

**Potencialidades de la flora en agroecosistemas productivos de montaña para el control de *Fusarium* sp.**

**Potentials of floristic components in productive mountain agroecosystems for the control of *Fusarium* sp.**

**Autores:** Lic. Noryaysi Abreu-Romero, MSc. Lázaro M. Cotilla-Pelier, MSc. Irliadis Urguellés-Cardoza, Lic. Arleis Abreu-Romero, MSc. Amaury Díaz-Rodríguez.

**Organismo:** Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz, El Salvador. Guantánamo. Cuba.

**E-mail:** [noryaisi@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:noryaisi@cdm.gtmo.inf.cu), [lazar@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:lazar@cdm.gtmo.inf.cu), [amaury@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:amaury@cdm.gtmo.inf.cu)

**Resumen.**

Se estudió la actividad *in vitro* frente a *Fusarium* sp. de los extractos hidroalcohólicos de seis especies de la flora presentes en agroecosistemas productivos de montaña del macizo montañoso Nipe Sagua Baracoa. Las especies fueron colectadas en agroecosistemas de las localidades de Las Munciones, Riíto y Raizú en el municipio de Yateras, provincia Guantánamo, así como la localidad de Majayara en el municipio de Sagua de Tánamo, provincia Holguín. Se realizó el tamizaje fitoquímico de las especies y se obtuvieron extractos hidroalcohólicos, los cuales se ensayaron *in vitro* frente a la cepa de *Fusarium* sp. a la concentración de 15%. Los extractos crudos de las especies *C. paradisi* (semillas) y *E. pulcherrima* inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium* sp., observándose el mayor efecto inhibitorio al aplicar el extracto de *C. Paradisi*.

**Palabras clave:** *Fusarium*, *C. paradisi*, *E. pulcherrima*, extractos.

**Abstract.**

The *in vitro* activity against *Fusarium* sp. of extracts of six species of plants in productive agroecosystems of Nipe-Sagua-Baracoa mountainous area. The species were collected in agroecosystems from the localities of Las Munciones, Riíto and Raizú in Yateras municipality from Guantánamo province, and from Majayara in Sagua de Tánamo municipality, Holguín province. The phytochemical screening of the species was carried out and hydroalcoholic extracts were obtained, which were tested *in vitro* against *Fusarium* sp. at 15% concentration. The crude extracts of the species *C. paradisi* (seeds) and *E. pulcherrima* significantly inhibited them and the cell growth of *Fusarium* sp., being the highest inhibitory effect when applying the extract of *C. Paradisi*.

**Key words:** *Fusarium*, *C. paradisi*, *E. pulcherrima*, extracts.

### **Introducción.**

El creciente desarrollo de la agricultura ha favorecido el incremento de la demanda de nuevos productos de origen natural que permitan el incremento de las producciones agrícolas, beneficien el desarrollo de los cultivos y no tengan un impacto negativo sobre el medio ambiente. Esta demanda está dada por las afectaciones en los rendimientos de los cultivos las cuales están condicionadas por diferentes factores como la calidad de los suelos y la incidencia de organismos plagas. Las nuevas investigaciones sugieren el empleo de productos bioactivos de origen natural, como sustitutos de los productos de origen químico dados los efectos beneficiosos que estos ejercen en las plantas, tales como la inducción de mecanismos defensivos y la estimulación del crecimiento vegetal.

Entre las alternativas que se han venido explorando para el control de fitopatógenos se ha destacado el uso de algunos extractos vegetales, tales como los de ají, ajo, cebolla y los aceites esenciales extraídos del limón, mandarina, naranja y algunas especies de eucalipto, los cuales contienen metabolitos secundarios bioactivos que permitirían un manejo sostenible de hongos fitopatógenos, por lo menos a nivel de agricultura orgánica (da Cruz et al., 2013). La diversidad estructural y los modos de acción son característicos de estos extractos, lo cual podría retrasar la aparición de cepas resistentes, además de ofrecer alta eficacia y probable baja toxicidad para el hombre, los organismos no blancos y el ambiente (Feliziani et al., 2013).

Se estima que se han evaluado biológicamente sólo del 5% al 15% de las 250 000 a 500 000 especies vegetales conocidas y existe muy poca información relacionada con las propiedades biológicas de la inmensa mayoría de las plantas tropicales. Además, muchos de estos estudios no están completos y a menudo los procedimientos de ensayo utilizados son inadecuados. Desde el punto de vista químico, se informan alrededor de 30 000 metabolitos secundarios de plantas; pero probablemente menos del 10% de las plantas terrestres han sido fitoquímicamente analizadas, el número real de metabolitos secundarios se estima excede los 100 000 (Harvey, 2009).

Existe, por lo tanto, la necesidad de realizar evaluaciones masivas de especies vegetales para determinar la presencia de compuestos bioactivos, pues productos naturales potencialmente activos permanecen sin investigar en este gran depósito de material vegetal. Así mismo, la inmensa mayoría de los estudios de bioactividad realizados en especies de la flora no han cerrado el ciclo de investigación con productos acabados y listos para su introducción en la práctica productiva (Da Rocha *et al.*, 2016).

La necesidad de sustituir los métodos de lucha contra plagas basados en los plaguicidas convencionales parece evidente por motivos medioambientales y esta necesidad de cambio está determinando la investigación actual en el campo agroquímico. Igualmente, el interés actual en la medicina herbolaria y la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas tiene sus raíces en una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades (considérese la frecuencia cada vez mayor con que las cepas microbianas desarrollan resistencia a los antibióticos de síntesis), como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrear. También influyen el aspecto económico (precios más bajos en la herbolaria) y la tendencia cada vez más evidente en ciertos sectores de la población de reencontrar valores y de adoptar modos de vida más “naturales” (Lucas *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las potencialidades de algunos componentes de la flora asociada a agroecosistemas productivos de montaña para el control del crecimiento micelial *in vitro* de hongos fitopatógenos.

### Materiales y métodos.

El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña en el período comprendido de enero a junio de 2017.

### Tamizaje fitoquímico a las especies.

Se partió de las especies identificadas y colectadas en agroecosistemas de las localidades de Las Munciones, Riíto y Raizú en el municipio Yateras, provincia Guantánamo y de la localidad de Majayara, en el municipio de Sagua de Tánamo, provincia Holguín. Se seleccionaron seis especies pertenecientes a dos familias botánicas para la caracterización química y los estudios de actividad biológica. Como criterios para la selección de las especies se consideraron los antecedentes de actividad biológica registrados en la bibliografía especializada para las familias botánicas y los géneros a las que pertenecen las mismas, así como los resultados obtenidos en proyectos de investigación anteriores.

La identificación taxonómica de las especies se realizó en el Centro Oriental de Ecología y Biodiversidad (BIOECO), de Santiago de Cuba.

Como recurso adicional para la clasificación de otras especies se consultaron las galerías de imágenes de herbarios virtuales y el sistema de bases de datos de colecciones biológicas, disponible en el sitio <http://arctos.database.museum> en la INTERNET.

Las especies seleccionadas se relacionan en la tabla 1:

<b><i>Euphorbiaceae</i></b>				
1	<i>Euphorbiaheterophylla</i> L.	Lechero, Yerba lechera	Cafetal Forestal	Raizú Riíto
2	<i>Euphorbiahirta</i> L.	Tapón	Cafetal Cafetal	Raizú Majayara
3	<i>Euphorbiapulcherrima</i> Willd Ex Koltz	Flor de pascua	Cafetal	Majayara
4	<i>Phyllanthusacidus</i> L.	Grosella	Cafetal	Raizú
5	<i>Jatrophaurens</i> L.	Chaya	Cafetal	Majayara
6	<i>Citrus paradisi</i> L.	Toronja	Cafetal	Majayara

Tabla 1. Especies seleccionadas para los tamizajes fotoquímicos.

El material vegetal se recolectó en horario de la mañana en las diferentes zonas del Macizo. Las plantas se revisaron, separándose las partes en mal estado, se lavaron y se secaron en estufa a 40°C. Posteriormente se molinaron en un molino de cuchilla y se conservaron en nylon de polietileno a una temperatura de 20°C. Todas las plantas se identificaron debidamente y se prepararon muestras para su depósito en herbario.

Se realizó una caracterización química cualitativa de las especies seleccionadas a partir de las identificadas en los sitios estudiados, para lo cual se utilizó la metodología descrita por López y Ortiz (2003), según la cual se ensayan 14 grupos de Metabolitos secundarios:

1. Alcaloides.
2. Triterpenos y esteroides.
3. Quinonas.
4. Aceites esenciales.
5. Saponinas.

6. Fenoles y taninos.
7. Flavonoides.
8. Cumarinas.
9. Resinas.
10. Antocianidinas.
11. Aminoácidos libres y aminas.
12. Azúcares reductores.
13. Carbohidratos y/o glicósidos.
14. Mucílagos.

### **Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos vegetales (actividad frente a hongos fitopatógenos).**

Se desarrollaron bioensayos exploratorios con extractos hidroalcohólicos obtenidos de las especies seleccionadas, a partir de los resultados de los tamizajes fitoquímicos y los antecedentes de estudios de actividad biológica para las familias y géneros implicados. Sobre esta base se evaluaron las siguientes especies:

- *Citrus paradisi* L.
- *Euphorbia hirta* L.
- *Phyllanthus acidus* L.
- *Euphorbia pulcherrima* Willd Ex Koltz.
- *Euphorbia heterophylla* L.
- *Jatropha urens* L.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial de las especies fungosas se empleó el método de inhibición zonal en placas, mediante la siembra de discos de micelio de 3mm de diámetro en forma invertida, en el centro de placas Petri que contenían 20mL de medio Papa – Dextrosa - Agar (PDA). El extracto se depositó en 3 perforaciones de 5mm de diámetro hechas en el medio.

### **Tratamientos.**

Los extractos se evaluaron solamente frente a la cepa de *Fusarium sp.*

En todos los casos se utilizaron los extractos a la concentración del 15%.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial, donde el factor de variación fue el extracto utilizado.

Cada tratamiento se replicó tres veces con un tratamiento control en el que se utilizó etanol.

Las placas se incubaron a 24°C por 120 horas, durante las cuales se midió (en cm) el crecimiento de las colonias.

Para la interpretación de los resultados los datos se sometieron a Análisis de Varianza y las medias se compararon aplicando la prueba de Student Newman Keuls ( $p < 0.05$ ).

El procesamiento de la información se realizó a través del paquete estadístico Statgraphics Plus 4.1 (1999).

### **Resultados y discusión.**

#### **Tamizaje fitoquímico de las especies.**

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la caracterización química cualitativa de las especies seleccionadas.

Especie	Metabolitos ensayados													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Euphorbiaheterophylla</i> L.		+++	++		+	+++		++				+++	+++	
<i>Euphorbiahirta</i> L.		++				+++	++						+++	
<i>Euphorbiapulcherrima</i> WilldEx Koltz		+++	+			++	++		+			++	+++	
<i>Phyllanthusacid</i> sL.		++				++	++					++	+++	
<i>Jatrophaurens</i> L.	++	++			++	++	++			++	+++	++	++	
<i>Citrus paradisi</i> L.		++				++	++							

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios identificados en el pesquizaje fitoquímico de las especies

**Leyenda:** 1. alcaloides, 2. triterpenos y esteroides, 3. quinonas, 4. aceites esenciales, 5. saponinas, 6. compuestos fenólicos y taninos, 7. flavonoides, 8. cumarinas, 9. resinas, 10. antocianidinas, 11. aminoácidos libres y aminas, 12. azúcares reductores, 13. carbohidratos y/o glicósidos y 14. mucílagos.

Los triterpenos / esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides, se presentaron como los grupos de metabolitos secundarios más frecuentes, al detectarse la presencia de los mismos en más del 90% de las especies pesquizadas. Los carbohidratos / glicósidos se encontraron en el 69% de las plantas, mientras que los restantes grupos de compuestos detectados se presentaron con frecuencias inferiores al 50% de las especies estudiadas.

Los resultados obtenidos aportan un sólido criterio de selección de las especies a incluir en los estudios de bioactividad, puesto que los grupos de metabolitos identificados de manera mayoritaria en las mismas son los que con mayor frecuencia se encuentran asociados a actividades biológicas de interés, tanto desde el punto de vista agrobiológico como médico - farmacéutico, además de desempeñar importantes funciones ecológicas en las plantas.

El grupo de los triterpenos y esteroides está constituido por numerosos compuestos, estructuralmente muy similares, derivados mayoritariamente del epoxiescualeno o en menor número del propio escualeno. Todos ellos poseen un hidroxilo en el C<sub>3</sub> que les permite la unión con una o varias moléculas glucídicas, dando lugar a estructuras heterosídicas (Quezada y Rivera, 2015). Pueden establecerse dos grandes grupos dependiendo de su estructura química: triterpenos (tetra y pentacíclicos) y esteroides. Se encuentran en estos grupos compuestos de gran interés farmacéutico como son los saponósidos y los heterósidos cardiotónicos.

Los esteroides pueden desempeñar diversas funciones como reguladores del crecimiento, además de exhibir diferentes efectos biológicos de interés farmacológico (García *et al.*, 2015).

Los ácidos fenólicos son ácidos aril-carboxílicos, con uno o más grupos OH. Sus acciones y aplicaciones son diversas como antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, disuasivos de la conducta alimentaria de fitófagos, etcétera. Los taninos, por su parte, se encuentran principalmente en las raíces, la corteza y con menor frecuencia en las hojas de las plantas. Estos compuestos suelen exhibir propiedades antibacterianas, astringentes y

antisépticas, basadas generalmente en su capacidad para precipitar proteínas (Doroteo *et al.*, 2013).

El segundo grupo de metabolitos más abundantes en las plantas analizadas, los carbohidratos / glicósidos, también incluye sustancias con amplio espectro de actividad biológica. Son sustancias no reductoras que por hidrólisis ácida o enzimática dan uno o más azúcares y un componente no azucarado llamado aglicona o genina. Desempeñan funciones muy importantes en los seres vivos y una gran cantidad de los glicósidos que producen las plantas se emplean como medicamentos (Nava *et al.*, 2012; Arrázola, Grané y Dicenta, 2014).

De todo lo anterior se infiere el potencial bioactivo de la mayor parte de las especies analizadas, al contener grupos de metabolitos secundarios frecuentemente asociados a un variado espectro de actividades biológicas. De manera particular, resultan atractivas las especies de las familias *Euphorbiaceae*, *Rutaceae* y *Agavaceae*, por los numerosos antecedentes que avalan las potencialidades bioactivas de las especies incluidas en las mismas. Esto constituye una razón de peso para la realización de estudios de bioactividad y fraccionamientos biodirigidos de los extractos de estas especies frente a dianas específicas, que conduzcan al desarrollo de nuevos productos de interés agrobiológico.

#### Extractos evaluados frente a *Fusarium sp.*

Los extractos de las especies *C. Paradisi* (semillas) y *E. pulcherrima* inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, observándose el mayor efecto inhibitorio al aplicar el extracto de *C. paradisi* con diferencias significativas respecto al control y los restantes tratamientos (Tabla 3).

Los extractos de *J. urens* y *P. acidus*, por otra parte, provocaron un crecimiento micelial significativamente superior respecto al tratamiento control y los restantes tratamientos, a partir de lo cual se infiere un posible efecto de estimulación sobre el crecimiento del hongo.

El crecimiento micelial frente a los extractos de *E. heterophylla* y *E. hirta* no mostró diferencia significativa respecto al tratamiento control, pero sí respecto a los restantes tratamientos.

Tratamientos	Crecimiento Micelial (cm)
Control	2.41c
<i>Euphorbiahirta</i> L.	2.36c
<i>Phyllanthusacidus</i> L.	2.56b
<i>Euphorbiapulcherrima</i> WilldEx Koltz	1.43d
<i>Euphorbiaheterophylla</i> L.	2.35c
<i>Jatrophaurens</i> L.	2.76a
<i>Citrus paradisi</i> L.	0.75e
Es x	0.081

Tabla 3. Comportamiento del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* Frente a los extractos de las especies evaluadas.

\*Medias con letras comunes no difieren significativamente para  $p < 0.05$ , según la Prueba de Student Newman Keuls.

Los efectos inhibitorios observados al aplicar los extractos de *C. paradisi* y *E. pulcherrima* resultan de gran importancia, si se toma en consideración que este ha sido uno de los géneros de hongos fitopatógenos más incidentes y devastadores de cultivos en el planeta en los últimos años (Villa *et al.*, 2015). Esto ha motivado la búsqueda de alternativas más confiables y benéficas para su control, dentro de las cuales un lugar importante lo ocupa

la utilización de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios presentes en plantas según lo demuestran los numerosos antecedentes al respecto.

En el caso específico de *C. paradisi* existen varios antecedentes, algunos citados anteriormente, de estudios de actividad biológica de los extractos de semillas de esta especie. Frente a hongos del género *Fusarium*, pueden citarse los trabajos de Rodríguez y Montilla (2000) quienes comprobaron la efectividad de un producto a base de extracto de semillas de *C. paradisi* (CitrusPar80<sup>MR</sup>) para controlar la marchitez producida por *Fusarium* en tomate. Igualmente, Villa *et al.* (2015) demostraron la capacidad de extractos de semillas de esta especie, entre otras, para el control de diferentes especies de *fusarium*.

Otros trabajos demuestran el potencial bioactivo de los metabolitos presentes en las semillas de *C. paradisi* para el control de otros patógenos, no solo de interés agrícola, sino también clínico (Sornoza y Ganen, 2014; Churata, *et al.*, 2016; Maldonado y Vinicio, 2017).

Se han desarrollado y se comercializan varios productos con fines agrobiológicos y clínicos que tienen como base activa extractos de *C. paradisi*, entre ellos CitrusPar80<sup>MR</sup>, Citrobiotic<sup>MR</sup> y Nutribiotic<sup>MR</sup>.

De *E. pulcherrima* se han encontrado antecedentes de estudios de actividad biológica frente a cepas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Murugan, Anand y Devi, 2007). Más recientemente se informan estudios de actividad frente a *Spodoptera frugiperda*, un lepidóptero que afecta extensas áreas cultivadas en Brasil (Tavares *et al.*, 2017). Sin embargo, no se informan estudios frente a hongos del género *Fusarium*.

### **Conclusiones.**

El tamizaje fitoquímico realizado a las especies seleccionadas mostró como grupos de metabolitos más frecuentes a los triterpenos / esteroides, los compuestos fenólicos y los flavonoides, seguidos de los carbohidratos y glicósidos.

Los grupos de metabolitos detectados se encuentran dentro de los más frecuentemente asociados a funciones ecológicas de importancia para las plantas, así como a actividades biológicas de interés agrobiológico y médico - farmacéutico, lo que evidencia las potencialidades de las especies en estudio como fuentes de sustancias bioactivas.

Los extractos crudos de las especies *C. paradisi* (semillas) y *E. pulcherrima* inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, observándose el mayor efecto inhibitorio al aplicar el extracto de *C. Paradisi*.

### **Referencias bibliográficas.**

- Churata, D., Ramos, D., Moromi, H., Martínez, E., Castro, A., García, R. (2016). Efecto antifúngico de Citrus paradisi “toronja” sobre cepas de Candida albicans aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Rev. Estomatol. Herediana*, 26, 47-53.
- Da Cruz, L., Pinto, V. F., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1-14.

- Da Rocha, J., et al. (2016). Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *Journal of Medicinal Plants Research*, 27, 409-416.
- Doroteo, V. H., Díaz, C., Terry, C., Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 79, 52-58.
- Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., Romanazzi, G. (2013). Pre-and post-harvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control post-harvest decay of sweet cherry. *Post-harvest Biology and Technology*, 78, 133-138.
- García, J. L., Ramos, R., Gómez, J., Vázquez, J. C., Cano, A. (2015). Biotransformación de esteroides con diferentes microorganismos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 46, 52-61.
- Harvey, A. L. (2009). The continuing value of natural products for drug discovery. *Rev. Salud Animal*, 31, 8-12.
- López, T., Ortiz, Y. (2003). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Dpto. de Farmacia. Santiago de Cuba. p. 55.
- Lucas, D. M., Still, P. C., Pérez, L. B., Grever, M. R., Kinghorn, A. D. (2010). Potential of plant – derived natural products in the treatment of leukaemia and lymphoma *Curr Drug Targets*, 11, 812-22.
- Maldonado, G., Vinicio, R. (2017). Efecto inhibitorio del extracto de toronja (citrus paradisi) en diferentes concentraciones sobre el streptococcusmutans. Estudio in vitro. Tesis para optar al título de Odontólogo, Universidad Central de Ecuador, Carrera de Odontología.
- Más, T. D., Martínez, A. Y., Rodríguez, B. R., Pupo, T. G., Rosabal, N. O., Olmo, G. C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 22, 22-29.
- Rodríguez, D., Montilla, J. O. (2000). Reducción de la marchitez por Fusarium en Tomate con extracto de semilla de Citrus paradisi (CitrusPar80MR). In: Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 46, Miami, FL (Abstract).
- Sornoza, M., Ganen, W. (2014). Proceso de obtención de extracto a partir de la semilla de la toronja (citrus paradisi) y su aplicación en desinfección de vegetales o frutas y superficies planas. Tesis para optar al título de Ingeniero Químico, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H. A., Basurto, M., Soto, J. M., Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agron*, 64, 194- 205.

**Fecha de recibido: 6 sept. 2018**

**Fecha de aprobado: 17 nov. 2018**