

## VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL TUBÉRCULO DE *Xanthosoma robustum* (QUEQUESQUE) Y DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

Erick Estrada,<sup>1</sup> Pedro Ordóñez,<sup>1</sup> Osberth Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Química y <sup>2</sup>Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,  
Universidad de San Carlos de Guatemala.

### RESUMEN

Se realizó el trabajo de campo que consistió en recolectar plantas de cultivos afectados por enfermedades fúngicas, identificando *in situ* algunos de los hongos presentes que posteriormente se aislaron, purificaron e identificaron en laboratorio, logrando identificarse tres de los 20 hongos aislados, de las cinco cepas utilizadas tres fueron aisladas y dos son cepas proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Una vez establecidos los hongos fitopatógenos disponibles se procedió a obtener los extractos acuoso y etanólico de la planta *Xanthosoma robustum*. Del etanólico se hizo una partición líquido-líquido, con hexano, cloroformo y acetato de etilo. Posteriormente se realizó un tamizaje fitoquímico a los extractos acuoso y etanólico; obteniéndose los siguientes resultados: en el extracto etanólico se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, taninos, saponinas, principios amargos, en el extracto acuoso la presencia de las mismas familias de metabolitos a excepción de flavonoides y principios amargos. Se le atribuye la actividad fungicida a los flavonoides y antraquinonas. Para las pruebas biológicas se logró determinar que sí existe un efecto antifúngico de amplio espectro para todos los extractos en concentraciones que van desde 0.5 a 0.125 mg/mL, pero a partir de 0.05 mg/mL solo el extracto etanólico inhibió el crecimiento de micelio, y a concentraciones de 0.0250 mg/mL no se logró evidenciar un efecto antifúngico.

### INTRODUCCIÓN

Los fungicidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de hongos fitopatógenos, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha originado diversos problemas, como toxicidad a los usuarios y daños al medio ambiente, por lo que se deben extremar las precauciones al utilizarlos. A pesar de esto, los fungicidas sintéticos son de uso cotidiano en Guatemala (1).

Ante esta situación, una alternativa prometedora es el uso de productos naturales derivados de las plantas para el control de hongos fitopatógenos. Existe información de cerca de 400 especies de plantas con propiedad fungicida y se estima que esta propiedad se presenta frecuentemente en algunas familias de metabolitos secundarios. Por ejemplo, en plantas con actividad antifúngica, se han sugerido que algunos compuestos bioactivos presentes en los extractos o aceites esenciales, como responsables de dicha actividad (2-3).

Actualmente en el interior del país, los agricultores utilizan el extracto acuoso del tubérculo de *Xanthosoma robustum* como pesticida de amplio espectro (presentando características insecticidas, nematocidas y fungicidas) al rociarlo en plantaciones de cultivos de café, tomate, chile, maíz, etc. (4).

Dada la importancia que representa para la ciencia y para los agricultores el uso de este extracto, se propone la investigación del perfil fitoquímico y la validación de su actividad antifúngica de *X. robustum*, para la cual, según la base de datos NAPRALERT no existe información etnomédica, actividad biológica reportada del extracto, ni identificación de sus metabolitos secundarios (5-8).

Por lo tanto, es indispensable comprobar la actividad, identificar el extracto que presenta la actividad así como la familia de metabolitos secundarios presentes en dicho extracto por métodos de tamizaje fitoquímico, restringiendo el estudio únicamente a la determinación de la actividad antifúngica.

### Aislamiento, purificación e identificación de hongos fitopatógenos

Esterilización completa de todo el material a utilizar. Preparación de soluciones para tratar la superficie del tejido infectado, con el fin de eliminar o reducir notablemente los contaminantes de superficie: solución de hipoclorito de sodio al 5.75%, los tejidos deben secarse con un trozo de papel estéril cuando sean tratados con las dos primeras soluciones y pasarse por tres cambios de agua estéril (9).

Preparación de medios de cultivo en el que se desarrollan los hongos y bacterias patógenos. Agar Papa Dextrosa y Sabouraud.

#### Aislamiento del patógeno de las hojas

El método para aislar a los patógenos de las hojas infectadas consiste en seleccionar varios cortes pequeños de 5 a 10 mm<sup>2</sup> a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos. Esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, a fin de que cada uno de ellos se esterilice (a nivel de superficie) a diferentes tiempos. Algunos de los cortes depositados en el esterilizante de superficie durante periodos intermedios permitirán que solo el patógeno se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que se ha permitido que el esterilizante actué el tiempo suficiente para destruir a todos los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno. Y para terminar de purificar la cepa se cambia de caja hasta lograrlo (10).

#### Obtención del material vegetal a analizar

Tubérculo de *X. robustum* (Quequesque), proporcionado por FUNDEBASE en fresco y clasificado por el Ing. Mario Veliz del Herbario BIGU de la Facultad de CCQQ y Farmacia (11-14).

#### Obtención del extracto acuoso

Se procede a pelar y picar el tubérculo en pequeñas porciones, se pesa una cantidad conocida y se deja en un recipiente cerrado con una cantidad de agua determinada, durante cuatro a cinco días para una extracción efectiva (maceración). Lo anterior coincide con el método empírico utilizado por los agricultores en el campo.

#### Obtención del extracto madre

El material vegetal seco y molido se coloca en un percolador de vidrio y se le agregan disolventes en orden decreciente de polaridad (hexano, cloroformo y etanol al 80%). Cada uno de los disolventes se agrega en tres porciones sucesivas de 1L cada una (pueden ser hasta cinco, dependiendo de la intensidad del color de las fracciones extraídas). Entre cada porción se deja reposar el disolvente por una noche, luego se recolecta y se unifican todas las fracciones.

#### Concentración del extracto madre

Se obtienen como mínimo 3L de extracto madre, los cuales se concentran en rotavapor a una temperatura no mayor de 55°C hasta llegar a una consistencia pastosa.

#### Cromatografía en capa fina

Todas las fracciones obtenidas se analizan por cromatografía en capa fina utilizando dos diferentes fases móviles; butanol:agua:ácido acético (60:25:15) y cloroformo:metanol:agua (80:18:2) para determinar cuales son las que pueden unirse.

#### Realización de bioensayos

Las fracciones obtenidas de los extractos se concentran nuevamente en rotavapor y se llevan a una consistencia pastosa, se anota el peso de cada una y se prueba su actividad antifúngica contra las especies de hongos aislados e identificados. En esta parte se determinará cual de los extractos obtenidos presenta mayor actividad, es decir contra todas o el mayor número de especies de hongos en estudio.

Medio de cultivo para hongos filamentosos.

Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud, esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:100). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL. Verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para chequear esterilidad. Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

#### Preparación del inóculo fúngico

Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con 0.6 g de dextrosa, 0.3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 g de Peptona y 0.6 g de agar-agar. Agregarlo a 300 mL de agua, disolver, verter 10 mL en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación. Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo. Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla. Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar un minuto en vortex y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer. Llevar la suspensión a 100 esporas/ml = 1x10<sup>8</sup> esp/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

#### Inoculación de hongos filamentosos

Se abren cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro en forma equidistante. Tomar 30 mL de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días. Hacer cuatro repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

#### Lectura e interpretación de resultados

Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm. Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control. Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%. (Figura 1).

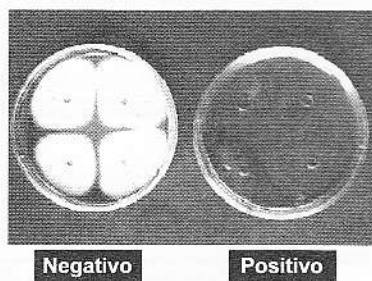


Figura 1: Tamizaje antifúngico.

#### Tamizaje fitoquímico

Para la determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico y acuoso, se utilizó cromatografía en capa fina.

### RESULTADOS

#### Aislamiento de hongos fitopatógenos

Cultivos infectados de los cuales se aislaron los hongos fitopatógenos: café, tomate, chile, maíz. Los cultivos fueron seleccionados al azar, y se encuentran en la aldea Tzalpetei, San Antonio Palopó, Sololá, Guatemala, 1800 msnm. Se lograron aislar 37 diferentes microorganismos.

#### Purificación de hongos fitopatógenos

En el proceso de purificación se trabajaron únicamente 20 cepas. Se descartaron las cepas que presentaban impurezas como otros hongos, bacterias, ácaros, etc.

#### Identificación de hongos fitopatógenos

Se realizó una identificación de campo *in situ* a los hongos que se encontraban afectando las plantas que se colectaron, los cuales fueron: *Fumagina*, *Cercospora*, *Cenicilla*, *Helminthosporium*, Tizón, *Phytophthora*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Antracnosis*. (15)

Los anteriores fueron identificados por el Ing. Agrónomo Edil Rodríguez de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. De las 20 cepas de hongos fitopatógenos aisladas se lograron identificar las cepas de *Fusarium* sp, *Aspergillus*\*, *Coletotricum*, *Mucor* sp, *Penicillium*\*.

\* Cepas "estándar" incluidas para los bioensayos (proporcionadas por el Departamento de Microbiología). Todas las cepas se sometieron a cultivo en placa para identificación.

#### Preparación de soluciones de esporas

Se sembraron los hongos en un medio pobre en nutrientes (Takashio) para inducir esporulación. Se prepararon soluciones de esporas de cada una de las cepas hasta una concentración de 100 esporas/ $\mu$ L.

#### Obtención de extractos

##### Extracto acuoso

Se pesaron 2,200 g de material vegetal crudo, en 3.7 L de agua, después del proceso de percolación y filtrado se sometió el extracto a liofilización del cual se obtuvieron 31.18 g de extracto acuoso.

##### Extracto etanólico

Se pesaron 400 g de material vegetal seco, en 2.5 L de etanol, después del proceso de percolación y filtrado se sometió el extracto a reconcentración en rotavapor, del cual se obtuvieron 30.2 g de extracto etanólico seco.

#### Partición por disolventes

A partir del extracto etanólico, se realizaron las extracciones líquido-líquido con los siguientes disolventes: hexano, cloroformo y acetato de etilo. Se eliminaron los disolventes y los extractos se dejaron en una desecadora para eliminar la mayor cantidad de disolvente.

#### Tamizaje fitoquímico

Se determinó presencia o ausencia de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina a los extractos acuoso y etanólico, según fuentes de bases de datos consultadas no existía información al respecto, para el *X. robustum*.

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico

Metabolito Secundario	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
Alcaloides	+	+
Flavonoides	-	+
Cumarinas	+	+
Antraquinonas	+	+
Taninos	+	+
Saponinas	+	+
Principios amargos	-	+

+ Presencia de metabolito secundario

- ausencia de metabolito secundario

Una porción de material vegetal seco se sometió a análisis de determinación de aceites esenciales, por el método de hidrodestilación Neoclevenger, obteniendo como resultado presencia de aceite esencial pero en una cantidad mínima (no cuantificable). No se logró cuantificar azufre y glicósidos cianogénicos.

Tabla 2. Extracto acuoso

	Concentraciones utilizadas de los extractos*					
	Control	0.5	0.25	0.125	0.05	0.025
<i>Fusarium</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Coletotricum</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Penicillium</i>	-	+	+	+	-	-

(+) Inhibe: Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparando con el control. \* Concentración en mg/mL

Tabla 3. Extracto etanólico

	Concentraciones utilizadas de los extractos*					
	Control	0.5	0.25	0.125	0.05	0.025
<i>Fusarium</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Coletotricum</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Penicillium</i>	-	+	+	+	+	-

(+) Inhibe: Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

\* Concentración en mg/mL

Tabla 4. Extracto hexánico

	Concentraciones utilizadas de los extractos*					
	Control	0.5	0.25	0.125	0.05	0.025
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Coletotricum</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Penicillium</i>	-	+	+	-	-	-

(+) Inhibe: Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

\* Concentración en mg/mL

Tabla 5. Extracto clorofórmico

	Concentraciones utilizadas de los extractos*					
	Control	0.5	0.25	0.125	0.05	0.025
<i>Fusarium</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Coletotricum</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Penicillium</i>	-	+	+	+	-	-

(+) Inhibe: Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control

\* Concentración en mg/mL

Tabla 6. Extracto acetato de etilo

	Concentraciones utilizadas de los extractos*					
	Control	0.5	0.25	0.125	0.05	0.025
<i>Fusarium</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Coletotricum</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Mucor</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Penicillium</i>	-	+	+	-	-	-

(+) Inhibe: Se observa un efecto de reducción del diámetro en un 75% comparado con el control.

\* Concentración en mg/mL

## CONCLUSIONES

Las cepas de hongos aisladas, purificadas e identificadas son *Mucor* sp., *Fusarium* sp., y *Coletotricum*.

Se determinó la presencia de los siguientes familias de metabolitos secundarios en el extracto etanólico alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, taninos, saponinas, principios amargos, los mismos se determinaron en el extracto acuoso con excepción de flavonoides y principios amargos.

Las familias de metabolitos secundarios presentes en *X. robustum* que según la literatura tienen potencial de actividad fungicida son las antraquinonas y los flavonoides.

Todos los extractos presentan inhibición en el crecimiento de hongos fitopatógenos hasta una concentración de 0.125 mg/mL, por debajo de la cual ya no hay actividad fungicida.

El extracto etanólico fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición y amplio espectro contra hongos a una menor concentración (0.05 mg/mL).

Por el método de hidrodestilación Neoclevenger se determinó que el tubérculo de *X. robustum* posee aceite esencial pero en cantidades no cuantificables.

### RECOMENDACIONES

Actualizar el cepario de hongos fitopatógenos de la Facultad de CCQQ y Farmacia de la USAC regularmente, a manera de realizar pruebas posteriores con una batería mas completa.

Identificar todos los hongos fitopatógenos que conforman la batería de hongos fitopatógenos aislados y purificados, para complementar el amplio cepario con el que cuenta el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Realizar el tamizaje fitoquímico a las fracciones que presenten mayor actividad en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, para determinar que familias de metabolitos secundarios se encuentran presentes en esa fracción.

Fomentar el estudio de plantas con actividad antifúngica, para proveer al agricultor de insumos de origen natural, como alternativas en la alternancia de fungicidas para el manejo y control de hongos fitopatógenos.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo técnico y material del Departamento de Citohistología y del proyecto Flora Regional financiado por OEA

### REFERENCIAS

1. Manners J.G. Introducción a la fitopatología, México, LIMUSA. 1986 pag. 205-235.
2. Wagner SH. Bladt, EM. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer - Verlag Berlin Heidelberg 1983. pag. 60-140.
3. Harborne JB. Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant analysis), Chapman & Hall Ltd. New York, 1984 pag. 20-130.
4. Agrios GN. Manual de Enfermedades de las plantas. México, Ediciones Ciencia y Técnica, 1991 pag. 201-220.
5. Dreisbach R. Manual de Toxicología Clínica. México, Editorial el Manual Moderno, 1984. pag. 180, 192-193, 229, 234.
6. The Merck Index 10ed, Edition. Rahway, N.J. USA, 1983, pag. 1662, 2161, 8849.
7. Clauss E. Pharmacognosy, Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1956. pag 676-677.
8. Romero S. Hongos Fitopatogenos, México, Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Patrono Universitario, 1988, pag. 88-105.
9. Dickinson CH. Lucas JA. Patología Vegetal y Patógenos de Plantas, México Limusa, 1987 pag 251.
10. Morales OA. Caracterización Agronómica, Morfológica y Bromatológica de 7 cultivares de Quequesque en San Miguel Panam Suchitepéquez, Guatemala. Tesis Ing. Agrónomo Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1988. pag.12 - 26.
11. De Pöll E. Plantas Comestibles y Tóxicas de Guatemala, 1983. pag 67-68.
12. Gros E. Introducción al Estudio de los Productos Naturales, Washington, EU, OEA. 1985. Pag 146-161.
13. De Campos M. Finkelman J. Situación actual del uso y manejo de plaguicidas en Guatemala, Publicación técnica del proyecto "Aspectos Ocupacionales y Ambientales de la Exposición a los Plaguicidas en el Istmo Centroamericano" (PLAGSALUD), Guatemala, 1998 pag. 60-85.
14. Calderón R. Meléndez L. Recopilación de las Investigaciones de Plaguicidas realizadas en el Salvador. (Publicación técnica del proyecto "Aspectos Ocupacionales y Ambientales de la Exposición a los Plaguicidas en el Istmo Centroamericano"(PLAGSALUD)), San Salvador, 2001, pag. 20 - 125.
15. Alexopolus CJ. Introducción a la micología, 4 ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 1996, pag. 217-223.