

Actividad antifúngica de alcaloides del extracto metanólico de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*

Antifungal activity of alkaloids from methanolic extract of *Jatropha platyphylla* against *Aspergillus parasiticus*

Mario Alejandro Leyva-Acuña¹, Eber Addi Quintana-Obregón¹, Federico Soto-Landeros¹, Karla Marina Baez-Parra², Julio Montes-Ávila², Miguel Angel Angulo-Escalante^{*1}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, km 5.5 Carr. El Dorado-Culiacán, Sinaloa, México, C.P. 80110.

² Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calzada de las Américas Norte 2771, Culiacán, Sinaloa, México, C.P. 80030.

RESUMEN

Los metabolitos secundarios presentes en plantas han demostrado ejercer diversas propiedades biológicas, principalmente el grupo de alcaloides, los cuales han sido investigados por su actividad fungicida, capaz de reemplazar a los productos sintéticos. Las especies del género *Jatropha* han sido estudiadas por su amplia variedad de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano, siendo relevantes en la búsqueda de nuevas alternativas al control de hongos de importancia clínica y alimentaria como *Aspergillus parasiticus*, considerado como una de las principales especies de hongos productores de aflatoxinas. En el presente trabajo se identificó por primera vez por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) la presencia de alcaloides en *Jatropha platyphylla* y se evaluó la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos y alcaloides, a concentraciones de 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg/mL, sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*. Además se determinó su germinación a partir de la CI_{50} de los tratamientos. Se observó una mayor actividad de los alcaloides a 2 mg/mL, con el 80 % de inhibición a las 48 h ($P < 0.05$), con una CI_{50} de 2.7 mg/mL. Estos resultados evidencian a los alcaloides del extracto metanólico de hoja de *J. platyphylla* como posible tratamiento alternativo para el control de *A. parasiticus*.

Palabras clave: antifúngico, extracto, alcaloide, identificación, *Jatropha platyphylla*.

ABSTRACT

Secondary metabolites present in plants have shown diverse biological properties, mainly the alkaloid group, which have been investigated for their fungicidal activity, capable of replacing synthetic products. The species of the *Jatropha* genus have been studied for their wide variety of secondary metabolites with antimicrobial potential, becoming relevant in the search for new control alternatives against fungi with clinical and food importance such as *Aspergillus parasiticus*, considered as one of the main aflatoxin producer-species. In this work, the presence of alkaloids in *Jatropha platyphylla* was first identified by high-resolution thin layer chromatography (HPTLC) and the inhibitory acti-

vity of methanolic extracts and alkaloids was evaluated, at concentrations of 0.01, 0.1, 0.5, 1 and 2 mg/mL, on the radial growth of *A. parasiticus*. In addition, germination was determined from the IC_{50} of the treatments. A higher activity of the alkaloids was detected at 2 mg/mL, with 80 % inhibition at 48 h ($P < 0.05$), with an IC_{50} of 2.7 mg/mL. These results show the alkaloids of the methanolic extract of *J. platyphylla* leaf as possible alternative treatment to the control of *A. parasiticus*.
Keywords: antifungal, extract, alkaloid, identification, *Jatropha platyphylla*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación en productos alimenticios por micotoxinas, es un problema a nivel mundial que genera pérdidas económicas e impacta en la salud de los consumidores (Yogendrarajah *et al.*, 2016). Entre los patógenos de mayor importancia de acuerdo a su distribución están las especies pertenecientes al género *Aspergillus* (Paulussen *et al.*, 2017). *A. parasiticus* es una de las especies predominante en la producción de micotoxinas, principalmente aflatoxinas, en cultivos de maíz, maní, arroz, nueces, semilla de algodón e incluso lácteos (Dasan *et al.*, 2016; El-Nagerabi *et al.*, 2012). Las aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos, las cuales al ser ingeridas pueden ocasionar diversas complicaciones en la salud como hepatotoxicidad, teratogenicidad e inmunotoxicidad (Kumar *et al.*, 2017).

Una estrategia en el control de *A. parasiticus* es la desinfección del suelo y el uso de fungicidas del tipo azoles (Hollomon, 2017; Berger *et al.*, 2017); sin embargo, su uso constante a través de los años ha favorecido la resistencia de los hongos fitopatógenos a estos tratamiento, dificultando su control (Prigitano *et al.*, 2019). Por estas razones, la prevención de contaminación por micotoxinas de los productos agrícolas, así como la búsqueda de estrategias alternativas a los fungicidas convencionales, es una prioridad.

Una alternativa a los tratamientos químicos convencionales, es el uso de productos naturales obtenidos a partir de extractos de plantas, debido a que algunos extractos han demostrado ser eficaces en el control de hongos (El-Ghany *et al.*, 2015). Lo anterior se debe a los grupos de metabolitos

*Autor para correspondencia: Miguel Ángel Angulo Escalante

Correo electrónico: mangulo@ciad.mx

Recibido: 30 de enero de 2020

Aceptado: 6 de julio de 2020

secundarios que poseen las plantas, mismos que normalmente actúan como mecanismo de defensa natural contra patógenos. Algunos de los metabolitos con actividad biológica identificados en principales grupos de plantas son los flavonoides, terpenos, taninos, saponinas y alcaloides (Nandagoapalan *et al.*, 2016). Cabe mencionar que entre ellos destaca el grupo de los alcaloides al poseer una amplia gama de propiedades biológicas, lo cual es asociado a su similitud estructural con los aminoácidos (Roy, 2017). Esto ha motivado el desarrollo de nuevos tratamientos alternativos a partir de este grupo, logrando ser aplicados como antibióticos, antifúngicos y antiparasitarios de origen natural (Barbieri *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2015; Cushnie *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2007; Ogungbe *et al.*, 2013). Por lo tanto, la investigación de nuevas fuentes naturales de moléculas activas como los alcaloides, resulta ser de gran relevancia en la generación de tratamientos eficaces en el control de microorganismos.

México es conocido por poseer una gran variedad de flora, llegando a ocupar el quinto lugar en diversidad a nivel mundial (Olivas-Quintero *et al.*, 2017), a pesar de esto, solo unas cuantas han sido estudiadas por sus actividades biológicas. *Jatropha platyphylla* es una especie endémica de México y está distribuida desde Sinaloa hasta Michoacán (Soto-Landeros *et al.*, 2017). Esta no ha sido previamente evaluada por sus propiedades microbicidas a pesar de los antecedentes en especies de este mismo género, como lo ha sido *J. curcas*. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de extractos metanólicos de hoja y corteza de *J. platyphylla*, y sus alcaloides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto metanólico

La hoja y corteza de *J. platyphylla* fueron obtenidas de especímenes localizados en el Ejido de la Campana (24° 53' 52.3" N; 107° 27' 18.3" W y 94 m.s.n.m) en Culiacán, Sinaloa, México. Las muestras fueron transferidas al Laboratorio de Biorecursos en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Se limpiaron y secaron a temperatura ambiente por una semana y se pulverizaron con un homogenizador (Oster®, Florida, USA). Se pesaron 100 g de harina y se mezcló con metanol grado analítico (J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México) en una relación (1:10) utilizando un agitador orbital S-500 (VWR International, Pennsylvania, USA) por 24 h a temperatura ambiente y ausencia de luz. El extracto se filtró con papel Whatman (No.1) al vacío y se concentró hasta sequedad en un evaporador rotatorio (BUCHI, Flawil, Switzerland) a 365 mbar, 45 °C y 50 rpm para obtener el concentrado alcohólico de hoja y corteza de *J. platyphylla*, el cual se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Tamizaje fitoquímico

La determinación de los grupos de metabolitos secundarios del extracto metanólico crudo de hoja y corteza de *J. platyphylla* se realizó utilizando la prueba de FeCl₃ para la determinación de taninos y gelatina en sal para su confirma-

ción, prueba de Shinoda para la determinación de flavonoides, prueba de Dragendorff, Mayer y Wagner para alcaloides, prueba de espuma para saponinas y finalmente Salkowski y Liebermann para derivados de terpenos, donde el cambio de color o formación de precipitado se utilizó como indicativo de una respuesta positiva a estas pruebas (Maria *et al.*, 2018).

Extracción de alcaloides

Se maceraron 5 g del extracto metanólico de *J. platyphylla* con 50 mL de ácido clorhídrico (10 %) (J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México) por 24 h y se filtró al vacío con papel Whatman (No.1) para remover gomas y ceras. Posteriormente, la fase acuosa ácida se alcalinizó a pH 10 con 100 mL de hidróxido de amonio (J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México) en un embudo de separación y se añadió 50 mL cloroformo (J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México) generando una fase orgánica, la cual fue recuperada y tratada con 50 mL de ácido clorhídrico (10 %), nuevamente se alcalinizó a pH 10 con 100 mL de hidróxido de amonio y se recolectó la fase orgánica. Estos pasos se repitieron tres veces hasta lograr una fase orgánica clarificada con los alcaloides del extracto metanólico de *J. platyphylla*.

Una vez obtenidos los alcaloides en su forma de base libre suspendidos en la fase orgánica, se dejó secar en sulfato de sodio anhidrido (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), finalmente, se adicionó gota a gota ácido tartárico (10 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hasta obtener el precipitado de los alcaloides en su forma de sal (Silva *et al.*, 2013).

Perfil fitoquímico por HPTLC

La determinación de la presencia de alcaloides en la muestra se llevó a cabo por HPTLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland) (Demissie y Lele, 2013). Se disolvieron 100 mg del precipitado obtenido anteriormente en 1 mL de etanol:cloroformo (1:1 v/v), se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 µm (Millex, Darmstadt, Germany) de cada muestra y estándar (lidocaína) se aplicaron 4 µL con un aplicador automático Linomat 5 HPTLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland) sobre una placa de vidrio de silica gel G-25 UV₂₅₄ (10 cm × 10 cm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). La placa se desarrolló en una cámara de HPTLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland) con la fase móvil de cloroformo, etanol y tolueno (4:2:2) en una cámara previamente saturada por 30 min. Una vez alcanzado el frente de solvente (80 mm), la placa se secó con aire frío por 5 min y se escaneó con un densitómetro (CAMAG, Muttenz, Switzerland) a una longitud de 277 nm obteniendo el cromatograma por medio del software visionCATS 2.5. Se colocó sobre una placa de calentamiento a 60 °C por 2 min para evaporar los solventes de la placa y finalmente se asperjó con revelador de Dragendorff (CAMAG, Muttenz, Switzerland), siguiendo la metodología propuesta por Shawky (2013).

Espectroscopia infrarrojo

Se colocaron 10 mg del alcaloide de *J. platyphylla* en el espectrofotómetro Cary 600 FT/ATR (Agilent Technologies,

Ratingen, Germany) y se realizó un barrido de 400-4000 cm^{-1} (Chavan *et al.*, 2015).

Aislados de *Aspergillus parasiticus*

Se utilizó la cepa *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992), la cual se activó en medio de cultivo agar papa y dextrosa (PDA) (B.D. Bioxon, L.A, USA) e incubó por 5 días a 25 °C. Posteriormente, se suspendieron los conidios en 10 mL de Tween 80 (0.1 %) estéril y se determinó la concentración de las esporas suspendidas mediante conteo en una cámara de Neubauer (Blaubrand, Wertheim, Germany).

Crecimiento radial.

La actividad antifúngica de los extractos metanólicos de hoja y corteza de *J. platyphylla* así como los alcaloides del extracto metanólico, fue evaluada por la técnica de crecimiento radial descrita por Quintana-Obregón *et al.* (2010). En cajas de Petri de 50 mm de diámetro con medio PDA, se añadieron los extractos y alcaloides de *J. platyphylla* a concentraciones de 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg/mL. Posteriormente las placas fueron inoculadas con 1×10^5 esporas/mL del inóculo e incubadas a 25 °C. Se realizó la medición de la inhibición micelial con un vernier digital (Gearwrench, Maryland, EUA) una vez que el grupo control alcanzó el borde de la caja de Petri. El ensayo se realizó por triplicado.

La inhibición de cada extracto se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de colonia en medio control} - \text{Diámetro de colonia en medio con extracto}}{\text{Diámetro de colonia en medio control}} \times 100$$

Además, se determinó la concentración mínima de los tratamientos de *J. platyphylla* para retardar el crecimiento radial del hongo en un 50 %, con respecto al control (CI_{50}). Se analizaron los datos y obtuvieron curvas de crecimiento radial con el programa Microsoft Excel 2000. Así mismo, se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de Tukey con el programa estadístico Minitab 17. El análisis Probit se realizó utilizando el programa estadístico NCSS 2000 (NCSS Inc., USA) para obtener el valor CI_{50} con la cual se realizó la técnica de germinación de esporas.

Germinación de esporas

Con las CI_{50} obtenidas, se evaluó el porcentaje de germinación de esporas con la técnica de inoculación por siembra en placa. Se inocularon 10^5 esporas en el centro de la caja Petri con medio PDA y se distribuyeron en toda la superficie con una varilla de vidrio estéril. Se incubó a 25 °C, tomando lecturas de las muestras aleatorias a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 h. Se observó a través de un microscopio óptico, contándose por cada placa 200 esporas al azar, determinando el número de esporas germinadas y no germinadas. Una espора se consideró germinada cuando la longitud del túbulo germinal alcanzó la mitad del diámetro total de la espора (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

Mediciones morfométricas

Del ensayo de germinación de esporas se tomaron entre 10 y 20 imágenes al azar en diferentes campos con magnificación de 400 x. En estas se hicieron mediciones morfométricas de las esporas hasta obtener ≥ 25 observaciones a 400 x utilizando el programa Image-Pro Plus v. 6.3 (Media Cybernetics, Inc., USA, 1993-2008). Se determinó la longitud y el diámetro promedio de las esporas. Se realizaron de 75-100 mediciones por cada tratamiento a los diferentes tiempos de incubación.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para el experimento de crecimiento radial con dos factores, correspondientes a los tratamientos y concentraciones del extracto de *J. platyphylla*. La inhibición del crecimiento micelial se analizó con un análisis de varianza (ANDEVA) comparando las medias por Tukey un $\alpha = 0.05$. Se bloquearon los términos en el análisis utilizando el paquete estadístico Minitab 17. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis fitoquímicos del extracto de hoja y corteza de *J. platyphylla* mostraron la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas y terpenos; para los dos extractos se observó mayor presencia de flavonoides y taninos. Mientras que la presencia de terpenos fue menor en el extracto metanólico de corteza en comparación al extracto metanólico de hoja. Finalmente, ambos extractos reaccionaron levemente a la presencia de alcaloides (Tabla 1). Estos resultados son similares a los reportados por Ambríz-Pérez *et al.* (2016) con extractos hidroalcohólicos de la hoja de *J. platyphylla*.

Posteriormente, con base a ensayos preliminares, se procedió a obtener los alcaloides de la hoja de *J. platyphylla*, los cuales fueron identificado por HPTLC. Se encontró un solo pico en el cromatograma a un R_f de 0.667 con un altura de 0.047 y área de 0.001, con un recorrido similar al control de lidocaína con R_f de 0.701 con una altura de 0.249 y área de 0.008 respectivamente a una longitud de onda de 277 nm (Figura 1).

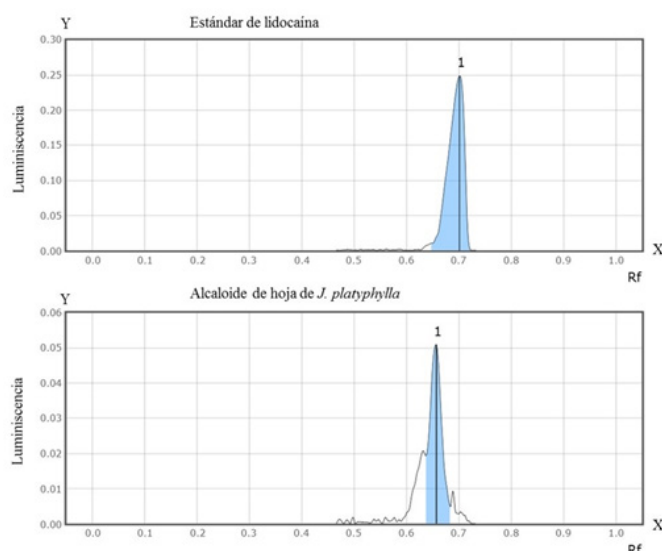
Una vez revelada la placa con el reactivo de Dragendorff en ambas muestras se observó el cambio de tono a rojizo en los R_f 's correspondientes al alcaloide del extracto metanólico de *J. platyphylla* y lidocaína, lo cual es característico de moléculas con grupos aminos en su estructura química de acuerdo a lo reportado por Sutar *et al.* (2016).

La lectura realizada por espectroscopia de IR, demostró señales en las regiones de 3224 (NH-), 1710 (C=O), 1549 (C=C) y 1390 (C-H en alifáticos). A partir de estos resultados se estima la presencia de al menos una molécula con características de alcaloide en forma cristalina en los extractos de hoja de *J. platyphylla*, el cual no ha sido reportado previamente en esta especie. Sin embargo, en la corteza, semilla, hoja y raíz de *Jatropha curcas* se ha reportado la presencia de alcaloides (Gupta *et al.*, 2011b; Igbinosa *et al.*,

Tabla 1. Perfil fitoquímico cualitativo de extractos metanólicos de hoja y corteza de *J. platyphylla*.**Table 1.** Phytochemical profile of methanolic extracts of leaf and bark from *J. platyphylla*.

| Grupo fitoquímico | Prueba | Extracto de hoja | Extracto de corteza |
|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Taninos | FeCl ₃ | +++ | +++ |
| | Gelatina | ++ | ++ |
| Flavonoides | Shinoda | ++ | ++ |
| Alcaloides | Dragendorff | + | + |
| | Mayer | + | + |
| | Wagner | + | + |
| Saponinas | Espuma | ++ | ++ |
| Terpenos | Salkowski | +++ | ++ |
| | Libermann | +++ | ++ |

Leve turbidez o precipitación: + media turbidez o precipitación: ++ alta turbidez o precipitación: +++

**Figura 1.** Cromatograma desarrollado con UV 277 nm, donde se marca el posible pico referente a un alcaloide aislado, comparando Rf con estándar de lidocaína.**Figure 1.** UV 277 nm chromatogram, where the possible peak referring to an alkaloid isolated is indicated, comparing Rf with lidocaine standard.

2009; Uche y Aprioku, 2008), así como en rizoma de *Jatropha elliptica* (Dos Santos *et al.*, 2014).

Actividad antifúngica

Los extractos metanólicos de hoja y corteza de *J. platyphylla* no inhibieron el crecimiento micelial de *A. parasiticus* a las concentraciones evaluadas (Figura 2 y 3). Sin embargo, con el tratamiento de alcaloides del extracto metanólico de *J. platyphylla* a la concentración 1 mg/mL, se encontró una inhibición del 41.07 % a las 48 h (Figura 2) y de 17.5 % a las 120 h (Figura 3). Por su parte, con la concentración de 2 mg/mL se observó una inhibición significativa de hasta 80.95 % durante las primeras 48 h (Figura 2). Sin embargo, su efecto inhibitorio disminuyó en horas posteriores, observándose la

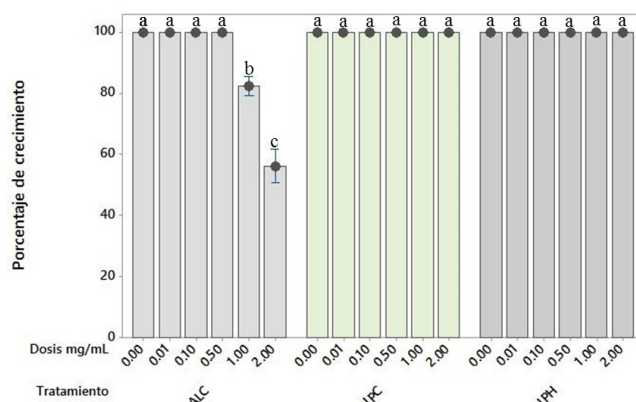
**Figura 2.** Crecimiento radial (mm) de *A. parasiticus* en medio PDA con diferentes concentraciones de extractos de *J. platyphylla* a un tiempo de incubación de 48 h. Promedios y desviaciones estándar (n=3), letras superíndices indican grupos estadísticos en líneas, prueba Tukey ($\alpha=0.05$). ALC: Extracto de alcaloides, JPC: Corteza de *J. platyphylla* y JPH: Hoja de *J. platyphylla*.

Figure 2. Radial growth (mm) of *A. parasiticus* in PDA medium with different *J. platyphylla* extracts and concentrations at an incubation time of 48 h. Averages and standard deviations (n = 3), superscripts indicate statistical groups in lines, Tukey test ($\alpha = 0.05$). ALC: Alkaloid extract, JPC: Bark of *J. platyphylla* and JPH: Leaf of *J. platyphylla*.

inhibición del crecimiento micelial en un 43.75 % durante las 120 h (Figura 3).

A partir de los datos obtenidos de la inhibición micelial llevada a cabo por los alcaloides del extracto metanólico de *J. platyphylla*, se calculó la CI_{50} por medio de un análisis Probit, el cual resultó en una concentración de 2.79 ± 0.13 mg/mL del tratamiento de alcaloides para *A. parasiticus*. Una posible razón por la cual los extractos metanólicos de hoja y corteza de *J. platyphylla* no mostraron ser eficaces a las concentraciones utilizadas, puede deberse a que el grupo de alcaloides

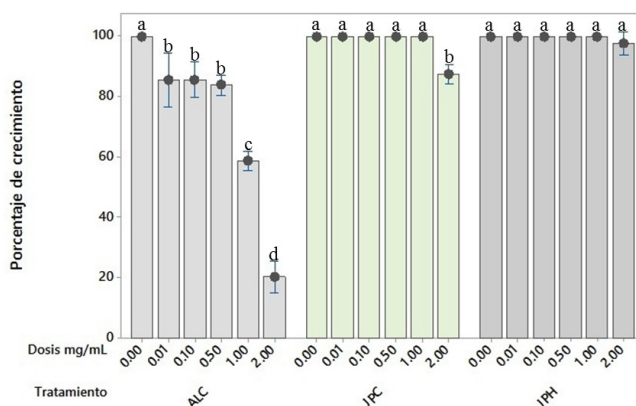
**Figura 3.** Crecimiento radial (mm) de *A. parasiticus* en medio PDA con diferentes concentraciones de extractos de *J. platyphylla* a un tiempo de incubación de 120 h. Promedios y desviaciones estándar n = 3, letras superíndices indican grupos estadísticos en líneas, prueba Tukey ($\alpha=0.05$). ALC: Extracto de alcaloides, JPC: Corteza de *J. platyphylla* y JPH: Hoja de *J. platyphylla*.

Figure 3. Radial growth (mm) of *A. parasiticus* in PDA medium with different *J. platyphylla* extracts and concentrations at an incubation time of 120 h. Averages and standard deviations (n = 3), superscript letters indicate statistical groups in lines, Tukey test ($\alpha = 0.05$). ALC: Alkaloid extract, JPC: Bark of *J. platyphylla* and JPH: Leaf of *J. platyphylla*.

con efecto sobre este patógeno se encuentra en baja concentración (Gupta et al., 2011a; Sharma et al., 2016). En un estudio anterior se reportó que los extractos metanólicos del fruto de *J. curcas* son capaces de inhibir el crecimiento solo a concentraciones mayores de 10 mg/mL contra *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya (Rahman et al., 2011). Mientras que en otras especies de hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Curvularia lunata* y *Colletotrichum capsici* su completa inhibición fue a concentraciones de 4-6 mg/mL con extractos metanólicos de la semilla de *J. curcas* y una CI_{50} de 0.58 mg/mL para *Fusarium semitectum* (Saetae y Suntornsuk, 2010). De igual manera, para lograr la inhibición completa del crecimiento de *Candida albicans* fueron necesarias concentraciones de 20 mg/mL del extracto hexánico de la raíz de *J. podagrica* (Aiyelaagbe et al., 2000). Todos estos trabajos coinciden con el hecho de que los extractos de *Jatropha* pueden ser utilizados como un método preventivo y muestran que es necesario utilizar altas concentraciones de los extractos crudos de especies de *Jatropha* para la inhibición del crecimiento micelial de diversos fitopatógenos. La actividad inhibitoria sobre la germinación de esporas se realizó utilizando la CI_{50} de los alcaloides de la hoja de *J. platyphylla* (Figura 4). El efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas fue de carácter fungistático, ya que a las 32 h de exposición se presentó un aproximado del 80 % de germinación, sin embargo en comparación con el control, este logró el 100 % a las 16 h. De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 4, se puede observar una mayor susceptibilidad de *A. parasiticus* al tratamiento con alcaloides de *J. platyphylla*, ya que los tiempos de germinación son retardados más tiempo aplazados a mayores horas utilizando una concentración de 2.7 mg/mL (CI_{50}) del tratamiento.

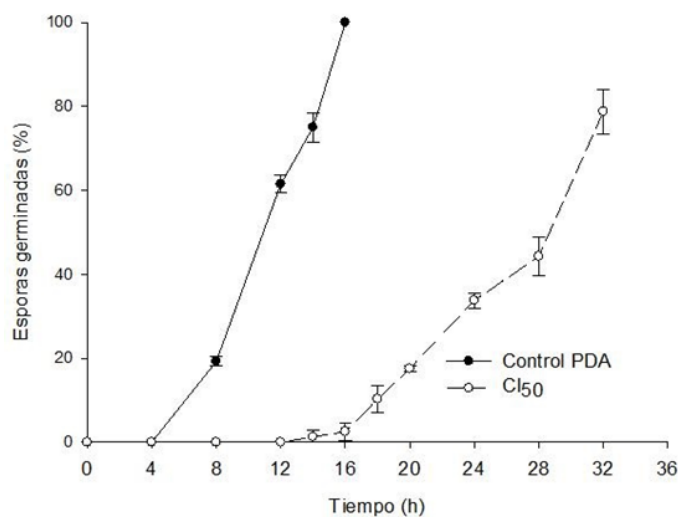


Figura 4. Cinética de germinación de esporas de *A. parasiticus* utilizando alcaloides del extracto metanólico de *J. platyphylla* en la concentración CI_{50} (2.7 mg/mL).

Figure 4. Germination kinetics of *A. parasiticus* spores using alkaloids from methanolic extract of *J. platyphylla* at the CI_{50} concentration (2.7 mg/mL).

Se observa que durante las primeras 4 h las esporas expuestas al tratamiento de alcaloide mantienen un diámetro y longitud similares a los del control, sin observar aun indicios de germinación en ambos tratamientos. Es a partir de las 8 h cuando se aprecia un mayor diámetro de 9.73 ± 4.59 y longitud de 7.65 ± 2.77 en el tratamiento control, el cual presenta un porcentaje de 19.25 % de esporas germinadas, sin embargo, no se observan cambios en la morfometría en las esporas del tratamiento con alcaloide (Tabla 2 y Figura 5).

A partir de las 12 h aproximadamente, más de la mitad de las esporas germinaron, observándose diámetros de 15.87 ± 18.46 y longitudes de 7.75 ± 4.03 (Tabla 2), debido al crecimiento de los tubos germinales de los polos en las esporas, esparciéndose en el medio, tal y como se observa en la Figura 5. Mientras que en el tratamiento de alcaloides se comienzan a apreciar esporas con indicio de polarización, ya que el diámetro de estas aumenta de 6.55 ± 1.35 a las 8 h a 9.05 ± 9.21 en las 12 h (Tabla 2 y Figura 5).

Tabla 2. Efecto de alcaloides de *J. platyphylla* sobre las características morfológicas en esporas de *A. parasiticus* a diferente tiempo de incubación.

Table 2. Effect of *J. platyphylla* alkaloids on the *A. parasiticus* spores morphological characteristics at different incubation times.

| | Control | Alcaloide (2.7 mg/mL) |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 4 h | | |
| Esporas germinadas (%) | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| Diámetro de esporas (µm) | 6.19±0.83 ^a | 6.48±1.00 ^a |
| Longitud de esporas (µm) | 6.11±0.72 ^a | 6.32±0.96 ^a |
| 8 h | | |
| Esporas germinadas (%) | 19.25±1.1 | 0.0±0.0 |
| Diámetro de esporas (µm) | 9.73±4.59 ^a | 6.55±1.35 ^b |
| Longitud de esporas (µm) | 7.65±2.77 ^a | 6.47±1.53 ^b |
| 12 h | | |
| Esporas germinadas (%) | 61.5±2.12 | 0.0±0.0 |
| Diámetro de esporas (µm) | 15.87±18.46 ^a | 9.05±9.21 ^b |
| Longitud de esporas (µm) | 7.75±4.03 ^a | 6.86±2.378 ^a |
| 16 h | | |
| Esporas germinadas (%) | 100±0.0 | 2.5±2.12 |
| Diámetro de esporas (µm) | NA | 6.41±6.54 |
| Longitud de esporas (µm) | NA | 6.56±5.43 |
| 18 h | | |
| Esporas germinadas (%) | 100±0.0 | 10.25±3.2 |
| Diámetro de esporas (µm) | NA | 10.01±15.04 |
| Longitud de esporas (µm) | NA | 6.98±2.97 |

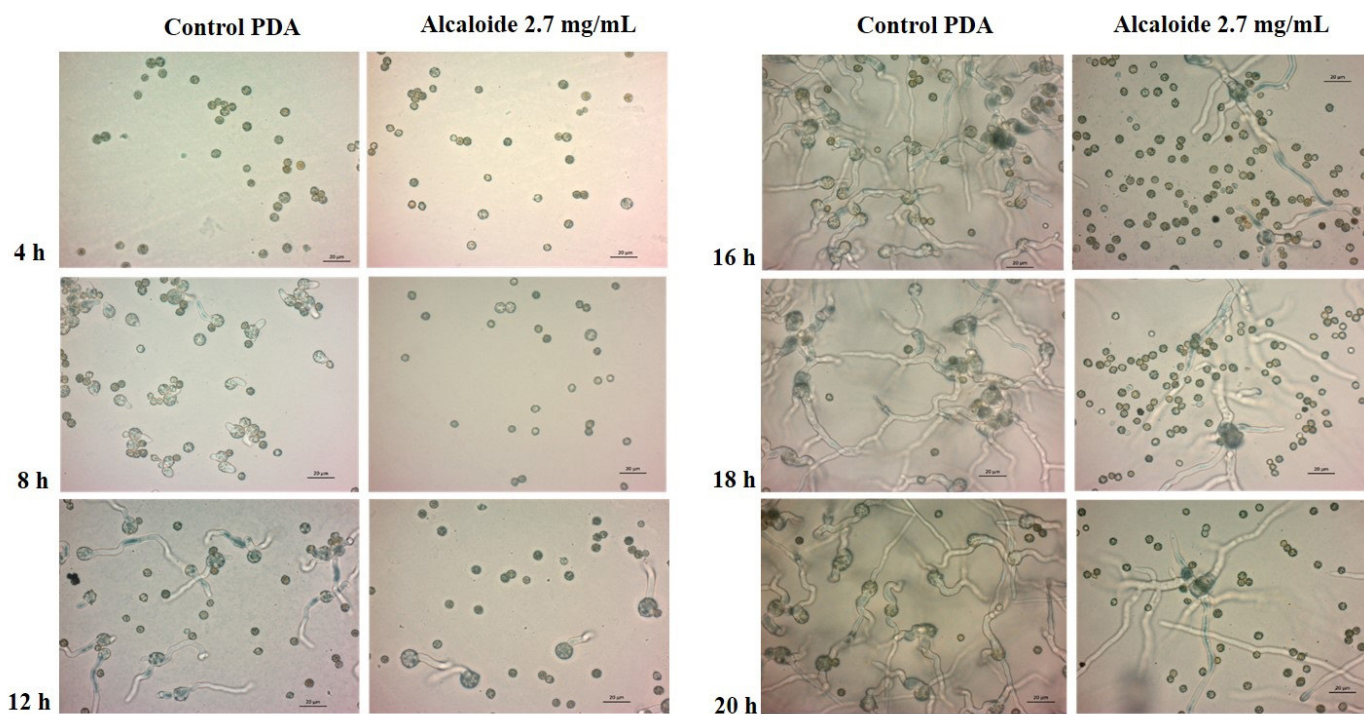


Figura 5. Germinación de esporas de *A. parasiticus* en medio de PDA como control y medio con alcaloides de *J. platyphylla* 2.7 mg/mL en donde (A): control 4 h en incubación en PDA; (B): tratamiento de alcaloide 4h; (C): control 8 h; (D): tratamiento 8 h; (E): control 12 h; (F): tratamiento 12 h; (G): control 16 h en incubación en PDA; (H): tratamiento de alcaloide 16 h; (I): control 18 h; (J): tratamiento 18 h; (K): control 20 h; (L): tratamiento 20 h.

Figure 5. Germination of *A. parasiticus* spores in PDA medium as control, and medium with *J. platyphylla* alkaloids at 2.7 mg/mL where (A): control 4 h in PDA incubation; (B): 4 h alkaloid treatment; (C): 8 h control; (D): 8 h treatment; (E): 12 h control; (F): 12 h treatment; (G): control 16 h in incubation in PDA; (H): 16 h alkaloid treatment; (I): control 18 h; (J): treatment 18 h; (K): control 20 h; (L): treatment 20 h.

Finalmente se consideró como 100 % de germinación en el tratamiento control a partir de las 16 h, debido a la expansión de los túbulos germinales que comienzan a unirse entre sí para formar estructuras más complejas como el micelio, tal y como se observa en la Figura 5. A pesar de esto, no es sino hasta las 18 h que se comienza a observarse un mayor crecimiento de los túbulos germinales de *A. parasiticus* en el tratamiento de PDA con alcaloides de *J. platyphylla* y un porcentaje de germinación de 10.25 ± 3.2 . Esto se puede observar en la Figura 5 como una gran cantidad de esporas sin germinar. Sin embargo, las esporas que se encuentran en estado de germinación cuentan con sus tubos germinales delimitados. Este mismo patrón se puede observar gradualmente conforme aumenta el tiempo.

CONCLUSIONES

Los alcaloides obtenidos del extracto metanólico de la hoja de *J. platyphylla* fue capaz de retardar la germinación de *A. parasiticus* durante las primeras 12 h, con la disminución del crecimiento del micelio hasta en un 80 % a las 48 h, sin embargo, este efecto comienza a decrecer subsecuentemente, por lo cual se considera que los alcaloides únicamente poseen un potencial fungistático para *A. parasiticus*, por lo que habrá que evaluarlo en otras especies.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por su financiamiento al proyecto y el otorgamiento de la beca 454581 al estudiante de Maestría en Ciencias Mario Alejandro Leyva Acuña. Al grupo de investigación de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán.

REFERENCIAS

- Aiyelaagbe, O., Adesogan, E., Ekundayo, O. y Adeniyi, B. 2000. The antimicrobial activity of roots of *Jatropha podagrica* (Hook). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 14: 60-62.
- Ambriz-Pérez, D.L., Bang, W.Y., Nair, V., Angulo-Escalante, M.A., Cisneros-Zevallos, L. y Heredia, J.B. 2016. Protective role of flavonoids and lipophilic compounds from *Jatropha platyphylla* on the suppression of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64: 1899-1909.
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S.F. y Nabavi, S.M. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*. 196: 44-68.
- Berger, S., El Chazli, Y., Babu, A.F. y Coste, A.T. 2017. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a consequence of antifungal use in agriculture? *Frontiers in Microbiology*. 8: 1024-1030.

- Chavan, R., Chaturvedi, P., y Chowdhary, A. 2015. Anti-influenza potential of alkaloidal molecules of *Jatropha curcas* leaves. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6: 4705-4711.
- Cushnie, T.P., Cushnie, B. y Lamb, A.J. 2014. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. International Journal of Antimicrobial Agents. 44: 377-386.
- Dasan, B.G., Mutlu, M. y Boyaci, I.H. 2016. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. International Journal of Food Microbiology. 216: 50-59.
- Demissie, A.G. y Lele, S.S. 2013. Bioactivity-directed isolation and identification of novel alkaloid from *Jatropha curcas* (Linn.). Research Journal of Chemical and Environmental Sciences. 1: 22-28.
- Dos Santos, A.F., Fonseca, S.A., César, F.A., De Azevedo Albuquerque, M.C.P., Santana, J.V. y Santana, A.E.G. 2014. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. Parasitology Research. 113: 1077-1084.
- El-Ghany, A., Roushdy, M. y Mohamed, A. 2015. Efficacy of certain plant extracts as safe fungicides against phytopathogenic and mycotoxigenic fungi. Agricultural and Biological Sciences Journal. 1: 71-75.
- El-Nagerabi, S.A., Al-Bahry, S.N., Elshafie, A.E. y Alhilali, S. 2012. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. Food Control. 25: 59-63.
- Feng, N., Ye, W., Wu, P., Huang, Y., Xie, H. y Wei, X. 2007. Two new antifungal alkaloids produced by *Streptoverticillium morookaense*. The Journal of Antibiotics. 60: 179-183.
- Gupta, S.M., Arif, M. y Ahmed, Z. 2011a. Antimicrobial activity in leaf, seed extract and seed oil of *Jatropha curcas* L. plant. Journal of Applied and Natural Science. 3: 102-105.
- Gupta, D.D., Haque, M.E., Islam, M.N., Rahman, S., Hasan, A.M. y Shibib, B.A. 2011b. Alkaloid and steroid from the stem bark of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences. 10: 9-11.
- Hollomon, D. 2017. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? Pest Management Science. 73: 1987-1993.
- Igbinsola, O., Igbinsola, E. y Aiyegoro, O. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn.). African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3: 058-062.
- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K. y Kang, S.G. 2017. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. Frontiers in Microbiology. 7: 2170-2180.
- Maria, R., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S. y Jodie, D. 2018. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. Journal of King Saud University-Science. 30: 500-505.
- Nandagoapalan, V., Doss, A. y Marimuthu, C. 2016. Phytochemical analysis of some traditional medicinal plants. Bioscience Discovery. 7: 17-20.
- Ogungbe, I.V., Ng, J.D. y Setzer, W.N. 2013. Interactions of antiparasitic alkaloids with Leishmania protein targets: A molecular docking analysis. Future Medicinal Chemistry. 5: 1777-1799.
- Olivas-Quintero, S., López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S.P., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J.Á., Salazar-Salas, N.Y. y Delgado-Vargas, F. 2017. Chemical composition and biological activities of *Helicteres vega* and *Heliopsis sinaloensis*. Pharmaceutical Biology. 55: 1473-1482.
- Paulussen, C., Hallsworth, J.E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W.C., Hamill, P.G., Blain, D., Rediers, H. y Lievens, B. 2017. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microbial Biotechnology. 10: 296-322.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M. y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience. 3: 582-586.
- Prigitano, A., Esposto, M.C., Romanò, L., Auxilia, F. y Tortorano, A.M. 2019. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the Italian environment. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 16: 220-224.
- Quintana-Obregón, E.A., Plascencia-Jatomea, M., Sánchez-Mariñez, R.I., Rosas-Burgos, E.C. y Cortez-Rocha, M.O. 2010. Inhibición del crecimiento radial "in vitro" de la *Fusarium verticillioides* en presencia de quitosano. Revista Iberoamericana de Polímeros. 11: 386-391.
- Rahman, M., Ahmad, S.H., Mohamed, M.T.M. y Rahman, M.Z.A. 2011. Extraction of *Jatropha curcas* fruits for antifungal activity against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of papaya. African Journal of Biotechnology. 10: 9796-9799.
- Roy, A. 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. International Journal of Plant Biotechnology. 3: 1-9.
- Saetae, D. y Suntornsuk, W. 2010. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 319-324.
- Santos, M.F., Harper, P.M., Williams, D.E., Mesquita, J.T., Pinto, E.G., Da Costa-Silva, T.A., Hajdu, E., Ferreira, A.G., Santos, R.A. y Murphy, P.J. 2015. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora arbuscula*. Journal of Natural Products. 78: 1101-1112.
- Sharma, A.K., Gangwar, M., Kumar, D., Nath, G., Sinha, A.S.K. y Tripathi, Y.B. 2016. Phytochemical characterization, antimicrobial activity and reducing potential of seed oil, latex, machine oil and presscake of *Jatropha curcas*. Avicenna Journal of Phytomedicine. 6: 366-375.
- Shawky, E. 2013. Determination of synephrine and octopamine in bitter orange peel by HPTLC with densitometry. Journal of Chromatographic Science. 52: 899-904.
- Silva, C.R., Fröhlich, J.K., Oliveira, S.M., Cabreira, T.N., Rossato, M.F., Trevisan, G., Froeder, A.L., Bochi, G.V., Moresco, R.N. y Athayde, M.L. 2013. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model. Journal of Ethnopharmacology. 145: 205-213.
- Soto-Landeros, F., Alcaraz-Meléndez, L., Angulo-Escalante, M.A., Reynoso-Granados, T., Cruz-Hernández, P. y Herrera-Cedano, F. 2017. Pollen morphology of four species of *Jatropha* (Euphorbiaceae), including toxic varieties, in Northwestern Mexico. Revista de Biología Tropical. 65: 799-806.

- Sutar, R.C., Musmade, D.S. y Ware, A.L. 2016. HPTLC finger printing analysis of the alkaloids from *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) Planch leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5: 215-219.
- Uche, F. y Aprioku, J. 2008. The phytochemical constituents, analgesic and anti-inflammatory effects of methanol extract of *Jatropha curcas* leaves in mice and Wister albino rats. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 12: 99-102.
- Yogendrarajah, P., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Mavromichali, E., De Saeger, S., De Meulenaer, B. y Devlieghere, F. 2016. Mycotoxin production and predictive modelling kinetics on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates in whole black peppercorns (*Piper nigrum* L). *International Journal of Food Microbiology*. 228: 44-57.