

Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Aida Tania RODRÍGUEZ PEDROSO¹✉, Miguel A. RAMÍREZ ARREBATO¹, Silvia BAUTISTA BAÑOS², Ariel CRUZ TRIANA¹ y Deyanira RIVERO¹

¹Unidad de Ciencia y Técnica de Base Los Palacios, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Km. 1,5 Carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, CP 22900, Cuba y ²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Km. 8,5 Carretera Yautepec-Jojutla, San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62731, México. E-mail: atania@inca.edu.cu ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 23/06/2011 Fin de primer arbitraje: 25/01/2012/ Primera revisión recibida: 14/02/2012
Fin de segundo arbitraje: 17/03/2012 Segunda revisión recibida: 04/05/2012 Aceptado: 16/05/2012

RESUMEN

Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas en el control de enfermedades que afectan a cultivos de interés económico. La obtención de los extractos vegetales y el estudio de sus compuestos activos propician su empleo contra diferentes hongos. En este trabajo se obtuvieron dos extractos de la especie vegetal *Acacia farnesiana*: uno hidroalcohólico (Extracto A) y otro acuoso (Extracto B). Se le determinó el efecto antifúngico de ambos extractos sobre el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en el tiempo y se le realizó el correspondiente análisis químico cualitativo. Los extractos mostraron más de un 90% de inhibición del crecimiento micelial desde la primera evaluación realizada a las 72h después de la inoculación. Además, se comprobó efecto fungicida de los mismos sobre el hongo. Adicionalmente, se observó la presencia de metabolitos con actividad antimicrobiana reconocida como: flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides y saponinas.

Palabras clave: *Fusarium*, extractos vegetales, metabolitos secundarios, *Acacia farnesiana*, antimicrobiana.

ABSTRACT

Plants produce compounds with antimicrobial properties that can be used for diseases control that affect cultivars of economic interest. The obtention of the vegetal extracts and identification of their active compounds will allow their application against different fungi. In this work we received two vegetal extracts: one aqueous-alcoholic and other plant species *Acacia farnesiana*. The antifungal activities were evaluated of the two extracts on the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by the percentage of inhibition of mycelial growth in time and were performed for phytochemical analysis. Both extracts showed more 90% of inhibition micelial growth in the first evaluation (72 hours) after of the inoculation. So, the vegetal extracts showed fungicide effect on the fungus. Besides, two vegetal extracts showed the presence of metabolites to microbial activity known as flavonoids, tannins, phenols, alkaloids and saponins.

Key words: *Fusarium*, vegetal extracts, secondary metabolites, *Acacia farnesiana*, antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

El control de hongos fitopatógenos a través de fungicidas sintéticos continúa siendo la medida fitotécnica más importante para aumentar los rendimientos de los cultivos (Bernal *et al.* 2005). Sin embargo, la utilización masiva y a veces indiscriminada de estos productos ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes (Cooke *et al.* 2003; Leroux, 2003 y Guerrero *et al.* 2007).

El marco de una agricultura sostenible ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos para el control de enfermedades cuya actividad y seguridad ambiental sea adecuada (Wilson *et al.* 1999; Bautista *et al.* 2004; Boyraz y Ozcan, 2006, Hernández *et al.* 2007 e Igbinsosa *et al.* 2009). En este sentido, se han desarrollado alternativas naturales, entre las cuales se encuentra el uso de extractos vegetales, con los que se han obtenido resultados prometedores. Además, los extractos vegetales tienen las ventajas de poseer un

origen biológico, ser degradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente (Bravo *et al.* 2000 y Barrera y Bautista, 2008). Diversos autores han demostrado la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas *in vitro* e *in vivo* (Rodríguez *et al.* 2000; Bautista *et al.* 2004; Cárdenas *et al.* 2005, Alzate *et al.* 2009 y Garduno *et al.* 2010).

El empleo de plantas que son consideradas malezas, tal como la *Acacia farnesiana* que compete con los cultivos de importancia económica por los nutrientes, luz solar y el espacio, resultan una fuente económica y muy importante de obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana.

Por otra parte, se ha descrito que el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ocasiona grandes daños al cultivo del tomate y los tratamientos químicos en ocasiones resultan ineficaces. Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivos determinar la actividad antifúngica de dos extractos de *Acacia farnesiana* sobre *F. oxysporum* f. sp. y realizar el análisis químico cualitativo de los compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron hojas plenamente desarrolladas y frescas de la especie *Acacia farnesiana*, el material vegetal fue identificado y depositado en el Herbario EELP de la Unidad Científico Tecnológica de Base de Los Palacios, con un voucher bajo el No AF 001, las cuales se recolectaron en horas tempranas de la mañana, entre los meses de marzo y abril de 2006 y 2007, en áreas de la Unidad Científico Tecnológica de Base de Los Palacios en Pinar del Río, Cuba. Una vez cosechadas las hojas se descartaron las dañadas y enfermas. Las hojas seleccionadas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y posteriormente se lavaron con agua destilada. Seguidamente, se secaron en estufa con recirculación de aire a una temperatura de 30-35°C hasta haber obtenido tres pesadas constantes. El material deshidratado se molió con un molino manual.

Preparación de los extractos

Los extractos fueron denominados: Extracto A y Extracto B. Para la preparación del Extracto A (extracto hidroalcohólico): se pesaron 30 g del

material vegetal y se le adicionó 30 mL de alcohol etílico al 30 %. En cuanto al Extracto B (extracto acuoso): se pesaron 30 g del material vegetal se le adicionó 30 mL de agua destilada.

Ambos extractos se dejaron reposar durante 72 h a temperatura ambiente, se filtraron a través de papel Whatman No.1 y posteriormente en filtro de fibra de vidrio microporo (Tequida *et al.*, 2002).

Condiciones del aislado utilizado

El aislamiento empleado fue *Fusarium oxysporum* f. sp. (FOL-03) del cepario del laboratorio de Micología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en el municipio de San José las Lajas de la provincia de Mayabeque. Se tomó micelio del hongo y se cultivó sobre el medio de papa-dextrosa-agar (PDA) a pH 5.6 con alternancia de luz y oscuridad (16 y 8 horas respectivamente) y a una temperatura de 26-28 °C durante 7 días.

Actividad antifúngica

Evaluación del efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial

Los tratamientos fueron:

1. Control (medio PDA)
2. Extracto A (hidroalcohólico al 30 %)
3. Extracto B (acuoso)

El ensayo se llevó a cabo en Placas PETRI, las cuales contenían 20mL del medio PDA, el cual fue esterilizado en autoclave (AESA, Mod. CV 250) durante 15 min. A una presión de 15 lb/pul² a 121°C. Posteriormente, se le adicionó 5mL de cada extracto por placas, el cual fue distribuido por toda la placa y después se inocularon con un disco de agar que contenía al patógeno de 0.8 cm de diámetro.

Ensayo de actividad fungicida

Para evaluar el efecto fungicida, se tomó del ensayo anterior las placas donde no hubo crecimiento micelial del hongo. De ellas, se transfirió el disco de agar que contenía al inóculo a nuevas

placas que contenían 20 mL del medio PDA a pH 5.6 y se incubaron con alternancia de luz y oscuridad (16 y 8 horas respectivamente) y a una temperatura de 26-28 °C durante 9 días, hasta que el micelio cubriera toda la placa.

Se realizó seguimiento del crecimiento fúngico en ambos ensayos a las 72, 120, 168 y 216 horas después de la inoculación midiendo el diámetro micelial de cada colonia con regla graduada en mm y determinando posteriormente el promedio de los mismos. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento y ambos experimentos se repitieron tres veces.

Análisis estadístico

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con respecto al control de medio de cultivo inoculado, el cual se consideró como el 100 % de crecimiento radial o 0 % de inhibición del crecimiento micelial mediante la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición micelial o radial} = \frac{(\text{Control}-\text{Tratado})}{\text{Control}} \times 100$$

Para realizar el análisis estadístico, los datos originales se transformaron por la fórmula $\text{arcsen}\sqrt{\%}$. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey.

Análisis químico cualitativo de los extractos

A los extractos se les realizó el análisis fitoquímico para metabolitos secundarios según metodología descrita por Trease y Evans (1989) y Harborne (1998). En la Tabla 1, se refieren los diferentes ensayos realizados.

Tabla 1. Compuestos químicos a determinar en los extractos (Extracto A y Extracto B) de *Acacia farnesiana*.

| Ensayos | Compuestos |
|--------------------|---------------------|
| Shinoda | Flavonoides |
| Fehling | Azúcares reductores |
| Cloruro Férrico | Fenoles |
| Gelatina | Taninos |
| Ninhidrina | Aminoácidos |
| Lieberman-Burchard | Triterpenos |
| Bornträger | Quinonas |
| Mayer | Alcaloides |
| Espuma | Saponinas |

Extracto A: hidroalcohólico al 30 % y Extracto B: acuoso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se observan los resultados del efecto *in vitro* de los dos extractos vegetales sobre el hongo.

Tabla 2. Efecto del Extracto A y del Extracto B de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

| Tratamientos | Inhibición del crecimiento micelial (% por horas) | | | |
|----------------|---|--------|--------|--------|
| | 72 | 120 | 168 | 216 |
| Control | 0,0 c | 0,0 c | 0,0 c | 0,0 c |
| Extracto A | 98,0 a | 98,5 a | 98,8 a | 99,0 a |
| Extracto B | 94,0 b | 96,4 b | 98,1 b | 98,2 b |
| Error Estándar | 0,059 | 0,067 | 0,03 | 0,02 |

Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Extracto A: hidroalcohólico al 30 % y Extracto B: acuoso

Como puede apreciarse, todos los tratamientos difirieron entre sí, los correspondientes al Extracto A y al Extracto B fueron las que tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo; siendo el Extracto A el que mostró mayor efecto, aunque el porcentaje de inhibición fue mayor del 95 % en ambas fracciones. En el caso del control mostró un crecimiento normal, por lo tanto su porcentaje de inhibición fue de un 0 %.

Actividad fungicida

En cuanto a la actividad fungicida de los Extractos A y B, se pudo observar que todos los micelios provenientes de los tratamientos con los extractos no tuvieron crecimiento; sin embargo, el tratamiento control si creció hasta cubrir la placa, demostrando así el efecto biocida de los mismos sobre el patógeno utilizado y en las condiciones que se realizó el experimento.

Análisis químico cualitativo de los extractos

En la tabla 3 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos A y B de *Acacia farnesiana*, el cual nos ayuda a determinar los principales grupos químicos presentes.

Tabla 3. Análisis químico cualitativo realizado a los extractos A y B de *Acacia farnesiana*.

| Compuestos | Extracto A | Extracto B |
|---------------------|------------|------------|
| Flavonoides | ++ | + |
| Azúcares reductores | ++ | + |
| Fenoles | ++ | + |
| Taninos | ++ | + |
| Aminoácidos | + | - |
| Triterpenos | ++ | - |
| Quinonas | + | - |
| Alcaloides | + | + |
| Saponinas | ++ | + |

++ presencia fuerte del metabolito en el extracto

+ presencia ligera del metabolito en el extracto

- ausencia del metabolito en el extracto

Extracto A: hidroalcohólico al 30 % y Extracto B: acuoso

Al analizar los resultados del tamizaje fitoquímico, se pudieron observar los diferentes metabolitos secundarios presentes en ambos extractos. Este estudio comprendió un conjunto de ensayos y técnicas sencillas, que aunque no brindan un resultado concluyente, debido a diversos factores influyentes, sí nos dan una idea general sobre la composición química de la planta (Pérez e Iannacone, 2008).

Es importante destacar, que los dos extractos contenían: flavonoides, azúcares, fenoles, taninos, alcaloides y saponinas, aunque en el extracto hidroalcohólico (Extracto A) la presencia de estos compuestos era más fuerte que en el extracto acuoso (Extracto B). Este resultado pudo deberse a la polaridad del solvente y a la capacidad del mismo para disolver los diferentes compuestos químicos (Cowan, 1999).

En el caso del extracto alcohólico, en el ensayo de Fehling se observó un precipitado rojo perfectamente distinguible indicativo de la presencia de compuestos reductores, iguales resultados se obtuvieron para los ensayos de Lieberman-Burchard, Ninhidrina, Cloruro férrico, Shinoda, indicando la presencia de triterpenos y/o esteroides, aminoácidos libres o aminas en general, taninos y/o compuestos fenólico y flavonoides, respectivamente. Cada uno de estos ensayos mostró las coloraciones correspondientes que permitieron evaluar los resultados y emitir los criterios expuestos anteriormente.

La inhibición del crecimiento micelial mostrada por los dos extractos se debe a la presencia de algunos de estos metabolitos como los flavonoides, que son un grupo de compuestos con amplio rango de actividad biológica, que incluye la actividad antimicrobiana, antiviral, atrayente de polinizadores, protectora de las plantas contra la luz ultravioleta, antioxidantes y antibacterial (Maneemegali y Naveen, 2010). Autores como Seigler (2003) y Sánchez *et al.* 2010 han identificado a los flavonoides presente en plantas de la misma familia como responsables de la actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos fitopatógenos. Otros de los metabolitos con actividad antimicrobiana son los terpenos, taninos, saponinas. (Okigbo e Iqwe, 2007).

También se plantea que el mecanismo de acción de estos compuestos es variable sobre los microorganismos. Por ejemplo: los taninos inhiben la síntesis de proteínas en la célula (Shimada, 2006). Por su parte, los fenoles producen inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos no ha sido dilucidado por completo pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se dice que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conocen que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se hace necesario aislar e identificar los compuestos activos que presenta esta planta y considerar los cambios morfológicos, moleculares y bioquímicos que estos pueden causar sobre *F. oxysporum* f. sp. También estudiar la posibilidad de utilizarlos como principios activos en formulaciones para el control de este patógeno y así minimizar las pérdidas que éste puede causar. De esta forma, se aumentará la productividad al reducir los costos por el empleo de agroquímicos, con una notable disminución de la contaminación ambiental.

LITERATURA CITADA

Alzate, N.; V. López, H. Marín y A. Murillo. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos Filamentoso. Revista Tumbago 4: 59-71.

- Barrera, L. y S. Bautista. 2008. 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 26 (1): 27-31.
- Bautista Baños, S., M. Hernández and E. Bosquez. 2004. Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (2): 178-186.
- Bernal, A.; J. F. Zamora, G. Virgen y R. Nuño. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23 (2): 140-146.
- Boyraz, N. and M. Ozcan. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hidrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. Journal Food Microbiology 107: 238-242.
- Bravo, L. L.; T. Bermúdez y B. Montes. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo Integrado de Plagas 57: 29-34.
- Cárdenas, N.; M. Zavala, R. Aguirre, C. Pérez and S. Pérez. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray. Journal of Agricultural and food chemistry 53: 4347-4349.
- Cooke, D. E. L.; V. Young, P. R. J. Birch, R. Thoth, F. Gourlay, J. P. Day, S. F. Carnegie and J. M. Duncan. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). Plant Physiology 52:181-192.
- Cowan, M. 1999. Plant products as an antimicrobial agents. Clinica Microbiological. Rev. 10: 564-582.
- Garduno, C.; L. Barrera and Y. Rios. 2010. Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gadioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathology Journal 9: 103-111.
- Guerrero, E.; S. Solis, F. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 48-53.
- Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods. A Guide to modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall, London, UK. p. 182-190.
- Hernández, A. N.; S. Bautista y M. G. Velázquez. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 30 (2): 119-123.
- Igbinosa, O. O.; E. O. Igbinosa and O. A. Aiyegoro. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology 3 (2): 58-62.
- Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemical towards plan pathogens. Comptes Renduns Biologies 326: 9-21.
- Maneemegalai, S. and T. Naveen. 2010. Evaluation of antibacterial activity of flower extracts of *Cassia auriculata* L. Ethnobotanical Leaflets 14:182-92.
- Okiqbo, R. N. and D. I. A. Iqwe. 2007. Antimicrobial effects of *Piper guineense* 'Uziza' and *Phyllanthus amarus* 'Ebe-benizo' on *Candida albicans* and *Streptococcus faecalis*. Acta Microbiologica et Immunologica et Hungarica 54 (4): 353-66.
- Pérez, D. and J. Iannacone. 2008. Mortalidad y repelencia en *Eupalamides cyparissias* (Lepidoptera: Castniidae), plaga de la palma aceitera *Elaeis guineensis*, por efecto de diez extractos botánicos. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 67 (1-2): 41-48.
- Rodríguez, A. T.; D. Morales y M. A. Ramírez. 2000. Efecto de extractos vegetales *in vitro* sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos. Cultivos Tropicales 21 (2): 79-82.
- Sánchez, E.; S. García and N. Heredia. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholera*. Applied and Environmental Microbiology 76 (20): 6888-6894.
- Seigler, D. S. 2003. Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*. Biochemistry Sys. Ecol. 31: 845-873.

- Shimada, T. 2006. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *Journal Chemical Ecology*. 32 (6): 1149-1163.
- Tequida, M.; M. Cortez, E. C. Rosas, S. López y C. Corrales. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansus*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 84-88.
- Trease, G. and W. Evans. 1989. *Textbook of Pharmacognosy*. 12th edn. Balliere, Tinadl, London. UK.
- Whalen, M. M.; S. Wilson, C. Gleghorn and B. G. Loganathan. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environment Research* 92: 213-220.
- Wilson, C. L.; A. El Ghaouth and M. E. Winiewski. 1999. Prospecting in nature's storehouse for biopesticide. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17: 49-53.