

Efecto Inhibitorio de Extractos Hidroalcoholicos de Larrea Tridentata Sobre Saprolegnia Sp

Alba Rocio Ochoa-Meza¹

aochoa.meza@itvy.edu.mx

<http://orcid.org/0000-0001-8108-9876>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
Mexico

Joe Luis Arias-Moscoso

jarias.moscoso@itvy.edu.mx

<http://orcid.org/0000-0002-2548-4625>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
México

Felipe de Jesus Reynaga Franco

felipe.rf@vyaqui.tecnm.mx

<https://orcid.org/0000-0002-8474-7763>

Tecnológico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
País México

Jaime Edzael Mendivil Mendoza

jmendivil.mendoza@itvy.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0002-2562-7550>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
México

Julia Icela Galindo Félix

jgalindo.felix@itvy.edu.mx

<https://orcid.org/0009-0000-9313-6377>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
México

Nayeli Esmeralda Uribe-Ochoa

<https://Orcid.Org/0009-0000-0244-3831>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
Mexico

Odilia Azucena Higuera Barraza

ohiguera.barraza@itvy.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0003-4030-129X>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
México

Francisco Cadena-Cadena

fcadena.cadena@itvy.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0001-5409-3909>

Tecnologico Nacional de Mexico, Instituto
Tecnologico del valle del Yaqui
México

¹ Autor pirncipal

Correspondencia: fcadena.cadena@itvy.edu.mx

RESUMEN

En los últimos años, el sector acuícola ha experimentado un rápido crecimiento debido a su relevancia en la producción alimentaria. No obstante, las industrias de peces de agua dulce se enfrentan a grandes desafíos, incluyendo enfermedades causadas por Oomicetos, como Saprolegniae. En este proyecto se evaluó el efecto del extracto de *Larrea tridentata* sobre la inhibición de *Saprolegnia* Sp. mediante un bioensayo in vitro. Las cepas de *Saprolegnia* fueron obtenidas de peces infectados con este Oomiceto. La identificación del hongo se realizó vía morfológica obteniéndose dos cepas *S. parasítica* y *S. Ferax*. Las cuales fueron usadas en el ensayo inhibitorio. El rendimiento fue de 167.5 mg/mL en metanol y 113 mg/mL en etanol, el análisis fitoquímico reveló la presencia de fenoles, flavonoides y taninos, así como una intensa actividad antioxidante. En cuanto a la inhibición del Oomiceto, se encontró que a una concentración arriba de 50 mg/mL presentaba una inhibición completa del microorganismo. Lo anterior permite concluir que el uso de extracto etanólico es una opción potencial para su uso en organismos acuáticos.

Palabras clave: oomicetos; antimicótico; saprolegnia; extracto etanolico

Inhibitory Effect of Larrea Tridentata Hydroalcoholic Extracts on Saprolegnia Sp

ABSTRACT

In recent years, the aquaculture sector has undergone rapid growth owing to its significance in food production. Nonetheless, freshwater fish industries are encountering significant hurdles, including diseases caused by Oomycetes, like Saprolegniae. This research project evaluates the impact of Larrea tridentata extract on inhibiting Saprolegnia Sp. through an in vitro bioassay. Saprolegnia strains were procured from fish afflicted with this Oomycete. Morphological methods were employed to identify the fungus, resulting in the isolation of two strains - S. parasitica and S. Ferax - which were tested in the inhibitory assay. The yield was found to be 167.5 mg/mL in methanol and 113 mg/mL in ethanol. Phytochemical analysis revealed the presence of phenols, flavonoids and tannins, as well as intense antioxidant activity. Concentrations above 50 mg/mL exhibited complete inhibition of the Oomycete. This suggests that the utilization of an ethanolic extract presents a promising option for implementation in aquatic organisms.

Keywords: *oomycetes; antifungal; inhibitory effect; saprolegniae*

Artículo recibido 19 agosto 2023

Aceptado para publicación: 23 setiembre 2023

INTRODUCCIÓN

Las infecciones micóticas en ambientes dulceacuícolas son causadas principalmente por los oomicetos oportunistas, que proliferan en los peces estresados y se acompañan de lesiones e infecciones bacterianas (Pickering & Willoughby, 1982). Dentro del grupo de los Oomicetos se reconocen varios órdenes, siendo el más importante el orden Saprolegnia (Bruno et al., 2011). La enfermedad producida por *Saprolegnia* sp principalmente afecta a peces de agua dulce. Sin embargo, se ha encontrado en estanques de baja salinidad por lo que la distribución es mundial. Generalmente el primer signo de infección por *Saprolegnia* en estanques inicia con la aparición de manchas blancas o grises de forma algodonosas en la piel de los organismos (Barde et al., 2020). Se ha observado la asociación entre la infección y los factores ambientales (Perez et al., 2016). No obstante, el estrés y la mala calidad de agua juegan un papel muy importante en la supervivencia de los peces. El incremento de la temperatura del agua proporciona un entorno ideal para el desarrollo de infecciones por *Saprolegnia* sp debido al debilitamiento del sistema inmunológico de los peces (Barde et al., 2020; Pavić et al., 2021).

La infección por este moho afecta principalmente a peces como tilapia, salmón, tenca, barramundi, esturión y carpas en un estadio sexualmente maduro (Bruno et al., 2011). En países asiáticos la mortalidad anual en salmón ha llegado a sobrepasar el 50 % debido a *S. parasitica* lo que indica que puede infectar a los peces en diferentes estadios de vida (Hatai & Hoshiai, 1992; Sandoval-Sierra et al., 2014). De la misma manera, *Saprolegnia* afecto el cultivo de bagre en Uttar Pradesh, India donde informaron pérdidas de más del 52 granjas de cultivo. Los peces infectados estaban letárgicos, con nado errático cerca de la superficie del agua, en el aislamiento de las lesiones de los peces se encontro la presencia de hifas no septadas que concuerdan con la infección de una cepa virulenta de *S. parasitica* (Ravindra et al., 2022). En tilapia del Nilo evaluada en estaques de Egipto se encontraron peces con necrosis y ulceración de la piel con una prevalencia de más de 77 % similar a infecciones de años anteriores (El-Gamal et al., 2023). Las infecciones fúngicas en la industria de la acuicultura ralentizan las operaciones y causan grandes pérdidas económicas. El interés en el uso de extractos de plantas ha crecido en los últimos años debido a su disponibilidad y a su facilidad de uso (Perez et al., 2016). En la actualidad, se conocen diversas

especies botánicas que han demostrado tener propiedades antimicrobianas y antifúngicas eficaces contra numerosas plagas y enfermedades. Algunas de estas especies incluyen especies como *Schinus molle*, *Erythrina cristagalli* L, *Ruta graveolens*, *Larrea tridentata*, *Karwinskia humboldtiana*, *Ricinus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Ambrosia ambrosioides*, *N. glauca*, *Ambrosia confertiflora*, *Datura discolor*, *Baccharis glutinosa*, *Proboscidea parviflora*, *Solanum rostratum*, *Jatropha cinerea*, *Salpianthus macrodonthus* y *Sarcostemma cynanchoides*. Estas plantas han demostrado su utilidad como medidas efectivas de control contra una variedad de microorganismos patógenos (R. G. Rodríguez et al., 2010; Tequida-Meneses et al., 2002; Zampini et al., 2007). Este efecto se ha atribuido a diversos metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas y alcaloides que le confieren una protección natural (A. Rodríguez et al., 2000). Por ello, *Larrea tridentata* es utilizada en el manejo integrado de plagas y enfermedades; debido a su alta efectividad y bajo costo. Se ha reportado que los extractos etanólicos y metanólicos muestran actividad contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium. Oxysporum f. sp, lycopersici*, *A. flavus*, *A. níger*, *Penicilium chrysogenum*, *P. expansum*, *Fusarium poae*, *F. moniliforme*, *Colletotricum gleosporides*, *Alternaria alternata* y *Rhizopus sp* (Jasso de Rodríguez et al.; Saldívar, 2003; Saldívar-Lira, 2003; Tequida-Meneses et al., 2002).

METODOLOGÍA

Muestras vegetales

Las hojas de *Larrea tridentata* fueron colectadas en Empalme, Sonora en las coordenadas 28° 2', 41.755''N y 110°, 36', 3.14''O en los meses de mayo-junio. La planta fue trasladada al laboratorio de Acuacultura en el Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Valle de Yaqui. El material colectado se seco por 23 días bajo la sombra hasta obtener un peso constante (Moreno-Limón et al., 2011). Una vez obtenido el peso constante cada muestra se limpio cuidadosamente separando las hojas a partir de las cuales se realizaron los extractos.

Preparación de extractos botánicos

La molienda de las hojas secas fue realizada con mortero hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5-1 mm. La preparación de los extractos se realizo utilizando etanol y metanol en una

proporcion de 300 g/L. Se dejo reposar durante 48 horas en obscuridad, se filtro y centrifugo a 3000 g, Se concentro el sobrenadante utilizando un rotavapor a 55°C hasta sequedad total (El-Gamal et al., 2023; Moreno-Limón et al., 2011).

Obtención, aislamiento y confirmación de *Saprolegnia* sp.

La obtención de la muestra se realizó mediante un raspado en la zona lesionada y con un hisopo estéril en las estructuras algodonosas (Perez et al., 2016). Las muestras fueron colocadas en agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico (AT). La incubación fue realizada a una temperatura de 27 °C por 15 días con observaciones diarias hasta obtener formación de colonias (Serrano-Martínez et al., 2014). Una vez obtenidas las colonias fungosas se sembraron e identificaron taxonómicamente.

La Identificación fue realizada mediante un examen macroscópico teniendo en cuenta tamaño, forma, color de las superficies superior e inferior del medio, así como color, textura, y consistencia de cada colonia. Para la identificación preliminar de las colonias, se aplicó la tinción con azul de lactofenol, con especial énfasis en las colonias blancas, algodonosas, esponjosas, ligeramente abultadas y blandas (Deutsch et al., 2023; Zaror et al., 2004). La observación se realizo bajo un microscopio con un aumento de 10x y 400x observándose la estructura y la replicación del micelio (Dinçtürk et al., 2019; Koneman & Allen, 2008).

El inculo se realizo cubriendo las colonias de hongos con solución salina estéril, se agitaron durante un minuto. Al término de ese tiempo se frotó la superficie del hongo, de manera firme y suave. La suspensión obtenida fue colocada en tubos de vidrio de 15 mL. Antes de su utilización la solución fue homogeneizada (Moreno-Limón et al., 2011).

Efecto inhibitorio de extractos de *Larrea tridentata* sobre *Saprolegnia*

El efecto inhibitorio de los extractos de *Larrea tridentata* se realizo siguiendo la metodología reportada por Moreno-Limon et al., (2011) (30, 50, 70 y 100 mg/mL de extracto) con ligeras modificaciones. La siembra se efectuó en cinco placas por cada concentración en medio avena acidificado con acido tartárico. Se utilizo la técnica de dilución del extracto en agar, para posteriormente incubarse a una temperatura de 26°C por un período de 30 días en el cual se

tomaron los datos de crecimiento radial cada cinco días con ayuda de un vernier (Cadena-Cadena et al., 2023; Moreno-Limón et al., 2011).

Cuantificación de flavonoides

Se colocaron 310 μL de cada extracto en una microplaca y se añadieron 125 μL de agua destilada, 9.5 μL de cloruro de aluminio al 10 % y 9.5 μL de nitrito de sodio al 5 %. Todas las soluciones se incubaron durante 3 minutos. Pasado ese tiempo se agregaron 125 μL de NaOH 0.5 M y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad. La absorbancia se midió a 510 nm utilizando un lector de microplacas. La concentración fue calculada mediante una curva de calibración con 2 mg/mL de catequinas como estándar (Kostennikova, 1983; Pérez-Pérez et al., 2014).

Cuantificación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales se reactivó Folin-Ciocalteu 2N el procedimiento consistió en mezclar 25 μL del extracto en una microplaca de 96 pocillos con 100 μL de carbonato de sodio al 7,5 %. Adicionalmente se agregaron 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad. A continuación, se midió la absorbancia a 760 nm. El contenido fenólico total de las muestras se expresa en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto o muestra (mg EAG/g). Para ello se construyó una curva de titulación utilizando ácido gálico como patrón (Alejandro, 2009; Treviño-Cueto et al., 2007; Zapata et al., 2014).

Cuantificación de Taninos

Se empleó N, N-dimetilacetamida (DMAC) al 0.1 % para determinar la presencia de taninos en cada extracto. La solución de DMAC se preparó disolviendo 50 mg de N, N-dimetilacetamida al 99 % en 50 mL de solución de HCl al 10 %. En una microplaca de 96 pocillos, se añadieron 50 μL del extracto y 250 μL del reactivo DMAC al 0.1 %. La microplaca se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en ausencia total de luz. Inmediatamente después de completar el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 640 nm. A partir de los valores obtenidos, se construyó una curva de calibración utilizando 2 mg/mL de catequina como estándar, para determinar el

contenido de taninos en las muestras. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de catequina por gramo (mg EC/g) (Herrera-Fuentes et al., 2017; Treviño-Cueto et al., 2007).

Ensayo de actividad antioxidante

Ensayo ABTS. Este método cuantifica la reducción del color del radical ABTS⁺ por antioxidantes, convirtiéndolo en ABTS. El radical ABTS⁺ es verde azulado y absorbe luz a 734 nm. Se genera mediante la oxidación del compuesto ABTS con persulfato de potasio. El grado de decoloración, expresado como porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺, depende de la concentración de antioxidantes. En el análisis, se mezclaron 100 µL de muestra con 1 mL de solución del radical ABTS⁺. La solución del radical ABTS⁺ se preparó combinando soluciones de ABTS y persulfato de potasio, y posteriormente se diluyó en un tampón ácido acético-acetato de sodio hasta obtener una absorbancia de aproximadamente 0,7 nm. Las mediciones se realizaron a 734 nm después de 30 minutos de reacción y a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron mediante una curva de referencia construida con trolox como antioxidante en un rango de concentraciones de 0-200 µmol/L (Re et al., 1999).

El ensayo DPPH consta de mezclar los extractos etanólicos y metanólicos con agua destilada para obtener concentraciones de 0,8 a 4 mg/mL. Se mezclaron 0,8 mL de cada dilución con 1,6 mL de una solución de DPPH en metanol, con una concentración de 20 mg/L, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro. Los resultados se convirtieron en porcentaje de inhibición y se expresaron como capacidad antioxidante en µmol de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de extracto de etanólico ó metanólico (TEAC) (Molyneux, 2004).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el paquete estadístico SPSS 22. Se utilizó estadística descriptiva como media y la desviación estándar tratando de mantener la aleatoriedad de las muestras. Para determinar diferencias significativas entre las medias pertinentes de crecimiento se utilizó la prueba de Tukey con nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extractos en función del solvente utilizado

La eficiencia de la extracción de fitoquímicos de *Larrea tridentata* varía según el tipo de solvente empleado. En este contexto, se observó que el metanol presentó un rendimiento superior al del etanol, y esta diferencia podría estar vinculada con las diferencias en polaridad entre ambos solventes. Tanto el etanol (con un índice de polaridad de 4.3) como el metanol (con un índice de polaridad de 5.1) son moléculas polarizadas. Esta polaridad da lugar a la formación de cargas parciales positivas y negativas en las moléculas, lo que les permite establecer enlaces de hidrógeno con otras sustancias polares. Este índice de polaridad ejerce un impacto directo en la capacidad de estos solventes para extraer determinados compuestos de las plantas (Gupta et al., 1997). El rendimiento de 167.5 mg/mL en metanol y 113 mg/mL en etanol indica la cantidad de fitoquímicos obtenidos por unidad de volumen de solvente. Otros estudios previos realizados en *Larrea tridentata* reportaron rendimientos más bajos, como 59.2 mg/mL, 53.3 mg/mL (Moreno-Limón et al., 2011) y 6.573 mg/mL (Delgadillo-Ruiz et al., 2017) esta diferencia puede estar relacionado con diferentes factores como la estacionalidad, el estrés hídrico, la geografía, los factores de luz, la altitud, la temperatura y los factores del suelo (Ahmed et al., 2019). Estos factores pueden influir en la producción de metabolitos secundarios, provocando variaciones en los rendimientos de extracción (Delgadillo-Ruiz et al., 2017).

Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico de las hojas de *Larrea tridentata* reveló la presencia de fenoles, flavonoides y taninos. Se encontró que el extracto metanólico presentaba una mayor concentración de fenoles y taninos en comparación con el extracto etanólico. Sin embargo, en el caso de los flavonoides, el extracto etanólico mostraba un mayor contenido. Estas diferencias de concentración entre los dos extractos fueron estadísticamente significativas, como se indica en la Tabla 1. Los resultados obtenidos son consistentes con el estudio realizado por Moreno-Limón et al. (2011), quienes también encontraron que los solventes metanólicos proporcionaban un mayor rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos en *Larrea tridentata*. En otro estudio realizado con *Larrea tridentata* colectada en la ubicación 27°28'55.9"N 110°00'02.0"W en los meses de enero-febrero,

se encontró una concentración de polifenoles de 228.88 ± 3.45 mg de GAE 100 g^{-1} (Cadena-Cadena et al., 2023) colectada en los meses de abril y mayo. Esta concentración es superior a la mencionada en el estudio actual. Estas diferencias pueden deberse a las variaciones en las condiciones ambientales, como la salinidad, el estrés hídrico y el tipo de suelo, que pueden afectar el contenido de fitoquímicos en las plantas (Biber, 2006; Kumar et al., 2017).

Tabla 1.

Cuantificación fitoquímica de los extractos etanólico y metanólicos de las hojas de *Larrea tridentata*

Compuesto químico	Extractos	
	Etanol	Metanol
Flavonoides (mg CAT/g)	3.06 ± 0.05^a	2.21 ± 0.12^b
Fenoles (mg EAG/g)	0.29 ± 0.04^a	0.35 ± 0.017^b
Taninos (mg CAT/g)	1.73 ± 0.033^a	1.95 ± 0.022^b

*Resultados expresados en porcentaje como media más-menos desviación estándar ($X \pm SD$).

En estudios anteriores realizados por Moreno-Limón et al. (2011) se encontró la presencia de fitoquímicos y antimicrobianos en *Larrea tridentata*. Encontraron que la resina de la planta era rica en compuestos fenólicos y demostraron su actividad antimicrobiana. Estos hallazgos respaldan la idea de que la resina de *Larrea tridentata* es una fuente importante de moléculas bioactivas en la planta. Estos compuestos pueden contribuir a las propiedades medicinales y antioxidantes asociadas con *Larrea tridentata*.

Actividad antioxidante

Ensayos ABTS y DPPH

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas de *Larrea tridentata* se evaluó mediante los ensayos ABTS y DPPH. Se encontró que la capacidad antioxidante variaba según el método utilizado y la concentración de cada extracto. Los resultados mostraron un rango de potencial antioxidante de 1.40 a $2.99 \mu\text{M TROLOX g}^{-1}$ para el ensayo ABTS y de 0.10 a $2.16 \mu\text{M TROLOX g}^{-1}$ para el ensayo DPPH, como se indica en la Tabla 2. En el ensayo ABTS, se observó que la actividad antioxidante aumentaba a medida que se incrementaba la concentración en ambos extractos. Por otro lado, en el ensayo DPPH, la capacidad antioxidante fue mayor en los extractos con mayor concentración. No se encontraron

diferencias estadísticamente significativas entre los extractos, pero sí hubo diferencias significativas entre las concentraciones de los tratamientos en todos los experimentos.

Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Martins et al. (2012), quienes informaron que los compuestos responsables de la actividad antioxidante en *Larrea tridentata* son el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), kaempferol y quercetina. Además, en la mayoría de los estudios se ha reportado que los extractos obtenidos con metanol presentan los valores más altos de actividad antioxidante, seguidos por los extractos etanólicos y acuosos (Aguirre-Joya et al., 2018; Treviño-Cueto et al., 2007). Morán Santibañez et al. (2019) encontraron que el extracto etanol-agua era el más eficiente y presentaba el contenido fenólico más alto. Aguirre-Joya et al. (2018) identificaron a NDGA, kaempferol y quercetina como los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante confirmando lo publicado por Martins et al. (2012).

Las diferencias encontradas entre los dos métodos de ensayo pueden deberse al mecanismo de unión de los radicales (Imeh & Khokhar, 2002). El DPPH es un radical libre orgánico, mientras que el ABTS es un radical formado a partir de varias reacciones con peroxidasa y peróxido de

Tabla 2.

Capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los extractos hidroalcolicos de las hojas de *Larrea tridentata* a distintas concentraciones

Extracto	Concentración (%)	ABTS ($\mu\text{M TRLOX/g}$)	DPPH ($\mu\text{M TRLOX/g}$)
Etanólico	10	1.4 \pm 0.19 ^a	2.1 \pm 0.12 ^{ab}
	20	1.81 \pm 0.10 ^{ab}	2.16 \pm 0.07 ^a
	30	2.31 \pm 0.33 ^{bc}	1.88 \pm 0.03 ^{bc}
	40	2.44 \pm 0.12 ^c	1.99 \pm 0.05 ^{ab}
	50	2.58 \pm 0.22 ^c	1.72 \pm 0.15 ^c
Metanólico	10	1.8 \pm 0.19 ^a	1.21 \pm 0.06 ^a
	20	2.11 \pm 0.04 ^{ab}	0.25 \pm 0.03 ^b
	30	2.37 \pm 0.23 ^{bc}	0.15 \pm 0.02 ^c
	40	2.70 \pm 0.22 ^{cd}	0.12 \pm 0.03 ^d
	50	2.99 \pm 0.15 ^d	0.10 \pm 0.03 ^e

*Resultados expresados en porcentaje como media más-menos desviación estándar (X \pm SD)/Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas

hidrógeno (Kuskoski et al., 2005). Además, la solubilidad de los radicales también puede influir, ya que el DPPH es soluble solo en medios orgánicos, mientras que el ABTS es soluble en medios acuosos y alcohólicos, lo que permite la medición de la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Kuskoski et al., 2004; Morán-Santibañez et al., 2019).

Porcentaje de crecimiento radial de *Saprolegnia* evaluada con extracto etanólico y metanólico de *Larrea tridentata*

El extracto etanólico de *Larrea tridentata* exhibe un comportamiento dual, es decir, puede tener efectos tanto fungistáticos como fungicidas en el crecimiento de *Saprolegnia*. Concentraciones de 30 mg/mL y 50 mg/mL detuvieron el crecimiento del hongo, mientras que concentraciones de 70 mg/mL y 100 mg/mL inhibieron completamente su crecimiento. A 30 mg/mL, el crecimiento aumentó un 35 % en 5 días y alcanzó su máximo en 30 días. Por otro lado, a 50 mg/mL, el crecimiento aumentó un 11 % en 30 días. Estos resultados demuestran el efecto significativo del extracto en diferentes concentraciones (Tabla 3). Estos resultados coinciden con investigaciones previas en *L. divaricata*, que también mostraron efectos inhibidores en xilófagos, hongos y levaduras mediante extractos etanólicos y metanólicos (Tequida-Meneses et al., 2002). Además, se ha encontrado que el extracto etanólico de *Larrea tridentata* tiene actividad antimicótica contra diferentes especies de hongos, incluyendo *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Cryptococcus neoformans* (Moreno-Limón et al., 2011).

El efecto inhibitorio del extracto metanólico es un efecto fungistático y fungicida que depende de las concentraciones: a 30 mg/mL el efecto inhibitorio presentado fue de 69 % a los 15 días decreciendo hasta llegar al 60 % a los 30 días siendo un efecto fungistático; en la concentración de 50 mg/mL el efecto inhibitorio fue de 100 % hasta los diez días, a partir de ahí fue decreciendo gradualmente hasta el 88 % a los 30 días; en la concentración de 70 y 100 mg/mL el efect

Tabla 3
Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos y metanólicos.

Tiempo en días	% de Inhibición							
	30 ETOH	30 METOH	50 ETOH	50 METOH	70 ETOH	70 METOH	100 ETOH	100 METOH
5	64.44±2.21 ^a	24.61±7.43 ^b	100	40.11±0.44 ^b	100	58.46±4.54	100	90.76±6.22
10	68.91±3.41 ^a	9.61±25.32 ^b	100	26.87±0.32 ^b	100	44.68±0.53	100	89.68±7.32
15	69.07±0.50 ^a	0	92.15±2.21 ^a	7.75±0.33 ^b	100	34.75±0.99	100	90.25±4.10
20	66.45±0.22 ^a	0	90.07±1.12 ^a	0	100	22.77±0.44	100	88.11±6.66
30	60.77±0.43 ^a	0	88.88±1.77 ^a	0	100	18.41±1.02	100	86.43±0.22

*Resultados expresados en porcentaje como media más-menos desviación estándar (X±SD)/Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas entre líneas

Inhibitorio fue del 100 % durante todo el ensayo siendo un efecto fungicida. Según investigaciones previas realizadas por Quiroga et al. (2004) y Tequida-Meneses et al. (2002), los extractos etanólicos y metanólicos de *L. divaricata* (una especie divergente de *Larrea tridentata*) son eficaces en la inhibición del crecimiento de algunos xilófagos fitopatógenos, hongos y levaduras. Sin embargo, el análisis de los resultados reportados para *A. flavus* indicaron un efecto inhibitorio en el crecimiento de 71.2 % y del 76 % con los solventes de metanol y etanol, respectivamente. También reportaron que el extracto etanólico y metanólico de *Larrea tridentata* afectó el crecimiento de *P. expansum*, ya que el hongo presentó un diámetro de crecimiento de 0.5 cm mientras que el testigo tuvo un crecimiento de 1.2 cm, lo que representó una inhibición del 58.3 % y del 50 %, respectivamente (Moreno-Limón et al., 2011; Tequida-Meneses et al., 2002). Un estudio realizado por Bautista et al. (2004) se evaluó la actividad antimicótica del extracto etanólico de *Larrea tridentata* contra una variedad de hongos. Los resultados del estudio indicaron que el extracto fue efectivo contra todos los hongos probados, incluyendo *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer* (López et al., 2004), *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Cryptococcus neoformans* (Agüero et al., 2014). El análisis de las resinas mostro que el solvente etanol tenía la mayor actividad fungicida, mientras que el solvente de metanol tuvo menos inhibición, lo que puede atribuirse a la volatilidad de los compuestos responsables de la inhibición. Estos resultados respaldan la actividad antifúngica de *Larrea tridentata* con lo reportado por varios autores. La polaridad del solvente utilizado para preparar el extracto se relacionó indirectamente con los datos obtenidos. La diferencia en la efectividad de los extractos puede relacionarse con la polaridad del solvente utilizado para prepararlos, donde el etanol parece tener una mayor actividad fungicida en comparación con el metanol. Esta variación puede deberse a la volatilidad de los compuestos responsables de la inhibición en cada solvente. En general, estos hallazgos subrayan la importancia del extracto de *Larrea tridentata* como una fuente potencial de compuestos antifúngicos con aplicaciones en la agricultura y la investigación biomédica.

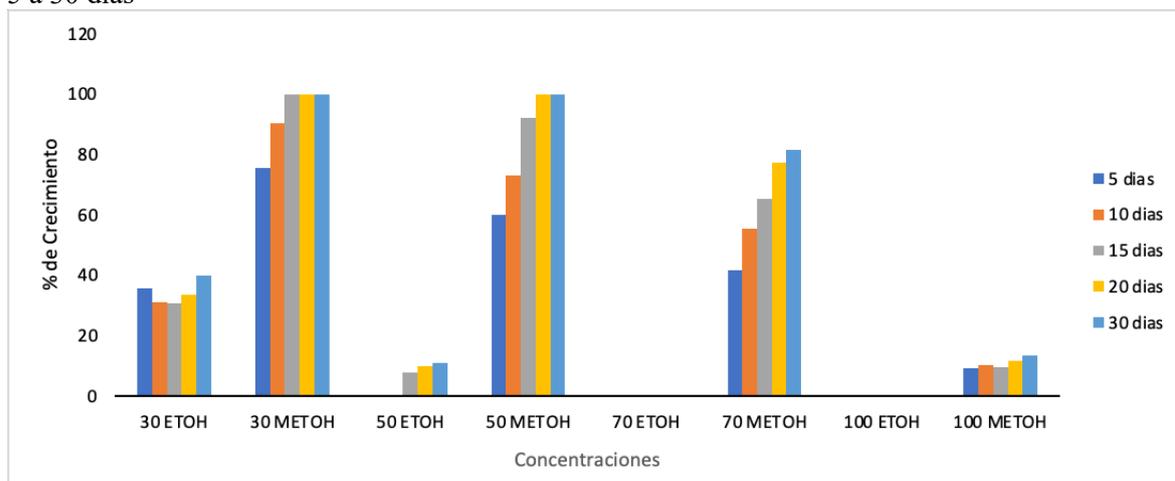
Comparación del porcentaje de crecimiento e inhibición del extracto etanólico y metanólico de *Larrea tridentata*

La comparación del crecimiento de *Saprolegnia* utilizando extractos metanólicos y etanólicos de *Larrea tridentata* en diferentes concentraciones muestra que a una concentración de 30 mg/mL, el extracto metanólico alcanzó su máximo crecimiento a los 20 días con un 125 %, mientras que el extracto etanólico lo alcanzó a los 30 días con un 40 %. A 50 mg/mL, el extracto metanólico mostró un mínimo de crecimiento del 60 % a los cinco días, llegando a su máximo con un 100 % a los 30 días. En cambio, el extracto etanólico tuvo un inicio de crecimiento del 7 % a los 15 días y finalizó con un 11 %. En las concentraciones de 70 y 100 mg/mL, no se observó crecimiento en el extracto etanólico, mientras que el extracto metanólico mostró un crecimiento del 41 % al 81 % a los 30 días en la concentración de 70 mg/mL, y del 9 % al 13 % en la concentración de 100 mg/mL. En general, el crecimiento radial del Oomiceto fue mayor en el extracto metanólico en todas las concentraciones evaluadas durante todo el ensayo (Figura 1).

En la prueba de comparación de varias muestras, no se encontró una diferencia significativa en el crecimiento entre las concentraciones de 50, 70 y 100 mg mL⁻¹ del extracto etanólico, así como la concentración de 100 mg/mL del extracto metanólico. Sin embargo, se observaron similitudes en diferentes días de medición entre las demás concentraciones evaluadas. Estos resultados indican que el extracto metanólico de *Larrea tridentata* puede promover un mayor crecimiento del Oomiceto en comparación con el extracto etanólico, y que la concentración utilizada también puede influir en el efecto inhibitorio del crecimiento.

Figura 1

Crecimiento del hongo a diferentes concentración de resinas metanolicas y etanolicas medido de 5 a 30 días



El extracto metanólico presentó mayor crecimiento comparado con el etanólico, en la concentración de 30mg ml⁻¹ a los 20 días el metanólico tuvo su máximo crecimiento con 125 % mientras que el etanólico lo tuvo a los 30 días con el 40 %; en 50mg/ml el metanólico tuvo un mínimo de 60 % a los cinco días y su máximo a los 30 días con el 107 %, en el caso del extracto etanólico su crecimiento inicio a los 15 días con 7 % y finalizo con 11 %; en las concentraciones de 70 y 100mg/ml el extracto etanólico no se observo crecimiento, contrario del extracto metanólico que en la concentración de 70mg/ml creció del 41 % a 81 % y en 100mg/ml de 9 % a 13 % hasta los 30 días. El crecimiento radial del Oomiceto fue mayor en el extracto metanólico durante todo el ensayo en las diferentes concentraciones. En la prueba de comparación de varias muestras, durante todo el ensayo no existe una diferencia significativa entre las concentraciones del extracto etanólico de 50, 70, 100 mg/ml y metanol de 100 mg/ml, mientras que los demás compartieron similitudes en diferentes días de medición. Los efectos inhibitorios de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento de *Saprolegnia* fueron evidentes en todas las concentraciones analizadas. A una concentración de 30 mg/ml de extracto etanólico, se observó un efecto inhibitorio constante a lo largo del tiempo. El punto máximo de inhibición, que alcanzó el 69 %, se registró a los cinco días. Por otro lado, a una concentración de 50 mg/ml de extracto etanólico, se observó una inhibición del 100 % en los primeros diez días, pero esta disminuyó al 88 % a los 30 días. Las concentraciones de 70 mg/ml

y 100 mg/ml de extracto etanólico mostraron un efecto inhibitorio del 100 % en todo el período evaluado (Figura 1).

En contraste, el extracto metanólico exhibió un patrón de inhibición diferente. A una concentración de 30 mg/ml, mostró inhibición solo en los primeros diez días, siendo nulo el efecto en el resto del ensayo. A 50 mg/ml de extracto metanólico, se observó un efecto inhibitorio del 40 % a los cinco días, pero este efecto desapareció en el período de 20 a 30 días. En las concentraciones de 70 mg/ml y 100 mg/ml de extracto metanólico, se encontró un efecto inhibitorio del 58 % a los cinco días y del 18 % a los 30 días en la concentración de 70 mg/ml, mientras que a 100 mg/ml se registró un efecto inhibitorio del 90 % a los cinco días y del 86 % en el día 30.

La diferencia en la efectividad de los extractos puede deberse a la variabilidad en la cantidad de principios activos presentes en la resina de la planta, que depende del solvente utilizado. El principal compuesto responsable de la actividad biocida es el lignano, ácido nordihidroguaiarético (NDA) (Moreno-Limón et al., 2011). El extracto etanólico de *Larrea tridentata* exhibe un efecto inhibitorio más consistente y fuerte sobre el crecimiento de *Saprolegnia* en comparación con el extracto metanólico. No obstante, se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos y los efectos específicos de estos extractos en *Saprolegnia*.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos y etanólicos de *Larrea tridentata* presentaron actividad fungicida y fungistática sobre *Saprolegnia parasitica* en condiciones in vitro. El efecto inhibitorio de los extractos fue mejor con etanol en comparación con metanol, manteniendo el efecto fungistático los primeros 15 días en las concentraciones bajas de 30 y 50 mg/ml y a partir de la concentración de 70mg/ml se presentó un efecto fungicida. En relación a la extracción de resina utilizando dos solventes diferentes, se observó que el extracto obtenido con etanol mostró un rendimiento menor en miligramos por mililitro en comparación con el extracto obtenido con metanol. Sin embargo, se encontró que el extracto etanólico exhibió una mayor actividad inhibitoria contra *Saprolegnia*,

un oomiceto comúnmente encontrado en ambientes acuáticos. Además, la capacidad antioxidante vario de acuerdo al método utilizado y posiblemente la variación sea atribuida al tipo de molécula que se encuentra interactuando. Tanto el etanol como el metanol demostraron tener un efecto fungistático sobre el oomiceto durante los primeros 15 días, aunque esta actividad disminuyó en las concentraciones de 30 y 50 mg/ml a medida que avanzaba el período de cultivo. Por lo ya descrito se puede argumentar el uso de extractos etanólicos de *Larrea tridentata* como alternativa profiláctica para tratar infecciones por *Saprolegnia* y tiene el potencial para utilizarse como protocolo sanitario en el manejo de instalaciones acuícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüero, M. B., Svetaz, L., Baroni, V., Lima, B., Luna, L., Zacchino, S., . . . Tapia, A. (2014). Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Industrial Crops and Products*, 57, 166-173.
- Aguirre-Joya, J. A., Pastrana-Castro, L., Nieto-Oropeza, D., Ventura-Sobrevilla, J., Rojas-Molina, R., y Aguilar, C. N. (2018). The physicochemical, antifungal and antioxidant properties of a mixed polyphenol based bioactive film. *Heliyon*, 4(12), e00942.
- Ahmed, S., Griffin, T. S., Kraner, D., Schaffner, M. K., Sharma, D., Hazel, M., . . . Stepp, J. R. (2019). Environmental factors variably impact tea secondary metabolites in the context of climate change. *Frontiers in plant science*, 10, 939.
- Alejandro, G. N. M. (2009). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. *Rev Acad*, 1, 1-4.
- Barde, R. D., Deshpande, M., Nagthane, N., Darak, O., y Baig, M. M. V. (2020). A review of *Saprolegnia* infection in freshwater fishes and control of the saprolegniosis. *Sustainable Humansphere*, 16(1), 702-711.
- Biber, P. D. (2006). Measuring the effects of salinity stress in the red mangrove, *Rhizophora mangle* L. *African Journal of Agricultural Research*, 1(1), 1.
- Bruno, D. W., VanWest, P., y Beakes, G. W. (2011). *Saprolegnia* and other oomycetes. *Fish Diseases and Disorders: Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 2nd Edition.

- Cadena-Cadena, F. A.-M., Joe Luís, Meza Ochoa, A. R., Camacho Velazquez, I. E. M. M., Jaime Edzael , Reinaga Franco, F. J., y Cuevas Acuña, D. A. S. P., Aaron Jonary. (2023). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of *Larrea tridentata* leaves. In Pantanal (Ed.), *Advances in biology through agronomy, aquaculture, coastal and environmental sciences* (Vol. 1, pp. 17-26).
- Delgadillo-Ruíz, L., Bañuelos Valenzuela, R., Delgadillo Ruíz, O., Silva Vega, M., y Gallegos Flores, P. (2017). Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova scientia*, 9(19), 273-290.
- Deutsch, Y., Samara, M., Nasser, A., Berman-Frank, I., y Ezra, D. (2023). *Kocuria flava*, a Bacterial Endophyte of the Marine Macroalga *Bryopsis plumosa*, Emits 8-Nonenoic Acid Which Inhibits the Aquaculture Pathogen *Saprolegnia parasitica*. *Marine Drugs*, 21(9), 476.
- Dinçtürk, E., Tanrikul, T. T., y Birincioğlu, S. S. (2019). First report of *Saprolegnia parasitica* from a marine species: Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) in brackish water conditions. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(2), 1503-1510.
- El-Gamal, S. A., Adawy, R. S., Zaki, V. H., Abdelkhalek, A., y Zahran, E. (2023). Prevalence and genetic analyses of *Saprolegnia* strains isolated from Nile tilapia farms at northern Egypt. *Aquaculture*, 563, 738946. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738946>
- Gupta, M. N., Batra, R., Tyagi, R., y Sharma, A. (1997). Polarity index: the guiding solvent parameter for enzyme stability in aqueous-organic cosolvent mixtures. *Biotechnology progress*, 13(3), 284-288.
- Hatai, K., y Hoshiai, G. (1992). Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 532-536.
- Herrera-Fuentes, I. A., Quimis-Ponce, K. L., Sorroza-Rojas, N. A., García-Larreta, F. S., Mariscal-Santi, W., y Mariscal-García, R. E. (2017). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Polo del Conocimiento*, 2(7), 500-522.

- Imeh, U., y Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6301-6306.
- Jasso de Rodríguez, D., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F. D., Villarreal Quintanilla, J. A., y Galván-Cendejas, A. (2007). Antifungal effects in vitro of semiarid plant extracts against post-harvest fungi.
- Koneman, E. W., y Allen, S. (2008). Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*: Ed. médica panamericana.
- Kostennikova, Z. A. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*, 33(6), 83-86.
- Kumar, S., Yadav, A., Yadav, M., y Yadav, J. P. (2017). Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of Aloe vera (L.) Burm. f. *BMC research notes*, 10(1), 1-12.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*, 24, 691-693.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- López, M. H., Molina, E. B., y Baños, S. B. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 178-186.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26(2), 211-219.
- Morán-Santibañez, K., Vasquez, A. H., Varela-Ramirez, A., Henderson, V., Sweeney, J., Odero-Marah, V., . . . Skouta, R. (2019). Larrea tridentata extract mitigates oxidative stress-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Antioxidants*, 8(10), 427.

- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., y Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*(32), 193-205.
- Pavić, D., Miljanović, A., Grbin, D., Šver, L., Vladušić, T., Galuppi, R., . . . Bielen, A. (2021). Identification and molecular characterization of oomycete isolates from trout farms in Croatia, and their upstream and downstream water environments. *Aquaculture*, 540, 736652.
- Perez, V. K. C., Serrano, E., y León, J. (2016). Aislamiento e identificación morfológica de *Saprolegnia* sp. en paiche (*Arapaima gigas*) proveniente de criaderos artesanales en Iquitos, Perú. *Revista AquaTIC*(41).
- Pérez-Pérez, E., Ettiene, G., Marín, M., Casassa-Padron, A., Silva, N., Raga, J., . . . Medina, D. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31, 60-77.
- Pickering, A. D., y Willoughby, L. G. (1982). *Saprolegnia* infections of salmonid fish. *Freshwater Biological Association, Windermere, England. (50th Annual Report)*
- Ravindra, Kumar, R., Ahmad, N., Verma, D. K., Kantharajan, G., Kumar, C. B., . . . Jena, J. K. (2022). Mortalities in cultured *Pangasianodon hypophthalmus* due to oomycete *Saprolegnia parasitica* infection in Uttar Pradesh, India. *Aquaculture Reports*, 23, 101047. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101047>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rodríguez, A., Morales, D., y Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 21(2), 79-82.
- Rodríguez, R. G., Morales, M. E., Verde, M. J., Oranday, A., Rivas, C., Núñez, M. A., . . . Treviño, J. F. (2010). Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus*

- kotschoubeyanus (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler)(Cactaceae). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 41(1), 55-59.
- Saldívar, R. H. L. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 214-222.
- Saldívar-Lira, R. H. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 214-222.
- Sandoval-Sierra, J. V., Martín, M. P., y Diéguez-Uribeondo, J. (2014). Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal biology*, 118(7), 559-578.
- Serrano-Martínez, E., Castro, V., Quispe, M., Casas, G., y León, J. (2014). Aislamiento de bacterias y hongos en tejidos de paiche (*Arapaima gigas*) criados en cautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(1), 117-122.
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S., y Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista iberoamericana de micología*, 19(1), 84-88.
- Treviño-Cueto, B., Luis, M., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., Aguilera, A., y Aguilar, C. N. (2007). Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresource Technology*, 98(3), 721-724.
- Zampini, I. C., Cudmani, N., y Isla, M. I. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(3), 385-393.
- Zapata, S., Piedrahita, A. M., y Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16(1), 25-36.

Zaror, L., Collado, L., Bohle, H., Landskron, E., Montaña, J., y Avendaño, F. (2004). Saprolegnia parasitica en salmones y truchas del sur de Chile. Archivos de medicina veterinaria, 36(1), 71-78.