

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL FRUTO DE *Bromelia pinguin* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A UN HONGO AISLADO DEL FRUTO DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) EN ESTADO DE PUDRICIÓN.

Phytochemical Characterization of the Hydro-Alcoholic Extract of the Fruit of *Bromelia pinguin* and Evaluation of Their Antifungal Activity Against an Isolated Fungus From Cacao (*Theobroma cacao L.*) in State Rot

T

Andrés Felipe Lugo Vargas 1 , Daniela TarráJaramillo2, María Natali Nieto Guzmán3 y JhonIronzi Maldonado Rodríguez4*

1,2,4Grupo BPNA del Programa de Química., Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonía, Campus Porvenir calle 17 Diagonal 17 con carrera 3F-Barrío Porvenir 3Laboratorio de Fitopatología del centro de investigaciones Amazónicas SINCHI

RESUMEN

Se evaluó el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de fruto de *B. pinguin* frente a un hongo aislado de frutos enfermos en estado de pudrición de Cacao (*Theobroma cacao L.*) mediante un ensayo de inhibición de crecimiento micelial empleando el método de dilución en agar. El extracto tuvo un efecto antifúngico bastante notorio en un rango de concentraciones entre 2,5 y 10 % (V/V) y se pudo evidenciar además una fuerte relación dosis-respuesta. Un análisis fitoquímico preliminar, permitió identificar flavonoides, antraquinonas, taninos, saponinas y glucósidos cardiotónicos como los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *B. pinguin*; sin embargo, aquí se discute sobre la Pinguinaína, como principal responsable de dicha actividad.

Palabras Clave: *B. pinguin*, pinguinaína, *M. roleri*, Moniliasis, extracto hidoralcohólico, Cacao

ABSTRACT

The antifungal effect of hydroalcoholic extract of *B. pinguin* fruit against an isolated fungus from diseased fruits cocoa (*Theobroma cacao L.*) in state rot, by an inhibition assay using the method mycelial growth agar dilution. The extract had a remarkable antifungal effect in a range of concentrations between 2.5 and 10% (V/V) and could also show a strong dose-response relationship. A preliminary phytochemical analysis identified flavonoids, anthraquinones, tannins, saponins and cardiac glycosides as the main secondary metabolites present in the aqueous alcoholic extract of *B. pinguin*; however, it is discussed on the Pinguinaína, as the main responsible for the activity.

Palabras Clave: *B. pinguin*, pinguinaína, *M. roleri*, Moniliasis, extracto hidoralcohólico, Cacao

1. INTRODUCCION

Uno de los grandes problemas que afrontan a nivel mundial los cultivadores de Cacao (*Theobroma cacao L.*) son las infecciones causadas por hongos fitopatógenos como *Moniliophthora roreri*, *Ceratocystis fimbriata*, *Collectotrichum gloeosporoides*, *Crinipellis pernicioso*, hongos del complejo *Phytophthora*, entre otros, que pueden generar pérdidas hasta del 100 %. En Colombia el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* es causante de la enfermedad denominada Moniliasis o pudrición acuosa que puede causar pérdidas hasta del 90 % de la producción de Cacao. Los fungicidas de síntesis química para el control de *M. roreri* no son del todo satisfactorios o son inconsistentes de año a año, y su alta frecuencia de uso está asociado a la contaminación ambiental y a mayores costos de producción que resulta antieconómico para el cacaoero (1). El manejo de estas enfermedades se basa en la integración de prácticas agronómicas como la tecnificación, la reducción del inóculo primario, la siembra de clones de alta productividad y la implementación permanente de prácticas de saneamiento y de manejo cultural; sin embargo, la poca capacitación a los productores y sus bajos recursos económicos para implementarlos hacen difícil su implementación (2).

Los plaguicidas naturales han sido usados en la agricultura como una alternativa para el manejo de problemas fitosanitarios y muestran ventajas; por ejemplo, en su mayoría son biodegradables y no afectan la salud del hombre ni la del medio ambiente (3). Lo anterior permite generar un interés permanente en la búsqueda de plaguicidas naturales. y en este aspecto, las plantas representan un potencial enorme ya que contienen principios activos los cuales extraídos en forma adecuada y administrados en dosis suficientes, producen efectos insecticidas o fungicidas que permiten el manejo de insectos-plaga y de microorganismos fitopatógenos (4), (5).

Bromelia pinguin L. (Bromeliaceae) es una planta ampliamente distribuida en toda América central y el caribe, conocida como Piñuela, Maya, o Piña de ratón (6), (7), (8). El fruto es comestible aunque ocasiona irritación ligera en los labios sin efectos nocivos y también pequeños dolores ulcerosos sobre los dedos de las personas quienes manipulan su pulpa aunque de carácter reversible (9). Además de ser considerado como un posible alimento funcional (10), su fruto ha sido usado en fitoterapia como antihelmíntico y

para tratar la tosferina y el escorbuto (11). También es considerado como una fuente rica en proteasas, especialmente pinguinaina; esta última, considerada un preparado proteico cuya composición podría ser variable (9), (11).

Varios estudios han mostrado evidencias sobre la actividad antibacteriana y fungitóxica del fruto de *B. pinguin* frente a distintas cepas de hongos y bacterias; sin embargo, aún no existen estudios que pretendan establecer algún tipo de actividad frente a patógenos fúngicos de Cacao (*Theobroma cacao L.*). En este sentido el objetivo de este trabajo fue investigar sobre la posible actividad fungicida que podría tener un extracto hidro-alcohólico de fruto de *B. pinguin* frente a un hongo aislado de frutos enfermos en estado de pudrición de Cacao, y además establecer mediante un análisis fitoquímico preliminar, el contenido de sus principales metabolitos secundarios.

2. METODOLOGIA

Obtención del material vegetal.

El material vegetal constituido por el fruto de *B. pinguin L.* fue obtenido en una zona rural cercana al municipio de Florencia en el departamento del Cauca-Colombia, en el mes de septiembre del año 2015. Los frutos fueron cortados en trozos pequeños y sometidos a secado en estufa eléctrica a $43 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 días consecutivos y posteriormente fue pulverizado en un molino convencional, obteniéndose 2385 g de material vegetal.

Obtención del extracto hidroalcohólico.

El material pulverizado se sometió a un proceso de sucesivas extracciones por maceración con etanol al 75 % hasta agotar matriz. Luego de cada extracción el material vegetal fue filtrado mediante vacío usando papel filtro Whatman No. 1y el filtrado se concentró a presión reducida para eliminar el alcohol. Posteriormente dicho filtrado se dejó durante un mes a temperatura ambiente y tapado con papel aluminio al cual se le hicieron pequeños orificios para permitir la eliminación de cualquier vestigio de etanol en la muestra, obteniéndose finalmente 60 mL de un líquido relativamente denso y de color café oscuro (Extracto hidroalcohólico). Este extracto se almacenó a temperatura ambiente en un tubo plástico con tapa-rosca debidamente rotulado para los posteriores análisis químicos

Transcurrido este tiempo, y con la ayuda de una aguja de disección estéril se inoculó en todo el centro de la caja de Petri una fracción del hongo de 15 días de crecimiento y cada caja fue mantenida en estufa para cultivos a 26 °C durante un periodo de 12 días. Como control positivo en lugar de extracto se adicionó al medio de cultivo el fungicida comercial de amplio espectro Ridomil® (Metalaxyl-M + Mancozeb) en una concentración de 500 ppm. El control negativo consistió en el hongo creciendo en medio de cultivo sin ningún aditivo adicional o extracto.

Medición del crecimiento.

El crecimiento del hongo fue seguido mediante registro fotográfico y las mediciones de crecimiento radial se hicieron a partir del cuarto día, justo cuando el control negativo alcanzó su crecimiento completo en la caja de Petri, hasta el día 7.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de *Bromelia pinguin*

Tipo de metabolito secundario	Resultado
Flavonoides	+
Leucoantocianidinas	-
Antraquinonas	+
Taninos	+
Cumarinas	-
Alcaloides	±
Saponinas	+
Glucósidos cardiotónicos	+
Esteroides y/o triterpenos	±

+ = Presencia, - = Ausencia, ± = No concluyente

Como puede apreciarse en la tabla 1, el extracto hidroalcohólico de *Bromelia pinguin* mostró la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas, y glucósidos cardiotónicos, en tanto que las pruebas para alcaloides, triterpenos y esteroides no fueron concluyentes. A pesar de los pocos estudios fitoquímicos reportados; metabolitos como flavonoides, taninos y cumarinas, terpenos y saponinas ya han sido descritos para esta planta (20), (21), (10), mientras que para los alcaloides y glucósidos cardiotónicos aún no existe reporte alguno. Es bien sabido que la composición y contenido de metabolitos presentes en una planta puede variar de acuerdo a condiciones geo-

gráficas, clima, suelo, estado vegetativo de la planta al momento de recolección y también debido a posibles variaciones genéticas de la planta (22). De igual manera, las pruebas negativas o poco concluyentes para el caso de cumarinas y terpenos respectivamente, pueden estar asociadas también a la baja concentración de estos constituyentes en el extracto y la poca sensibilidad del método para ser detectados. Para el caso de alcaloides se sabe también que ciertos grupos en moléculas de proteínas pueden dar falsos positivos.

Actividad antifúngica.

Con respecto a la actividad antifúngica se pudo evidenciar que el extracto hidroalcohólico de *Bromelia pinguin* posee un efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del patógeno fúngico que genera la pudrición del fruto de *Theobroma cacao L.* En la figura 3 se muestra un registro fotográfico del crecimiento del hongo durante 7 días en la cual se puede observar claramente un efecto inhibitorio el cual además es dependiente de la dosis. Para concentraciones de extracto mayores de 10 % V/V no se observó crecimiento luego de 7 días de incubación, mientras que a dosis menores su crecimiento fue notorio y a partir del cuarto día ya se observaban diferencias significativas de crecimiento radial entre las concentraciones de extracto evaluadas, y entre éstas y los respectivos controles.

Los mismos resultados mostrados en la figura 3 pero expresados en términos de porcentaje de inhibición de crecimiento radial en la tabla 2 permiten observar una inhibición del 100 % del crecimiento radial a una concentración de extracto de 10 % v/v o mayores y sin efecto significativo o ninguno (0-9,3 % de inhibición) a concentraciones de extracto de 0.6 % v/v o menores. Se ha reportado que en ensayos de efectividad biológica para cualquier fungicida un 70 % de inhibición es considerado aceptable (23) y en este experimento dicha inhibición corresponde a una concentración alrededor de 5 % v/v de extracto. Estos resultados aunque alagadores no son del todo novedosos, pues no es la primera vez que se reporta actividad antifúngica para el fruto de *B. pinguin*. Ya en años anteriores se había descrito una significativa actividad antifúngica del extracto de pulpa del fruto de esta planta frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* (24), incluso, un estudio reciente ha demostrado que *B. pinguin* inhibe la población de hongos y bacterias en suelos donde esta planta crece (8). Del fruto También existen reportes sobre la actividad anti

bacteriana frente a varias cepas patogénicas humanas (10).

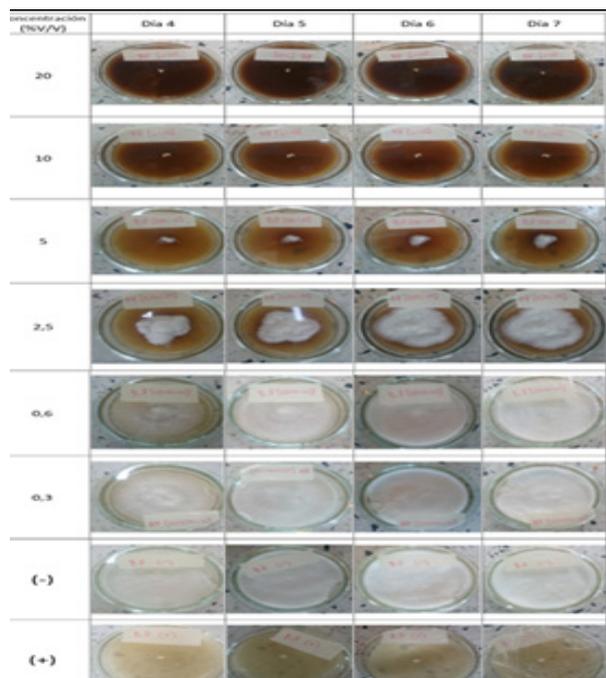


Figura 1. Registro fotográfico del crecimiento de patógeno fúngico frente a distintas concentraciones de extracto de *Bromelia pinguin*

Sin embargo, hay que considerar aquí la presencia en *B. pinguin* de enzimas proteasas, en particular la pinguinaína, un pre parado enzimático con actividad proteolítica presente en el fruto de esta especie la cual ya ha sido blanco de diferentes estudios (27), (28), (29), (9), (30).

Dicha enzima podría ser la responsable de la actividad antifúngica frente al patógeno fúngico que afecta el fruto de *Theobroma cacao L.* encontrada en este estudio. Además de la amplia diversidad estructural de los metabolitos secundarios con efecto antifúngico, también se han descrito proteínas antifúngicas (25), (31), (32), e incluso se han caracterizado algunas a partir de plantas (33) (34) y otros organismos (35), (36), (37), (38).

Múltiples mecanismos de acción antifúngica podrían estar involucrados en la inhibición de esta enzima sobre el patógeno fúngico que genera la pudrición del fruto de *Theobroma cacao L.*, como por ejemplo estar atravesando la membrana e interfiriendo en la síntesis de ADN, y ARN. También podría estar inhibiendo la cadena respiratoria celular o disminuyendo el ATP

Tabla 2. Inhibición del crecimiento del hongo frente al extracto hidroalcohólico de *B. Pinguin* (Resultado promedio de tres mediciones)

Concentración de extracto (% V/V)	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	% de inhibición	% de inhibición	% de inhibición	% de inhibición
20	100	100	100	100
10	100	100	100	100
5	83,8	80	76,8	76
2.5	46,6	34,9	28	26
0,6	9,3	4,7	2	0
0,3	2,4	2,4	0	0
Control positivo	100	100	100	100

La lista de metabolitos secundarios que han mostrado actividad antifúngica es tan amplia como su diversidad estructural o el espectro de actividades biológicas que algunos de ellos muestran y es por esto que sería muy apresurado establecer con exactitud una relación entre el efecto inhibitorio mostrado por el extracto hidroalcohólico de *B. pinguin* y alguno de sus metabolitos presentes. Flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenos y muchos otros han sido reportados muchas veces haciendo mención sobre sus actividades antifúngicas (25), (26).

(39); o podrían estar alterando la permeabilidad de la membrana formando poros y ocasionando la pérdida de iones y otros solutos (40). También podría estar hidrolizando o interfiriendo en la síntesis de componentes esenciales de la pared celular como la quitina, el quitosán, entre otros (41). De cualquier manera, establecer la responsabilidad de la pinguinaína en la inhibición in vitro de *M. roleri* al igual que algunos de estos u otros mecanismos de acción requerirá de otros estudios. Actualmente en nuestros laboratorios se llevan a cabo experimentos de inhibición con el preparado enzimático tanto in vitro como in vivo.

3. CONCLUSIONES

Por primera vez se estudió la actividad antifúngica frente a un hongo aislado de frutos enfermos de Cacao (*Theobroma Cacao*) del extracto hidroalcohólico de *B. pinguin* del Caquetá, región Amazónica Colombiana, encontrándose un significativo efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial del hongo, que es además dependiente de la dosis. Los resultados obtenidos y los antecedentes de *B. pinguin* señalan a la Pinguinaína como la principal responsable de la actividad, considerando sin embargo que es necesario llevar a cabo otros estudios para tratar de resolver esta hipótesis. De igual forma se están llevando a cabo otros ensayos para identificar el hongo.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen sinceramente a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de la Amazonía, al Profesor Armando Sterling Cuéllar, a la profesora Claudia Gonzales y su grupo de auxiliares de laboratorio, y a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este estudio.

Con respecto a los grupos de alimentos y la frecuencia de suministro en la dieta de los preescolares, se evidenció que los grupos más importantes eran suministrados a diario, tal es el caso de las frutas y las verduras, los cereales, las carnes y leguminosas y los lácteos. Si bien el consumo de los azúcares y las grasas se limitan en el adulto, el niño puede comerlos a diario sin sobrepasar las porciones recomendadas según la edad, en este aspecto las madres aseguraron limitar su consumo a 1 o 2 veces por semana (63%).

BIBLIOGRAFIA

1. Phillips M. W, Coutiño A, Ortiz C.F, López A. P, Hernández J. & Aime M. C. First report of *Moniliophthoralaroreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cacao in Mexico. *Plant Pathol.* 2006, 55:584.
2. López B.O, González M.O, Ramírez G.S.I, Lee R.V, Ramírez G.M.B, Alvarado G.A. & Gehrke V.M. Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del cacao. Universidad Autónoma de Chiapas; Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Impreso: Digitall. 2006, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 40p.
3. Vergara R. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. Memorias Seminario Regional. 1997, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
4. Hernández L. A.N, Bautista B. S. & Velázquez V. M.G. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en Poscosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana* 2007, 30 (2): 119-123.
5. Barrera N. L. & Bautista B. S. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2008, 26:27-31.
6. Payrol J. A, Mosquera D. G, Meneses A, Cruz M.D, Banze F, Martínez M. M, López O.R. Determinación de Parámetros Farmacognósticos y Bromatológicos y Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de una Preparación obtenida del Fruto de *Bromeliapinguin* L. que crece en Cuba. *Acta Farm. Bonaerense* 2005a., 24(3): 377-382.
7. CONABIO, Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, 2009, Mexico City.
8. Looby C. I. and Eaton D. W. Effects of *Bromeliapinguin* (Bromeliaceae) on soil ecosystem function and fungal diversity in the lowland forests of Costa Rica. *BMC Ecology* 2014, 14:12.
9. Payrol A. J, Obregón D. W, Natalucci L. C, Caffini O. N. Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromeliapinguin* fruit. *Fitoterapia* 2005b, 76, 540-548.
10. Pio L. J. F, López A. G, Paredes L. O, Beltrán U. M, Díaz C.P.S, Delgado V. F. Physicochemical, Nutritional and Antibacterial Characteristics of the Fruit of *Bromeliapinguin* L. *Plant Foods Hum Nutr.* 2009, 64:181-187.
11. Looby C, Hauge B.J, Barry D, Eaton D.W. Fungal inhibition by *Bromeliapinguin* (Bromeliaceae) and its effect on nutrient cycle dynamics. *Tropical Ecology* 2012, 53 (2): 225-234.
12. Domínguez X. A, Balick M. J, Cicció J. F, Joel D. M, Marbach I, Mayer A. M. & Hilton J. J. Métodos de investigación fitoquímica (No. 581.19072 D671). Centro Regional de Ayuda Técnica, México, 1973, DF (México).
13. Sanabria G. A. Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de cuarenta plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 1983, Santafé de Bogotá.

14. Bilbao M. R. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío, Armenia-Quindío, Colombia. 1997, 180
15. Martínez M. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. 2008, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.
16. Suárez C. L. Y. Aislamiento e identificación de *Moniliophthororeri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente Colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. Revista respuestas – Universidad Francisco de Paula Santander, 2006, 11(1): 3-8.
17. Villavicencio M. y Jiménez M. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthororeri* aislados de cinco provincias de la costa ecuatoriana. Artículos de tesis de grado – FIMCP, 957. 2010, ESPOL, Ecuador.
18. Sánchez M. F. D. y Garcés F.F.R. *Moniliophthororeri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia agropecuaria*, 2012, 3(3): 249 - 258.
19. Phillips M. W, Castillo J, Krauss U, Rodriguez E. y Wilkinson J. M. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthororeri* from pathogen genetic groups. *Plant pathology*, 2005, 54: 483-490.
20. Payrol J. y Miranda M. Estudio farmacognóstico de *BromeliaPinguin* L. (piña de ratón). *Rev. Cubana de farm.*, 2000, 34(3): 181-186.
21. Payrol J, Miranda M. y García J. Extracto etéreo de frutos de *BromeliaPinguin* L. (piña de ratón) por el sistema acoplado CG-EM. *Rev. Cubana de farm.*, 2001, 35(1): 51-55.
22. García C. Y, Díaz N. A, Oyola C. L.L. Brango V. J, Castaño O. J.C, Maldonado J.I. Estudio fitoquímico preliminar y de actividad antimicrobiana de la especie *Lippia alba* originaria del Piedemonte Amazónico. *Mom. Cien.* 2014, 11(2):75,82.
23. Pérez A.R, García E. S.R, Carrillo F. J. A, Angulo E. M.A, Valdez T. J. B, Muy R. M. D, García L. A. M, Villareal R. M. Control de *Cenicilla* (*Sphaerothecafuliginea*Schlechtend: Fr, Pollaci) con Aceites Vegetales y Sales Minerales en Pepino de Invernadero en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2010, 28 (1): 17-24.
24. Camacho H. I. L, Chavez-Velazquez J. A, Uribe-Beltran M.J, Rios-Morgan A, Delgado-Vargas F. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromeliapinguin*. *Fitoterapia* 2002, 73: 411-413.
25. Montes B. R, Cruz C. V, Martínez M. G, Sandoval G.G, García L. R, Zilch D. S, Bravo L. L, Bermúdez T. K, Flores M. H. E, Carvajal M. M. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de Investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2000, 18 (2):125-131.
26. Montes B. R. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 2009, 29: 73-82.
27. Toro G. E, Marezki A. y Matos M. Isolation, purification, and partial characterization of pinguinain, the proteolyticenzyme from *Bromelia pinguin*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1968, 126: 91-104.
28. Toro G. E. y Rodríguez I. Immunochemical studies on pinguinain, a sulfhydryl plant protease. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1976, 175: 359-366.
29. Toro G. E, Rodríguez I. y Ehrig H. Structural studies on pinguinain, changes induced by carboxamidomethylation. *Biochimicaet Biophysica Acta*, 1980, 622: 151—159.
30. Payrol J, Obregón W, Trejo S. y Caffini N. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromeliapinguin*L. grown in Cuba. *Protein J.*, 2008, 27:88–96.
31. Upadhyay A. y Srivastava S. Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens*strain Psd as a potential biocontrol agent. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008, 47: 98-105.
32. Yan R, Hou J, Ding D, Guan W, Wang C, Wu Z. y Li M. In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *J. Basic Microbiol.* 2008, 48: 293-301.
33. Chu K.T, Liu K.H. y Ng T.B. Cicerarin, a novel antifungal peptide from the green chickpea. *Peptides.* 2003, 24: 659-663.
34. Ng T.B, Parkash A. y Tso W.W. Purification and characterization of-and-benincasins, arginine/ glutamate-rich peptides with translation-inhibiting activity from wax gourd seeds. *Peptides.* 2003, 24: 11-1
35. Yang L, Tan R.X, Wang Q, Huang W. y Yin Y. Antifungal cyclopeptides from *Halobacilluslitoralis*YS3106 of marine origin. *Tetrah. Lett.* 2002, 43: 6545-6548.
36. Tomie T, Ishibashi J, Furukawa S, Kobayashi S, Sawahata R, Asaoka A, Tagawa M. y Yamakawa, M. Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 307: 261-266.

37. Gomes V. M, Carvalho A. O, Da Cunha M, Keller M. N, Bloch Jr. C, Deolindo P. y Alves E.W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararacavenom*. *Toxicon*. 2005, 45(7): 817-27.
38. Meyer V. A. Small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 78: 17-28.
39. Cociancich S, Ghazi A, Hetru A, Hoffman J.A. y Letellier L.. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 19239-19245.
40. Thevissen K, Terras F.R.G. y Broekaert W.F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Env. Microbiol.* 1999, 65: 5451-5458.
41. Odds F.C, Brown A.J.P. y Gow N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003, 11: 272-279.