

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA IN VITRO DE *Gutierrezia sarothrae* (HIERBA DEL PASMO) CONTRA *Aspergillus flavus* Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

Corella Madueño M.A.G.^{a,**}, Gálvez-Iriqui A.C.^{a,*}, Carvajal Herrera S^a., Castellón Campaña L.G.^a, Cádiz Carrasco G.^a, Orduño Fragoza O.^a, Martínez Robinson K, G.^b, Vallejo Cohen S.^b

a) Universidad de Sonora, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Boulevard Luis Encinas y Avenida Rosales s/n, Colonia Centro, C.P. 83200, Hermosillo, Sonora, México.

b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD.A.C.). Carretera a la Victoria. Km. 0.6. Hermosillo, Sonora, México. **lcorella@guayacan.uson.mx

RESUMEN

El arbusto silvestre, *Gutierrezia sarothrae* (Pursh), hierba del pasmo, se emplea en medicina tradicional de los pueblos del sur de Sonora, por sus propiedades, antifúngicas, así como antiinflamatorias, antiproliferativas, antibacterianas, entre otras. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica "in vitro" de hierba del pasmo contra *Aspergillus flavus*, utilizando bioensayos de medio con extracto. *Aspergillus spp.*, es un hongo productor de aflatoxinas, contamina los cultivos de maíz y cacahuete principalmente. Para conocer la bioactividad de la hierba del pasmo, se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos a partir de las hojas de la planta, los cuales fueron concentrados en un rotavapor, eliminándose el solvente. La actividad antifúngica de los extractos se evaluó, utilizando el método de dilución en agar. Se emplearon concentraciones del extracto de 50 a 10,000 ppm en DMSO, las que fueron añadidas al medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) por duplicado. El hongo se inoculó en el centro de la placa y se evaluó la inhibición del crecimiento. Como control se usaron placas inoculadas con el hongo pero sin el extracto. Las diferentes concentraciones del extracto establecidas para el estudio, mostraron efecto antifúngico, demostrando el potencial bioactivo de fuentes naturales y la importancia de su caracterización.

Palabras clave: *Aspergillus spp.*, bioactividad, *Gutierrezia sarothrae*.

ABSTRACT

The wild bush, *Gutierrezia sarothrae* (Pursh), pasmo grass, is used in traditional medicine by the people of rural towns of southern Sonora, mainly due to its antifungal, anti-inflammatory, antiproliferative, and antibacterial characteristics, among others. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity "in vitro" of grass pasmo against *Aspergillus flavus*, using extract bioassay medium. *Aspergillus spp.*, is a producer of aflatoxin fungus, it mainly contaminates maize and peanut crops. To get to know the pasmo grass bioactivity, the hydroalcoholic extracts from plant leaves where obtained by utilizing a rotary evaporator thus eliminating the solvent. The antifungal activity of the extracts was evaluated using the agar dilution method. Extract concentrations from 50 to 10,000 ppm in DMSO were used, which were added to the culture medium of potato dextrose agar (PDA) in duplicate. The fungus was inoculated onto the center of the plate and the growth inhibition was evaluated. As a measurement control, inoculated plates with fungus but without extract were used. The different concentrations of the extract provided for the study, showed antifungal activity, demonstrating bioactive potential from natural sources and the importance of their characterization.

Keywords: *Aspergillus spp.*, bioactivity, *Gutierrezia sarothrae*.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Un objetivo bien conocido en el estudio de las plantas es el descubrimiento y caracterización de nuevos componentes bioactivos que ayuden a prevenir y controlar enfermedades, causadas por plagas, bacterias y hongos (Lucero *et al.*, 2006). A través de los años se han dedicado grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos materiales, provenientes de fuentes naturales para el control de hongos, bacterias, plagas de insectos y también para la conservación de alimentos (Irkin y Korukluoglu, 2007).

Para este estudio se escogió *Gutierrezia sarothrae* conocida como escobilla, hierba del pasmo o arbusto trementina, que es un planta leñosa perenne que crece a lo largo del noroeste de Latino América. Esta planta se emplea en medicina tradicional principalmente en el sur de Sonora, por sus propiedades, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas, entre otras. Su composición química es muy compleja; contiene metabolitos secundarios como terpenos, diterpenos, saponinas y flavonoides. A estos compuestos se les atribuyen las actividades antes mencionadas, junto con su alta capacidad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006).

Una de las causas de la baja producción de cultivos agrícolas no sólo en México sino en todo el mundo, es el ataque a los cultivos por diversas plagas de insectos, invasión por hongos y bacterias, que causan devastadoras enfermedades. El maíz y el trigo son los cereales más susceptibles al ataque de estos organismos, que degradan su calidad en diversas formas, considerándose a los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* las especies predominantemente responsables de la producción de aflatoxinas, que contaminan los cultivos antes de la cosecha o durante el almacenamiento (Tequida *et al.*, 2002). Estos hongos pueden causar daños como pérdida de capacidad de germinación, decoloración, calentamiento y la más importante producción de micotoxinas que resultan tóxicas para mamíferos y aves.

El uso de fungicidas químicos convencionales es el método más empleado para el control de hongos; estos productos químicos sintéticos, resultan ser tóxicos causando daño al agroecosistema. Actualmente, se ha intensificado la búsqueda de materiales naturales que ayuden evitar el uso de agentes químicos tóxicos y ya existen varios estudios en los que se ha demostrado que el uso de extractos de plantas naturales proporciona esta oportunidad (Irkin y Korukluoglu, 2007).

Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hierba del pasmo (*Gutierrezia sarothrae*) contra *Aspergillus flavus*. En este trabajo también se realizó una evaluación fitoquímica preliminar de hierba del pasmo encontrándose compuestos fenólicos los que fueron cuantificados, obteniéndose los fenoles totales, a los cuales se continuará caracterizando para obtener los compuestos individuales responsables de la bioactividad de los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se realizó una colecta de planta de hierba del pasmo, obteniéndose la muestra del municipio de Huatabampo, Sonora, México, que se localiza entre los paralelos 26°54' y 26°14' y entre los meridianos 109°00' y 109°53'. La corroboración de la especie se realizó en el herbario de la Universidad de Sonora. Este material se secó a temperatura ambiente bajo sombra durante aproximadamente una semana.

Obtención del extracto de hierba del pasmo. El material seco de la planta se molió en una licuadora industrial (Hinox), se pesó en una balanza analítica (Sartorius, 11219-03) y se sometió a maceración con etanol al 70% durante una semana en la oscuridad y con agitación ocasional. Transcurrido este tiempo, el material fue filtrado utilizando papel Whatman No. 4. Se eliminó el solvente del filtrado obtenido en un evaporador rotatorio (IKA, RV10 Digital D). El extracto fue secado a temperatura ambiente utilizando flujo de aire y se guardó en refrigeración hasta su uso en la evaluación antifúngica, mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar. Condiciones de cultivo y preparación del inóculo fúngico. Se utilizó una cepa del hongo *Aspergillus flavus*, la cual fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de microbiología, del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora (DCQB) de la UNISON. Para la evaluación antifúngica, el hongo, se cultivó en agar papa dextrosa (PDA) a temperatura ambiente por 7 días. Se preparó el inóculo, cultivando en tubos con PDA en pico de flauta, hasta desarrollo del hongo; a estos tubos se les añadió 5.0 mL de solución salina estéril al 0.85%, obteniendo una suspensión de esporas. El conteo de esporas se realizó por placa vertida, obteniéndose un inóculo de 3.4×10^7 esporas/mL.

Preparación de stocks. Se prepararon cuatro diluciones pesando 80 mg de extracto para cada una; el extracto se disolvió en 0.15, 0.75, 15 y 30 mL de DMSO, para obtener una concentración final de 50, 250, 5,000 y 10,000 ppm, respectivamente (Da Silva *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2011).

Evaluación antifúngica.

Se preparó medio de cultivo PDA y se dejó enfriar hasta 45°C. Posteriormente a las placas estériles se les adicionó la solución de stocks a diferentes concentraciones; se añadió el medio, se homogeneizó y se dejó solidificar (medio con extracto de hierba del pasmo). Cada placa se perforó en el centro (0.6 cm) con una pipeta Pasteur y se añadió 25 µL del inóculo (*A. flavus*). Como control se usó PDA con inóculo de *A. flavus* sin extracto y PDA con dimetil sulfóxido (DMSO) e inoculada con el hongo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por cinco días y posteriormente se realizaron las observaciones correspondientes a c/u de los tratamientos y controles.

Método de dilución de extracto en agar. Utilizando este método, se determinó la actividad fungicida del extracto de hierba del pasmo midiendo el crecimiento radial del hongo, la cepa se activó haciéndola crecer en placas Petri de 9 cm con medio PDA a 28°C por seis días. Se prepararon tubos con 5 mL de medio PDA, se esterilizaron y se mantuvieron en baño de agua para evitar su solidificación. A estos tubos se adicionó el extracto a 500 ppm en 100 µL del disolvente (metanol), se agitó en vortex y se vació inmediatamente en placas Petri de 5 cm estériles y se esperó a que el medio solidificara completamente. Para la siembra del hongo en estas placas, se tomó con asa el hongo de las placas de 9 cm y se sembró por picadura central. La incubación se llevó a cabo a 28 °C por seis días, se incluyeron controles negativos de placas con PDA y la misma cantidad de disolvente pero sin extracto. La evaluación se llevó a cabo por triplicado (March *et al.*, 1991).

Análisis de fenoles totales. La concentración de fenoles totales en el extracto de hierba del pasmo fue medida por espectrofotometría (UV-V), basándose en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción, siendo el agente oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (2 mg/ml), de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL-300 µL en intervalos de 30 µL, completando el volumen de cada uno a 600 µL con metanol (Figura 1).

Determinación de fenoles en el extracto. Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de metanol. Se tomaron 120 µL de los estándares y del extracto, y se completaron con 900 µL de agua destilada. Después se le adicionaron 240 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, se reposo por 5 min. Posteriormente se le adicionaron 360 µL de Na₂CO₃ al 20%. Se aforaron a 3 mL y se dejó reposar por 2 horas en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

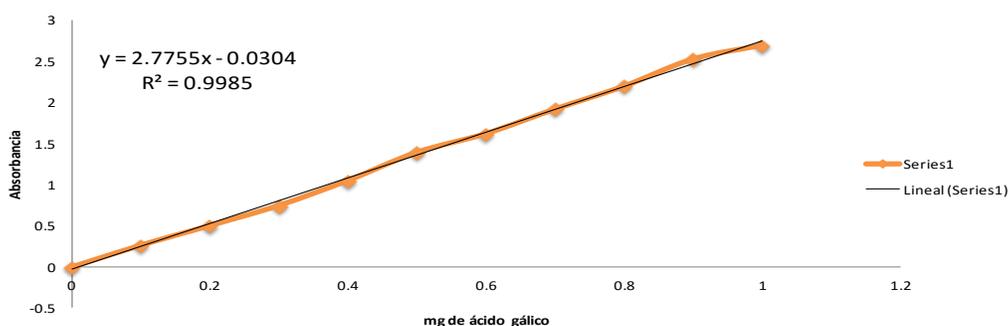


Figura 1. Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 760 nm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las diferentes concentraciones del extracto. Como controles en la evaluación antifúngica se utilizaron dos placas: una con medio PDA y la otra con PDA-DMSO; inoculadas con el hongo pero sin el extracto, en las cuales el hongo se desarrolló por completo. En las placas correspondientes a la evaluación

antifúngica, a las concentraciones de 50, 250, 5,000 y 10,000 ppm, figura 2 A, B, C y D; respectivamente, se observó que el extracto de hierba del pasmo inhibe el crecimiento de *A. flavus* a todas las concentraciones evaluadas. Pero, la mayor actividad inhibitoria se observó a las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm, en donde no hubo crecimiento del hongo. El Agar PDA con DMSO se utilizó como control para confirmar que este, no presentaba ningún efecto sobre la bioactividad del hongo. La observación del crecimiento micelial en las placas, se realizó diariamente y hasta el 7º día, lo cual se observa en la figura 2. A, B, C y D con los resultados previamente descritos.

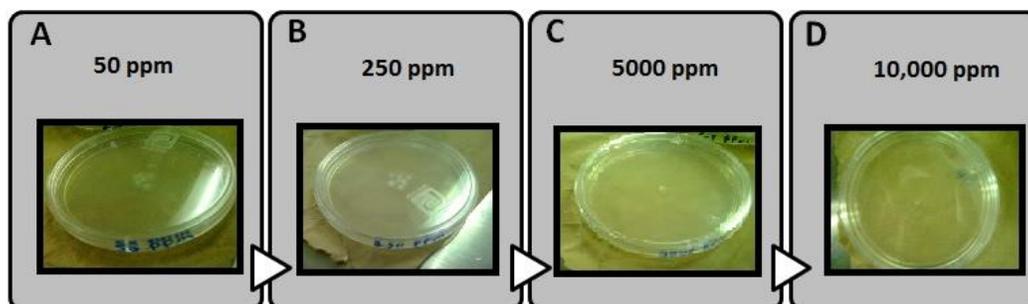


Figura 2. Medios de cultivo (PDA) con extracto de hierba del pasmo, inoculados con *A. flavus*

Actualmente, el interés científico en las propiedades biológicas o actividad de los extractos de plantas se ha incrementado notablemente. Estudios realizados en esta planta han demostrado la presencia en su composición química de metabolitos secundarios diversos, como los compuestos de la clase de los terpenos y los compuestos fenólicos (Flavonoides).

La concentración de fenoles totales determinada en los extractos de hierba del pasmo por el método Folin-Ciocalteu, fue de 0.557 ± 0.0184 mg GA/g de extracto, lo cual demuestra que los compuestos fenólicos son componentes de hierba del pasmo. En estudios recientes sobre la bioactividad de los metabolitos secundarios se perfilan a éstos compuestos con potencial para el control de la contaminación fúngica, tanto en el campo de la agricultura como en la salud humana (Soliman & Badea, 2002; Tajkarimi *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en la evaluación antifúngica de los extractos de hierba del pasmo muestran que contienen componentes que actúan como fungicidas lo que permitirá continuar con su caracterización para utilizarlos como potenciales antifúngicos.

Técnica de dilución de extracto en agar. Esta técnica reflejó la actividad del extracto por el crecimiento radial del hongo, del cual posteriormente se calculó el diámetro. El porcentaje de inhibición de crecimiento se obtuvo tomando en cuenta que la inhibición es el inverso del crecimiento y los resultados fueron calculados mediante la siguiente fórmula: % de crecimiento = (Diámetro del crecimiento del hongo en el extracto/diámetro del control negativo) x 100. % de inhibición = 100 - % de crecimiento (Tequida *et al.*, 2002). El resultado fue una inhibición del hongo del 50% a 500 ppm, por lo cual será conveniente realizar una nueva evaluación a una concentración de 1000 ppm en futuras evaluaciones. Los resultados arrojados por

ambas técnicas permitieron detectar los efectos antifúngicos que presentaron los extractos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Journal of Food Chemistry* 99: 191-203.
2. Da Silva F., Chalfoun S., De Siqueira M., Botelho D., Lima M., Batista L. 2012. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Brasileira de Farmacognosia Brazilian. *Journal of Pharmacognosy* 22(5): 1002-1010
3. Irkin R, Korukluoglu M. 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *Afr J Biotechnol* 6: 384-387.
4. Lucero, M. E., Fredrickson, L., Estell, R.E., Morrison, A and Richman D. 2006. Volatile composition of *Gutierrezia sarothrae* (Broom Snakeweed) as determined by steam distillation and solid phase microextraction 1. *Essent. Oil Re.\$.*, 18, 121-125.
5. March C., Sanz I. Primo-Yufera E. 1991. Antimicrobial activites on mediterranean plants. *Zentralbl, Mickrobioll.* 146: 291-295.
6. Sharma Ankita and Sharma Kanika. 2011. Should solubility and zone of inhibition be the only criteria for selection of solvent in antimicrobial assay? *Advances in biological research* 5 (5): 241-247.
7. Soliman KM, Badea BI 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 40: 1669-1675.
8. Tajkarimi M M, Ibrahim S A, Cliver D O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21:1199-1218.
9. Tequida M., Cortez M., Rosas E., López S., Corrales C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*.