

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Melia azederach* SOBRE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp**EVALUATION OF THE ANTIFÚNGI ACTIVITY OF *Melia azederach* ON ISOLATED OF *Colletotrichum* spp.**

PEREZ, C. ALEXANDER Dr¹., ROJAS, S. JOHANNA² M.Sc., CHAMORRO, A. LEONARDO³., PEREZ, P. KATY⁴.

¹Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia. Grupo Bioprospección Agropecuaria. ² Jefe departamento de Biología, Universidad de Sucre. ³ Candidato a maestría en Biología, Universidad de Sucre, grupo Bioprospección Agropecuaria. ⁴ Bióloga.

Correspondencia: alexander.perez@unisucra.edu.co

Recibido: 12-06-2011; Aprobado: 27-09-2011

Resumen

El estudio consistió en evaluar *in vitro* la actividad antifúngica del extracto de hoja de *Melia azederach* L sobre aislados de hongos del género *Colletotrichum* sp, causante de la enfermedad de la antracnosis en el cultivo del ñame en el departamento de Sucre, Colombia. Fueron obtenidos extractos totales en etanol a partir de hojas secas de *M. azederach* mediante el método de extracción por Soxhlet y a partir del extracto total, se prepararon fraccionamientos líquido-líquido con éter de petróleo (E. petrol) y acetato de etilo (AcOEt). Del extracto total etanólico y las dos fracciones se prepararon diferentes concentraciones (ppm) y su actividad fue evaluada *in vitro* sobre 4 aislados de *Colletotrichum* sp. Los aislados que mostraron mayor susceptibilidad a los extractos fueron C040 y C853 con respecto a C279 y C507 quienes presentaron resistencia a la actividad del extracto. Se observó mayor actividad antifúngica con el extracto total etanólico, y la fracción acetato de etilo a partir de 50 ppm. El screening fitoquímico realizado en *M. azederach*, indicó presencia de metabolitos secundarios tipo terpenos/ esteroides, alcaloides, saponinas, taninos y antocianinas. Este es el primer preliminar que se tiene en Colombia sobre el efecto *in vitro* del extracto vegetal de esta especie de planta sobre el crecimiento de aislados de hongos del género *Colletotrichum* sp causante de la enfermedad de antracnosis en el cultivo de ñame en regiones Caribeñas de Colombia.

Palabras claves: extracto, hongo, antracnosis, ñame

Abstract

The study was to evaluate *in vitro* antifungal activity of leaf extract of *Melia azedarach* L on fungi isolated from *Colletotrichum* sp, which causes anthracnose disease of yam cultivation in the department of Sucre, Colombia. Total extracts were obtained in ethanol from the dried leaves of *M. azedarach* by Soxhlet extraction method and from the extracts, were prepared with liquid-liquid splits light petroleum (E. petrol) and ethyl acetate (AcOEt). Total ethanolic extract and two fractions were prepared different concentrations (ppm) and its activity was evaluated *in vitro* in 4 isolates of *Colletotrichum* sp. Isolates that showed increased susceptibility to the extracts were C040 and C853 compared to C279 and C507 who were resistant to the activity of the extract. Greater antifungal activity was observed in total ethanol extract and ethyl acetate fraction from 50 ppm. The phytochemical screening performed in *M. azedarach*, indicated the presence of secondary metabolites such terpenes/sterols, alkaloids, saponins, tannins and anthocyanins. This is the first draft you have in Colombia on the *in vitro* effect of plant extract of this plant species on the growth of fungi isolated from the genus *Colletotrichum* sp causing anthracnose disease of yam cultivation in the Colombian Caribbean región.

Key words: extract, fungy, anthracnose, yam.

Introducción

Aunque en los últimos años, son notables los adelantos científicos respecto al desarrollo de programas de prevención y tratamiento de las enfermedades fúngicas en cultivos comerciales, estas siguen amenazando plantaciones en diferentes regiones del mundo y disminuyendo la producción de alimento sustento de millones de personas a nivel mundial. El enfoque agrícola basado en las crecientes demandas de productos naturales está directamente relacionado con la dinámica de crecimiento del comercio agropecuario internacional, elemento determinante para el futuro de la agricultura en nuestro país.

Dioscorea sp se encuentra dentro de las especies vegetales que se cultivan tradicionalmente en Colombia, el ñame dejó de ser utilizado, solamente para el abastecimiento del mercado local, pues constituye un alimento básico para la economía campesina de la Costa Atlántica, para convertirse en un cultivo de exportación. En los años de 1989 fueron sembradas aproximadamente 25.000 hectáreas de ñame; sin embargo, la producción se vio drásticamente afectada por

una infección masiva del hongo *Colletotrichum sp* causante de la antracnosis (Pérez *et al.*, 2003), ocasionando la reducción del área sembrada, que en 1990 llegó a mil hectáreas. La alta incidencia de la antracnosis en la Costa Atlántica colombiana ha afectado drásticamente la producción llegando a ocasionar pérdidas hasta en un 85% (GREEN *et al.*, 2000; CERÓN *et al.*, 2006).

El uso indiscriminado de sustancias desarrolladas sintéticamente para el control de patógenos ha ocasionado la inducción de resistencia de algunos microorganismos, causando efectos importantes en muchos otros cultivos; además, del efecto toxicológico sobre animales, humanos y organismos en los diferentes ecosistemas. Por otro lado, el alto costo de los plaguicidas y el desarrollo de resistencias han obligado a los investigadores a buscar nuevos ingredientes activos biodegradables, para la implementación de medidas de manejo con menor impacto ambiental y económico, pero con un efecto similar o mayor al utilizado en el control de plagas (QUINTERO *et al.*, 2001). El departamento de Sucre, Colombia, cuenta con una gran diversidad de especies vegetales en diferentes nichos ecológicos, de las cuales se desconoce su potencial farmacológico. Muchas de estas especies son nativas y aun existe escasa información sobre su posible potencial biológico en la inhibición de fitopatógenos, en especial, el hongo que causa la enfermedad de la antracnosis en el cultivo del ñame. Tomando como referencia la problemática descrita, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos de hojas de *Melia azederach L.* sobre aislados de hongos del género *Colletotrichum*, causante de la antracnosis en el cultivo del ñame en el departamento de Sucre, Colombia.

Materiales y métodos

Hojas frescas de *Melia azederach L.* fueron colectadas en el municipio de Sincelejo departamento de Sucre, Colombia. Las muestras fueron divididas en tres partes: Una para envío al herbario Nacional de Colombia para su respectiva identificación taxonómica, otra para determinación de metabolitos secundarios y la ultima para la obtención del extracto total etanólico.

Para la obtención del extracto vegetal, las hojas previamente secadas a temperatura ambiente por 8 días, fueron fraccionadas para iniciar el proceso de extracción. 1000 g de material vegetal se sometieron a una extracción con etanol al 97% en equipo Soxhlet a 60 °C-80 °C durante 6 horas, el cual se concentró en un rotaevaporador a 60 °C al vacío hasta obtener el extracto seco (GUALTIERI *et*

al., 2008). Después de obtener el extracto etanólico se realizó un fraccionamiento líquido-líquido con éter de petróleo (E. petrol) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose así las fracciones de E.petrol y AcOEt (ÁVILA *et al.*, 2006). Para evaluar la actividad antifúngica, del extracto etanólico total seco y sus diferentes fracciones fueron diluidas con dimetilsulfóxido para preparar concentraciones de 1 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm.

Aislados del hongo del género *Colletotrichum* de la colección del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, fueron previamente activados y purificados en medio PDA y utilizados para su evaluación antifúngica *in vitro* con extractos de hojas de *M. azederach* L. Para la prueba de actividad inhibitoria se utilizó el método de siembra directa con crecimiento puro de cada aislado. Se realizaron siembras individuales, utilizando aproximadamente 5 mm x 5 mm de área de crecimiento (PÉREZ *et al.*, 2010 en prensa), el cual fue inoculado sobre la superficie del medio papa dextrosa agar (PDA), en ambiente aséptico.

A cada aislado purificado de los hongos en PDA, se les adicionó 50 µl del extracto total etanólico y las dos fracciones (E.petrol y AcOEt) a diferentes concentraciones (1, 25, 50, 75 y 100 ppm) por separado. Se utilizó un control positivo con nistatina (4 mg/mL) y un testigo absoluto sin ningún tipo de tratamiento. Los ensayos fueron incubados a 30°C por 7 días. La actividad antifúngica se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada aislado. El resultado se interpretó como porcentaje de índice de antifúngico (índice de inhibición) el cual se determinó mediante la siguiente fórmula: índice antifúngico (%) = $(1 - D_a/D_b) \times 100$ (ZHANYONG GUO *et al.*, 2007). Para determinar la eficiencia de cada extracto, se comparó el índice antifúngico del extracto total etanólico y el de las fracciones con el control positivo. La comprobación de los diferentes tipos metabolitos secundarios presentes en los extracto de la especie vegetal, se realizó mediante pruebas de coloración y reacciones estandarizadas que indicaron la presencia de compuestos químicos específicos (CONTRERAS y CORTEZ, 2007).

Para correlacionar de la actividad antifúngica (índice antifúngico) del extracto de hojas de *M. azederach* en función a las variables fracción, concentración y

aislados, se realizó un ANOVA multifactorial. Se hicieron varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre el índice de inhibición. Fue evaluada la significancia de las interacciones entre los factores, las cuales se evidenciaron a partir de los resultados de las pruebas-f obtenida mediante ANOVA, lo que permitió identificar los factores de mayor significancia. Los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

Resultados

La especie vegetal utilizada en el presente estudio fue identificada como *Melia azederach* L, de la familia Meliaceae (número voucher 546006). En la Fig. 1, se observa las características culturales y microscópicas de los aislados de hongos del género *Colletotrichum* sp en medio PDA, analizados en el presente estudio.

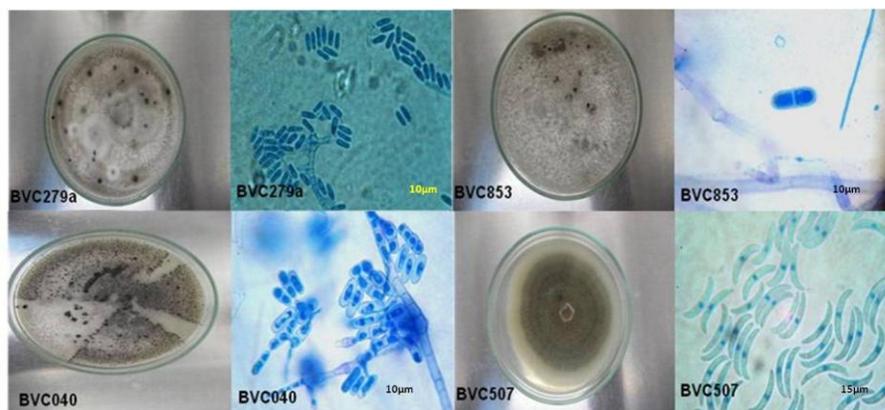


Figura 1. Características culturales y microscópicas de los 4 aislados de hongos del género *Colletotrichum* sp BVC: Laboratorio Biotecnología vegetal aislado *Colletotrichum*.

La Tabla 1, muestra el análisis multifactorial para la actividad antifúngica (índice de inhibición en porcentaje) de *M. azederach* en función a las variables fracciones, concentración (ppm) y aislados. Los resultados indican que existe diferencias significativas (p value=0.0000) entre la actividad inhibitoria del extracto de *M. azederach* en función a las variables evaluadas.

Para visualizar los resultados de significancia obtenido en la tabla 1, se realizaron gráficos de boxplot. La Fig. 2, muestra el resultado grafico entre índice antifúngico del extracto de hoja de *M. azederach* en función a extracto total etanólico y las fracciones acetato de etilo y etanol. Se observa que el extracto total de etanol y acetato de etilo mostraron la mayor actividad antifúngica en comparación a la fracción de éter de petróleo.

Tabla 1. Resultados de ANOVA multifactorial del índice de antifúngico (%) de *M. azederach* en función a fracción, concentración en ppm y aislados de hongos del género *Colletotrichum* sp.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
Fracción	6214.32	2	3107.16	12.94	0.0000***
Concentración en ppm	14314.8	4	3578.69	14.90	0.0000***
Aislados de <i>C. sp</i>	8389.73	3	2796.58	11.65	0.0000***
Residuos	40818.0	170	240.106		
Total (corregido)	69772.7	179			

***: Altamente significativo al 95% del nivel de confianza

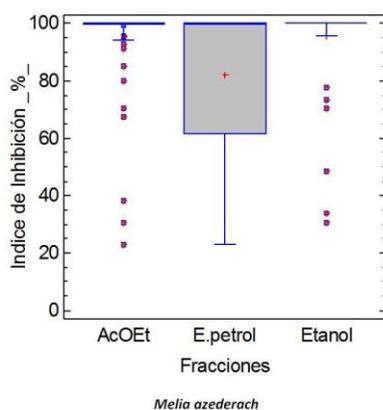


Figura 2. Resultado grafico de boxplot entre índice antifúngico (%) de las hoja de *M. azederach* función al extracto total etanólico (etanol) y las fracciones acetato de etilo (Acoet) y éter de petróleo (E.petro).

Los resultados del gráfico de boxplot observados en la Fig. 3, muestran diferencias altamente significativas (p value=0000) entre actividad antifúngica del extracto de hojas de *M. azederach* con respecto a la concentración, observándose mayor inhibición a partir de la concentraciones de 50 ppm.

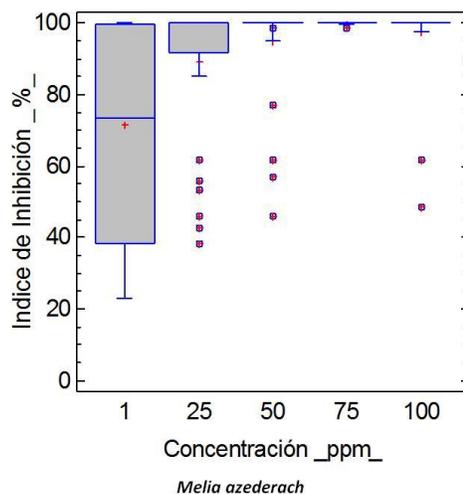


Figura 3. Resultados de grafico de boxplot de índice de inhibición en función a concentración en ppm del extracto de hoja de *M. azederach*.

En la Fig. 4, se muestran los resultados del gráfico de boxplot del índice de inhibición de *M. azederach* sobre los diferentes aislados de hongos analizados. En ella se aprecia mayor actividad antifúngica para los aislados C040 y C853 con relación a C279 y C507 que tuvieron resistencia a la acción del extracto de esta especie de vegetal.

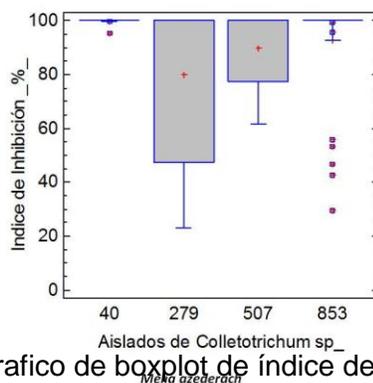


Figura 4. Resultados de grafico de boxplot de índice de inhibición del extracto de hoja de *M. azederach* en función de aislados de hongos del género *Colletotrichum sp* (40, 279, 507 y 853).

Los resultados de la prueba de tukey (Fig. 5), no muestra diferencia significativa a partir de la concentración de 50 ppm para *M. azederach* en relación al control positivo con nistatina (4 mg/mL), es decir que con estas concentraciones el extracto obtuvo una actividad antifúngica igual al control químico con nistatina.

Los ensayos de caracterización cualitativa o screening fitoquímico realizado al extracto en etanol de las hojas frescas de *M. azederach* (Tabla 2) permitió determinar la presencia de metabolitos secundarios tipo alcaloide, terpenos/esteroles, saponinas, taninos y antocianina; la detección de estos compuestos coinciden con lo reportado dentro de la fitoquímica de las especies (DE ARAUJO *et al.*, 2009).

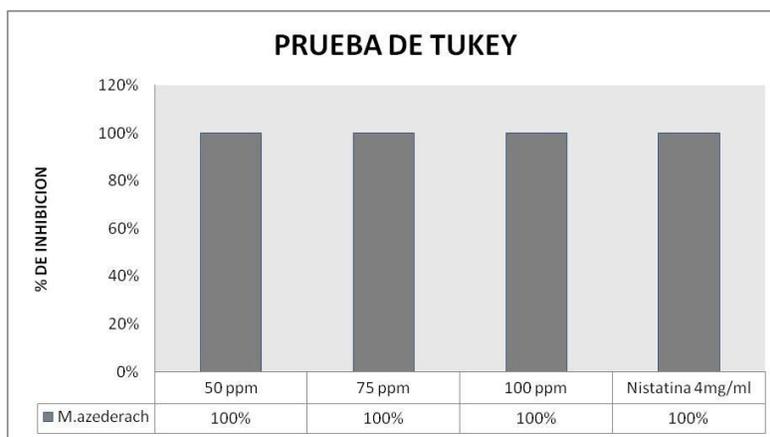


Figura 5. Prueba de Tukey para la actividad antifúngica de los extractos de hojas de *M. azederach* a concentraciones de 50, 75 y 100 ppm con relación al control químico con nistatina.

Tabla 2. Resultados de screen fitoquímico de hojas de extracto total etanólico de *M. azederach*.

Metabolitos secundario	Reactivo/prueba	<i>M. azederach</i>
Terpenos/ esteroides	Liebermann-Burchard	+
Quinonas	Borntrager	-
Flavonoides	Shinoda	-
Saponinas	Agitación vigorosa	+
Taninos	Gelatina-sal	+
Antocianinas	Rosenheim	+
	Erlyc	-
Alcaloides	Wagner	+
	Hager	+
	Dragendorff	+

Discusión

Los mecanismos de acción de estos compuestos orgánicos producidos por las plantas son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos; los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos; se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN o pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas (BORBOA-FLORES *et al.*, 2010). Así mismo las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana (BORBOA-FLORES *et al.*, 2010).

En relación a la determinación de metabolitos secundarios en los extractos del propóleos proveniente de 3 especies vegetal, se detectó la presencia de compuestos flavonoides, alcaloides y taninos. La presencia de tales compuestos en el propóleos utilizado en este estudio, podría explicar en parte la acción antifúngica que el extracto de estos mismos ejerció en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, en cuanto a que el efecto antimicótico sobre el crecimiento de *C. lindemuthianum* puede ser atribuido a la presencia de compuestos fenólicos encontrados en los extractos usados en esa investigación (OBASA *et al.*, (2007).

La nistatina, mostró ser un buen control positivo en todos los ensayos, sin embargo al comparar estos resultados con los tratamientos evaluados, se puede evidenciar que algunas de las concentraciones utilizadas (50, 75 y 100 ppm) mostraron los mismos efectos de inhibición sobre algunos aislados, lo cual representa una alternativa eficaz para disminuir la infección del hongo *Colletotrichum*. El dimetilsulfóxido utilizado para preparar las concentraciones del extracto etanólico total y las fracciones no presentó ningún tipo de interferencia en los resultados obtenidos, puesto que no mostró actividad inhibitoria en los ensayos, de tal manera que los efectos inhibitorios se le atribuyen directamente a los extractos.

Aun sin existir estudios similares en Colombia de la actividad antifúngica del extracto de *M. azederach* sobre especies de hongos que causan la antracnosis en el cultivo del ñame en la región Caribe, los resultados de este preliminar indican que los posibles responsables del efecto antifúngico del extracto y sus fracciones puedan deberse a los metabolitos secundarios presentes en la planta tales como: alcaloides, saponina, taninos y antocianinas. Compuestos como los limonoides (azadiractina), pertenecientes al grupo de los tetranotriterpenos obtenidos a partir de *M. azederach* han demostrado una amplia actividad insecticida, antitumorales, bactericidas, antivirales y antifúngicos, lo que sugiere su papel en la defensa de la planta contra ciertos microorganismos (DE ARAUJO *et al.*, 2009). Otros estudios han planteado que el extracto etanólico obtenido de frutos maduros de *M. azederach*, presentaron actividad fungistática y fungicida para los hongos patógenos *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Microsporium canis* (DE ARAUJO *et al.*, 2009).

Sin embargo se hace necesario continuar con estudios fitoquímico y espectroscópicos más detallados que permitan determinar los principales compuestos responsables de la actividad antifúngica presente en las fracciones de acetato de etilo y etanólica de las hojas secas de *Melia azederach* L. Además se debe evaluar otras partes de la planta como los frutos y flores para determinar si tienen actividad antifúngica sobre estos hongos y otros causantes de

enfermedades de interés agrícola. Así mismo se proyecta a mediano plazo realizar estudios en campo para evaluar los efectos inhibitorios obtenidos de *Melia azedarach* L sobre las especies de *Colletotrichum* causante de la antracnosis en el cultivo del ñame en condiciones del Caribe Colombiano.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Javier Beltrán Herrera por el obsequio de los aislados de hongos del género *Colletotrichum*.

Referencias

ÁVILA, L.B.; VIÑA, A.M. 2006. Actividad antibacteriana de *Diplostegium tolimense* cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Rev. Fac. de química farmacéutica 13(1): 55-60.

BORBOA-FLORES, J.; RUEDA-PUENTE, E.O.; ACEDO-FÉLIX, E.; PONCE, J.F.; CRUZ-VILLEGAS, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J.L.; et al. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Trop and Subtrop Agroecosys 12:539 – 547.

CERÓN, L.; HIGUERA, B.; SÁNCHEZ, J.; BUSTAMANTE, S.; BUITRAGO, G. 2006. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f.*alatae* durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biol Colomb. 11 (1): 99 – 109.

CONTRERAS, E.; CORTEZ, D. 2007. Tamizaje fitoquímico preliminar de la raíz seca de *Rauwolfia viridis* Roem et Schult (APOCINACEAE) y evaluación *in vitro* de la actividad antiofídica frente al veneno de *Bothopsasper*. [Trabajo de grado]. Sincelejo: Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología.

DE ARAÚJO, S.A.; TEIXEIRA, M.F.; DANTAS, T.V.; MELO, V.S.; LIMA, F.E.; RICARTE, A.R.; COSTA, C.; et al. 2009. Artigo de revisão usos potenciaies de *Melia azedarach* l. (Meliaceae): um levantamento. Arq Inst Biol. 76(1): 141-148.

GUALTIER, M.; GONZÁLEZ, M.; CONTRERAS, K.; NOGUERA, M.; UZCÁTEGUI, E.; VILLASMIL, S. et al. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los

extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel 39 (2):12-16.

OBASA, K.C.; ADEOTI, A.; ENIKUOMEHIN, O.A.; BODUNDE, J.G. 2007. Efficacy of Bee-propolis in the control of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. And Magn.) Briosi and Cav In vitro. Res J of Microbiol. 2 (2): 175-179.

PÉREZ, L.; BAQUERO.; BELTRAN, J. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. Como agente causal de la antracnosis en ñame Dioscorea sp. Rev Col Biotecnol. 15(1):24-35.

PÉREZ, A.; ROJAS, J.; CHAMORRO, L.; PÉREZ, K. 2011. Evaluación *in vitro* de actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre cepas de hongos del género *Colletotrichum* sp. Rev Acta Agronom. 16 (2):158-164

QUINTERO, S.R.; GIOANETTO, F.; CHÁVEZ, C.E.; BÁRCENAS, O.D. 2001. Curso taller de agricultura orgánica. Universidad Autónoma De Chihuahua: CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: 2009. A Language and Environment for Statistical computing, R Foundation for Statistical Computing [Programa de ordenador]. Versión 2.11.1. Disponible en línea: <http://www.R-project.org>.

ZHANYONG, G. ; RONGE, X. ; SONG, L. ; ZHIMEI, Z. ; XIA, J. ; LIN, W. ; et al. 2007. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. Carbohydrate Polymers 71(4); 694-697.