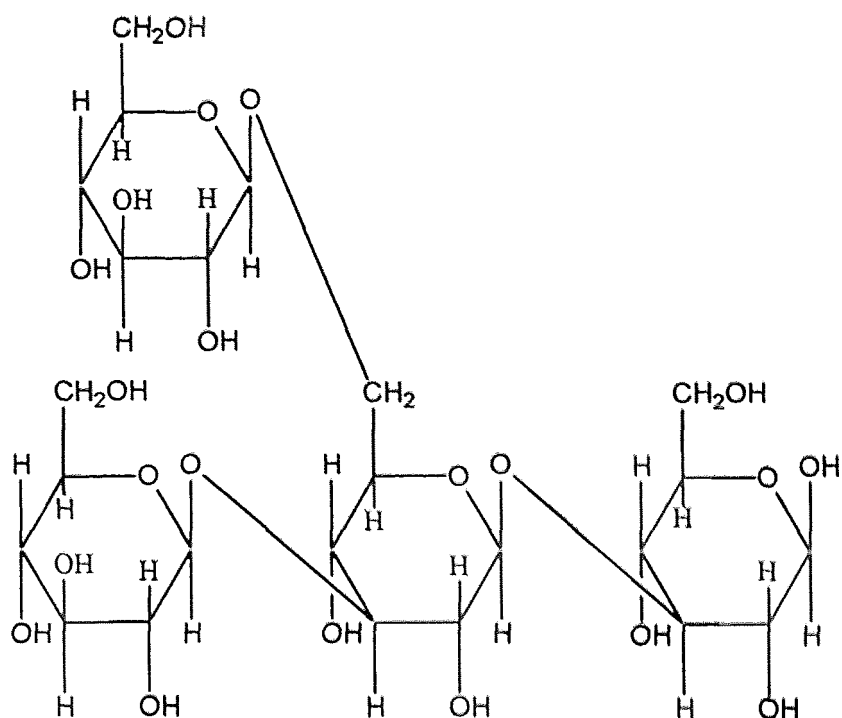


Figura 18. Estructura del β -D-glucopiranosido, formado por β-1,3-D-glucosa con una cadena lateral de β -1,6-D-glucosa cada tres residuos principales (tomado de la web. Czop J. K., y http://www.foodnews.ch/x-plainmefood/20_lebensmittel/Scleroglucan.html).

Turner (1971), reportó que el *Sclerotium rolsfii* produce el derivado de un ácido sencillo (Figura 19), al cual se le ha probado actividad tóxica.

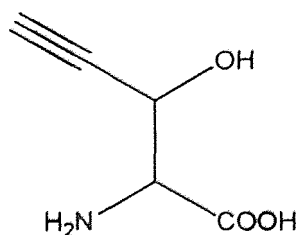


Figura 19. Ácido (2S, 3R)-2-amino-3-hidroxipenten-4-inoico.

Dawood y Sadik (1985); Stone y Armentrout (1985) descubrieron que la formación de ácido oxálico se puede obtener de este hongo in vivo o in vitro. Establecen que la formación de este ácido es la que ocasiona la podredumbre de la planta.

2. 4. 3 Importancia del *Sclerotium cepivorum* Berk

Según la red nacional hortícola, *Sclerotium cepivorum* Berk genera graves pérdidas a nivel mundial en cultivos de cebollas y ajos. En México tan solo en el 2001 se llegaron a importar 6,074.44 toneladas desde Chile, debido a las pérdidas de este producto producidas por la infestación de este hongo.

(http://www.sitec.cl/boletines/hortalizas/panorama_horticola_n7.doc).

Sin embargo, los estudios realizados a este respecto se han enfocado principalmente a su biocontrol, mecanismo de ataque, efecto de la temperatura, pH y nutrimentos sobre su crecimiento; formas de propagación y algunas características bioquímicas y genéticas, para su pronta detección. (Carbone y Kohn, 1993; Farina *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 1991; Harper *et al.* 2002 Pinto *et al.*, 1998; Tyson *et al.*, 2002).

CAPÍTULO III PLANTEAMIENTO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

3. PLANTEAMIENTO Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Muchos de los alimentos que consumimos son susceptibles a ser infectados por organismos fitopatógenos, entre los que destacan los hongos; los cuales pueden contaminar a los alimentos durante la cosecha, traslado, almacenamiento o incluso durante la manipulación o preparación de los mismos. Esto nos lleva a la posibilidad de tener alimentos contaminados por organismos que pueden producir sustancias nutri o nutracéuticas o bien tóxicas a nuestro organismo.

Dentro de los hongos de nuestro interés se encuentran los que pertenece el género *Sclerotium* y de estos, algunas de estas especies produce sustancias con actividades biológicas interesantes; de este género encontramos la especie *Sclerotium cepivorum* Berk, el cual no ha sido estudiado químicamente, ya que solo se han llevado a cabo estudios sobre el control biológico por las graves pérdidas agrícolas y económicas que la infestación de éste produce en el mercado de vegetales.

Así, debido al desconocimiento de los metabolitos secundarios que este hongo produce y por todo lo anterior, resulta de gran interés el conocimiento sobre el tipo de sustancias que este organismo produce.

CAPÍTULO IV

OBJETIVO E HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo el estudio químico en infusión de cebolla del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.
- Determinar las condiciones óptimas de cultivo del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk en un medio de cebolla.
- Cultivo.
- Extracción y purificación de los metabolitos producidos.
- Caracterización e identificación química de los compuestos aislados.

4.3 HIPÓTESIS

Como todo hongo, *Sclerotium cepivorum* Berk debe producir compuestos derivados de su metabolismo secundario, por lo que al cultivarlo en un medio lo más natural posible como una infusión de cebolla, pondría conducirnos al conocimiento del tipo de sustancias que este hongo puede llegar a producir cuando infesta alimentos como la cebolla.

CAPÍTULO V

PLAN DE TRABAJO

5. PLAN DE TRABAJO



CAPÍTULO VI

MATERIAL Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL

Las cepas del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk utilizadas en este trabajo se obtuvieron por dos vías. La primera, fue donada por el Colegio de Posgraduados de Montecillos y la segunda, fue aislada a partir de cebollas infestadas con este hongo procedente de la región de Tlaxcala.

Para su cultivo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml.

El medio de cultivo utilizado fue infusión de cebolla en agua destilada (300 g/l).

El material y medio de cultivo fue esterilizado en autoclave previo a su uso a temperatura de 120° C, 15 lb de presión durante 30 min.

La inoculación fue hecha bajo estrictas condiciones de esterilidad con ayuda de una camara de flujo laminar.

Los 25 litros del caldo de fermentación fueron concentrados por medio de un evaporador a presión reducida marca SEV, un liofilizador marca Labconco y un evaporador de efecto simple a presión reducida con capacidades de 3, 2 y 40 litros respectivamente, cuando así lo requirió, hasta llegar a 3.7 ml.

Para concentrar el medio líquido, se utilizó un evaporador de efecto simple a presión reducida con capacidad de 3.0 litros, un liofilizador y un evaporador de efecto simple a presión reducida con capacidad de 40 litros de acero inoxidable.

Las extracciones se llevaron a cabo en un extractor líquido-líquido de flujo continuo para disolventes más densos que el agua con capacidad de 5 litros.

Todos los disolventes se purificaron mediante destilación a través de una columna de rectificación.

Los extractos fueron concentrados en un evaporador rotatorio a presión reducida.

Las columnas gravitatorias fueron usadas con gel de sílice Merck en dos tamaños de malla, 60 (0.2–0.5 mm) y 230 a 400 (0.0040–0.063 mm), compactadas en seco. Las cromatografías en capa fina se realizaron empleando gel de sílice Merk 60 GF₂₅₄ sobre soporte de vidrio y cromatófolios de gel de sílice Merk 60 GF₂₅₄ 0.2 mm de tamaño de partícula.

El revelado se hizo bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga y corta (254 y 365 nm), así como con vapores de yodo.

Los puntos de fusión se determinaron por medio de un Electrothermal y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear ¹H y ¹³C se realizaron en un espectrómetro Varian modelo mercury plus a 300 y 75 MHz respectivamente, utilizando como disolvente cloroformo deuterado, metanol deuterado y como referencia interna tetrametilsilano.

Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) en unidades δ , y los espectros de RMN ¹H a 300 MHz usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃) y metanol deuterado (CD₃OD) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

Las abreviaturas empleadas en la descripción de los compuestos fueron:

Señal simple	(s).	Señal compleja	(c).
Señal doble	(d).	Señal compleja ancha	(c a).
Señal triple	(t).		

6. 2 MÉTODOS

6. 2. 1 Descripción general del trabajo experimental

6. 2. 1. 1 Aislamiento de la cepa

El hongo *S. cepivorum* Berk, fue aislado de cebollas las cuales venían infestadas por éste y traídas de la ciudad de Tlaxcala; para poder aislarlas se procedió de la siguiente forma:

1. Se preparó medio de cultivo agar papa-zanahoria PZA (consultar en apéndice medios de cultivo).
2. Para el aislamiento del hongo, se tomaron los esclerocios de la cebolla infestada por medio de pinza con punta delgada, y se colocaron en un papel filtro, fueron lavados varias veces con agua corriente, se pasaron los hongos en diferentes papeles filtro para tratar de eliminar en lo posible la tierra y elementos que puedan estar pegados al hongo. Al finalizar se enjuagaron con agua destilada varias veces antes de la siembra, de la misma forma se trataron los esclerocios donados.
3. En condiciones de asepsia y bajo campana de flujo laminar se sembraron en cajas Petri (con una pinza) un esclerocio, colocándolo en la parte central de la caja usando como medio de cultivo PZA.
4. Se observaron los primeros días hasta la aparición de micelio blanco algodonoso el cual se transfirió a otra caja Petri con el mismo medio de cultivo, realizándolo varias veces (4 o 5) hasta obtener una cepa pura.
5. Una vez obtenida la cepa pura se procedió a la caracterización.

6. La identificación se llevó a cabo por comparación morfológica de las 2 cepas obtenidas, se realizaron observaciones microscópicas con preparaciones de micelio en portaobjetos agregando un colorante como medio de contraste (azul de lactofenol ver apéndice A).

6. 2. 2 Elección de la cepa

Para determinar la cepa a usar se realizaron pruebas de infestación en su medio natural infectante (cebollas), las pruebas se realizaron por triplicado, colocando micelio de cada cepa en distintas cebollinas y determinando el tiempo de infestación de ambas cepas.

6. 2. 3 Elección de las condiciones de cultivo

6. 2. 3. 1 Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas

Una vez obtenida la cepa pura, lo siguiente que se buscó fue la temperatura apropiada para su crecimiento y desarrollo. Tomando en cuenta los reportes obtenidos en el estudio bibliográfico, se estableció que el medio más adecuado para determinar la temperatura de estos hongos era PDA, por lo que se usó este medio y se procedió de la siguiente forma:

1. Preparación de agar papa dextrosa (PDA).
2. Con un asa o pinza con punta fina y en condiciones de trabajo estériles, bajo campana de flujo laminar se procedió a sembrar el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk por inóculo central en cada caja, a diferentes temperaturas las cuales oscilaron entre 10° a 30° C en cuatro rangos de temperaturas: a) 10-16° C; b) 17-22° C; c) 23-26° C y d) 27-30° C.

3. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió en centímetros el crecimiento radial de las cepas en las distintas temperaturas probadas.

Los medios se sembraron el mismo día y se llevaron a cabo 3 repeticiones, utilizando además los esclerocios de las dos cepas.

6. 2. 3. 2 Determinación del medio de cultivo

Se probaron diferentes medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, los medios sólidos fueron: agar de Czapeck Dox, agar infusión de cebolla y agar papa dextrosa (PDA); los medios líquidos fueron: infusión de papa e infusión de cebolla (apéndice A), los resultados son un promedio por triplicado.

Se realizó una curva de crecimiento para determinar la formación de biomasa en medio de agar-infusión de cebolla, así también, establecer el tiempo de incubación en el cual se obtuvieron más metabolitos los cuales fueron monitoreados por medio de cromatografía en capa fina. Se procedió de la siguiente forma:

Medios sólidos

1. Se prepararon los medios sólidos como está descrito en el apéndice A.
2. Se sembró en cada caja Petri (bajo campana de flujo laminar y condiciones de asepsia) un esclerocio en posición central con ayuda de una pinza de punta fina.
3. Se incubaron a la temperatura encontrada como la más adecuada.
4. Se tomaron en cuenta el crecimiento radial y la formación de esclerocios.

Medios líquidos

1. Preparar los medios líquidos (apéndice A).
2. Se inoculó en matraces Erlenmeyer de 500 ml y se vertió en cada uno 100 ml de medio en cada matraz.

3. Para el cultivo se Introdujeron seis esclerocios en cada matraz y la incubación fue a la temperatura encontrada.

6. 2. 4 Cultivo del hongo

El cultivo masivo del hongo *S. cepivorum* Berk se llevó a cabo en 250 matraces Erlenmeyer de 500 ml, los cuales fueron lavados y esterilizados previamente.

- A. Se prepararon 25 litros de infusión de cebolla como medio de cultivo, se vertió en cada matraz 100 mililitros del medio y se esterilizó durante 15 minutos a 15 PSI y 120° C.
- B. Bajo campana de flujo laminar se introdujeron seis esclerocios en cada matraz, los cuales fueron tomados por medio de pinzas de disección de punta larga.
- C. Se colocaron los medios a una temperatura entre 17-23° C sin agitación, y se realizaron monitoreos los días restantes para identificar cualquier contaminación posterior a la siembra.

6. 2. 5 Preparación del medio

Se separaron el medio líquido o caldo de fermentación del sólido (micelio y esclerocios), por medio de filtración y centrifugación, obteniéndose un total de 25 litros de caldo, los cuales se concentraron a través de evaporación, liofilización y por un evaporador de efecto simple a presión reducida (Figura 20), hasta obtener un total de 3.7 litros.



Figura 20. Evaporador de efecto simple a presión reducida.

6. 2. 6 Extracción de metabolitos

6. 2. 6. 1 Extracción de compuestos

Una vez separado el medio de cultivo del micelio y esclerocios, estos dos últimos se congelaron con el propósito de romper células y facilitar la extracción de los compuestos. Tarea que se realizó con cloroformo y posteriormente metanol.

El caldo de cultivo como se ha comentado, se extrajo con cloroformo hasta agotamiento en un extractor liquido-liquido para disolventes más densos que el agua, (Figura 21), y posteriormente se hizo pasar a través de amberlita para eliminar el agua restante y sales (Takeuchi *et al.* 1989; Castillo *et al.* 1992; Riguera 1997; Vertesy *et al.* 2000. Intercambio iónico

http://www.tecnociencia.es/fecyt/especiales/intercambio_ionico/introduccion.html).

Finalmente se hicieron pasar mezclas de agua-metanol (1:1) y metanol para recuperar los metabolitos.

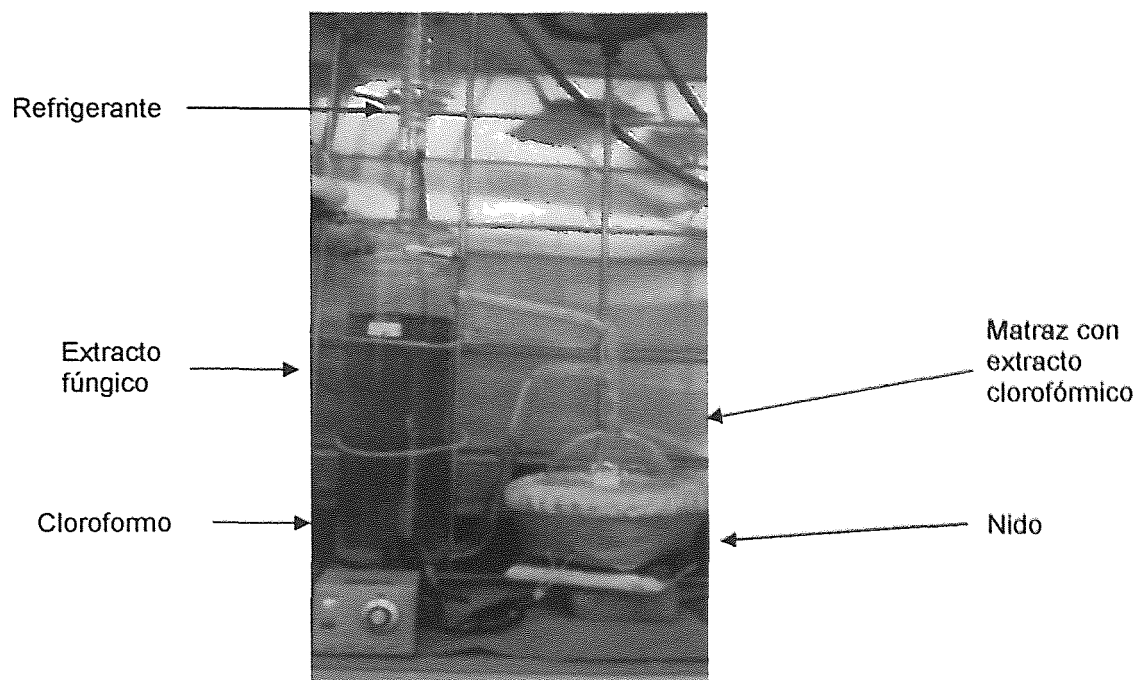


Figura 21. Extractor de flujo continuo para disolventes más densos que agua.

6. 2. 6. 2 Purificación de compuestos

El cultivo, tanto de la infusión de cebolla como del micelio, fue sometido a una extracción líquido-líquido con cloroforno durante 30 días. Posteriormente se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose 6.0 g de extracto. De la misma forma, el cultivo e infusión se sometieron a extracción con metanol obteniéndose 7.0 g de extracto.

Los extractos así obtenidos, se purificaron por cromatografía en columna gravitatoria; los compuestos se eluyeron con mezclas hexano-acetato de etilo, acetato de etilo, acetato de etilo-etanol, hasta llegar a etanol, a diferentes concentraciones.

Del extracto clorofórmico del caldo de cultivo de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (90:10), se obtuvieron 10.7 mg de un compuesto cristalino incoloro al cual se le denominó compuesto **1**, y cuyo punto de fusión y datos espectroscópicos se dan a continuación.

P. F. 132–135°C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ , ppm: a 3.54 (1H, s, H-3); 5.35 (1H, c, H-6); 0.69 (1H, s, H-18); 1.02 (1H, s, H-19); 0.92 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-21); 0.84 (1H, d, $J=6.3$ Hz, H-26); 0.81 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-27); 0.86 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-29).

Del mismo extracto clorofórmico, de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (80:20) se obtuvieron 43.0 mg de un compuesto cristalino incoloro al cual se le denominó compuesto **2**, y cuyo punto de fusión y datos espectroscópicos se dan a continuación.

P. F. 166–168°C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ , ppm: a 3.97 (1H, ca, H-3); 6.51 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6); 6.25 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7); 0.84 (1H, s, H-18); 0.92 (1H, s, H-19); 1.00 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-21); 5.20 (1H, t, H-22); 5.18 (1H, t, H-23); 0.80 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-26); 0.82 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-27); 0.93 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-28).

Del extracto metanólico del caldo de cultivo, se obtuvieron 56.0 mg de un compuesto formado de cristales amorfos que resultó ser una mezcla de dos componentes que se denominaron compuesto **3** y cuyo punto de fusión y datos espectroscópicos se dan a continuación.

P. F. 88–92°C.

^1H del compuesto 3A

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ , ppm: 5.10 (1H, d, $J=3.7$ Hz, H-1 α); 3.6 (4H, c, H-3, H-5 y H-6 α); 3.4 (2H, c, H-2 Y H-4 α).

^{13}C del compuesto 3A

RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) δ , ppm: 94.02 (C-1); 76.38 (C-2); 78.18 (C-3); 71.95 (C-4); 78.12 (C-5); 62.86 (C-6)

^1H del compuesto 3B

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ , ppm: 4.47 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1 β); 3.9 (2H, c, H-6 β); 3.2 (3H, c, H-3, H-4 y H-5 β); 3.12 (1H, dd, H-2 β).

^{13}C del compuesto 3B

RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) δ , ppm: 98.26 (C-1); 73.96 (C-2); 74.96 (C-3); 71.82 (C-4); 73.07 (C-5); 62.98 (C-6).

CAPÍTULO VII

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. 1 Selección de la cepa a estudio

Las cepas del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk fueron obtenidas, una de cebollas infestadas (cepa I) y la otra fue donada como se comentó en la metodología (cepa II). Las dos se aislaron usando un medio de cultivo mínimo (PZA).

Se determinó que la cepa I tiene un mayor poder de infestación que la cepa donada por el Colegio de Posgraduados, ya que solo tardó 5 días en comenzar la pudrición en cebollas, siendo que la cepa II dilató 9 días, por lo que se estableció que la cepa usada para esta investigación fuera la primera.

7. 2 Elección de las condiciones de cultivo

7. 2.1 Temperatura

Para saber cual era el rango de temperatura óptimo para el cultivo del hongo en estudio, se probaron distintas temperaturas en medio PDA (como se indica en la Tabla 1). Se puede observar que a temperaturas entre 17–22° C mejora el crecimiento debido a que en estas condiciones el micelio de las cajas Petri se desarrolla en menor tiempo (9 días).

En temperaturas de 12–16° C los esclerocios comienzan a formarse a los 26 días y finalizan su maduración a los 28 días, en temperaturas de 17–22° C a los 12 días comienza la formación de esclerocios y finalizan su maduración a los 14 días, y a temperaturas entre 23–26° C solo forma micelio y no sus formas de protección o esclerocios (Gráfico 1). Cabe aclarar que a temperaturas entre 27–30° C no presentó crecimiento micelial.

Tabla 1. Promedio de los monitoreos de temperaturas realizados por triplicado en medio PDA.

Días de incubación	Rangos de temperatura			
	12-16° C	17-22° C	23-26° C	27-30° C
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.20	0.00	0.00
6	0.00	0.60	0.00	0.00
7	0.17	1.10	0.00	0.00
8	0.23	2.00	0.00	0.00
9	0.43	3.40	0.00	0.00
10	0.57	4.30	0.00	0.00
11	0.77	**	0.00	0.00
12	1.13		0.00	0.00
13	1.37		0.00	0.00
14	1.70		0.00	0.00
15	2.03		0.00	0.00
16	2.33		0.00	0.00
17	2.66		0.18	0.00
18	2.93		0.20	0.00
19	3.13		0.22	0.00
20	3.47		0.39	0.00
21	3.73		0.43	0.00
22	3.87		0.63	0.00
23	4.13		0.72	0.00
24	4.40		0.83	0.00
25	**		1.08	0.00
26			1.85	0.00
27			2.07	0.00
28			2.34	0.00
29			2.91	
30			3.38	

* El crecimiento micelial se midió en centímetros y se reporta el promedio de los registros realizados por triplicado.

** Aparición de los primeros esclerocios.

☆ Punto en el que la caja Petri se satura de micelio.

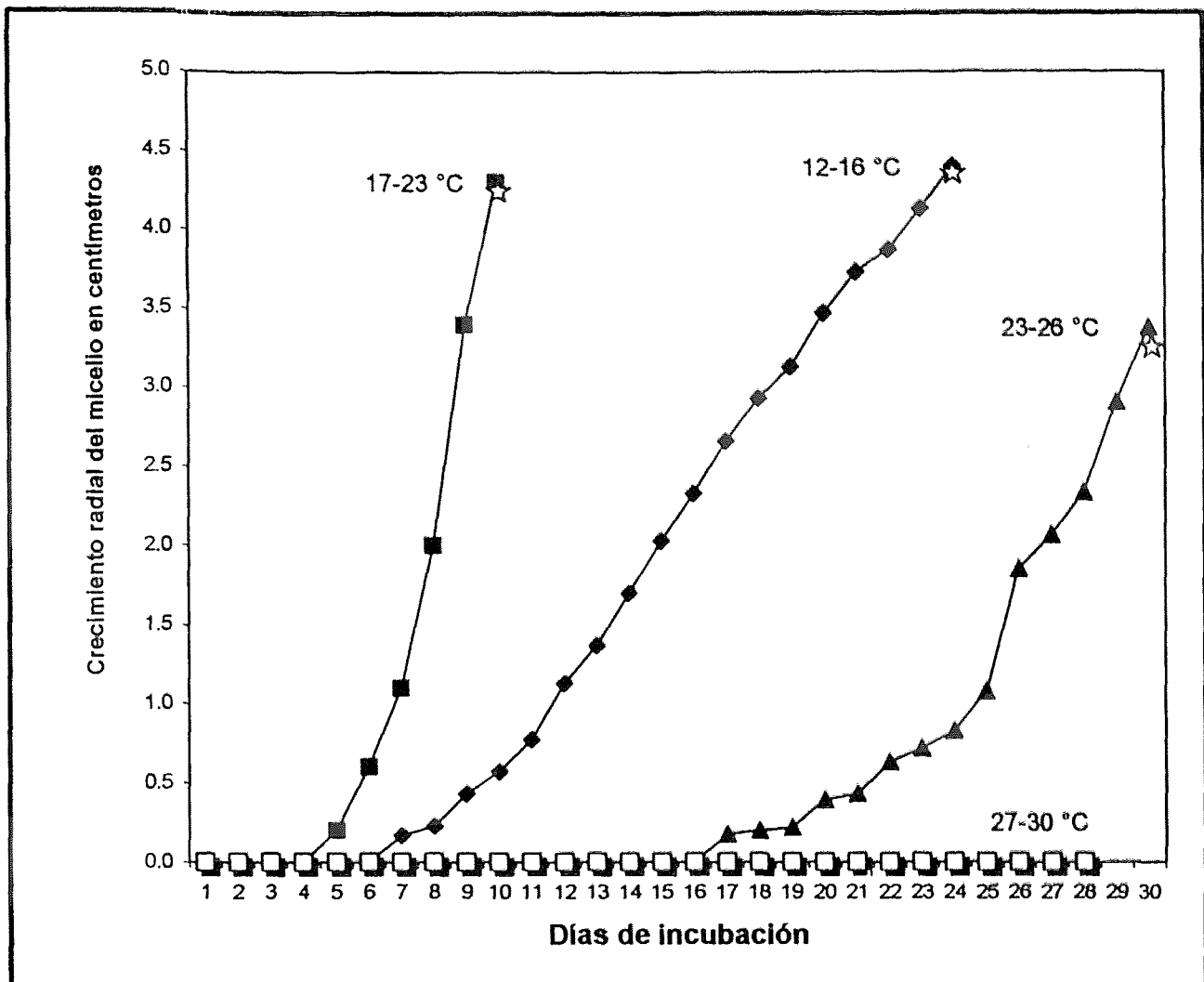


Gráfico 1. Crecimiento miceliar del *Sclerotium cepivorum* Berk a distintas temperaturas en medio PDA.

7. 2. 2 Medio de cultivo

De los 3 medios usados, agar-cebolla, agar-papa-dextrosa y Czapec-dox, el que mostró mayor eficiencia fue el de agar-cebolla, seguido de agar-papa-dextrosa y finalmente Czapec-dox como se indica en la Tabla 2, en la cual además se muestra, el crecimiento radial comparativo entre las dos cepas de *Sclerotium cepivorum* Berk, apreciándose que la cepa I sembrada en agar cebolla fue la que presentó mayor crecimiento.

Tabla 2. Diámetro de crecimiento radial en centímetros del *Sclerotium cepivorum* Berk en 3 diferentes medios de cultivo.

Días de incubación	Medios usados					
	PDA		Czapek-dox		Agar cebolla	
	Cepa I* y II**					
	C I*	C II**	C I*	C II**	C I*	C II**
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.23	0.13	0.00	0.00	0.70	0.60
5	0.63	0.40	0.30	0.20	1.70	1.20
6	3.43	2.60	1.60	1.10	4.20	3.90
7	4.40	4.10	2.60	1.70	4.50	4.50
8			3.56	2.83		
9			4.50	4.10		

C. I* cepa donada por el Colegio de Posgraduados de Montecillos.

C. II** cepa extraída de cebollas infectadas obtenidas en Tlaxcala Tlax.

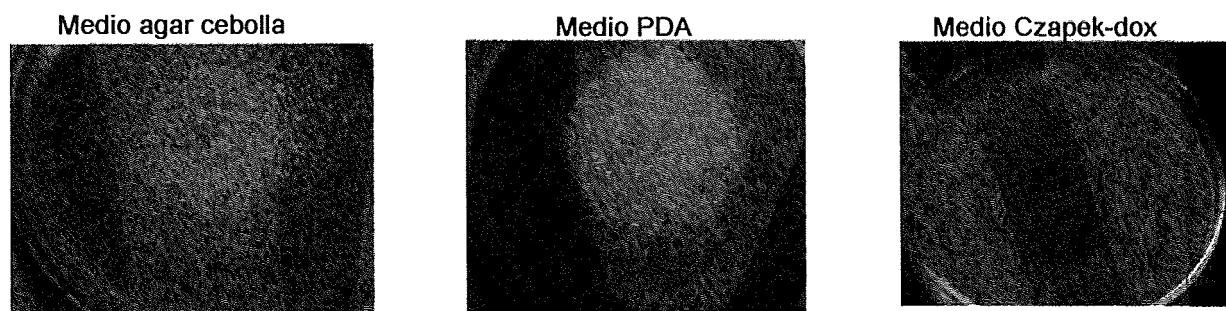


Figura 22. Diferentes tipos de crecimiento del *Sclerotium cepivorum* en los distintos medios de cultivo.

Se puede observar claramente en las fotografías anteriores (Figura 22), que el crecimiento en medio de cebolla es mucho más homogéneo que el de los demás medios, ya que en este se producen una mayor cantidad de esclerocios que en los otros dos, con un promedio de 12,000 esclerocios por caja Petri en agar cebolla, contra 10,000 en PDA y 6,000 en Czapek-dox.

7.3 Curva de crecimiento del *Sclerotium cepivorum* Berk

Para determinar el tiempo de cosecha del cultivo masivo del *Sclerotium cepivorum* Berk en el medio elegido, se realizó una curva de crecimiento para establecer el final de la fase estacionaria, fijándose a los 24 días (Gráfico 2).

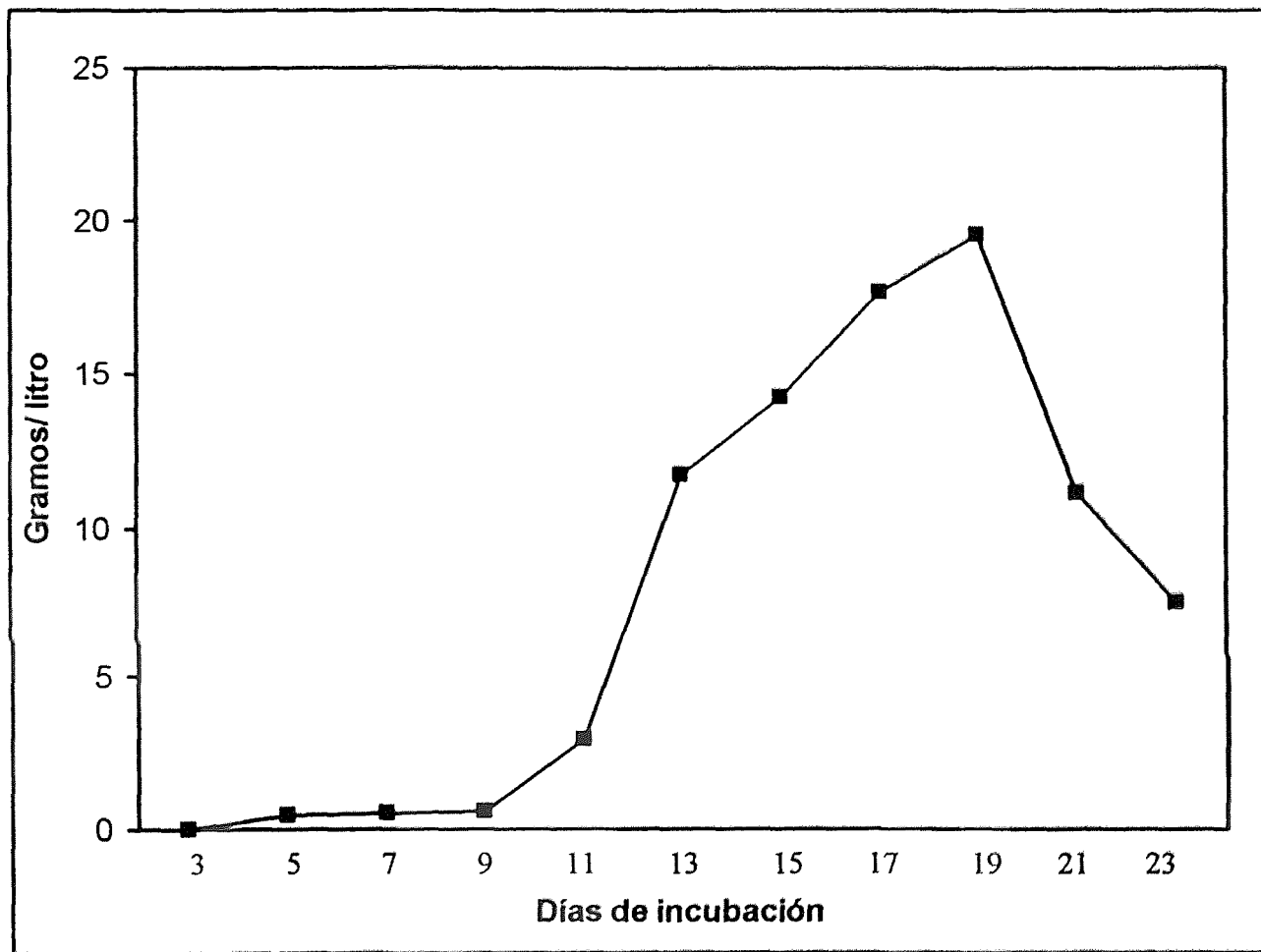


Gráfico 2. Curva de crecimiento de biomasa en medio de agar-cebolla a una temperatura entre 17-22° C del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.

7.4 Cultivo del *S. cepivorum* Berk

El cultivo masivo del hongo se llevó a cabo en 25 litros de caldo infusión de cebolla, en 250 matraces Erlenmeyer (100 ml en cada uno) y fueron incubados a una temperatura entre 17-23° C como se comentó en la metodología.

7.5 Material fúngico

Los 25 litros del caldo de cultivo se concentraron hasta obtener un total de 3.7 litros, los cuales se extrajeron con cloroformo obteniéndose 6.2 g del extracto clorofórmico.

7.6 Identificación de compuestos

Compuesto 1

De las fracciones del extracto clorofórmico eluidas con hexano-acetato de etilo (90:10), se obtuvo un total de 10.7 mg de cristales en forma de agujas finas transparentes y cuyo punto de fusión es de 132-135° C, que al eluirlos en mezcla de hexano acetato de etilo y revelar en vapores de yodo presentan un Rf. de 0.45. A este compuesto se le llamó compuesto 1 (Figura 23), y fue identificado mediante el análisis espectroscópico de RMN ^1H , como β -sitosterol.

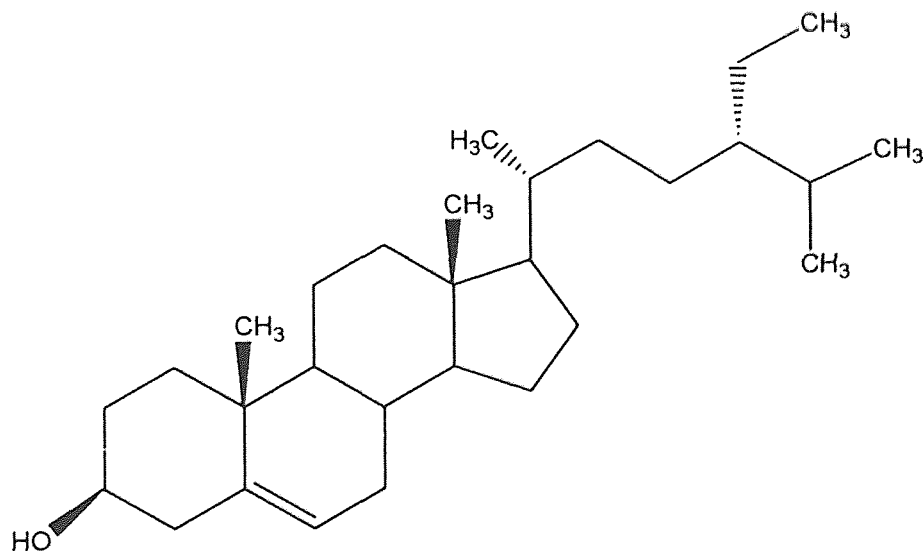


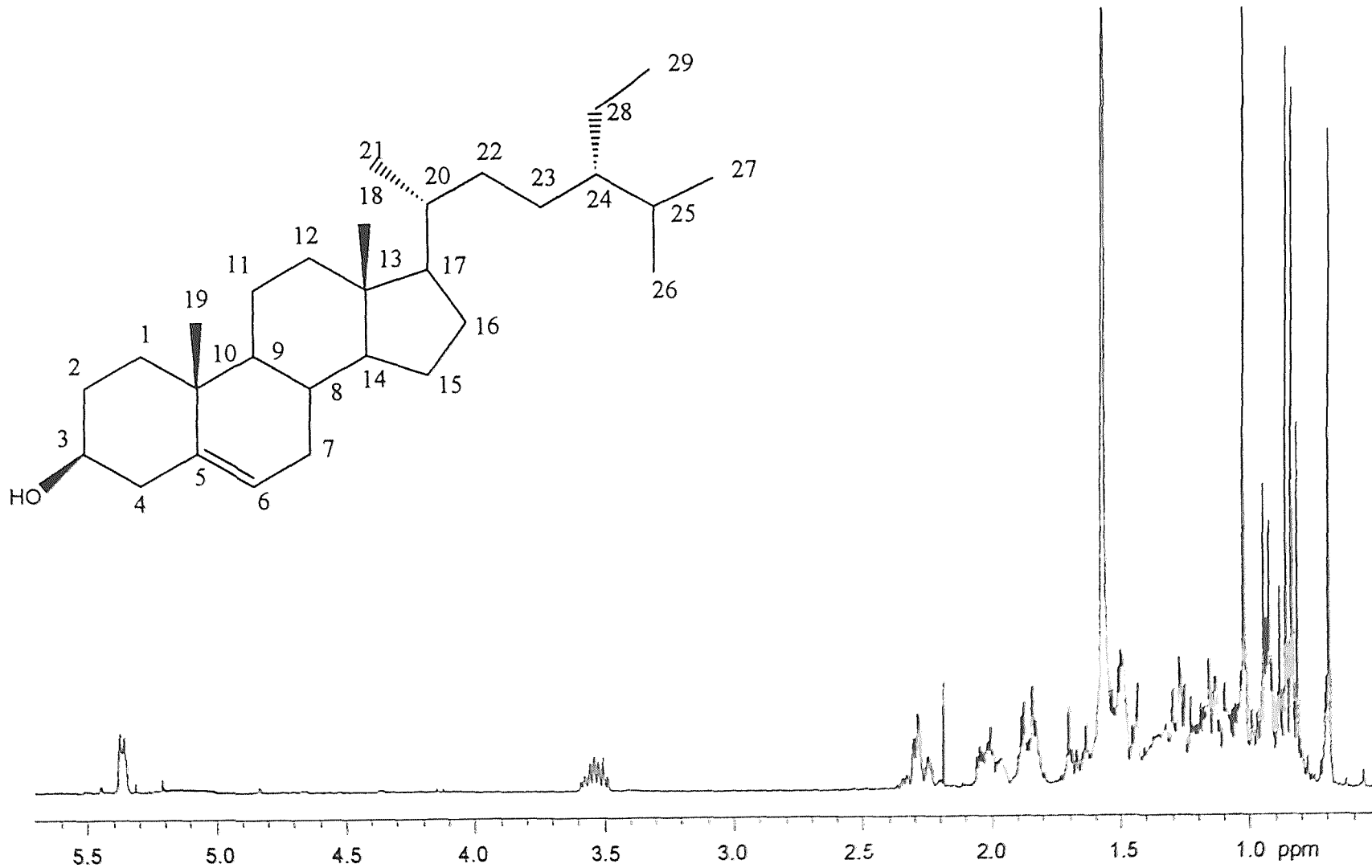
Figura 23. Estructura del β -sitosterol.

Los principales datos de RMN del ^1H a 300 Mhz para β -sitosterol (en CDCl_3), se encuentran en la tabla 3. Los desplazamientos químicos están dados en ppm o unidades δ , y los datos obtenidos se compararon con la literatura (Cole *et al.*, 2003; Guzmán, 2001; Pouchet and Behnke; 1993 Rosas *et al.* 1999).

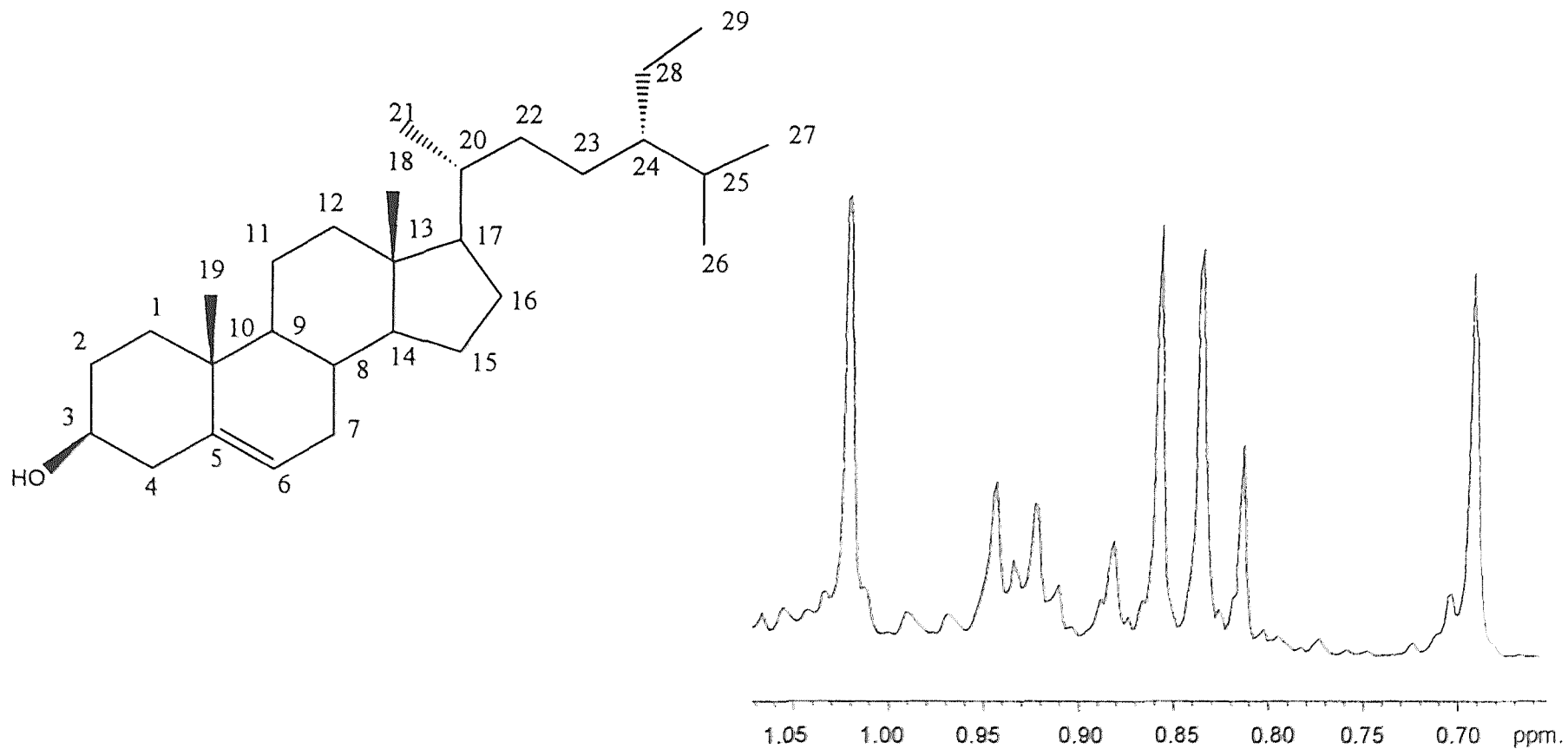
Tabla 3. Datos de RMN ^1H para el β -sitosterol (CDCl_3 como disolvente).

No. de Hidrógeno	^1H en ppm	Multiplicidad
3	3.54	c
6	5.35	c
18	0.69	s
19	1.02	s
21	0.92	d (J=6.6 Hz)
26	0.84	d (J=6.3 Hz)
27	0.81	d (J=6.6 Hz)
29	0.86	d (J=6.6 Hz)

Así en el espectro 1, de RMN ^1H destaca a 5.35 ppm una señal compleja angosta que integró para un protón atribuible al protón vinílico H-6; a 3.54 ppm una señal ancha compleja evidenció al protón geminal al hidroxilo dispuesto en β en la posición H-3; finalmente, la presencia de seis metilos existentes en la molécula se manifiestan a 1.02 (s), 0.92 (d, J=6.6 Hz), 0.86 (t, J=6.6 Hz), 0.84 (d, J=6.3 Hz), 0.81 (d, J=6.6 Hz) y 0.69 (d, J=6.6 Hz) ppm, como se aprecia en la ampliación de la zona del espectro 1 (Espectro 2).



Espectro 1. RMN ^1H del β -sitosterol.



Espectro 2. Ampliación en el espectro de RMN ^1H de las señales de los metilos del β -sitosterol.

Compuesto 2

De las fracciones del extracto clorofórmico eluidas con hexano acetato (80:20), se obtuvieron 43.0 mg de un compuesto en forma de agujas blancas que revela con yodo y cuyo punto de fusión es de 166-168° C, al que se le llamó compuesto **2** (Figura 24). Los datos espectroscópicos de RMN comparados con la literatura demostraron que se trataba del 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol (peróxido de ergosterol).

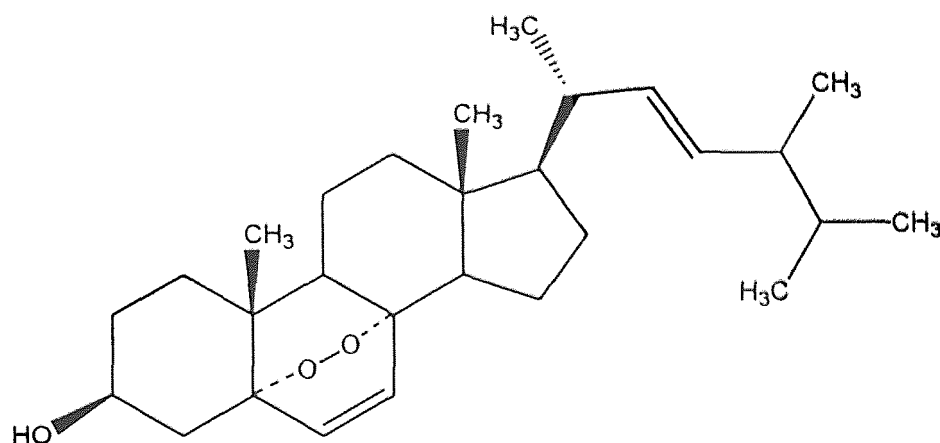


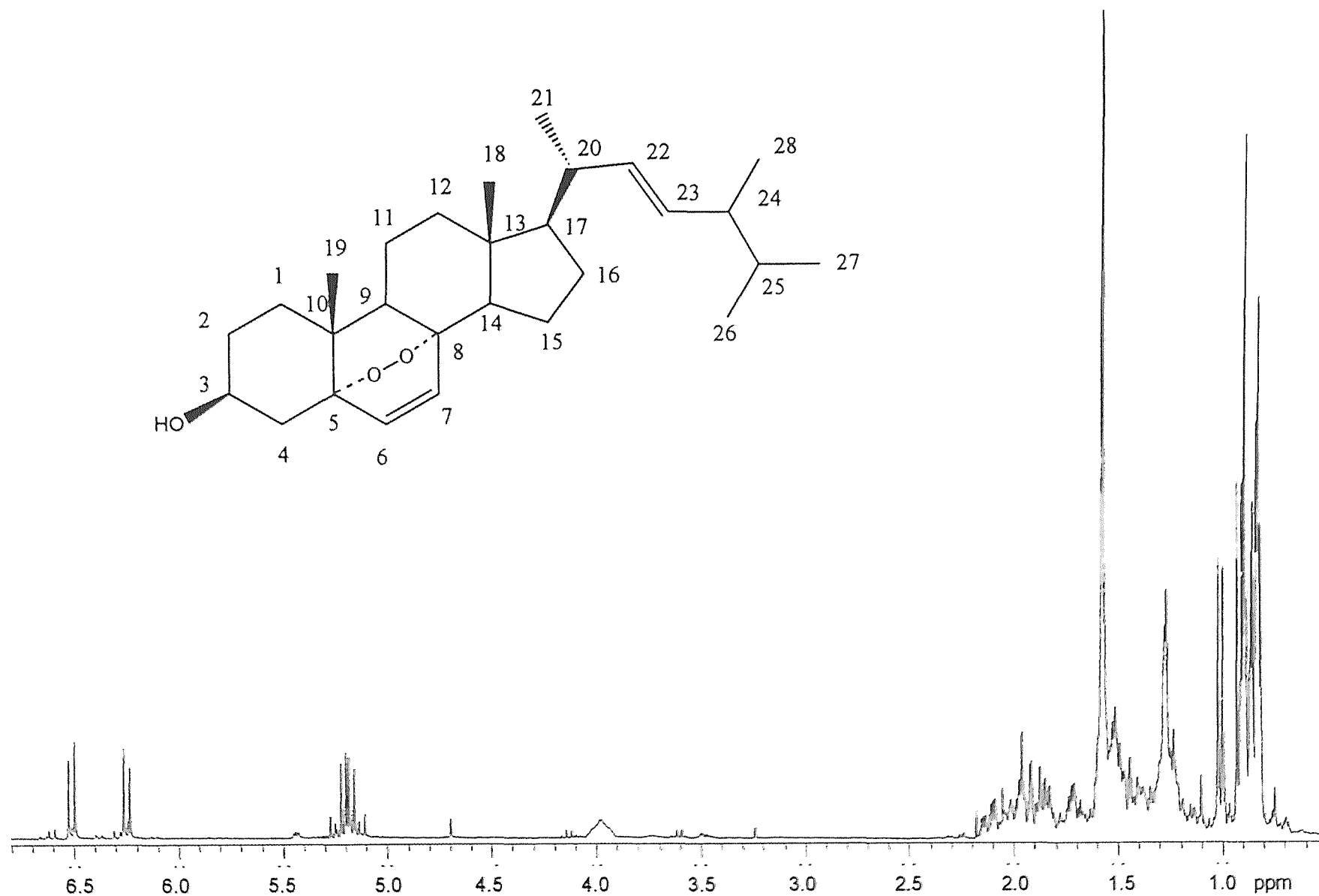
Figura 24. Estructura del 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol (peróxido de ergosterol).

Así, en el espectro de RMN del ^1H a 300 MHz en CDCl_3 se aprecia principalmente a 6.51 (d, $J=8.5$ Hz) y 6.25 (d, $J=8.5$ Hz) ppm dos señales dobles que integran cada una para un protón, que indica el sistema A-B de los protones vinílicos H-6 y H-7; a 5.20 y 5.18 ppm se observó un aparente triplete que integró para los 2 protones vinílicos H-22 y H-23 de la cadena lateral; a 3.97 ppm una señal compleja ancha a la que se asignó el protón geminal H-3 del grupo hidroxilo β ecuatorial característico de los esteroides naturales; finalmente, a 1.00 (d, $J=6.6$ Hz), 0.93 (d, $J=6.8$ Hz), 0.91 ppm, 0.84 ppm, 0.82 (d, $J=6.6$ Hz), 0.80 (d, $J=6.6$ Hz), mostraron la presencia de los 6 metilos presentes en la estructura como se pueden observar en la ampliación

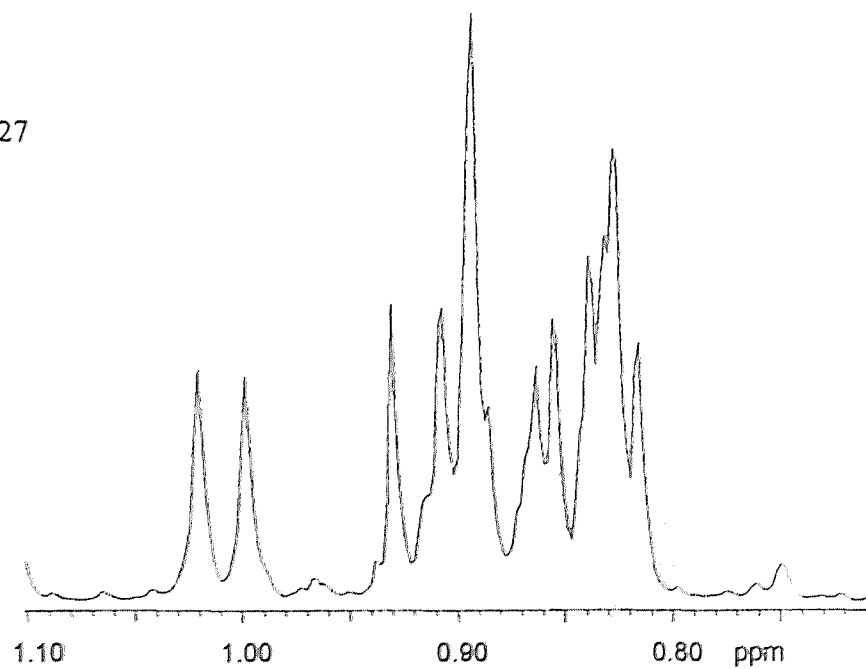
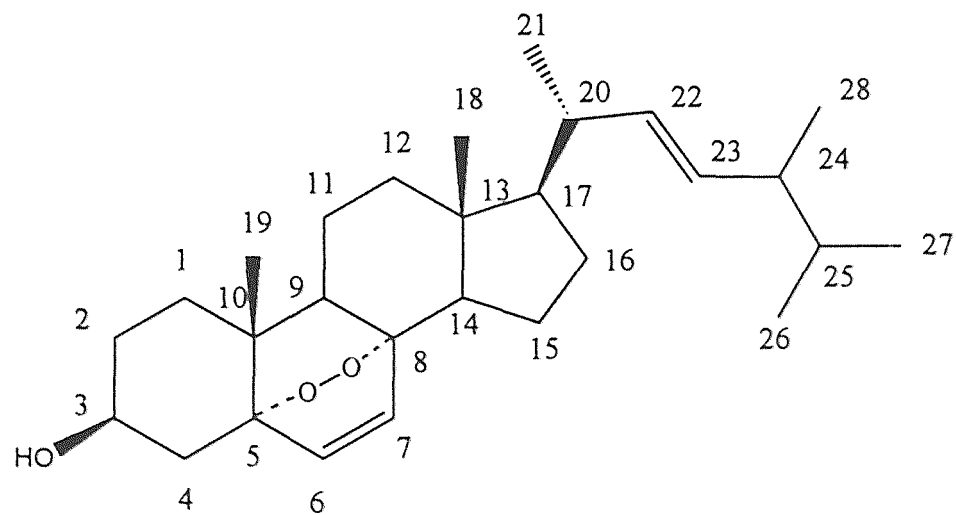
de la zona de metilos mostrada como espectro 3. Los datos espectroscópicos se encuentran reportados en la literatura, Tabla 4 (Cancela, 1995; Trigos y Ortega, 2002).

Tabla 4. Principales datos espectroscópicos en RMN para peróxido de ergosterol (CDCl_3 como disolvente).

No. de Hidrógeno	^1H ppm	Multiplicidad
3	3.97	c a
6	6.51	d (J=8.5 Hz)
7	6.25	d (J=8.5 Hz)
18	0.84	s
19	0.91	s
21	1.00	d (J=6.6 Hz)
22	5.20	t
23	5.18	t
26	0.80	d (J=6.6 Hz)
27	0.82	d (J=6.6 Hz)
28	0.93	d (J=6.8 Hz)



Espectro 3. RMN ¹H del peróxido de ergosterol.



Espectro 4. Ampliación del espectro de RMN ^1H de las señales de los metilos del peróxido de ergosterol.

Compuesto 3

Una vez que el cultivo se percoló con metanol a través de amberlita, fue llevado a sequedad, obteniéndose 7.0 g del extracto metanólico en peso. Así, cuando este fue purificado por cromatografía en columna, de las fracciones con acetato de etilo-etanol (90:10) se obtuvieron 56.0 mg de un compuesto sólido blanco con punto de fusión de 88–92° C y al cual se le llamó compuesto 3 (Figura 25). Los espectros de resonancia obtenidos demostraron que es una mezcla de α y β -D-glucopiranosos los cuales fueron comparados con la literatura (Pouchet and Behnke, 1993; Rodríguez, 1998).

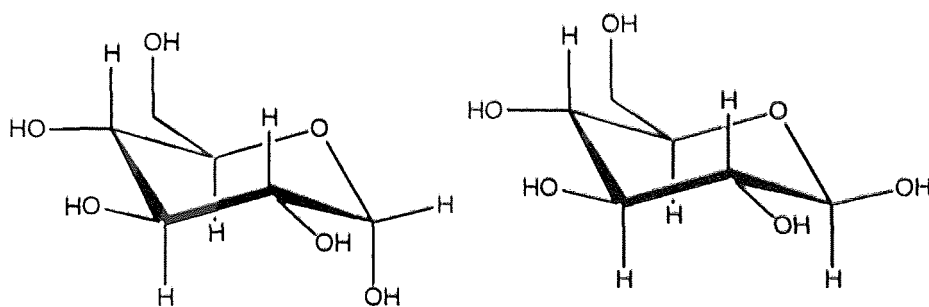
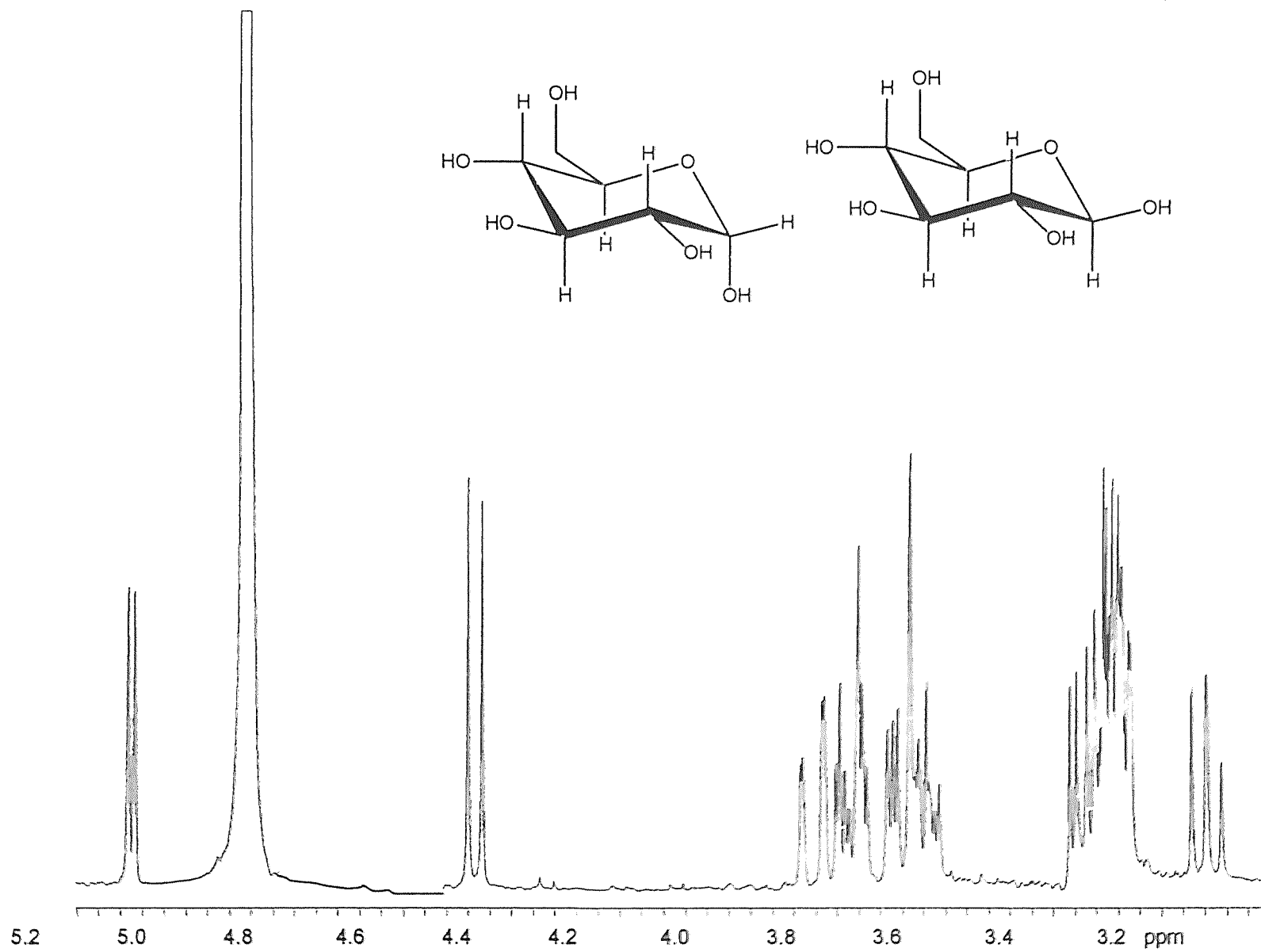


Figura 25. Estructuras α y β de la glucopiranososa.

Así, en la resonancia RMN ^1H realizada en metanol deuterado, se aprecian 2 señales dobles a 5.10 ($J=3.7$ Hz) y 4.47 ($J=7.7$ Hz) ppm que pertenecen a los 2 protones anoméricos correspondientes a la α -D-glucopiranososa y β -D-glucopiranososa respectivamente; entre 3.6 y 3.9 ppm se aprecia una señal compleja que se atribuye a los protones 3, 5 y 6 de la α piranososa y a los 2 protones en 6 de la β piranososa; mientras que a 3.2 y 3.4 ppm aproximadamente se observa otra señal compleja de los protones 3, 4 y 5 del anómero β y 2, 4 del α .

Finalmente, a 3.12 ppm se observa una señal doble de dobles que integra para un protón y que se asignó al hidrogeno 2 de la β -glucopiranososa.



Espectro 5. RMN ^1H de α y β -glucopiranosas.

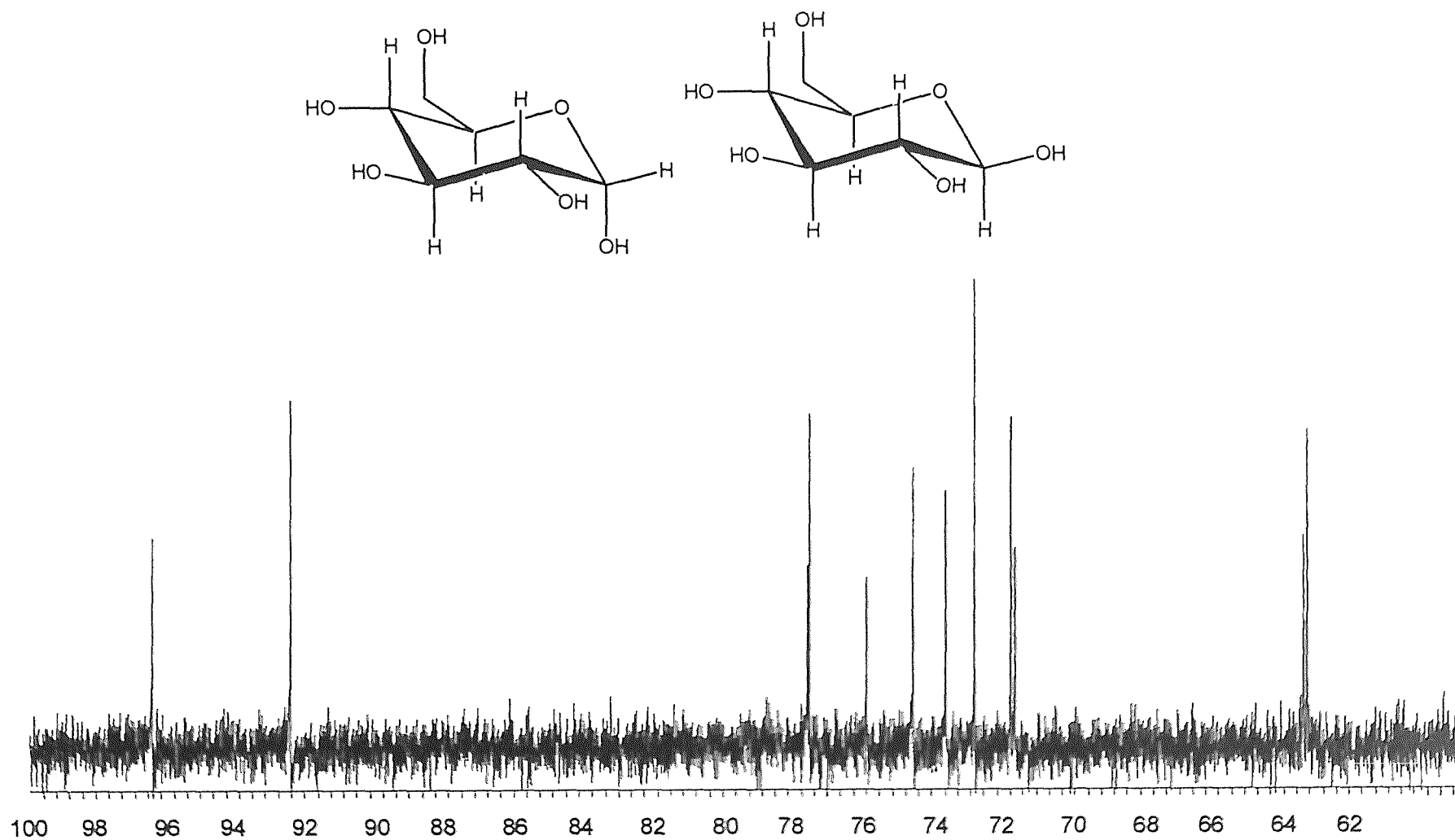
En el espectro de RMN de ^{13}C realizado en metanol deuterado (Espectro 6), se observa la presencia de 12 carbonos en los que destacan los 2 carbonos anoméricos a 98.3 y 94.0 ppm de la β y α -glucopiranosas respectivamente, mientras que en el experimento DEPT (Espectro 7), se observa la presencia de los 2 carbonos en 63.0 y 62.9 de ambas moléculas que indican su naturaleza como carbonos secundarios; mientras que el resto de los carbonos se observan como terciarios; el total de las asignaciones se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales señales de RMN del ^{13}C para glucopiranosas α y β .

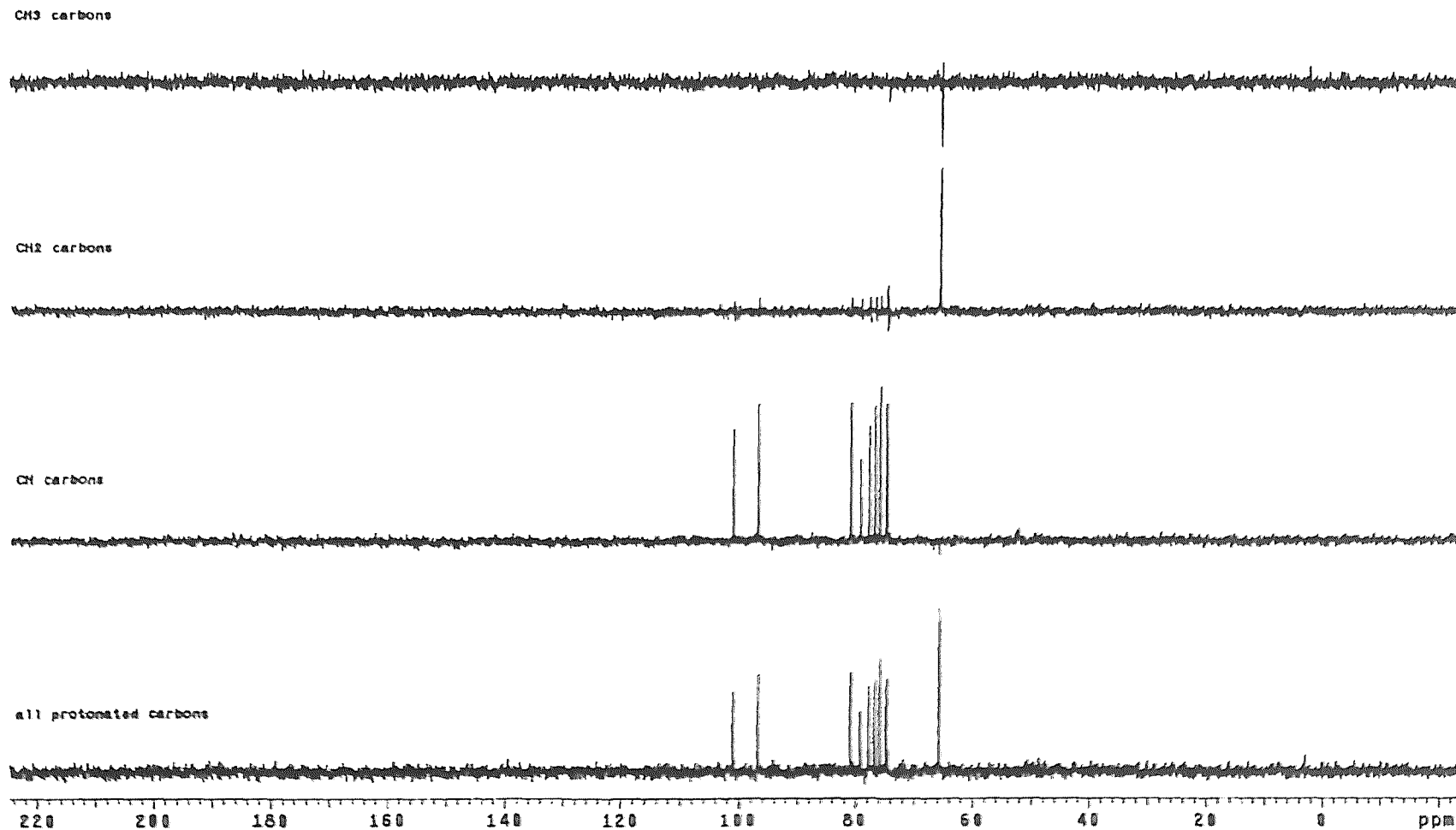
Carbono	ppm*	ppm**
1	94.02	98.26
2	76.38	73.96
3	78.18	74.96
4	71.95	71.82
5	78.12	73.07
6	62.86	62.98

* anómero α ** anómero β

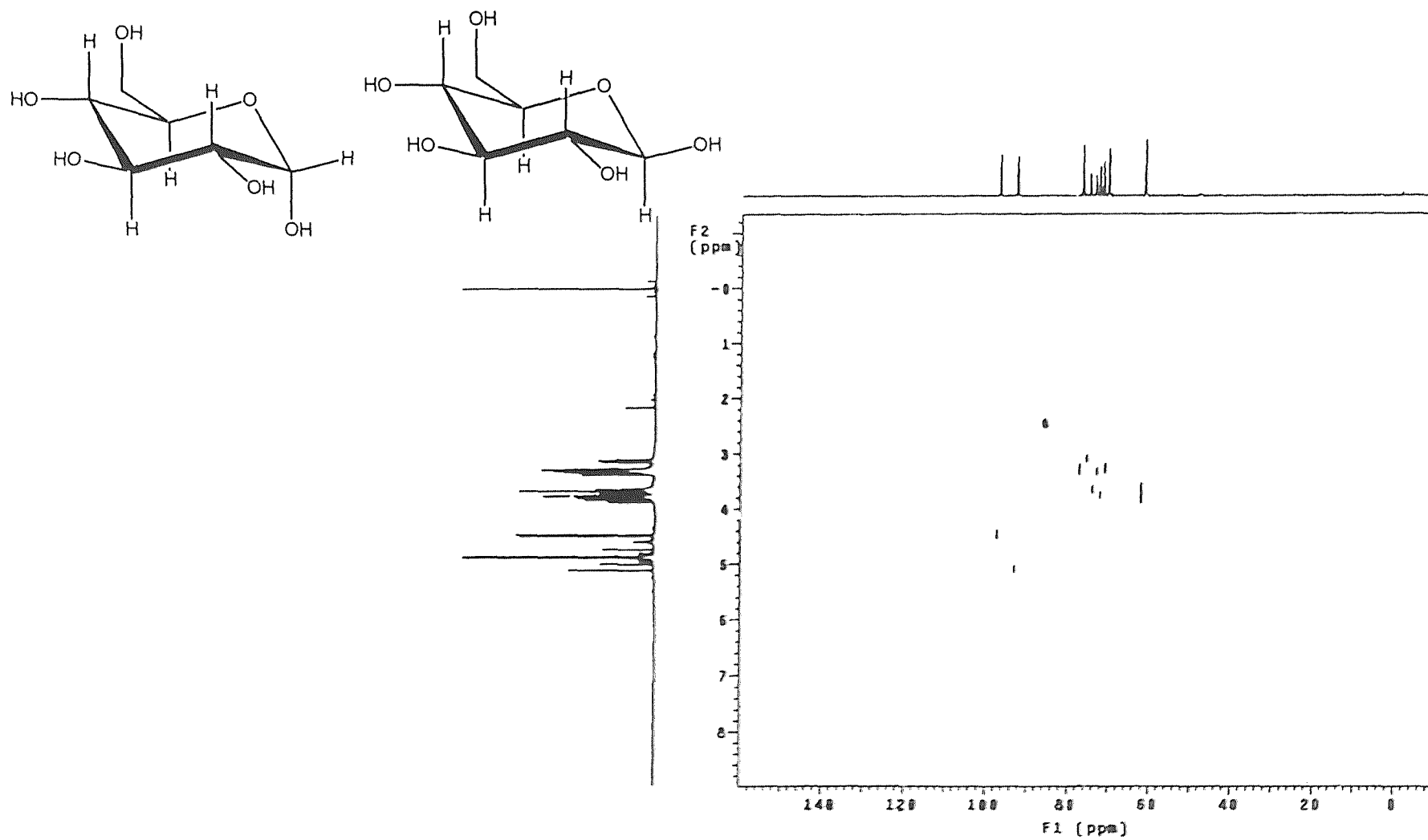
Con el experimento HMQC (Espectro 8), se confirmaron todas las correlaciones de los carbonos con los respectivos subgrupos de protones y con el HMBC (Espectro 9), se pudo corroborar que debido a que no se encontraron correlaciones a tres enlaces entre H-1 del anómero α con el C-3 del anómero β , ni tampoco entre el hidrógeno H-3 del anómero β con el C-1 del α ; razón por la que se trata de una mezcla de α y β -D-glucopiranosas y no de un disacárido, por lo que se trata de la glucosa de la cebolla que no logró fermentarse, pero sí en presencia de la condición ácida del medio de cultivo empleado sufrió una mutarrotación.



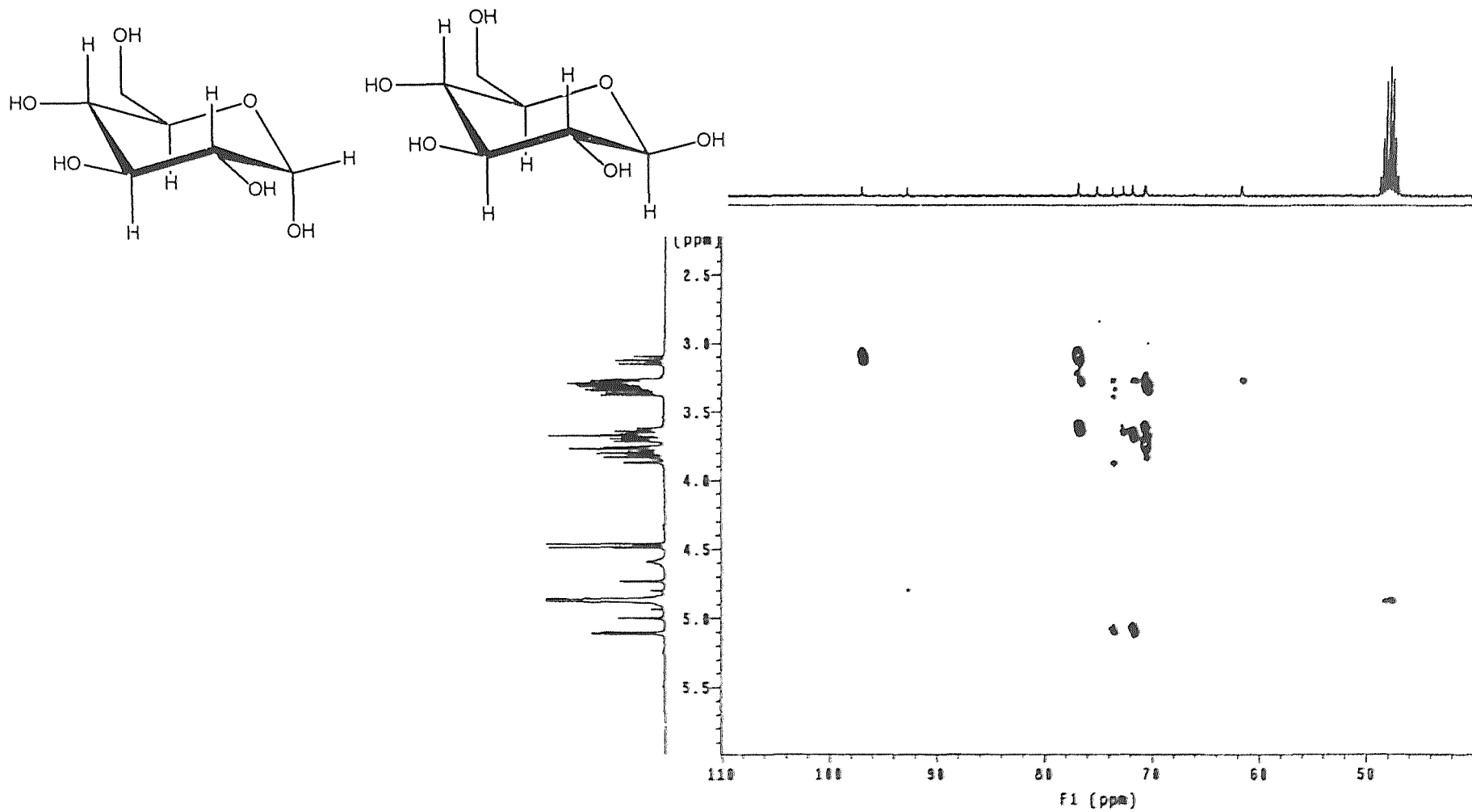
Espectro 6. RMN ^{13}C de la α y β -D-glucopiranosas.



Espectro 7. DEPT del ^{13}C α y β -D-glucopiranososa.



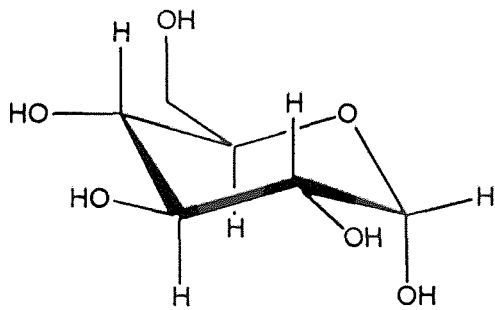
Espectro 8. HMQC de la α y β -D-glucopiranososa.



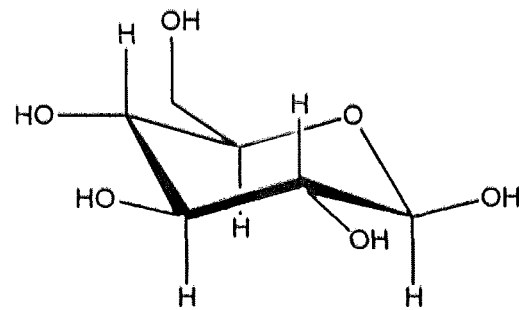
Espectro 9. HMBC de la α y β -D-glucopiranososa.

Esta mutarrotación se lleva a cabo debido a que existen ambas formas isoméricas de la D-(+)-glucosa, la estructura cíclica tiene un centro quiral más que la estructura abierta original de Fischer, la α -D-(+)-glucosa y la β -D-(+)-glucosa los cuales son diasterómeros, puestos que difieren en configuración en torno al C-1. Un par de diasterómeros de este tipo se conoce como anómeros.

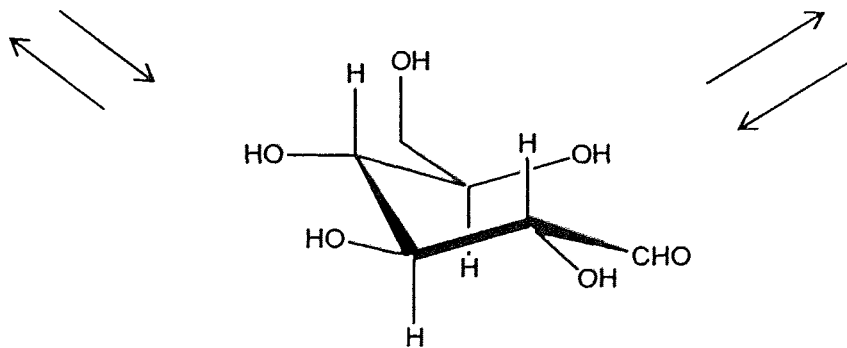
Como hemiacetales que son α y β -D-(+)-glucosa, se hidrolizan fácilmente en medio acuoso ácido, en estas condiciones se convierte cada uno de estos anómeros en una mezcla equilibrada que contiene ambos isómeros cíclicos, lo que sucede a través de la forma de cadena abierta. La fácil apertura y cierre del anillo hemiacetalítico es entonces la causa de la mutarrotación.



α -D-glucopiranososa



β -D-glucopiranososa



Forma de cadena abierta

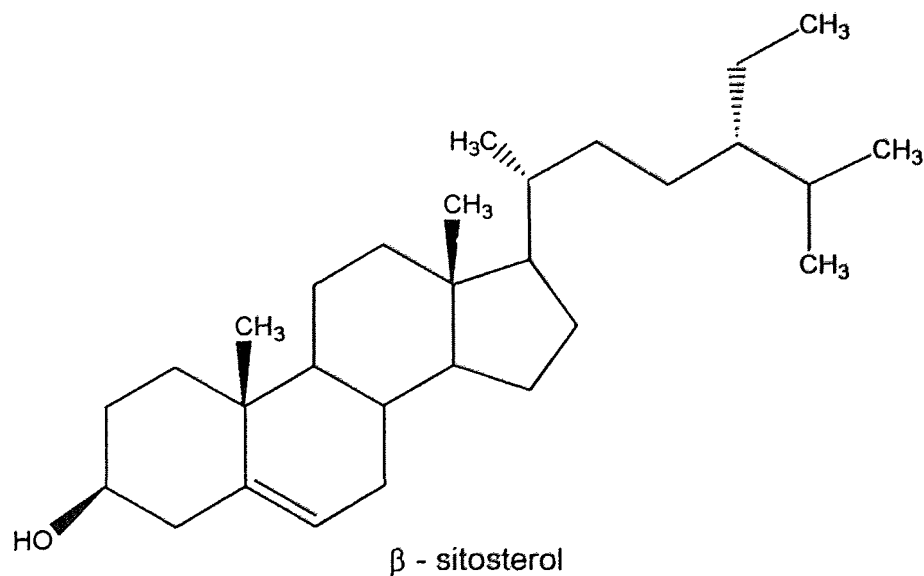
CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

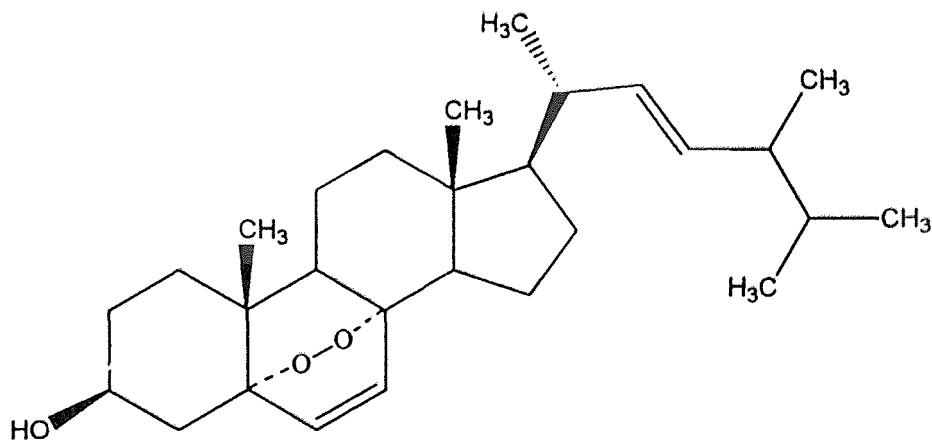
- Se logró el cultivo sobre infusión de cebolla en condiciones cercanas a las naturales del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk.
- La curva de crecimiento del hongo nos permitió conocer en que momento se alcanza la fase estacionaria, y así contar con un parámetro de referencia en la producción de metabolitos.
- Del estudio químico del cultivo masivo del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk se logró el aislamiento de dos esteroides y una mezcla de monosacáridos. Estos compuestos fueron extraídos y purificados por métodos convencionales de laboratorio y la elucidación de sus estructuras se llevó a cabo por métodos espectroscópicos de RMN.

El primer esteroide aislado resultó ser β -sitosterol, un metabolito secundario común en las plantas, pero que también se ha reportado que lo producen algunas especies de hongos como son: *Allomyces macrogynus*, *Aspergillus oryzae*, *Candida sp.*, *Cutills*, *Fusarium sporotrichioides* y otros (Cole et al., 2003; Pouchet and Behnke, 1993).



Algunas fuentes reportan que el β -sitosterol puede usarse en el tratamiento de la hiperlipidemia y el adenoma prostático; así mismo actúa como inhibidor de la absorción del colesterol y de la carcinogénesis (Budavari, 1996; Cicero *et al.*, 2003; <http://home.worldonline.es/biosport/docs/dietinox.htm>).

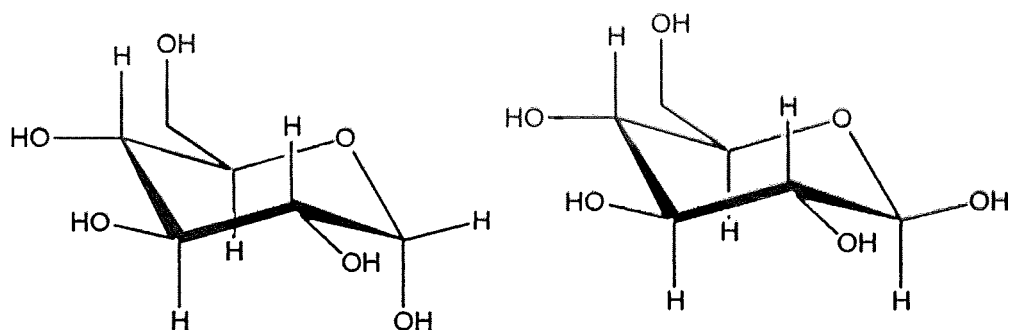
Mientras que el otro esteról aislado fue el $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi ergosta-6,22-dien-3 β -ol, mejor conocido como peróxido de ergosterol, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el reino Fungi y se produce a partir del ergosterol a través de la oxidación del sistema diénico del anillo β por una especie reactiva de oxígeno (oxígeno singulete) por medio de una ciclo adición tipo Diels-Alder. Este esterol, es considerado en algunas ocasiones como un artefacto de los procesos de extracción, aunque no queda del todo claro esta afirmación, no obstante, tanto el ergosterol como su peróxido, son dos sustancias bioactivas de gran interés. Así, el ergosterol es un precursor sintético de la vitamina D_2 y antioxidante natural semejante a la vitamina E.



$5\alpha,8\alpha$ -epidioxi ergosta-6,22-dien-3 β -ol
Peróxido de ergosterol.

Por otro lado, al peróxido de ergosterol se le han atribuido también cualidades antioxidantes y antitumorales como en la hiperplasia prostática, células tumorales gástricas y de colon, además de mostrar acción antibiótica contra la tuberculosis (Cantrell, 1999; Woldemichael, 2003).

Adicionalmente, los azúcares aislados e identificados a través de un minucioso estudio por técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC y HMQC) mostró la presencia de una mezcla constituida por α y β -glucopiranosas. Lo que demuestra que durante el tiempo de cultivo (24 días) no se logró el consumo total de la fuente de carbono, sin embargo, sí se presentó hidrólisis de los carbohidratos poliméricos, debido a esto probablemente no se lograron identificar otros metabolitos secundarios procedentes del cultivo en infusión de cebolla del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk (Budavari, 1996; Pouchet and Behnke, 1993; Rodríguez, 1998).



Estructura de la α y β -glucopiranosas.

Finalmente, si bien no hemos encontrado sustancias nuevas o conocidas con toxicidad, se puede concluir que la cebolla infestada por este hongo no son un riesgo a la salud; sin embargo, el *Sclerotium cepivorum* Berk también produce metabolitos como peróxido de ergosterol y β -sitosterol a los cuales se les han adjudicado ciertas propiedades funcionales, por lo que un consumo voluntario o involuntario podrían ayudar a mejorar o evitar ciertos padecimientos.

CAPÍTULO IX

APÉNDICE

9. APÉNDICE

9. 1 Medios usados

9. 1. 1 Medios sólidos.

9. 1. 1. 1 Agar papa dextrosa (PDA).

Medio para propagar cepas fúngicas.

Usar las siguientes proporciones (g/l):

39 g de agar PDA.

1000 ml de agua destilada.

Procedimiento:

Mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente hasta disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121° C durante 15 min.

pH final 5.6 ± 0.2.

9. 1. 1. 2 Agar papa-zanahoria (PZA).

Medio de cultivo mínimo para cepas fúngicas.

Usar las siguientes proporciones (g/l):

20 g de papa

20 g de zanahoria

20 g de agar

Procedimiento:

Lavar y pelar las papas y zanahorias, cocinar con agua destilada. Después de la cocción se filtra y se exprime usando un paño limpio (pañalina o franela). La infusión se afora a las proporciones deseadas. Puede dejarse en forma líquida al no agregar agar, o, sólida con el agar. Distribuir en cajas Petri y esterilizar a 121° C durante 15 min.

9. 1. 1. 3 Medio Czapec-Dox.

Usar las siguientes proporciones (g/l):

Sucrosa.	30 g
Cloruro de potasio (KCl).	0.5 g
Nitrato de sodio (NaNO ₃).	2.0g
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄).	1.0g
Sulfato de magnesio pentahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O).	0.5g
Sulfato férrico (FeSO ₄).	0.01g
Agar.	20.0g
Agua destilada.	1,000 ml
Sulfato de zinc (ZnSO ₄).	1.0 ml al 1%
Sulfato cúprico (CuSO ₄).	1.0 ml al 5%

Procedimiento:

En un matraz se vierte primero ZnSO₄ y el CuSO₄ y después los demás compuestos menos la sucrosa y el agar. Se calienta durante 15 minutos en baño María hasta la completa disolución de las sales; la

sucrosa se disuelve por separado y cuando ya está fría se le agrega junto con el agar. Finalmente se esteriliza en autoclave y se distribuye en cajas Petri o en matraces; no debe filtrarse, esterilizar a 121° C durante 15 min.

9. 1. 1. 4 Medio agar cebolla

Usar las siguientes proporciones (g/l):

300 g de cebolla (deben estar frescas).

20 g/l de agar base (opcional).

1 000 ml de agua destilada.

Preparación:

Las cebollas se lava a chorro de agua y se eliminan las partes secas, la raíz y el tallo, se pica finamente la cantidad requerida (300 g/l) y se lleva a ebullición con agua destilada (aspecto transparente), no sobrecocer. La infusión se filtra (evitando las partes leñosas de la cebolla), se afora a la cantidad deseada, si se requiere en forma sólida agregar agar base 20 g/l y se esteriliza. Distribuir en cajas Petri y esterilizar a 121° C durante 15 min.

9. 1. 2 Medios líquidos

9. 1. 2. 1 Infusión papa dextrosa

Usar las siguientes proporciones (g/l):

Papa pelada..... 300 g.

Dextrosa.....20 g.

Agua destilada.....c.b.p. 1000ml.

pH final entre 5.5 - 5.6.

Preparación:

Las papas peladas y cortadas en cubitos se cocinan hasta ebullición en 500 ml de agua destilada, durante 30 minutos, filtrar con gasa, ajustar el volumen filtrado a 1000 ml y agregar la dextrosa. Esterilizar a 121° C durante 15 min.

9. 1. 2. 2 Infusión de cebolla

Usar las siguientes proporciones (g/l):

300 g de cebolla (debe estar fresca y libres de pudrición por bacterias u hongos).

18 g de agar (opcional).

c.b.p. 1 000 ml de agua destilada.

Preparación:

La cebolla se lava a chorro de agua y se eliminan las partes secas, la raíz y el tallo. Se pica finamente y se lleva a ebullición con agua destilada sin sobrecocer. La infusión se filtra con tela de gasa. El filtrado se afora a la cantidad deseada con agua destilada. Y se esteriliza a 121° C durante 15 minutos. Para medio sólido se añade agar base en proporción de 18g/l de medio.

9. 1. 3 Colorante Azul de Lactofenol

Se usa para teñir estructuras hialinas como hifas y conidios de hongos dermatofitos.

Usar las siguientes proporciones (g/l):

Para 100 ml

100 ml de lactofenol

1.5 ml (al 1% en solución acuosa) azul de algodón

20 ml de ácido acético

CAPÍTULO X

COMPOSICIÓN DE LA CEBOLLA

10. COMPOSICIÓN DE LA CEBOLLA

Composición química (del bulbo de cebolla).

Allium cepa L- (*A. ascanolicum* L.).

La cebolla pertenece a la familia de las liliáceas, sus componentes químicos son muy parecidos a los del ajo y puerro, es por esto que el hongo *Sclerotium cepivorum* ataca a este tipo de alimentos.

La cebolla contiene compuestos sulfurados: alicina, capaeno-1 y derivados cíclicos del hexano, butano y etiltritiahexano. Sustancias proteicas: aliína, 2-carboxipropilglutación. Compuestos alicíclicos: derivados de la ciclopentadiona. Aceite esencial (0,015 %): al igual que el ajo, contiene disulfuro de alilpropilo (proveniente de la alicina y su antecesor, aliína) y metilaliltrisulfato. Flavonoides: quercetin. Otros: fructosano (10-40 %), agua (87 %), azúcares reductores, sacarosa (muy pequeña cantidad), glucoquinina, pectina, inulina, acroleína, adenosina (alcaloide), arbutina (un bencenoide), oxalato de calcio, trazas de vitamina A y B, vitamina C (8-10 %), ácido trihidroxioctadecenoico, minerales, enzimas (diastasas, oxidasas), difenilamina, aldehído tiopropiónico etc. Las hojas también contienen vitamina C, incluso 3 veces más que el bulbo. (Alonso, 1998).

Composición química por 100g de porción comestible.

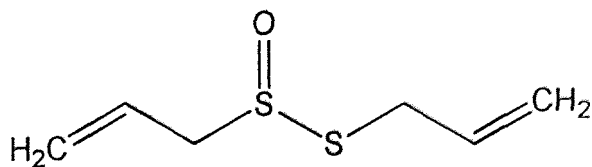
Producto	Cebolla
Valor energético	45.00 cal
Humedad	88 %
Proteínas	1.40 g
Grasas	0.20 g
Carbohidratos totales	9.70 g

Fibra	0.80 g
Cenizas	0.60 g
Calcio	30.00 mg
Fósforo	40.00 mg
Hierro	1.00 mg
Vitamina A	5.00 mcg
Tiamina	0.04 mg
Riboflavina	0.03 mg
Niacina	0.30 mg
Ácido ascórbico	10.00 mg

Principales compuestos en la cebolla.

Alicina.

La alicina (dialil tiosulfinato; tio-2-propene-1-ácido sulfínico-S-alil éster) se forma por la acción de la enzima alinasa sobre el sustrato aliína [S-(2propenil)-L-cisteína sulfóxido]. La reacción ocurre solo cuando las células del ajo están desintegradas, liberando la enzima para que actúe sobre el sustrato. Una reacción similar ocurre en la cebolla excepto por que el sustrato es S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido, siendo uno de los principales productos el tiopropenal-S-óxido. (Doyle, 1996).



Formula del dialil tiosulfinato

Acroleína (propenal)

Es un líquido incoloro, transparente, inflamable y volátil a temperatura ambiente. Miscible en agua y en disolventes orgánicos. Tiene un olor picante y sofocante. Es un poderoso lacrimógeno. Tiene un punto de ebullición de 52.5° C y un punto de fusión de -87.7° C. Se polimeriza fácilmente.

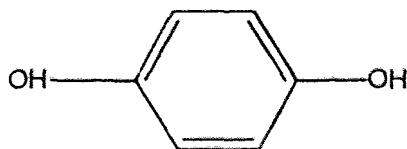
La acroleína se utiliza principalmente para la producción de D, L-metionina (aminoácido esencial que se usa como complemento en la alimentación animal) y ácido acrílico (usado en la fabricación de acrilatos). También se utiliza como biocida acuático de amplio espectro y muy efectivo, por ejemplo, para la desinfección de aguas residuales. Debido a su bajo umbral de olor e irritación se adiciona, como agente de advertencia, a otras sustancias altamente tóxicas.

La gayuba (Arctotaphylos uva-ursi)

En su composición química se encuentran abundantes taninos gálicos, ácidos fenólicos, triterpenos y flavonoides, y, como principio activo, heterósidos fenólicos, principalmente arbutósido que se hidroliza a nivel intestinal liberando una enzima, la hidroquinona; va acompañado de su derivado metilado, el metil-arbutósido.

Glucoquinona o hidroxiquinona

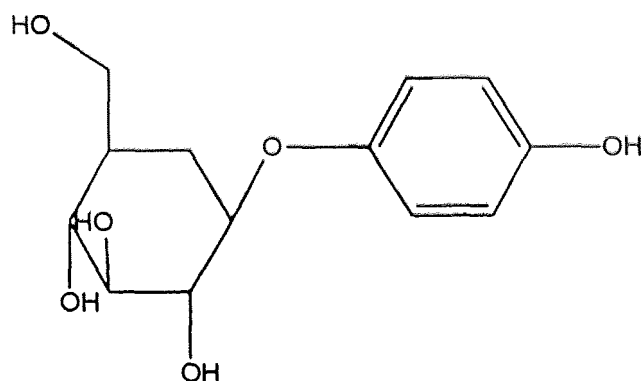
Es una hormona producida por la cebolla, el arandano, entre otros vegetales. Posee propiedades similares a la insulina ya que al ser inoculada en seres humanos es capaz de reducir la concentración de glucosa en sangre.



Estructura base de la hidroxiquinona.

Arbutina

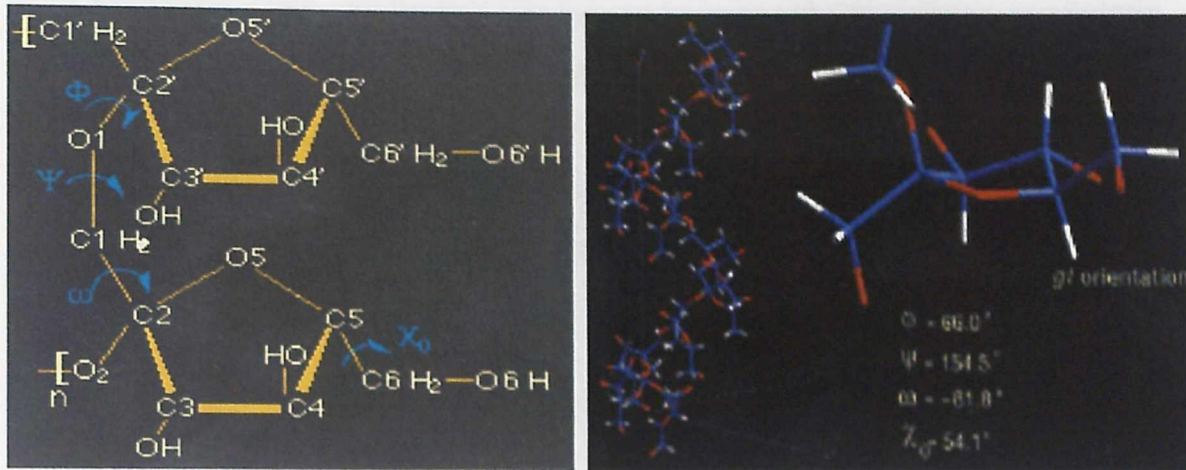
Glucósido hidroquinónico extraído de las hojas de la *Bergenia crassifolia*, del arándano, del *Arctostaphylos uva ursi* y de otras plantas.



Molécula de arbutina.

Fructosano o inulina

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos naturales que contienen fructosa y se encuentran en plantas como la achicoria (raíz), las dalias (raíz), cebollas, ajos, espárrago, plátano y alcachofas, entre otros muchos. Se componen de una cadena de unidades de fructosa con una unidad de glucosa terminal. La longitud de la cadena polimérica puede variar entre 2 y 60. La oligofructosa (FOS) es definida como una fracción de oligosacáridos con



Estructura base de la inulina <http://www.chemedia.com/frutooli.htm>

Componentes del ajo.

El ajo contiene una cantidad inusualmente alta de compuestos de sulfuro comparados a otras plantas y estos compuestos y sus productos de reacción son sus componentes más activos. El contenido total del sulfuro en el ajo está cerca de 1% de su peso seco. El compuesto activo más importante, alicina, no está realmente presente en ajo fresco. Alicina es relativamente inestable, y es producido por una cascada de las reacciones químicas que ocurren cuando se corta o se machaca rompiendo así las células del ajo fresco. Debido a la inestabilidad inherente de alicina, es necesario usar esta tecnología propietaria de fabricación la cual preserva cuidadosamente el potencial alicina en el cuerpo, más específicamente en el intestino delgado.

(http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_sea).

corta o se machaca rompiendo así las células del ajo fresco. Debido a la inestabilidad inherente de alicina, es necesario usar esta tecnología propietaria de fabricación la cual preserva cuidadosamente el potencial alicina en el cuerpo, más específicamente en el intestino delgado.

(http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_sea).

Quercetin

Quercetin pertenece a un grupo de pigmentos de la planta llamado flavonoides que son principalmente responsables de los colores de muchas frutas y flores. Quercetin trabaja como antihistamínico y antioxidante.

<http://www.healthandage.com/html/res/com/ConsSupplements/Quercetincs.html>

CAPÍTULO XI BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams P. B. 1987. Effects of soil temperature, moisture, and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum*, and *Sporidesmium sclerotivorum*. Pl. Prot. Inst., Agric. Res. Service, USDA, Beltsville. Plant Disease. 71 (2): 170-174.
2. Agrios G. N. 1999. Fitopatología. 2ª ed. Ed. UTHEA Noriega Editores. México, D. F. pp. 127-135.
3. Aldrich J., R. Baker. 1970. Control of *Fusarium roseum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. Repr. 54: 446-448.
4. Alegría T. J. A., P. Ponce N. y A. Flores M. 2003. Caracterización bioquímica y molecular de la proteína de desarrollo Sc1 de *Sclerotium cepivorum* Berk. V Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Universidad de Guanajuato. Querétaro.
5. Alexopoulos C. J., C. W. Mims. 1985. Lecciones hipertextuales de Botánica. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/deuterom.htm>
6. Alexopoulos C. J. 1982. Introducción a la Micología. 3ª ed. Ed. Universitaria, Buenos Aires. pp. 346-348.
7. Alonso J. R. 1998. Tratado de Fitomedicina - Bases Clínicas y Farmacológicas. Ed Isis. <http://www.holistica2000.com.ar/Cebolla.html>

8. Arora D. K., R. P. Elander., K. G. Mukerji. 1992. Fungal Biotechnology. Handbook of Applied Micology. Ed. Dekker. Nueva York. 4: 270-274.
9. Aycok R. 1987. Summation of Symposium on *Sclerotium rolfsii*. Phytopath. 51: 107-108.
10. Backhouse D., A. Stewart. 1987. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Bot. Dep., Univ. Auckland. Transactions of the British Mycological Society. 89 (4): 561-567.
11. Budavari S. 1996. The Merck Index. 12th ed. Ed. Merck & Co. Merck Research Laboratories. Nueva Jersey. pp. 562, 758 y 1467.
12. Burnett J. H. 1976. Fundamentals of Mycology. Ed. Crane Russaka & Company. Inc. Londres. pp 21-35.
13. Bushell M. E., U. Grafe. 1989. Bioactive Metabolites from Microorganisms. Publisher Elsevier. Ed. Hardcover. Nueva York. pp. 23-25.
14. Cancela S. G. 1995. Estudio químico del hongo *Russula olivacea*. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. Xalapa. pp. 21-25.
15. Cantrell C. L., Rajab M. S., Franzblau S.G., Fronczek FR., Fischer NH. 1999. Antimycobacterial ergosterol-5, 8-endoperóxide from *Ajuga remota*. Plant. Med. 65 (8):732-4.

16. Carbone I., L. Kohn. 1993. Ribosomal DNA sequence divergent within transcribed spacer of the *Sclerotiaceae*. *Mycologia* 85 (15): 427.
17. Castellano G. 2000. Variedades de pimentón tolerante a la pudrición blanca en condiciones naturales de infección. FONAIAP. Maracaibo.
<http://www.fonaipa.gov.ve/publica/divulga/fd61/pimiento.html>
18. Castillo H. J. A., R. Sánchez G., E. Speck G., E. R. Ledón R., C. Portilla V. 1992. Procedimiento para separar indio de cobre y hierro mediante resinas de intercambio iónico. CNIC. Cubanacán,
19. Cedeño L., H. Nass., C. Carrero., R. Cardona., H. Rodríguez y L. Alemán 1997. *Sclerotium hydrophilum* en arroz en Venezuela. *Acta Científica Venezolana*. Mérida. 10: 9-12.
<http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/v101/1001f003.html>
20. Cedeño L., E. Palacios-Pru. 1992. Características Ultraestructurales de *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca del ajo en Venezuela. *Acta Científica Venezolana*. 43 (3): 178-189. Táchira.
21. Cicero-Arrigo F. G., M. Minardi., E. Pedro., A. Gaddi. 2003. A new low dose Soy Protein/b-Sitosterol association significantly reduces plasma LDL-C levels versus baseline LDL-C concentrations. University of Bologna. <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/tl066/tl066.htm>
22. Cole R. J., B. B. Jarvis., M. A. Schweikert. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites. Vol. I, II y III. Ed. Academic Press. Londres. pp. 15, 128, 137, 164.

23. Craig C. R., R. E. Stitzel. 1982. Modern Pharmacology. Ed. Little, Brown and Company Boston. Boston.
24. Czop J. K. Department of Medicine, Harvard Medical School. Glucopiranósido formado por β -1,3-D-glucosa con una cadena lateral de β -1,6-D- glucosa. Boston. Obtenido de la red.
http://www.foodnews.ch/x-plainmefood/20_lebensmittel/Scleroglucan.html
<http://www.beta-glucan-info.com/gen-reach.htm>
25. Dawood M. K., E. A. Sadik. 1985. In vitro and in vivo production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum*. Dep. Agric. Bot., Fac. Agric., Mansoura Univ. Journal of Agricultural Sciences, Mansoura University. Mansoura. 10 (1): 109-114.
26. Decon J. 1988. Introducción a la Micología Moderna. 1ª ed. Ed. Noriega. México D. F. pp. 37, 115, 140.
27. Delgadillo-Sánchez F., A. Heredia-Zepeda., E. Zavaleta-Mejía., V. A. González-Hernández., I. Torres-Pacheco., D. Nieto-Ángel., S. Osada-Kawasoe. 2001. Susceptibilidad de diferentes tipos de ajo (*Allium sativum* L.) A *Sclerotium cepivorum* Berk. Revista Chapingo. Serie Horticultura. Tlaxcala. Vol. VII (2) p. 171.
<http://www.chapingo.mx/revistas/chapingo/contenido.php?vol=VII&id=14>
28. Díaz P. C., J. L. Castro. 2000. Agronomía Tropical. 27(5): 539-547. Agaricua. http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v27_5/v275a006.html

29. Dirzo R. 1996. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ed. Alquimia Visual, S. C. México D. F. p. 159
30. Ditinox. Medicamento.
<http://home.worldonline.es/biosport/docs/dietinox.htm>
31. Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T.J. 1996. Microbiología de los alimentos. Ed Acribia, S. A. México D. F. p. 563.
32. Domínguez G. F. 1993. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 9ª ed. Ed. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, pp. 528-530.
33. Donaire J. P., M. P. Rodríguez-Rosales., M. J. Soto., J. San-Juán., J. Olivares. 1999. Effect of fusicocan on the early infection process of legume roots by Rhizobium spp. Molecular Plant Microbe Interaction. 12: 1090-1094. <http://www.eez.csic.es/inves/grupos/B1.htm>
34. El cultivo de la cebolla (Obtenido en la web apartados del 10.1.4. al 10.2.5.) <http://www.nortecastilla.es/canalagro/>
35. Escoto-Chávez S. E., C. Cano C., A. Flores M., P. Ponce N. 2003. Obtención de marcadores moleculares para la identificación de *Sclerotium cepivorum* Berk Agente causal de la pudrición blanca del ajo. V Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Universidad de Guanajuato. Querétaro.
36. Estructura del ergot.
http://www.vetpharm.unizh.ch/giftdb/pflanzen/0021_vet.htm
37. Estructura base de la inulina <http://www.chemedia.com/frutooli.htm>

38. Farina J. I., F. Sineriz., O. E. Molina., N. I. Perotti. 2001. Aislamiento y características fisicoquímicas de escleroglucano soluble de *Sclerotium rolfsii*, propiedades reológicas, peso molecular y características conformacionales. PROIMI. San Miguel Tucumán. 44(1): 41-50.
39. Favaron F., C. Castiglioni., R. D'Ovidio., P. Alghisi. 1997. Polygalacturonase inhibiting proteins from *Allium porrum* L. and their role in plant tissue against fungal endo-polygalacturonases. *Physiol-mol-plant-pathol*. Academic Press. Londres. 50 (6): 403-417.
40. Frisvad J. C., P. D. Bridge., D. K. Arora. 1998. Chemical Fungal Taxonomy. Ed. Marcel Dekker, Inc. 10^a ed. Nueva York. pp. 94-97.
41. García G. M., R. R. Quintero., C. A. López-Munguía. 1999. Biotecnología Alimentaria. 2^a ed. Ed. Limusa. México D. F. pp. 20, 21, 351.
42. Gonsalves A., K. Ferreira. 1994. Patógenos y Plantas. Universidad de Hawaii. Manoa.
http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/scl_pri2.htm&prev=/search%3Fq%3DSclerotium%2Bcepivorum%2Band%2Btaxonomy%2B%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26oe%3DUTF-8%26sa%3Dn
43. González J. A., J. Renand C. 1968. Supervivencia de *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones de inundación. 7^{aa} ed. Jornadas Agronómicas. Táchira.
44. Griseofulvina obtenida de la red.
<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/images/griseofulvina.gif>

45. Guzmán G. 1994. "Algunos aspectos importantes en la ecología de los hongos (en especial de los macromicetos)". Veracruz. Rev. Mex. Mic. 5: 17.
46. Guzmán G. 1997. La diversidad fúngica en México. Ed. Limusa. México D. F. pp. 17-23.
47. Guzmán L. O. 2001. Obtención de esteroides de la fracción insaponificable del extracto clorofórmico a partir del hongo *Papulospora immersa*. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. Xalapa. pp. 31-36.
48. Harborne J. B. 1982. Phytochemical Methods. 2ª ed. Academic Press. Londres. pp. 89-105, 212,213.,
49. Harper G. E., C. M. Frampton., A. Stewart. 2002. Factores que influyen en la supervivencia de *Sclerotium cepivorum* en tierras de Nueva Zelanda. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 30: 29-35.
50. Hawksworth L. D. 1997. The critical role of fungi in the conservation of biodiversity. Sociedad Mexicana de Micología.
51. Herrera T., M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1ª ed. Ed. UNAM. México D. F. pp 182-185.
52. Holst-Jensen A., L. M. Kohn. Nuclear rDNA phylogeny of the *Sclerotiaceae*. Mycologia. Ontario. 89(6): 885-899. 1998.
53. Información para la red nacional hortofrutícola. 2002. Resumen: Panorama hortícola. 1: 7. INDAP.

http://www.sitec.cl/boletines/hortalizas/panorama_horticola_n/.doc

54. Intercambio iónico.

http://www.tecnociencia.es/fecyt/especiales/intercambio_ionico/introduccion.html

55. Isaac S. 1992. Fungal-Plant interactions. Ed. Academic Press, Inc. Nueva York.

56. Jackson A. M., J. M. Whipps., J. M. Lynch. 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential - *Gliocladium virens*, *Trichoderma viride* and *Trichoderma pseudokoningii* biological control agent against *Sclerotium cepivorum* white-rot fungus. Horticulture Research International, Microbial Biotechnol. 7, 4, 494-501.

57. Jackson A. M., J. M. Whipps., J. M. Lynch., M. J. Bazin. 1991. Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. Horticulture Research International. Biocontrol Science and Technology. 1 (1): 43-51.

58. Jiménez-Díaz R. M. 1998. Control de enfermedades. Ed. Mundi-Prensa. Córdoba.

59. Jiménez-Díaz R. M. 2001. Retos de la Fitopatología en el contexto actual de la Sanidad Vegetal en la Agricultura Sostenible. Madrid. pp. 1-8.
<http://tepidum.udg.es/sef/retos.htm>

60. Jiménez-Díaz R. M.; J. Lamo E. 1997. Agricultura Sostenible. Agrofuturo, Life. Edit. Mundi-Prensa. Madrid.
61. Keeler R. F., A. T. Tu. 1983. Handbook of Natural Toxins. Ed. Marcel Dekker. Vol. I. Inc. Nueva York.
62. Latorre G. B. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas. 5ª ed. Ed. Alfaomega, Universidad Católica de Chile. México D. F. pp. 283-284.
63. Leyva M. S. G., G. Ponce F., Z. Mendoza C. 1999. Manual de micología taxonómica. Universidad Autónoma de Chapingo. Tlaxcala. pp. 26-31, 211.
64. Lucker M. 1984. Secondary Metabolim in Plants and Animals. 2ª ed. Ed. Academic Press. Inc. Nueva York. pp. 543-545.
65. Macias S. I., C. Calvo M., P. Arteaga N., P. Ponce N., A. Flores M. 2003. El papel de las poliaminas durante el desarrollo de *Sclerotium cepivorum* Berk. V Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Universidad de Guanajuato. Querétaro.
66. Mann J. 1987. Secondary Metabolim. 2ª ed. Science. Publications. Oxford.
67. Martínez M. 1993. El bulbo de ajo y sus limitaciones fitopatológicas como semilla en el país. Fondo Nacional de Investigación Agropecuaria. Estado de Lara. FONAIIPA divulga. N. 44.
<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd44/texto/bulbo.htm>

68. Moreno B., R. Acevedo. 2002. Patogenic characterization and study of the myceliar groups of compatibility in *Sclerotium cepivorum* Berk. Rev. Iberoam. Micol. (19): 115-119. San Cristóbal.
<http://www.reviberoammicol.com/2002-19/p115119ps.shtml>
69. Muntañola M. 1999. Guía de los hongos microscópicos. Ed. Omega. Barcelona.
70. Nogrady T. 1988. Medical Chemistry. Ed. Oxford University Press. Oxford.
71. Orsi N., M. Marchetti., S. Pisani., V. Pietropaolo., L. Seganti. 1996. Dialog Chem. Planta Med. Roma. 62 (4): 303-307.
72. Pascual-Anderson M. R., V. Calderón P. 2001. Microbiología Alimentaria. 2ª ed. Madrid. pp. 141-143.
73. Patología General 2º - 00/01
<http://216.239.53.100/search?q=cache:iYfORO0xHdcC:www.pdipas.us.es/j/iosurbfue/Fitopatologia/Pato23.PDF+ciclo+vital++sclerotium&hl=es&ie=UTF-8>
74. Pérez-Moreno L., V. Olalde-Portugal, J. G. González-Salinas, J. R. Sánchez-Pale y A. R. Entwistle. 1994. Current Known Distribution of *Rot Sclerotium cepivorum* Berk In México. Revista Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV-IPN, Irapuato. 12 (1): 55-58.

75. Pérez-Moreno L., J. R. Sánchez-Pale y A. R. Entwistle. 1998. Control de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) del ajo (*Allium sativum* L.) con Esterilizantes en la Zona del bajo, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 16 (2): 72-77.
76. Pérez-Moreno L., V. Olalde-Portugal, G. J. Vandemark, O. Martínez-de-la-Vega, J. P. Martínez-Soriano, G. Vázquez-Marrufo. 2002. Genetic Relationships among Isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. Based on RAPD Analysis. Revista Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV-IPN, Irapuato. 20(2): 187-192.
77. Peroxido de ergosterol
http://www.mifarmacia.es/producto.asp?Producto=../contenido/articulos/articulo_n_equinacea
http://www.puritan.com/vf/healthnotes/HN77/HN77_Spanish/Es-Supp/Beta_Sitosterol.htm
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10630115&dopt=Citation
78. Pinto C. M. F., L. A. Mafia., R. D. Berger., E. S. G. Mizubui., V. W. D. Casali. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. Plant-dis. St. Paul, Minn., American Phytopathological Society. 82 (10): 1142-1146.
79. Plattner P., U. Nager. Helv. Chim. Acta. 1988. 31 (22) 03.
80. Pouchet C. J., J. Behnke. 1993. The Aldrich library of ¹³C and ¹H ft NMR spectra. Vol. I y III. Nueva York, pp. 175, 569 y 3570.
81. Ramos S. G. 1988. Experiencias en el cultivo del ajo en el estado de Mérida. 30. FONAIAP. Táchira.

<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd30/texto/experiencias.htm>

82. Riguera R. 1997. Isolating bioactive compounds from marine organism. Journal of Marine Biotechnology. 5:187-193.
83. Rodriguez V. K. 1998. Estudio del hongo fitopatógeno *Macrophominia phaseolina*. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. Xalapa. pp 31-44.
84. Rosas A. H., Soto H. M., Martínez V. M., Terrazas S. T. Fitoquímica de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht y *Cyrtocarpa procera* H.B.K. UNAM. México D. F.
<http://www.socbot.org.mx/disco/resume/re884.htm>
85. Romero C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. 1ª ed. pp. 342-343.
86. SEMARNAT. <http://www.semarnat.gob.mx>
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/nom/noms/Doc33/>
87. Stone H. E., V. N. Armentrout. 1985. Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. California State Polytechnic Univ., Mycologia. 77 (4): 526-530.
88. Takeuchi M., M. Nakajima., T. Ogita., M. Inukai., K. Kodama., K. Furuya., H. Nagaki and T. Haneishi. 1989. Fosfonochlorin, a new antibiotic with spheroplast forming activity. The Journal of Antibiotics. Vol. XLII. 2:198-205.

89. Trigos A. 1999. Química de los hongos. Producciones de Vitamina D₂ a partir de hongos macromicetos. Aspectos Científicos, Tecnológicos y Económicos. CYTEDCOLCIENCIAS. Ed. Augusto Rivera. Santa Fe de Bogotá.
90. Trigos A., D. Martínez-Carrera. 1994. Hongos comestibles cultivados como fuente de ergosterol. Micol. Neotrop. Apl. 5:11.
91. Trigos A., N. Zambrano. 1992. ¿Nos habremos olvidado de los hongos? Educación Química. 3(4): 290-297.
92. Turner W. B. 1971. Fungal Metabolites. Ed. Academic Press. Londres. pp. 270-273.
93. Turner W. B., D. C. Aldridge. 1983. Fungal Metabolites II. Ed. Academia Press. Londres. p. 22-29, 214-218.
94. Tyson J. L., H. J. Ridgway., R. A. Fullerton., A. Stewart. 2002. Diversidad genética en las poblaciones de *Sclerotium cepivorum* en Cantorbery Nueva Zelanda. Diario de Nueva Zelanda de la cosecha y de la ciencia hortícola. 30: 37- 48.
<http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.rsnz.govt.nz/publish/nzichs/2002/004.php&prev=/search%3Fq%3Dsclerotium%2Bcepivorum%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26oe%3DUTF-8%26sa%3Dn>
95. Vértesy L., H-J. Burguer., J. Kenja., M. Knaue., H. Kogler., E. F Paulus., N. V. S. Ramakrisna., K. H. S. Swamy., E. K. S., Vijayakumar and P. Hammann. 2000. Kodastain, novel inhibitors of glucose-6-phosphate

translocase T1 from *Aspergillus terreus* Thom DSM 11247. Isolation and Structural Elucidation. The Journal of Antibiotics. Vol. 53 No.7:677-686.

96. Webster R. K., P. S. Gunnell. 1992. Compendium of rice diseases. APS Press. St. Paul. Minnesota.

97. Woldemichael G. M., S. G. Franzblau., F. Zhang., Y. Wang., B. N. Timmermann. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium*. Tucson. Plant. Med. 69 (7): 628-31.