

Destilados y aceite homeopático de *Tagetes remotiflora*: efecto en *Botrytis cinerea*

Miguel Ángel Ruíz-González¹
Roney Solano-Vidal¹
Ernestina Valadez-Moctezuma¹
Miguel Ángel Serrato-Cruz^{1,§}

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. (miguelruiz93@live.com.mx; roneysv@hotmail.com; nestt56@yahoo.com.mx).

Autor para correspondencia: serratocruz@gmail.com.

Resumen

Un recurso fitogenético en México es el *Tagetes remotiflora* Kunze, con potencial en el control de enfermedades fúngicas. El objetivo fue describir la composición del aceite esencial de *T. remotiflora* y evaluar destilados (aceite e hidrolato) y aceite esencial homeopático en el control de *Botrytis cinerea* *in vitro*, en el ejercicio 2021. Por hidrodestilación de plantas en floración se obtuvo aceite esencial e hidrolato, el aceite esencial también se preparó en su modalidad homeopática, el aceite se analizó mediante la técnica GC-MS. Los tratamientos evaluados fueron: medio PDA (39 g L^{-1}), fungicida Cabrio C (1 g L^{-1}), Tween 20 (0.1 ml L^{-1}), aceite esencial (0.0001 , 0.001 , 0.01 , 0.1 , 0.5 , 1 y 2%), hidrolato (25 , 50 , 75 y 100%) y aceite esencial homeopático (1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 60 y 200 CH). Los datos de porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento micelial fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y mediante análisis probit se determinó concentración mínima inhibitoria 50 (DMI₅₀) y 90% (DMI₉₀). Se identificaron 37 compuestos químicos, cuatro mayoritarios: trans- β -Ocimeno, 2-Careno, Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)- y 5,7-Octadien-4-ona, 2,6-dimetil-, (E)-. Con el aceite esencial al 0.5% se inhibió en 92% el crecimiento micelial y con 1 y 2% se inhibió en 100% , al igual que el fungicida, con el aceite homeopático 6 CH la inhibición fue de 19.2% y con hidrolato al 75 ó 100% la inhibición fue de 74 a 85% . El análisis probit confirma los efectos biocidas del aceite esencial y fungistático del hidrolato contra *B. cinerea*.

Palabras clave:

Tagetes remotiflora, enfermedad fúngica, hidrolato, inhibición.



Introducción

Una de las vertientes para el aprovechamiento de plantas aromáticas en agricultura es someterlas a procesos de destilación para obtener los compuestos, la mayoría de ellos son metabolitos secundarios con actividad biológica. Durante la extracción de aceites esenciales por hidrodestilación se generan tres sustancias (aceite esencial, hidrolato y agua residual o infusión) con potencial de aprovechamiento como biocontroladores de plagas y enfermedades (Proto et al., 2022), aunque el aceite esencial es lo que más se utiliza.

En México, los recursos genéticos aromáticos son numerosos, sobresalen los relacionados con las familias botánicas Asteraceae, Burseraceae, Lauraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae, Lamiaceae y Verbenaceae; se estima que existen alrededor de 450 a 600 especies aromáticas (Calvo-Irabien, 2018). Asteraceae en México se compone de 3 113 especies (Villaseñor, 2018). *Tagetes* (Asteraceae) es un género con amplia distribución en México y es considerado un recurso natural alternativo para control de plagas y enfermedades (Serrato, 2014).

La actividad antimicrobiana y antioxidante que posee el aceite esencial de *Tagetes* ya se ha estudiado (Salehi et al., 2018). Sin embargo, la investigación sobre su actividad antifúngica aún es limitada (Mutlu-Ingok et al., 2020). *T. remotiflora* es una herbácea anual con distribución regional en México, de condición ruderal (Serrato, 2014), con actividad antibacteriana (Rincón et al., 2012) y actualmente sin explorar su composición química ni sus propiedades contra hongos fitopatógenos.

El hidrolato suele contener de 0.05 a 0.2 g L⁻¹ de aceite esencial y otros compuestos (Jakubczyk et al., 2021), característica que le confiere propiedades antioxidantes (Jakubczyk et al., 2021), organolépticas, antimicrobiano, antifúngico, medicinal y en la industria alimenticia (Aćimović et al., 2020), sobre su uso en el control de enfermedades fúngicas son pocos los estudios, sobresale la aplicación de hidrolatos de ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium fistulosum* L.) que inhiben el desarrollo de *Botrytis alli* Munn y *Sclerotium cepivorum* Berk. (Lozano et al., 2000); sin embargo, hasta ahora la exploración de hidrolatos de *Tagetes* contra hongos no se ha planteado.

Hay plantas aromáticas con propiedades fungicida o fungistática, pero su bajo rendimiento de aceite esencial limita su viabilidad económica como ingrediente activo para control de hongos fitopatógenos. Por tal motivo, se contempla la exploración de aceites esenciales homeopáticos que, además de representar un insumo barato, de elaboración personal y sin efecto contaminante al ambiente o al humano (Toledo et al., 2011), es una vía que coadyuva para la obtención de alimentos sanos, de aquí que resulte estratégico verificar su efecto biológico.

La experimentación sobre homeopatía incluye pocos estudios sobre aceites esenciales homeopáticos contra hongos fitopatógenos (Teixeira et al., 2017; Larios-Palacios et al., 2020). El aceite esencial en forma homeopática de *Eucalyptus citriodora* Hook. y *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf controlan *Alternaria solani* Sorauer y *Corynespora cassicola* (Berk. & M.A. Curtis) (Oliveira et al., 2017) y el nosode de *B. cinerea* (elaborado homeopático a partir del propio hongo que causa la enfermedad) en la dilución 7 CH y arsénico 6 CH inhiben de forma parcial el crecimiento micelial de *B. cinerea* in vitro (Larios-Palacios et al., 2020).

Aunque los aceites esenciales de *T. lemmonii* A. Gray. (Larios-Palacios et al., 2020) y *T. patula* L. (Romagnoli et al., 2005) tienen efecto inhibitorio contra *B. cinerea*, todavía no se dispone de antecedentes sobre aceites esenciales homeopáticos de *Tagetes* en el modelo de *B. cinerea*, de ahí la importancia de generar información básica sobre *T. remotiflora* para su aprovechamiento como insumo orgánico contra *B. cinerea*, que ocasiona pérdidas económicas estimadas entre 10 a 100 mil millones de dólares, es difícil de controlar y de naturaleza adaptativa a entornos cambiantes, lamentablemente la aplicación de fungicidas químicos para su control deriva en problemas de contaminación al ambiente y al humano (Boddy, 2016; Romanazzi y Feliziani, 2014).

El objetivo del estudio fue describir la composición del aceite esencial de *T. remotiflora* y evaluar destilados (aceite e hidrolato) y aceite esencial homeopático en el control de *B. cinerea* in vitro. Se espera que algunos compuestos en el aceite esencial de *T. remotiflora* coincidan con otras especies de *Tagetes*, pero otros podrían resultar específicos y que, tanto destilados y homeopáticos, tendrán efecto sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Materiales y métodos

Muestreo de material vegetal

Durante el mes de octubre de 2021 se muestrearon ejemplares de *T. remotiflora* (3.25 kg en peso seco) en etapa de floración en el municipio de San Martín Itunyoso, Oaxaca (17° 11' 58.37" latitud norte 97° 52' 40.13 longitud oeste), esta especie se distribuye principalmente en áreas de transición climática, no hacia los climas templados frío o los cálidos. Los sitios muestreados fueron georreferenciados con un geoposicionador UTM Geo Map 3.1.7. La caracterización botánica y depósito de especímenes con número de registro 35880 se realizó en el Herbario-Hortorio-JES Jorge Espinosa Salas del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), en el Estado de México.

Extracción de aceite esencial e hidrolato

Se recolectaron plantas completas (raíz, tallo, hojas y flores) y fueron trituradas con tijeras de poda de 8", la extracción de aceite esencial e hidrolato se hizo mediante hidrodestilación (Rodríguez *et al.*, 2012) durante 45 min en un destilador de cristal tipo italiano con capacidad de 6 kg. El hidrolato (600 ml) y aceite esencial (1.6 ml) se conservaron durante cinco meses en frascos de cristal hasta su uso.

Identificación de compuestos químicos en aceite esencial

En un frasco ámbar se agregó 1 ml de aceite esencial y se colocó una fibra de microextracción (PALsystem Ingenious Simple Handling) de fase sólida durante 1 min. Después, la muestra fue inyectada mediante el inyector del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) durante 45 min (Bicchi, 2000), se realizaron dos repeticiones. Para la caracterización química de la muestra, se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Agilent Technologies 7890 A GC System).

Se utilizó una columna capilar GC column VF-5ms, de 30 x 0.25 (0.25). La temperatura del horno de la columna se inició en 60 °C por 2 min y posteriormente a 120 °C durante 15 min y una temperatura final de 250 °C, se usó helio como gas acarreador a un flujo constante de 0.5 ml min⁻¹. La identificación de los compuestos se realizó al comparar el tiempo de retención y el espectro de masas con la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

Aislamiento de *Botrytis cinerea*

Durante enero de 2022, en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo, se recolectaron muestras de flores de *Rosa* sp. con síntomas de *Botrytis cinerea*. Las muestras se etiquetaron y colocaron en bolsas de polietileno. En cajas Petri con medio de cultivo PDA (BD Bioxon) se aisló el hongo al pasar fragmentos de 3-4 mm de pétalos de rosa previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1%, luego lavados tres veces con agua bidestilada y secados en papel filtro.

Las cajas se dejaron a temperatura ambiente y cada 24 h se registró el crecimiento del hongo y transcurridos tres días, con un sacabocado estéril de 3.5 mm de diámetro se obtuvo un disco de PDA con micelio y se pasó a nuevo medio de cultivo PDA para purificar el hongo. Para corroborar la identidad del hongo, se hicieron pruebas de patogenicidad en frutos de fresa variedad 'CP Zamorana' obtenidos de un invernadero del campo experimental Chapingo.

Se eligieron frutos maduros e inmaduros, las muestras se sumergieron durante 1 min en hipoclorito de sodio al 1%, enseguida se lavaron tres veces con agua bidestilada y secadas en papel filtro, después, en una caja Petri estéril se colocaron los frutos maduros e inmaduros por separado, se hicieron tres repeticiones. Los frutos se inocularon por contacto con un hisopo estéril que contenía micelio de siete días de edad. Como testigo se consideraron muestras solo desinfectadas. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento del hongo (tres días).

Identificación de *B. cinerea*

En un portaobjetos se agregó una gota de lactofenol, con una aguja de disección se hizo un raspado en las cajas Petri con crecimiento del hongo (colonia) para obtener micelio y se colocó en la gota de lactofenol, enseguida se cubrió con el cubreobjetos para observar al microscopio Olympus CX31 (40x). Para la identificación morfológica del hongo se observaron estructuras como: micelio gris y conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris (Brandhoff *et al.*, 2017), se usaron claves de identificación del color de la colonia y la forma de los conidios, micelio y formación de esclerocios (Abata *et al.*, 2016). También, se consultó el documento: Taxonomy and Identification in Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y Hunter, 1986).

Preparación de tratamientos

Para el bioensayo se empleó el método de agar envenenado que consistió en integrar al medio de cultivo las sustancias tratamiento (Balouri *et al.*, 2016). En matraces Erlenmeyer de 250 ml se prepararon 100 ml de medio PDA (39 g L⁻¹) por cada tratamiento. Con aceite esencial de *T. remotiflora*, agua bidestilada y Tween 20 (0.1%) se preparó una emulsión para obtener siete concentraciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2%) de aceite esencial, hidrolato en cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25%) preparado con agua bidestilada.

Las sustancias homeopáticas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 y 200CH) las elaboró el Dr. Felipe de Jesús Ruíz Espinoza del Centro Regional Universitario del Anáhuac de la UACH de acuerdo con el protocolo de Larios-Palacios *et al.* (2020). El fungicida fue Cabrio® C (BASF, 2023) (Boscalid 25.20% + Pyraclostrobin 12.80%) (1 g L⁻¹). Cabrio® C y Tween® 20 (Thermo Fisher Scientific, 2023) (0.1 L⁻¹) se usaron como testigos de referencia; en el caso de Tween 20 (Tw20), en ensayos previos se observó efecto biológico y se quiso confirmar. PDA 39 g L⁻¹ fue el testigo absoluto.

De los aceites homeopáticos se agregó 1 gota en cada matraz y se hizo una sucusión durante 2 min. Los matraces con las sustancias tratamiento se esterilizaron durante 20 min en autoclave (AESA modelo CV 300) a 120 °C y se vertieron en cajas Petri de vidrio estériles de 90 mm. El medio de cultivo se dejó gelificar a temperatura ambiente por 24 h. Después, con un sacabocado estéril de 3.5 mm de diámetro se obtuvo un disco de PDA con el inóculo del micelio del hongo de siete días de edad y con una aguja de disección se colocó el disco invertido en el centro de la caja Petri. Las cajas Petri con las sustancias tratamiento e inóculo se incubaron en oscuridad a 18 ± 2 °C en estufa ya que es una temperatura óptima para el crecimiento del hongo.

Diseño experimental

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con ocho tratamientos homeopáticos y 14 más, resultado del aceite esencial, hidrolato, testigo, Tween 20 y fungicida comercial, cada uno con cinco repeticiones y un testigo absoluto, la unidad experimental fue una caja Petri con medio de cultivo PDA con los tratamientos a evaluar.

Registro de datos

Con un vernier digital se midió el crecimiento radial del hongo cada 24 h hasta que el testigo cubrió completamente la caja Petri con micelio (cinco días). La velocidad de crecimiento (VC) y porcentaje de inhibición (%) se calcularon con las fórmulas que se muestran en el Cuadro 1.



Cuadro 1. Fórmulas para calcular las variables evaluadas.

Velocidad de crecimiento (VC)	Porcentaje de inhibición (%I)
$VC = \frac{Df - Di}{Tf - Ti}$	$\%I = \frac{D1 - D2}{D1} (100)$
<p>Df= diámetro final de crecimiento (mm); Di= diámetro inicial de crecimiento (mm); Ti= tiempo inicial de crecimiento (días); Tf= tiempo final de crecimiento (días); D1= diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm); y D2= diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm).</p>	

Análisis de datos

Los datos registrados se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc, 2024). El análisis se realizó por grupos de tratamientos: aceite, hidrolato al considerar la variable de porcentaje de inhibición y sustancias homeopáticas con las variables porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento.

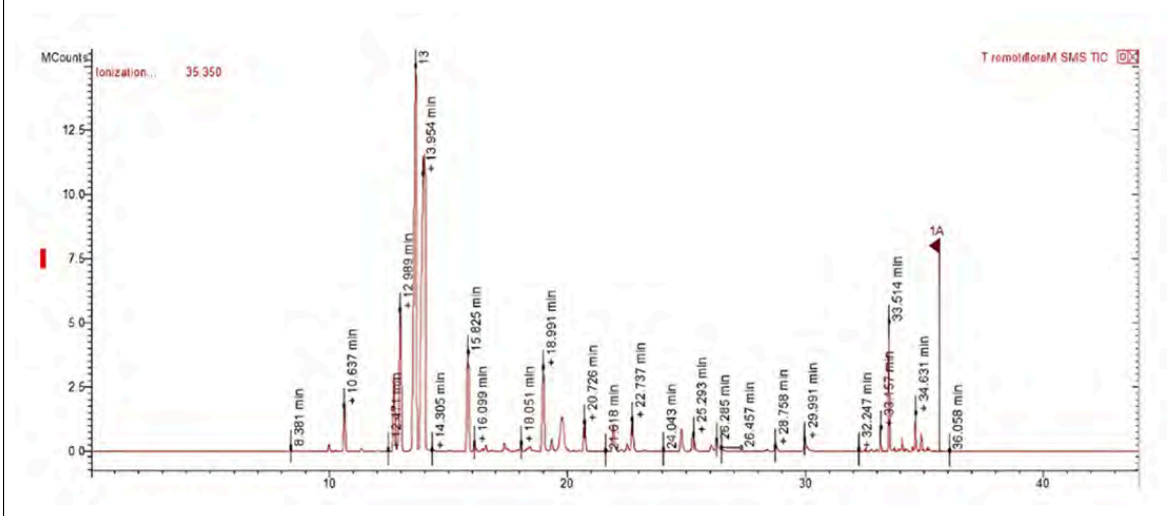
Análisis probit

Las estimaciones de regresión y la concentración que produjo inhibición (dosis mínima de inhibición) del 50 (DMI₅₀) y del 90% (DMI₉₀), se generaron mediante análisis probit en SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc, 2023). La DMI permitió conocer la concentración de la sustancia-tratamiento con la que es posible inhibir, en porcentaje, al crecimiento del micelio.

Resultados y discusión

El tiempo de retención de compuestos con el equipo CG-EM fluctuó entre 8.38 y 36.05 min, periodo en el que se detectaron 37 compuestos químicos, cuatro mayoritarios: trans- β -Ocimeno (6.98%), 2-Careno (4.98%), Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)- (4.87%) y 5,7-Octadien-4-ona, 2,6-dimetil-, (E)- (4.22%) (Figura 1). Los compuestos encontrados en el aceite de *T. remotiflora*, que por primera vez se identifican, especialmente el mayoritario trans- β -Ocimeno, se ha encontrado en otras especies de *Tagetes* (Xu *et al.*, 2012), mientras que 2-Careno parece específico de esta especie (Figura 1).

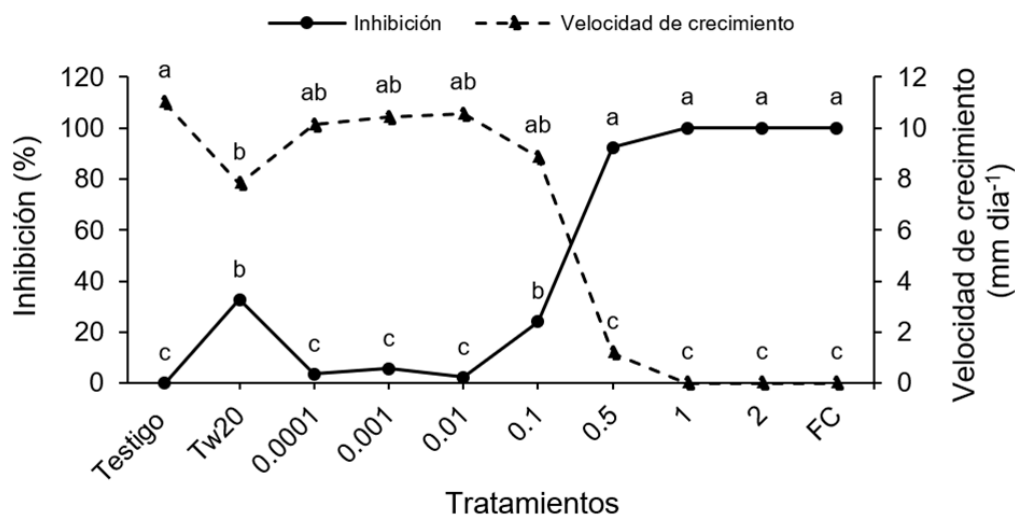
Figura 1. Cromatograma que muestra los picos y tiempos de retención de compuestos identificados en muestras de aceite esencial de *T. remotiflora*.



La morfología de estructuras reproductivas permitió confirmar la identidad de *B. cinerea*, misma que se comprobó mediante pruebas de patogenicidad que mostraron crecimiento del hongo que es causante del moho gris en frutos de fresa (Brandhoff *et al.*, 2017). Los aislados produjeron esclerocios con color negro, las colonias eran de color gris oscuro, micelio aéreo y conidios de forma ovalada.

En la evaluación toxicológica se observó que, al reducir la concentración del aceite, la inhibición disminuyó (100 a 3.45%) y aumentó la velocidad de crecimiento (0 a 10.13 mm día⁻¹) (Figura 2). El aceite esencial 1 y 2% y el fungicida comercial (FC) inhibieron totalmente el crecimiento micelial (Figura 2) con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.0001$). La variabilidad de esporulación de *B. cinerea* puede explicarse por las complejas interacciones entre las condiciones climáticas y la carga de inóculo, la germinación de esporas y el crecimiento de hongos en el medio de cultivo (Fedele *et al.*, 2019) resultado que concuerda con otros obtenidos para el mismo hongo al aplicarse aceite de *T. lemmonii* en 1% (Larios-Palacios *et al.*, 2020) y *T. patula* en 1% y 0.1% (Romagnoli *et al.*, 2005).

Figura 2. Efecto del aceite esencial de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. FC= fungicida comercial; Tw20= Tween 20 0.1%; 2= aceite esencial 2%; 1= aceite esencial 1%; 0.5= aceite esencial 0.5%; 0.1= aceite esencial 0.1%; 0.01= aceite esencial 0.01%; 0.001= aceite esencial 0.001%; y 0.0001= aceite esencial 0.0001%. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



Con las concentraciones 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001% la inhibición del micelio fue mayor (24.05 a 3.45%) que la registrada en el testigo (0%); con 0.1% de aceite, la velocidad de crecimiento fue de 8.84 mm día⁻¹, menor que el testigo (11 mm día⁻¹). Con aceite esencial de *T. remotiflora* también se reporta actividad inhibitoria en el crecimiento de bacterias como *Dikeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Rincón *et al.*, 2012).

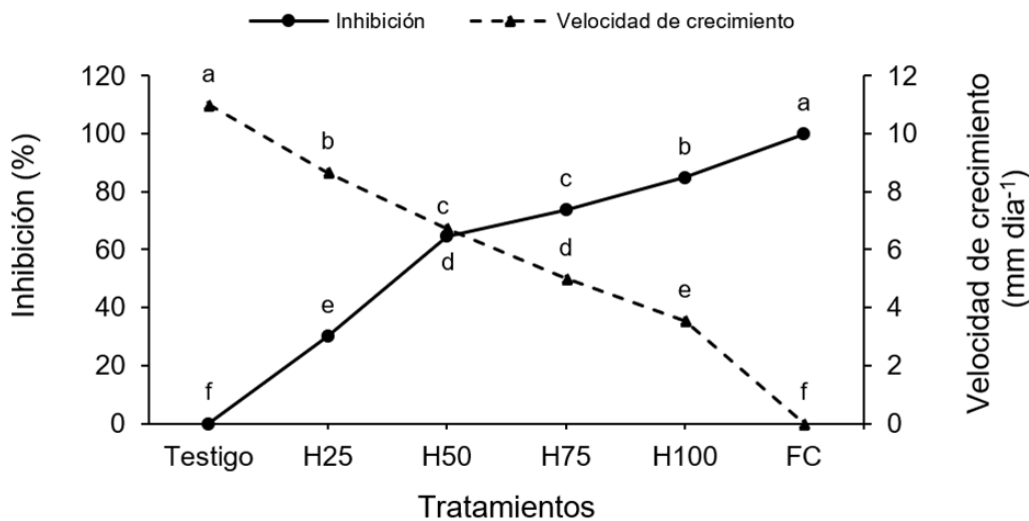
Los aceites esenciales y sus componentes actúan sobre la membrana y el citoplasma y en ciertas situaciones, alteran completamente la morfología de las células, su actividad podría ser causada por las propiedades de los terpenos/terpenoides (altamente lipofílicos y de bajo peso molecular) que son capaces de alterar la membrana celular (inhiben síntesis de ergosterol), adelgazamiento, distorsión de la pared hifal, causar la muerte celular o inhibir la esporulación y germinación de hongos (Nazzaro *et al.*, 2017).

Las concentraciones de 0.5, 1 y 2% no mostraron diferencias estadísticas en el crecimiento micelial (Figura 2), por ello, la concentración de 0.5% (5 ml L^{-1}) resultó prometedor desde el punto de vista económico ya que, al ser una concentración menor se puede preparar un mayor volumen ya que solo se requieren 5 ml L^{-1} , mientras que con la concentración de 1 y 2% se requieren 10 y 20 ml L^{-1} , respectivamente, por lo que convendría implementar evaluaciones *in vivo*.

Sin duda, aislar cada compuesto mayoritario y evaluar su efecto biológico individual será una próxima tarea, como también lo será la evaluación experimental de diferentes concentraciones del surfactante, ya que su efecto inhibitorio en el crecimiento micelial fue evidente y deberá discriminarse su interacción con el aceite esencial. Con hidrolato al 75 (H75) y 100% (H100), el porcentaje de inhibición fue 74 y 85% y la velocidad de crecimiento de 5 y 3.54 mm día^{-1} , respectivamente.

Al reducir la concentración, la inhibición en el crecimiento micelial también se redujo, como el caso de hidrolato 25% (H25) que inhibió 30%, esta misma tendencia siguió la velocidad de crecimiento micelial (Figura 3). Algunos estudios sobre hidrolatos de varias especies vegetales en la actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* destacan efectos biológicos atribuibles a su composición química y a las cantidades muy pequeñas de aceites esenciales que permanecen dispersas (Jakubczyk *et al.*, 2021).

Figura 3. Efecto del hidrolato de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. FC= fungicida comercial; H25= hidrolato 25%; H50= hidrolato 50%; H75= hidrolato 75%; y H100= hidrolato 100%. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



Los componentes activos del hidrolato pueden difundirse mejor en el medio acuoso alrededor de los microorganismos y su actividad aumenta en comparación con los aceites esenciales que necesitan solubilización inicial en un disolvente orgánico antes de su introducción en el medio acuoso (Karampoula *et al.*, 2016), esta situación refuerza la necesidad de explorar el papel del surfactante en bioensayos con aceite esencial que, para disolver en agua, requiere de ese insumo.

El efecto inhibitorio del hidrolato de *T. remotiflora* en el crecimiento del micelio de *B. cinerea* coincide con otros estudios en los que se han utilizado hidrolatos de diferentes especies como *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Sw. y *Zingiber officinale* Roscoe que inhiben en 50% el desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* H.C. Ramírez *et al.* (2011) y de *Allium sativum* y *Allium fistulosum* que inhiben a *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum* (Lozano *et al.*, 2000).

El efecto inhibitorio del 74 a 85% en *B. cinerea* (Figura 3) conforma la primera evidencia sobre hidrolatos de *Tagetes* como sustancia fungistática, por lo tanto, en la perspectiva de su evaluación *in vivo*, es necesaria la descripción del perfil químico mediante cromatografía líquida. En general, los hidrolatos poco se han explorado en su composición (Jakubczyk *et al.*, 2021).

El tratamiento testigo con el surfactante Tween 20 (Tw20), usado solo para la preparación de los tratamientos de aceite esencial, propició inhibición del crecimiento micelial (32%) con respecto al testigo (0%) y de efecto parecido al producido con aceite esencial en 0.0001 a 0.5% (Figura 2) y al hidrolato 25% (Figura 3).

Con el análisis probit (Cuadro 2), valores de DMI bajos correspondieron al aceite esencial (0.16 y 0.51%), mientras que valores altos al hidrolato (41 y 127%); es decir, se detectaron tendencias de inhibición parcial o completa del crecimiento micelial al aplicar destilados de *T. remotiflora*, se destaca que con dosis de 0.51% de aceite se puede inhibir 90% del crecimiento del micelio de *B. cinerea*, un resultado promisorio para establecer evaluaciones *in vivo*.

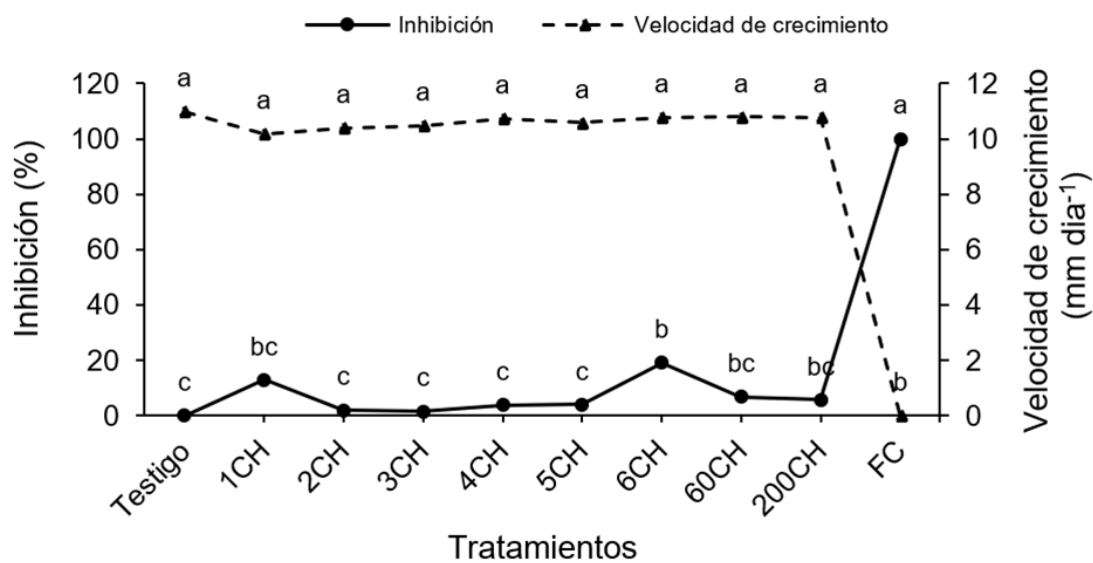
Cuadro 2. Dosis mínimas de inhibición para *B. cinerea*, estimadas por análisis probit a los cinco días de crecimiento.

Destilados	Dosis	
	DMI 50 (%)	DMI 90 (%)
Aceite esencial	0.16	0.51
Hidrolato	41.15	127.51

DMI= dosis mínima inhibitoria.

Con aceite esencial homeopático 6 CH, se logró inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* con significancia estadística ($p < 0.0001$). A medida que la dilución aumentó, no se observó un comportamiento definido en el crecimiento del micelio; por ejemplo, 1 CH (baja dilución), 4 CH (baja dilución), 60 CH (dilución media) y 200 CH (alta dilución) inhibieron 12.93, 3.8, 6.94 y 5.72%, respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Efecto de aceite esencial homeopático de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. CH= escala de dilución centesimal Hahnemanniana. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).



El efecto biológico de sustancias homeopáticas se ha observado con azufre homeopático 100 CH (Vargas *et al.*, 2016), *Arnica montana* Hook y *Thuja occidentalis* L. 30 CH (Hanif y Dawar, 2017), calcárea carbónica 1 000 CH (Dos Reis y Ottoni, 2021) y de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 24 CH (Rissato *et al.*, 2016), los cuales inhiben desde 40 hasta 90% el crecimiento micelial y producción de esclerocios en: *S. sclerotiorum*, *Phytophthora colocasiae* Racib., *Alternaria solani*, *Aspergillus niger* Tiegh., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

En *B. cinerea* únicamente se ha evaluado nosode de *B. cinerea* 7 CH y arsénico 6 CH, inhibitorios en 31.2 y 11.8%, respectivamente (Larios-Palacios *et al.*, 2020), dentro de esos porcentajes de inhibición se ubicó la respuesta de inhibición (19.2%) derivada del uso de aceite homeopático 6 CH de *T. remotiflora* (Figura 4). El efecto de las sustancias homeopáticas se debe a que con el proceso de dilución y sucusión se generan nanopartículas (del material de origen, en este caso, del aceite esencial) con mayor actividad biológica que con macromoléculas (Rajendran, 2017).

Es decir, durante este proceso (dilución-sucusión) el solvente puede ser modificado en su estructura física por la presencia, dilución y sucusión de los diferentes solutos, aun cuando estos hayan desaparecido en las progresivas diluciones (Montfort, 2019) y esa transferencia y aplicación de información que se vincula a las moléculas del solvente es la que mantiene el efecto o mecanismo de acción (Liu *et al.*, 1996).

La evaluación del aceite esencial homeopático de *T. remotiflora* en el modelo de *B. cinerea* es el primero con plantas de *Tagetes* y se suma a los escasos trabajos sobre aceites esenciales homeopáticos de especies vegetales aromáticas contra hongos fitopatógenos. La necesidad de reducir el uso de agroquímicos en la agricultura de México, ha incrementado el interés por la posible aplicación de extractos vegetales, aceites esenciales y sustancias homeopáticas en el control de fitopatógenos, de ahí que la atención al estudio y aprovechamiento de las especies aromáticas del país, como en el caso de *Tagetes*, podría ser fuente de soluciones promisorias, por lo que la evaluación *in vivo* de los resultados de este trabajo es necesaria, misma que está en proceso.

Conclusiones

El aceite de *T. remotiflora* contiene 37 compuestos químicos, cuatro de ellos mayoritarios. En función de la concentración, tanto del aceite esencial del taxón como de su hidrolato, es posible inhibir parcial o completamente el crecimiento micelial y esporulación de *B. cinerea*, el análisis probit confirma los efectos biocidas del aceite esencial y fungistático del hidrolato contra *B. cinerea*. El aceite esencial homeopático tiene efecto fungistático menor. La evaluación *in vivo* de los destilados de *T. remotiflora* y del aceite esencial homeopático es importante para confirmar su efectividad como insumos de biocontrol contra *B. cinerea* y el mecanismo de acción de estas sustancias requiere investigación para comprender su efecto a nivel molecular.

Bibliografía

- 1 Abata, L. K.; Izquierdo, A. R.; Viera, W. and Flores, F. J. 2016. First report of botrytis rot caused by *Botrytis cinerea* on peach in Ecuador. Journal of Plant Pathology. 98(3):677-697. <https://scholar.google.com.mx/scholar?q=First+report+of+botrytis+rot+caused+by+Botrytis+cinerea+on+Peach+in+Ecuador&hl=es&as-sdt=0&as-vis=1&oi=scholar>.
- 2 Aćimović, M. G.; Tešević, V. V.; Smiljanić, K. T.; Cvetković, M. T.; Stanković, J. M.; Kiprovska, B. M. and Sikora, V. S. 2020. Hydrolates by products of essential oil distillation: chemical composition biological activity and potential uses. Advanced Technologies. 9(2):54-70.
- 3 Balouiri, M.; Sadiki, M. and Ibsouda S. K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 6(2):71-79. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>.

- 4 Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1986. Taxonomy and identification in illustrated genera of imperfect fungi. 4th Ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.
- 5 BASF. 2023. Cabrio® C, fungicida para el cultivo de vegetales: Informaciones. Ciudad de México, México. <https://www.basf.com/mx/es.html>.
- 6 Bicchi, C. 2000. Gas chromatography, essential oils. *In*: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 3rd ed. Turin, Italy. 158-168 pp. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081019832024713>.
- 7 Boddy, L. 2016. Pathogens of autotrophs. *In*: the fungi. 3rd Ed. Watkinson, S. C.; Boddy, L. and Money, N. P. Academic Press. Cambridge, Massachusetts, USA. 245-292 pp. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123820341000086?via%3Dihub>.
- 8 Brandhoff, B.; Simon, A.; Dornieden, A. and Schumacher, J. 2017. Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light responsive transcriptional regulators *bcltf3* and *bcreg1*. *Current Genetics*. 63(5):931-949. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28382431/>.
- 9 Calvo-Irabien, L. M. 2018. Native Mexican aromatic flora and essential oils: current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. *Industrial Crops and Products*. 111:807-822. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017308038>.
- 10 Dos Reis, A. C. B. and Ottoni, O. J. R. 2021. Antifungal activity of homeopathic medicines against the white mold causing agent *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*. 43(1):e56548.
- 11 Fedele, G.; González-Domínguez, E.; Si-Ammour, M.; Languasco, L. and Rossi, V. 2019. Reduction of *Botrytis cinerea* colonization of and sporulation on bunch trash. *Plant Disease*. 104(3):808-816. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-08-19-1593-RE>.
- 12 Hanif, A. and Dawar, S. 2017. Antifungal activity of homeopathic drugs treated seeds against root decay pathogens and improvement of growth on crop plants. *Pakistan Journal of Botany*. 49(S1):355-362. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173269157>.
- 13 Jakubczyk, K.; Tuchowska, A. and Janda-Milczarek, K. 2021. Plant hydrolates Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 142:112033. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221008167>.
- 14 Karampoula, F.; Giaouris, E.; Deschamps, J.; Doulgeraki, A. I.; Nychas, G. J. and Dubois-Brissonnet, F. 2016. Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17):5309-5319. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01351-16>.
- 15 Larios-Palacios, O. E.; López-Vázquez, E. Y.; Curiel, R. A.; Ruíz-Espinoza, F. J.; Solano-Vidal, R. y Serrato-Cruz, M. A. 2020. Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11(3):593-606.
- 16 Liu, K.; Cruzan, J. and Saykally, R. 1996. Water clusters. *Science*. 271(5251):929-933.
- 17 Lozano, C.; Córdoba, N.; Avila-De-Moreno, C. y Velosa, M. 2000. Evaluación del efecto de hidrolatos de ajo (*Allium sativum*) y cebolla junca (*Allium fistulosum*) en el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum*. *Fitopatología Colombiana*. 24(1/2):29-32.
- 18 Montfort, C. H. 2019. De la naturaleza y los mecanismos de acción de las ultra diluciones homeopáticas (UDH). *Contribuciones teórico-experimentales realizadas en México. La Homeopatía de México*. 88(718):20-26.
- 19 Mutlu-Ingok, A.; Devecioglu, D.; Dikmetas, D. N.; Karbancioglu-Guler, F. and Capanoglu, E. 2020. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*. 25(20):1-36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066611/>.

- 20 Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Coppola, R. and Feo, V. 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*. 10(4):1-13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5748643/>.
- 21 Oliveira, J. S. B.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Bonato, C. M. and Carneiro, S. M. T. P. G. 2017. Homeopatas de óleos essenciais sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Revista Ciência Agronômica*. 48(1):208-215.
- 22 Proto, M. R.; Biondi, E.; Baldo, D.; Levoni, M.; Filippini, G.; Modesto, M.; Di Vito, M.; Bugli, F.; Ratti, C; Minardi, P. and Mattarelli, P. 2022. Essential oils and hydrolates: potential tools for defense against bacterial plant pathogens. *Microorganisms*. 10(4):1-16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35456755/>.
- 23 Rajendran, E. S. 2017. Nano pharmacological aspect of homeopathic drugs-A comparative study of different scales of ultra high dilutions based on HRTEM analysis and NP characterization of homeopathic drug natrum muriaticum 6C-CM and LM1-LM30. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 3(2):89-106.
- 24 Ramírez, G. S.; López, B. O.; Guzmán, H. T.; Munguía, U. S. y Espinosa, Z S. 2011. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). *Tecnología en Marcha*. 24(2):3-17.
- 25 Rincón, E. G.; Quiñones, E. E.; Serrato, C. M. A. y Qui, Z. J. A. 2012. Efectividad biológica de extractos de *Tagetes* spp. sobre bacterias fitopatógenas. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (SNICS)- Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). CIATEJ, México. 44 p.
- 26 Rissato, B. B.; Stangarlin, J. R.; Coltro-Roncato S.; Dildey, O. D. F.; Goncalves, E. D. V. and Lorenzetti, E. 2016. *In vitro* activity of homeopathic drugs against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientia Agraria Paranaensis*. 15(3):320-323. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20163346546>.
- 27 Rodríguez, A. M.; Alcaraz, M. L. y Real, C. S. R. 2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). 126183. México, DF. 47 p.
- 28 Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Vicentini, C. B. and Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*. PMID. 225(1-2):57-65. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15868213/>.
- 29 Romanazzi, G. and Feliziani, E. 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). *In: Elsevier eBooks*. 131-146 pp. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124115521000041?via%3Dihub>.
- 30 Salehi, B.; Valussi, M.; Morais-Braga, M. F. B.; Carneiro, J. N. P.; Leal, A. L. A. B.; Coutinho, H. D. M.; Vitalini, S.; Kr#giel, D.; Antolak, H.; Sharifi-Rad, M.; Silva, N. C. C.; Yousaf, Z.; Martorell, M.; Iriti, M.; Carradori, S. and Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules*. 23(11):2-24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6278309/>.
- 31 SAS Institute Inc. 2024. SAS® OnDemand for Academics. <https://welcome.oda.sas.com>
- 32 SAS Institute Inc 2023. SAS® OnDemand for Academics. <https://www.sas.com/es-mx/software/on-demand-for-academics.html>.
- 33 Serrato, C. M. A. 2014. El Recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)-Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (SNICS)-Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). Chapingo, Estado de México. 183 p.

- 34 Teixeira, M. Z.; Solange, M. T. and Carneiro, P. G. 2017. Effects of homeopathic high dilutions on plants: literature review. *Revista de Homeopatía*. 80(3/4):104-120.
- 35 Thermo Fisher Scientific. 2023. Ficha de datos de seguridad. Ciudad de México. [extension://elhekieabhbkmcefcfoobjddigcaadp/https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=10113103&productDescription=100ML+Tween*+20&countryCode=ES&language=es](https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=10113103&productDescription=100ML+Tween*+20&countryCode=ES&language=es).
- 36 Toledo, M. V.; Stangarlin, J. R. and Bonato, C. M. 2011. Homeopathy for the control of plant pathogens. *In: science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Ed. Formatex Research Center. Badajoz, España. 1063-1067 pp.
- 37 Vargas, T. M.; Renato, S. J.; Moacir, B. C.; Muriel, M. T.; Anghinoni, M. M.; de Broti, B. R.; Lorenzetti, E.; Coltro-Roncato, S.; Rosane, K. C. and Assi, L. 2016. Fungitoxicity activity of homeopathic medicines on *Alternaria solani*. *African Journal of Agricultural Research*. 11(39):3824-3838. <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/DCF0F9F60846>.
- 38 Villaseñor, J. L. 2018. Diversity and distribution of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*. 96(2):332-358.
- 39 Xu, L.; Chen, W. J.; Qi, H. and Shi, Y. P. 2012. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicine*. 4(2):103-117.



Destilados y aceite homeopático de *Tagetes remotiflora*: efecto en *Botrytis cinerea*

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 January 2025
Date accepted: 01 February 2025
Publication date: 13 April 2025
Publication date: Feb-Mar 2025
Volume: 16
Issue: 2
Electronic Location Identifier: e3494
DOI: 10.29312/remexca.v16i2.3494

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

Tagetes remotiflora
enfermedad fungosa
hidrolato
inhibición

Counts

Figures: 4

Tables: 2

Equations: 2

References: 39

Pages: 0