

# Actividad antifúngica de especies del género *Senna* (Caesalpinoideae, Leguminosae) del norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*

DI CIACCIO, L.S.<sup>1</sup>; FORTUNATO, R.H.<sup>2,3</sup>; SALVAT, A.E.<sup>4,5</sup>

## RESUMEN

El género *Senna* comprende alrededor de 360 especies presentándose el 80% en el continente americano. Varias son conocidas por las propiedades antimicrobianas y farmacológicas. Los antecedentes de actividad antifúngica en Argentina fueron reportados en un estudio de extractos metanólicos de hojas de *S. spectabilis* frente a *Fusarium graminearum*. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antifúngica de 12 extractos metanólicos de distintos órganos de 10 especies del género *Senna*, recolectadas en el norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*, responsable de la podredumbre de la espiga en maíz. Primeramente, todos los extractos fueron evaluados con un ensayo colorimétrico de susceptibilidad. Aquellos que mostraron actividad inhibitoria, luego fueron evaluados mediante bioautografía de contacto, tinción con azul de Evans y azul de anilina, test de crecimiento radial del micelio y por su capacidad para inhibir la producción de fumonisinas. El extracto de frutos de *S. spectabilis* mostró actividad antifúngica con una Concentración Mínima Inhibitoria de 99,9 µg ml<sup>-1</sup>. Asimismo, se observaron halos de inhibición significativos en la bioautografía de contacto, mientras que en la tinción con azul de Evans y azul de anilina se visualizaron algunas alteraciones en las hifas. En el test de crecimiento radial del micelio, se observó una reducción significativa, y en lo que respecta a la producción de fumonisinas, los extractos provenientes de frutos mostraron una inhibición en su producción de 48,3% mientras que los extractos de flores el porcentaje fue mayor (86,3%). Finalmente, se pudo determinar que *S. spectabilis* presenta actividad antifúngica frente *F. verticillioides*, confirniéndole un nuevo registro de bioactividad a esta especie vegetal.

**Palabras clave:** plantas nativas, antifúngicos, extractos, fumonisinas.

## ABSTRACT

The genus *Senna* comprises about 360 species being 80% from the American continent. Several of them are known by their antimicrobial and pharmacological properties. In Argentina antecedents of antifungal activities were reported in studies of methanolic extracts from leaves of *S. spectabilis* against *Fusarium graminearum*. The aim of this work was to analyze the antifungal activity of 12 methanolic extracts of different organs of 10

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Patobiología. CONICET. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN), Instituto de Recursos Biológicos. CONICET. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Moron, Morón, prov. de Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Patobiología, Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: salvat.adriana@inta.gob.ar

species of the genus *Senna* collected from northern Argentina against *Fusarium verticillioides*, causal agent of maize ear rot. At first all the extracts were evaluated to know their antifungal capacity with a colorimetric test. Those which showed inhibitory activity were analyzed by contact bioautography, Evans blue and Aniline blue staining, mycelial radial growth test and also their ability to inhibit fumonisins production. Fruit extract of *S. spectabilis* showed antifungal activity at a Minimum Inhibitory Concentration of  $99.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Likewise, in the contact bioautography an inhibition zone was evident, while in Evans blue and aniline blue staining, some alterations in the mycelial hyphae were visualized. In the mycelial radial growth test, a significant reduction was observed, and in the fumonisins production the extracts from fruits showed inhibition of 48.3% while in flowers the percentage was higher (86.3%). Finally, it was determined that *S. spectabilis* has antifungal activity against *F. verticillioides*, giving a new record of bioactivity to this plant species.

**Keywords:** native plants, antifungal activity, extracts, fumonisins.

## INTRODUCCIÓN

En el continente americano se han reportado gran variedad de compuestos químicos con propiedades antibacterianas, antibióticas, antifúngicas y antioxidantes presentes en diferentes especies nativas (Mors *et al.*, 2000; DeFilippis *et al.*, 2004; Viegas Júnior *et al.*, 2006; Lombardo *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2015). El género pantropical y subpantropical *Senna* Mill., conocido por sus diversas propiedades antimicrobianas y farmacológicas (Agarwal y Bajpai, 2010; Jothy *et al.*, 2012; de Albuquerque Melo *et al.*, 2014; Anthony *et al.*, 2014; Lombardo *et al.*, 2015), comprende alrededor de 360 especies, de las cuales más del 80% están distribuidas en América (Irwin y Barneby, 1982; Randell y Barlow, 1998). Argentina, por la extensa superficie que ocupa, posee gran variedad de climas (Cabrera, 1994) que permite la presencia de numerosas especies vegetales con gran potencial de actividad biológica (Ramos *et al.*, 1998; Barquero, 2007) reportándose importantes usos antimicrobianos (Cowan, 1999; Salvat *et al.*, 2004; Serafin *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2008; Silva Júnior *et al.*, 2010). En referencia a la actividad antifúngica del género *Senna*, en la Argentina solo existen registros sobre extractos metanólicos de hojas de *S. spectabilis* frente a una cepa de *Fusarium graminearum* productora de micotoxinas (Salvat, 2010).

En el territorio argentino, una extensa área es destinada al cultivo de maíz. En la campaña 2015/16 se implantaron 3,5 millones de hectáreas obteniendo una producción de 29 millones de toneladas (USDA, 2016). Algunas especies de hongos filamentosos del género *Fusarium* pueden infectar a los cultivos durante su desarrollo en el campo, así como a sus productos durante el almacenamiento. Las pérdidas sufridas en los cultivos asociados a hongos se deben no solo a la reducción del rendimiento y la alteración de la calidad comercial y nutricional, sino también a la producción de micotoxinas, que representan un riesgo para la salud humana y animal (USDA, 2006). *Fusarium* es el género que afecta con mayor frecuencia a los cultivos argentinos, las especies más importantes son: *F. graminearum*, y *F. verticillioides*. (Presello *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2012).

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por *F. verticillioides*, el cual sintetiza las fumonisinas  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$ ,  $\text{FB}_3$  (Marasas, 2001), que son responsables de provocar leucoencefalomalacia equina (ELEM) y edema pulmonar porcino (PPE). Además, producen efectos adversos en la función del sistema inmune en pollos, aumentando así la susceptibilidad a microorganismos oportunistas que causan infecciones graves (Voss *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antifúngica de 12 extractos metanólicos de distintos órganos de 10 especies del género *Senna*, recolectadas en el norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*, responsable de la podredumbre de la espiga en maíz y producción de fumonisinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y preparación de los extractos

Los ejemplares de plantas utilizados fueron recolectados del norte de Argentina, identificados taxonómicamente (Fortunato). Ejemplares del material estudiado fueron depositados en el Herbario del Instituto de Recursos Biológicos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (*Herbarium code: BAB* en <http://sciweb.nybg.org/Science2/IndexHerbariorum.asp>). El nombre de las especies, colector, número de espécimen y lugar de recolección se indican en la tabla 1.

El material vegetal fue obtenido dependiendo del estado fenológico de las plantas al momento de su recolección. Cada órgano (ramas, hojas, frutos y flores) fue secado a temperatura ambiente y luego molido finamente con un molino de martillos. Luego, el material vegetal fue extraído con metanol p.a. (MeOH, Merck) a temperatura ambiente, en total oscuridad, durante 48 horas. Los extractos fueron filtrados con filtro de papel y posteriormente se los llevó a sequedad en un evaporador rotatorio, a una temperatura de 40 °C. Posteriormente se pesó el residuo. El extracto crudo seco fue disuelto en MeOH a una concentración de 80 mg de materia seca por  $\text{ml}^{-1}$ . Para su conservación,

1 ml de cada extracto fue diluido con 9 ml de dimetilsulfóxido (DMSO, Biopack) alcanzando una concentración final de 8000 µg de materia seca por ml<sup>-1</sup>. Esta solución fue esterilizada utilizando filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius). Todos los extractos fueron mantenidos en crioviales a -35 °C.

### Microorganismo

La cepa de *F. verticillioides* M7075, con reconocida capacidad productora de fumonisinas, fue cedida por la Universidad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Esta fue cultivada en tubos de Synthetischer Nährstoffärmer Agar (SNA) a 28 °C por 7 días. Posteriormente se agregó a cada tubo 5 ml de agua peptonada + Tween 80. Mediante el uso de un vortex se agitó suavemente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión de conidios fue filtrada a través de gasa estéril contenida en un frasco de vidrio. Se realizó el conteo de células mediante cámara de Neubauer y posteriormente se ajustó la suspensión a una concentración entre 1-3 x 10<sup>4</sup> y 1-3 x 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias ml<sup>-1</sup> (UFC ml<sup>-1</sup>), dependiendo del ensayo para realizar.

### Medios de cultivo y agente antifúngico

Por una parte, se utilizó el medio sintético Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco by Life Technologies) 1x con L-glutamina sin rojo fenol. Además, el medio SNA compuesto por: fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,0 g, nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) 1,0 g, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>) 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, cloruro de potasio (KCl) 0,5 g, glucosa 0,2 g, sacarosa 0,2 g, agar 20,0 g, agua destilada 1000 ml. Por otra parte, el medio PDA (Agar papa dextrosa) proveniente de Oxoid. Y, por último, el colorante Resazurina sódica (0,01% solución acuosa; Sigma-Aldrich EUA) esterilizada por filtración a través de filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius) y conservada en crioviales a -35 °C.

Como agente antifúngico se utilizó el Ketoconazole (Ke) a una concentración de 2 µg ml<sup>-1</sup> para el ensayo colorimétrico de susceptibilidad, tinción con azul de Evans y azul de anilina y test de crecimiento radial del micelio; 50 µg ml<sup>-1</sup> para bioautografía de contacto. Todas las soluciones fueron esterilizadas utilizando filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius) y conservadas en crioviales a -35 °C.

Especies vegetales	Voucher n.º	Lugar de recolección	Órgano analizado
<i>Senna aphylla</i> (Cav.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>pendula</i> Robbiati & Fortunato	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6922	Córdoba: Dpto. Tulumba, RN 60 3 km S de San José de Las Salinas, 30°01'S, 64°35'O.	Hojas
<i>Senna aphylla</i> (Cav.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>aphylla</i>	BAB Fortunato <i>et al.</i> 7764	Salta: Dpto. Molinos, 3 km E de Brealito a RN 40, 25°19'S, 66°21'O.	Frutos
<i>Senna birostris</i> (Dombey ex Vogel) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 7813	Salta: Dpto. Cachi, Valle Encantado, R. Prov. 33, 13 km E, 25°10'S, 65°49'O	Hojas
<i>Senna burkartiana</i> (Villa) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 8216	Salta: Dpto. St. Victoria, camino a St. Victoria, 800 m O de Rodeo Pampa, 22°30'S, 64°20'O	Frutos
<i>Senna chloroclada</i> (Harms) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6922	Salta: Dpto. Gral. Güemes, R. Prov. 52 (Juana Azurduy), 20 km NO de Fuerte Esperanza, 25°04'S, 62 01' O.	Hojas
<i>Senna hirsuta</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6997	Salta: Dpto. Gral. José de San Martín, 5 km E de Campo Durán, enfrente a REFINOL, 22°12'S, 63°40'O	Hojas
<i>Senna morongii</i> (Britton) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6515	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, 47 km de Sauzalito a Santa Rita, 24°25'S, 61°44'O	Hojas
<i>Senna obtusifolia</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6570	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, Sauzalito de Fn. Belgrano, 24°25'S, 61°41'O	Hojas
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6569	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, Sauzalito de Fn. Belgrano, 24°25'S, 61°41'O	Hojas
<i>Senna spectabilis</i> (DC.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>spectabilis</i>	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6964	Salta: Dpto. Gral. J. de San Martín, R. Prov. 4, 4 km O de Paraje Las Maravillas, 22°11'S, 63°01'O	Frutos y flores
<i>Senna spiniflora</i> (Burbart) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 10155	Santiago del Estero: Dpto. Gral. Taboada: R Prov. 7, 5 km E de Anatuya. 28°26'S, 62°47'O.	Ramas

**Tabla 1.** Especies de *Senna* recolectadas de las provincias del norte de Argentina.

### Ensayo colorimétrico de susceptibilidad: microdilución en placa de 96 wells

El ensayo colorimétrico de susceptibilidad fue realizado de acuerdo a lo informado en el documento M38-A (NCCLS, 2002), con ciertas modificaciones para la actividad antifúngica (Salvat, 2010). Esta técnica se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos (Biofil). Se añadieron 200 µl de las soluciones de MeOH: DMSO (1:9) de los extractos de plantas a cada uno de los pocillos de la fila A, los pocillos restantes de las filas B a la H recibieron 100 µl de RPMI 1640. Para la realización de las diluciones, se tomaron 100 µl de los pocillos de la fila A y se depositaron en los pocillos de la fila B y así sucesivamente hasta la fila H (en dirección vertical). El exceso de dilución (100 µl) de la fila H fue descartado. De esta manera, los pocillos de la fila A contenían la concentración más alta del extracto (4000 µg ml<sup>-1</sup>) y los pocillos de la fila H la más baja (31,2 µg ml<sup>-1</sup>). Luego se colocaron 100 µl del inóculo que contenía entre 1-3x10<sup>4</sup> CFU ml<sup>-1</sup> en todos los pocillos, exceptuando al control del medio RPMI 1640. Por último, se depositaron 20 µl de Resazurina a todos los pocillos (Espinell-Ingroff *et al.*, 1995). Se utilizaron algunas columnas en cada placa para los respectivos controles de esterilidad del medio de cultivo RPMI 1640 y estabilidad química del colorante Resazurina (sin el inóculo), de viabilidad del inóculo (sin extracto ni solvente añadido), del agente antifúngico (Ke) a la concentración indicada anteriormente y del efecto del solvente MeOH: DMSO (1:9). La concentración de UFC ml<sup>-1</sup> se determinó contando las colonias desarrolladas 48 horas después de añadir una alícuota de 100 µl del inóculo utilizado en el ensayo, en placas de Petri que contenían PDA. Las microplacas fueron incubadas a 28 °C en oscuridad y examinadas a las 48 horas. El cambio de color de azul a rosa de la Resazurina indicaba crecimiento fúngico. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue considerada como la mayor concentración (en µg de materia seca por ml de medio) en la cual no se detecta viraje de color del indicador Resazurina. Cada extracto fue considerado activo cuando su CMI < 500 µg ml<sup>-1</sup> (Salvat *et al.*, 2001). Este ensayo se realizó por triplicado.

Posteriormente, en los extractos que mostraron actividad inhibitoria, se realizaron las siguientes técnicas:

#### Bioautografía de contacto

Para la separación de los extractos se llevó a cabo la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC). Como fase estacionaria, se utilizaron placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (9x5 cm) donde fueron depositados 20 µl en forma de banda para cada extracto (que corresponde a 400 mg ml<sup>-1</sup>) y 5 µl para el control positivo (Ke) y como fase móvil la mezcla de n-propanol:acetato de etilo:agua:ácido acético (Wagner y Bladt, 1996), con modificaciones (39:41:29:1). El medio PDA (40 ml) fue inoculado con 600 µl de entre 1-3x10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de *F. verticillioides* que luego fue vertido en placas de vidrio (150x25 mm). Los cromatogramas fueron colocados sobre el agar e incubados a 28 °C por 24 horas, luego fueron retirados y se continuó la incubación de las placas por 24

horas más a 28 °C. Finalmente, se visualizaron las bandas de inhibición y se calculó el frente de reacción (Rf): Rf = distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el solvente (Zacchino y Gupta, 2007). Esta técnica se realizó por triplicado.

#### Tinción con azul de Evans: visualización de alteración de las hifas

Esporas de *F. verticillioides* fueron incubadas en el medio líquido RPMI 1640 a 28 °C por 24 horas para la formación de las hifas. Transcurrido este período, se transfirió 1 ml del medio conteniendo las hifas a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Luego, a cada tubo se le añadió el extracto activo a su respectiva CMI, se incluyeron también, un tubo como control positivo (Ke), y otro como control del inóculo. Posteriormente se incubaron todos a 28 °C durante 24 horas. Luego, se procedió a centrifugar los tubos y a retirar el medio de cultivo para posteriormente colocar 2 gotas de la solución de azul de Evans (0,05%) por 5 minutos. Finalmente, se realizaron varios lavados con agua destilada estéril para remover el exceso de colorante. La diferencia en la tinción se observó bajo microscopio óptico a 400x y para su evaluación se siguió lo descrito por Semighini y Harris (2010); Savi *et al.* (2013).

#### Microscopía óptica

Esporas de *F. verticillioides* fueron colocadas en medio PDA el cual contenía diferentes concentraciones (CMI y 2xCMI) del extracto activo, también se incluyeron placas con el control positivo (Ke) y del micelio. Posteriormente, pequeños fragmentos del agar conteniendo micelio, se colocaron en un portaobjetos para luego ser teñidos con una solución acuosa al 1% de azul anilina (AOSA, 2008) por 5 minutos. Finalmente, la morfología de las hifas fue observada para su evaluación al microscopio óptico con aumento de 1000x.

#### Test de crecimiento radial del micelio

A partir de un cultivo en placa de 7 días de *F. verticillioides* en el medio PDA se tomaron discos de 5 mm de diámetro del cultivo y se colocaron en el centro de placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo PDA con dos concentraciones de uno de los extractos activos (MIC y 2xMIC). Asimismo, se realizaron los respectivos controles correspondientes al inóculo sin tratamiento, el inóculo con el antifúngico (Ke), y el control del solvente en el cual está diluido el extracto (DMSO: MeOH – 9:1). Todas las placas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. Todos los días se midió el diámetro de las colonias (mm) y se evaluó la eficacia de cada tratamiento (Mier *et al.*, 2002; Quiroga *et al.*, 2009). Este ensayo se realizó por triplicado.

#### Efecto de los extractos activos sobre la producción total de fumonisinas

A fin de medir las diferencias en la producción de fumonisinas, una suspensión de conidios de *F. verticillioides*



(entre  $1-3 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>) se sembró en placas de Petri con 20 ml de PDA conteniendo a los extractos activos, en sus CMI correspondientes. El mismo procedimiento fue realizado para el control con Ke y control de inóculo. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 15 días. Finalmente, el contenido de fumonisinas presente en el agar se determinó mediante el test de ELISA (ELISA kit Ridascreen® Fast Fumonisin R-Biopharm – Alemania). El límite de detección fue de 0,222 mg kg<sup>-1</sup>.

### Análisis estadístico

Los datos sobre el crecimiento radial del micelio se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido por el postest de Bonferroni. Se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). El análisis se expresó como media  $\pm$  desvío estándar y el valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

En el estudio de bioactividad, realizado mediante el ensayo colorimétrico de susceptibilidad, fueron considerados activos aquellos extractos con una CMI  $< 500$   $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Solo la especie *S. spectabilis* fue activa contra *F. verticillioides*, con una CMI de 99,9  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en lo que respecta a los frutos, mientras que para las flores la CMI fue de 437,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (tabla 2). Este resultado en parte es coincidente con los hallazgos reportados por Salvat (2010), quien determinó actividad antifúngica en extractos de hojas de esta especie, pero frente a *F. graminearum*, a una CMI de 125  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Especie vegetal	Órgano analizado	CMI
<i>S. aphylla</i>	Hojas	1000
<i>S. aphylla</i>	Frutos	1000
<i>S. birostris</i>	Hojas	1000
<i>S. burkartiana</i>	Frutos	1000
<i>S. chloroclada</i>	Hojas	1000
<i>S. hirsuta</i>	Hojas	2000
<i>S. morongii</i>	Hojas	1000
<i>S. obtusifolia</i>	Hojas	1000
<i>S. occidentalis</i>	Hojas	1000
<i>S. spectabilis</i>	Frutos	99,9
<i>S. spectabilis</i>	Flores	437,1
<i>S. spiniflora</i>	Ramas	1000
Ke	---	0,25

**Tabla 2.** Actividad antifúngica (Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de *Senna* ssp. y del Ke frente a *F. verticillioides*. Los datos se muestran como valores medios de CMIs obtenidos por triplicado.

Para establecer la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de frutos y flores de *S. spectabilis*, se utilizó la técnica de bioautografía de contacto. Con esta técnica, se pudo observar una banda amarilla cuyo Rf = 1, coincidente con la banda de inhibición en el agar (figura 1).

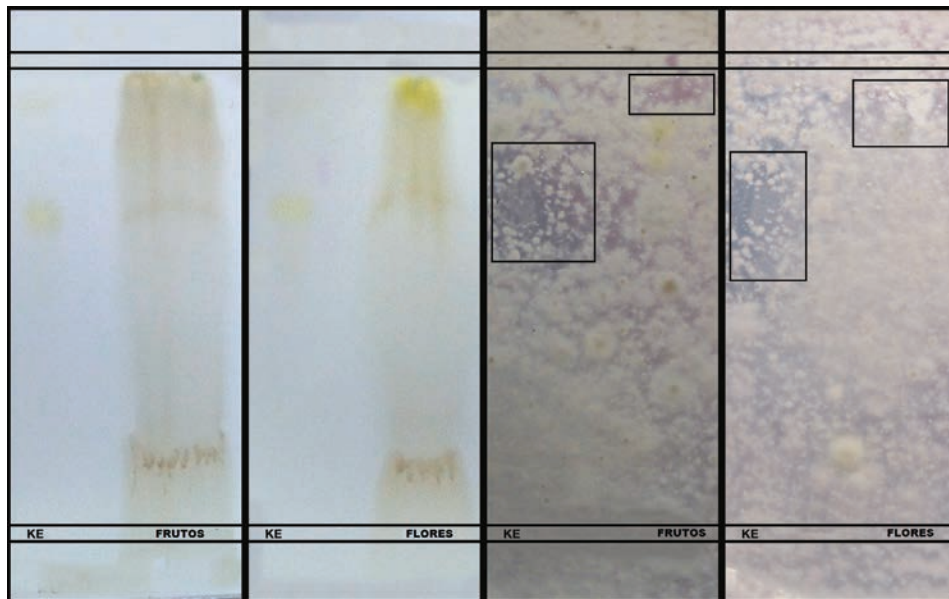
Por una parte, en relación con la tinción con el colorante azul de Evans (figura 2), las hifas expuestas a los dos extractos activos de *S. spectabilis* se encontraban teñidas de azul, lo cual indicaría que sufrieron algún tipo de daño en sus membranas plasmáticas debido a que no pudieron excluir al colorante. En cambio, las hifas control, cuyas membranas permanecieron intactas mantuvieron su coloración normal. Por otra parte, cuando las hifas del micelio desarrolladas en el medio PDA que contiene al extracto de frutos de *S. spectabilis* fueron teñidas con azul de anilina, se pudo observar una alteración en la integridad celular a nivel de citoplasma, sobre todo por la marcada presencia de vacuolas (figura 3). En el caso del extracto de frutos de *S. spectabilis* en el test de crecimiento radial del micelio, se evidenció la capacidad que tuvo para reducir el crecimiento de *F. verticillioides* cuando fue evaluado por un lapso de 7 días (figura 4).

Respecto a la producción de fumonisinas (tabla 3), cuando *F. verticillioides* fue expuesto a extractos de frutos de *S. spectabilis* se produjo una inhibición del 48,3%, en cambio en los extractos de flores el porcentaje fue mayor (86,3%), mientras que con el antifúngico (que en este caso corresponde a Ke) esta inhibición solo fue de un 19%, respecto al control.

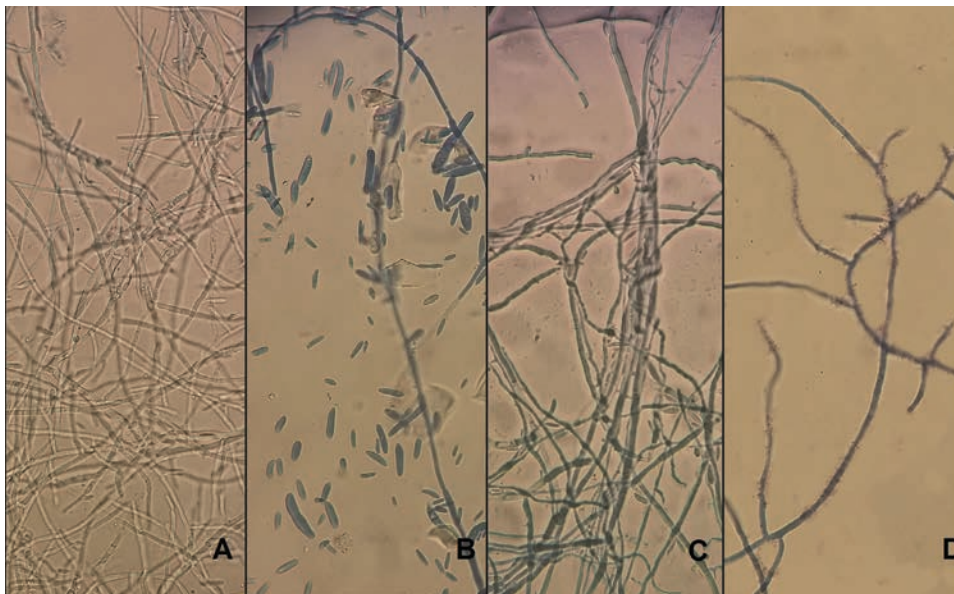
## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo es continuidad de estudios de bioprospección que se están realizando desde el año 2001. Sobre esta base, especies nativas del norte de Argentina fueron evaluados a fin de conocer su bioactividad ante *F. verticillioides* conocido por sus implicancias en la actividad productiva. Según los resultados de este trabajo, la actividad antifúngica frente a un mismo microorganismo no resultó ser igual en todas las especies estudiadas y además varió según el órgano del cual se obtuvo el extracto. Antecedentes de similar respuesta se han registrado en otros géneros, como *Polygonum* (Derita *et al.*, 2009).

En cuanto al ensayo colorimétrico de susceptibilidad que nos permitió determinar la CMI de los extractos evaluados, consideramos que si bien el DMSO:MeOH que se utilizó para diluir los extractos posee una cierta inhibición por sí mismo, esta se encuentra contemplada dentro de los primeros cuatro pocillos, por lo que las siguientes diluciones solo corresponderían a la actividad inhibitoria del extracto vegetal, que en este caso solo correspondió a los frutos y las flores de *S. spectabilis*. Sobre esta base, si tenemos en cuenta que los compuestos o principios activos responsables de la actividad contenida en las plantas generalmente se encuentran en menor proporción, estos dos extractos muestran una fuerte acción aun estando a una baja dilu-



**Figura 1.** Bioautografía de contacto: (A) TLC del extracto de frutos de *S. spectabilis*. (B) TLC del extracto de flores de *S. spectabilis*. (C) Bioautografía de contacto del extracto de frutos de *S. spectabilis*. (D) Bioautografía de contacto del extracto de flores de *S. spectabilis*.

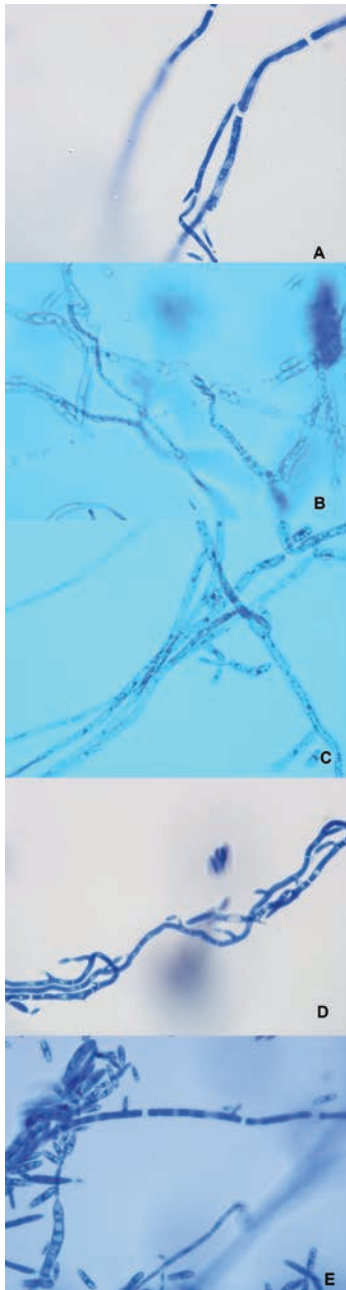


**Figura 2.** Coloración con azul de Evans: visualización de la alteración de las hifas: (A) Control (hifas vivas). (B) Ke. (C) Extracto de frutos de *S. spectabilis*. (D) Extracto de flores de *S. spectabilis*.

ción. Ante la susceptibilidad observada de este hongo frente a *S. spectabilis*, podría estar incluida dentro de la lista de otras especies evaluadas, que para este tipo de actividad mundialmente solo se encuentra en un pequeño porcentaje (Mccarthy *et al.*, 2000; Newman y Cragg, 2007).

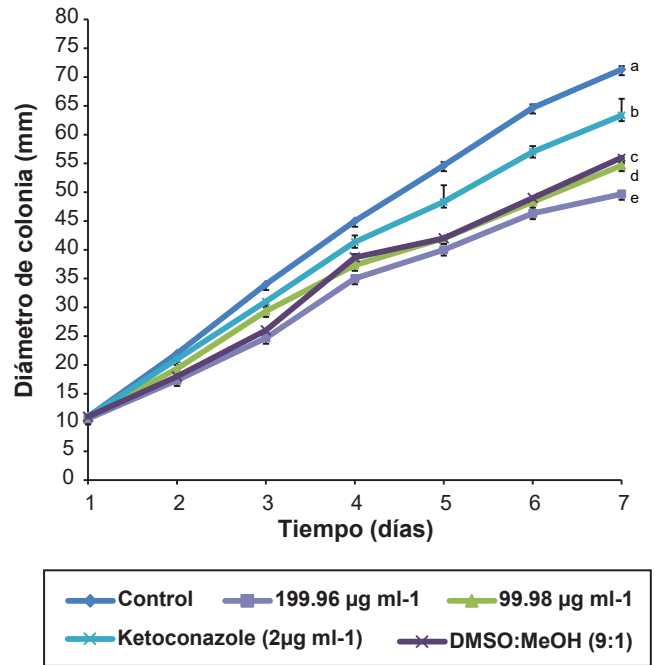
Además, con el fin de iniciar una aproximación para la identificación de los posibles compuestos responsables de

la actividad antifúngica, la bioautografía de contacto resultó ser una herramienta de utilidad ya que permitió la separación de los extractos metanólicos activos y la posterior observación de bandas, alguna de las cuales fueron coincidentes con los halos de inhibición del hongo. Esto podría relacionarse con lo establecido por Wagner y Bladt (1996) quienes determinaron en el género *Senna* la presencia del



**Figura 3.** Coloración con azul de anilina: (A) Control (hifas). (B) Extracto de frutos de *S. spectabilis* (99,9 µg ml<sup>-1</sup>). (C) Extracto de frutos de *S. spectabilis* (198,9 µg ml<sup>-1</sup>). (D) DMSO:MeOH. (E) Ke (2 µg ml<sup>-1</sup>).

compuesto antraquinona emodina coincidente con el frente de reacción (Rf) observado en este trabajo. Del mismo modo Guarize *et al.* (2012) y Andrade *et al.* (2015) estudiaron a este compuesto, el cual presentó actividad antibacteriana, efectos antiinflamatorios, laxantes y de motilidad intestinal. Asimismo, existen varios informes de poblaciones de *S. spectabilis* provenientes de Brasil cuyas flores y frutos tienen efectos farmacológicos asociados a la presencia de más de 20 alcaloides de piperidina y piperina con propiedades anal-



**Figura 4.** Actividad antifúngica del extracto de frutos de *S. spectabilis* frente a *F. verticillioides* (M7075) en PDA a diferentes concentraciones (los datos se muestran como valores promedio y desviación estándar del diámetro de colonia). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos.

Muestras	*Fumonisinas totales mg Kg <sup>-1</sup>	Efecto inhibitorio en la síntesis de fumonisinas (%)
Control	16,8	0
Ke	13,6	19,1
Frutos de <i>S. spectabilis</i>	8,7	48,3
Flores de <i>S. spectabilis</i>	2,3	86,3

\* Test ELISA

**Tabla 3.** Actividad antifumonisina de los frutos y flores de *S. spectabilis* frente a *F. verticillioides*.

gésicas y antiinflamatorias, entre otros (Viegas Júnior *et al.*, 2006). Estos datos y los observados en este trabajo son un punto de partida importante para futuras investigaciones, a fin de permitir caracterizar fitoquímicamente el o los compuestos activos, responsables de la actividad antifúngica.

Otra evidencia de este tipo de actividad, por parte de los extractos de *S. spectabilis*, fue manifiesta al observar mediante la tinción con el colorante azul de Evans que la per-



meabilidad celular estaba afectada, mientras que la tinción con azul de anilina permitió observar además daños a nivel citoplasmático. Sobre estos resultados sería deseable profundizar en la observación de los daños que se producen en las hifas por la acción de estos extractos, mediante la incorporación de otras técnicas de microscopía que ofrezcan mayor definición y exactitud.

A la hora de evaluar el efecto inhibitorio de la CMI y 2xCMI (99,9  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y 199,96  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de frutos de *S. spectabilis*, mediante el test de crecimiento radial del micelio, se pudo observar que a partir del segundo día de incubación se produjo una demora en el desarrollo del micelio en todos los tratamientos. En cambio, a partir del sexto día, las dos concentraciones del extracto provocaron un notorio retraso respecto al solvente (figura 4). Si bien este test no es concluyente para definir su comportamiento como fungicida o fungistático, se pudo observar que el extracto de frutos a estas concentraciones detuvo el desarrollo del micelio, indicando que su modo de acción es del tipo fungistático. Para complementar esta observación sería deseable realizar la técnica "time kill" (Palavecino Ruiz *et al.*, 2016).

Asimismo, resultó interesante la inhibición en la producción de fumonisinas cuando se hizo crecer a *F. verticilloides* en medio conteniendo los extractos de frutos y flores de *S. spectabilis* y en el medio conteniendo Ke. La inhibición en la producción de la toxina por los extractos fue mayor a la producida por el fungicida. Como es sabido, la capacidad de *Fusarium* para producir fumonisinas no solo depende de la cepa, sino también de los genes presentes en el hongo, del medio de cultivo o sustrato (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014) o de factores ambientales entre otros (Martínez *et al.*, 2010). En otros casos de especies nativas del norte argentino, se pudieron identificar algunos compuestos con una marcada actividad antifumonisina (Aristimuño Ficoseco *et al.*, 2014). Sin embargo en nuestro caso aún no se pudo determinar el compuesto responsable de dicha actividad. Sobre esta base se señala que estos sucesos refuerzan el concepto que las plantas tienen un enorme valor y son fuente de nuevas moléculas que aún faltan descubrir.

Para países productores de granos como Argentina, que en el año 2016 produjo más de 110 millones de toneladas entre cereales y oleaginosas (USDA, 2016), la presencia de especies como *Fusarium* en los cultivos y granos almacenados, representan una amenaza en varios sentidos. Contar con estudios que involucran a plantas nativas como alternativa de control de enfermedades fitopatogénicas podrían derivar en el futuro en opciones conducentes a aplicaciones de utilidad, contribuyendo de este modo con información sobre nuestra biodiversidad.

Finalmente, los resultados presentados en este estudio podrían ser tenidos en cuenta para futuras investigaciones que nos permitan la identificación de los compuestos activos de los frutos de *S. spectabilis* responsables de la actividad antifúngica frente a *F. verticilloides*, teniendo en cuenta que podría ser el resultado de la combinación de

varios compuestos. Consideramos que serían necesarios estudios adicionales para poder caracterizar y purificar los extractos activos de esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos, a la Dra. María Laura Ramírez. Laboratorio de Micología, Dpto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina) por haber cedido la cepa *F. verticilloides* (M7075). Al Sr. Nicolás Di Ciaccio de la Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina, por los aportes en la configuración de imágenes. Asimismo el agradecimiento es extensivo a la Dra. Flavia Hasenauer y la Téc. Rosa Amalia Salvatierra (Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA) por el aporte en las técnicas desarrolladas. Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de los Proyectos: INTA-Argentina/Universidad de Arizona-EUA, (1998 - 2003), y PIP 4197/98 CONICET (1998-2001).

## BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, V.; BAJPAI, M. 2010. Pharmacognostical and biological studies on Senna & its products: an overview. *Int J Pharma BioSci* 1 (2).
- ANDRADE, F.I.; PURGATO, G.A.; MAIA, T.; SIQUEIRA, R.P.; LIMA, S.; DIAZ, G.; NOGUEIRA DIAZ, M.A. 2015. Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. *J Evid-Based Complementary Altern Med*. Volumen 2015, Artículo ID 217598.
- ANTHONEY, T.S.; NGULE, M.C.; OBEY, J.K. 2014. Evaluation of in vitro antibacterial activity in Senna didymobotrya roots methanolic-aqua extract and the selected fractions against selected pathogenic microorganisms. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3 (5): 362–376.
- AOSA. 2008. Rules for testing seeds fungal endophyte testing. Section 10.
- ARISTIMUÑO FICOSECO, M.E.; VATTUONE, M.A.; AUDENAERT, K.; CATALÁN, C. A.N.; SAMPIETRO, D.A. 2014. Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in Anacardiaceae species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of Fusarium species. *J. Appl. Microbiol.*, 116(5), 1262–1273.
- BARQUERO, A. 2007. Plantas sanadoras. Pasado, presente y futuro. *Rev. Quím. Viva* 2(6): 19–35.
- CABRERA, A.L. 1994. Regiones fitogeográficas argentinas. En: KUGLER, W.F. (Ed.). *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. Tomo 2. 2.ª edición. 1.ª reimpresión. Acme. Buenos Aires. Argentina. Fascículo 1. 1–85 pp.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. 2008. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hypoxis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev Bras Farmacogn* (18) (Supl.): 670–675.
- COWAN, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* (12): 564–582.
- DE ALBUQUERQUE MELO, G.M.; RODRIGUES SILVA, M.C.; PEREIRA GUIMARÃES, T.; PINHEIRO, K.M.; BRITO DA MATTA, C.B.; DE QUEIROZ, A.C.; PIVATTO, M.; DA SILVA BOL-



- ZANI, V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; VIEGAS JÚNIOR, C. 2014. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Phytomedicine* 21 (3): 277–281.
- DE LA TORRE-HERNÁNDEZ, M.E.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; GALEANA-SÁNCHEZ, E.; PLASENCIA-DE LA PARRA, J. 2014. Fumonisin–Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP*, 17(1): 77–91.
- DEFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. 2004. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). Washington, DC: Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 72–73 pp.
- DERITA, M.G.; LEIVA, M.L.; ZACCHINO, S.A. 2009. Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum acuminatum* Kunth. *J Ethnopharmacol.* 124(3):377–83.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar>) verificado: 01 de febrero de 2017).
- ESPINEL-INGROFF, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V. 1995. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole resistant and susceptible isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* (33): 3154–3158.
- GARRIDO, C.E.; HERNÁNDEZ PEZZANI, C.; PACIN, A. 2012. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control* (25): 660–665.
- GUARIZE, L.; DA COSTA, J.C.; DUTRA, L.B.; MENDES, R.F.; LIMA, I.V.A.; SCIO, E. 2012. Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of *Senna macranthera* leaves. *Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Lett.* 26 (4): 331–343. DOI: 10.1080/14786411003754264.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. 1982. The American Cassiinae. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 35 (1–2): 918 p.
- JOTHY, S.L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y.S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, L.Y.; DEIVANAI, S.; SASIDHARAN, S. 2012. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement. *Molecules* (17), 10292–10305.
- LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KANEKO, T.M. 2009. Ethnic, biological and chemical aspects of *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev. ciênc. farm. básica apl.* 30 (1): 9–17.
- LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KATO, E.T.M.; MATHOR, M.B.; DE JESUS ANDREOLI PINTO, T.; KANEKO, T.M. 2015. Evaluation of in vitro biological properties of *Senna occidentalis* (L.) Link. *Acta Sci Biol Sci* 37 (1): 9–13.
- MARASAS, W. 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonins: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 109, Supplement 2. 239 p.
- MARTÍNEZ, M.; MOSCHINI, R.; BARRETO, D.; BODEGA, J.; COMERIO, R.; FORJAN, H.; PIATTI, F.; PRESELLO, D.; VALENTINUZ, O. 2010. Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisin en granos de maíz. *Trop Plant Pathol* 35 (5): 277–284.
- MCCARTHY, P.; CHEN, Y.; WRIGHT, A.; CHILSON, K.; SCHIMOLER, R.; SELITRENNIKOFF, C. 2000. New antifungal natural products from marine invertebrates. *Abstr. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sep 17–20; 40: 202.
- MIER, T.; TORIELLO, C.; ULLOA, M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos. UNAM. 34 p.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; ÁLVARES PEREIRA, N.; DEFILIPPS, A. 2000. Medicinal plants of Brazil. Reference Public., Nueva York. 501 p.
- NEWMAN, D.; CRAGG, G. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard.
- PALAVECINO RUIZ, M.D.; ORDÓÑEZ, R.M.; ISLA, M.I.; SAYAGO, J.E. 2016. Activity and mode of action of *Parastrephia lepidophylla* ethanolic extracts on phytopathogenic fungus strains of lemon fruit from Argentine Northwest. *Postharvest Biol. Technol.* (114), 62–68.
- PRESELLO, D.A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHERABIDE, G.H. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *J Crop Prot.* (27): 572–576.
- QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, D.A.; SGARIGLIA, M.A.; SOBERÓN, J.R.; VATTUONE, M.A. 2009. Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species. *International journal of food microbiology*, 132(1), 42–46.
- RAMOS, G.; MANTECÓN, A.R.; DE FRUTOS FERNÁNDEZ, P.; GIRÁLDEZ GARCÍA, F. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos Zootecnia* 47 (180): 597–620.
- RANDELL, B.R.; BARLOW, B.A. 1998. *Senna circinnata* Flora of Australia (12): 89–138. CSIRO: Melbourne.
- SALVAT, A.E.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. 2001. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* (32): 293–297.
- SALVAT, A.E.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine* (11): 230–234.
- SALVAT, A.E. 2010. Actividad antifúngica de extractos de plantas autóctonas sobre *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium graminearum*. Tesis de maestría, Universidad de San Martín.
- SAVI, G.D.; VITORINO, V.; BORTOLUZZI, A.J.; SCUSSEL, V.M. 2013. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphae alterations, conidia, and fumonisin production. *J. Sci. Food Agric.* 93 (13): 3395–3402.
- SEMIGHINI, C.P.; HARRIS, S.D. 2010. Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi, *Methods Mol. Biol.* (638): 269–279.
- SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A.B.; MONACHE, F.D.; GETTE, M.A.; ZACCHINO, S.; CECHINEL-FILHO, V. 2007. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Rev Bras Farmacogn.* (17): 578–582.
- SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn.* (17): 572–577.
- SILVA JUNIOR, I.F.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; RAO, V.S.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. 2010. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark