

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL EXTRACTO TOTAL EN ETANOL DE LA HOJAS FRESCAS DE *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (ULTIMORRIAL).

RESUMEN

Las fracciones diclorometano y acetato de etilo secas de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Ponit (Ultimorrial), fueron activas contra *fusarium oxysporum* cuando se evaluaron concentraciones de 10 y 13.33 mg/mL. Se detecto la presencia de terpeno, esterole, lactonas, flavonoides antocianinas y alcaloides por el tamizaje fitoquímico.

PALABRAS CLAVES: *Pedilanthus tithymaloides*, *fusarium oxysporum*, *Euphorbiaceae*, Antifúngico, tamizaje

ABSTRACT

Dichlorometane and ethyl acetate fraction of the fresh leaves of Pedilanthus tithymaloides L Ponit (Ultimorrial), were active against fusarium oxysporum the to concentration of 10 and 13.33 mg/mL. In addition, terpenes, sterols, lactones anthocyanins, flavonoids and alkaloids were detected through a phytochemical screening.

KEYWORDS: *Pedilanthus tithymaloides*, *fusarium oxysporum*, *Euphorbiaceae*, Antifungal, screening.

RITA LUZ MARQUEZ VIZCAINO

Químico farmacéutico, Ms.C
Profesora Asistente
Universidad de Sucre.
fitorita@yahoo.es

CATALINO DE LA ROSA TORRES

Químico farmacéutico, Ms.C
Profesor Titular
Universidad del Atlántico
cdelarosa@uniatlantico.edu.co
catalinod@yahoo.com

ANGELINA MERCADO PÉREZ

Universidad de Sucre,
Departamento de Biología.
Facultad de Educación y Ciencias,
Sincelejo –Colombia

1. INTRODUCCIÓN

La actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia a los distintos fungicidas comerciales utilizados normalmente en el control de enfermedades de cultivos hortícolas lo que ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, varios de los cuales se han mostrado efectivos contra fitopatógenos tanto in vitro como in vivo [1].

Dada la efectividad de las plantas como fuente medicinal se planteó el estudio preliminar fitoquímico del extracto etanólico total de la hoja de *Pedilanthus tithymaloides* L poit para evaluar la actividad antifúngica; esta especie perteneciente a la familia Euphorbiaceae es conocida comúnmente en las sabanas de Sucre como ultimorreal, a la cual se le han atribuido ciertas propiedades como depurativa, vomitiva, expectorante y en el tratamiento de enfermedades hepáticas y sifilicas [2], estos usos populares no están evaluados científicamente, igualmente no se tiene conocimiento sobre estudios en actividades biológicas, por lo cual se decidió evaluar si el extracto etanólico de la hoja de esta planta y sus fracciones (diclorometano, acetato de estilo) son capaces de inhibir el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum*; además identificar cualitativamente los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto etanólico total.

La familia Euphorbiaceae posee una amplia diversidad botánica y química por lo que abarca una gran gama de aplicaciones como alimenticias, venenosas, medicinales, industriales, entre otras. Los principales metabolitos secundarios detectados han sido los triterpenos, seguidos de flavonoides y alcaloides [3].

Estudios antifúngicos en la especie *Ricinus communis* L han demostrado que la hoja fresca de la planta tiene moderada actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* y el polvo de la hoja y el aceite tiene actividad fungicida contra fitopatógenos [4].

Existen sustancias, generalmente de origen natural cuya actividad biológica no puede ser determinada por sus propiedades químicas o físico químicas, en este caso para evaluar la actividad o potencia se emplean métodos de dosificación biológica, comparando cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones.

Los métodos más comúnmente usados para la evaluación de la actividad de productos naturales vegetales son: Método de difusión en placa, dilución en agar y método turbidimétrico [5, 6]

2. EXPERIMENTAL

2.1 Recolección y tratamiento del material vegetal

Pedilanthus tithymaloides L. *poit* de la familia *Euphorbiaceae*, registrada con el bauche COL 480935 en el Herbario Nacional, por el Sistemático Botánico Edgar L. Linares. Se recolectó en el municipio de Corozal (Sucre) tomando de las plantas ramas que contenían hojas jóvenes, teniendo cuidado de no maltratarlas, esto se realizó en las horas de la mañana conduciendo el material inmediatamente al laboratorio.

2.2 Extracción por maceración y percolación. 500 g de hojas frescas fueron finamente picadas, maceradas y depositadas en un erlenmeyer de 1000 mL al cual se le adicionó etanol al 98% a temperatura ambiente cubriendo la totalidad del material y haciendo pasar el solvente repetidas veces por el material, seguido de una filtración durante 10 días. El extracto etanólico obtenido fue concentrado a presión reducida y secado al vacío sin calor.

2.3 Identificación Cualitativa de Metabolitos Secundarios

A 10 mL de este extracto se le adicionó un volumen igual de una solución de acetato de plomo $Pb(C_2H_3O_2)_2$ al 4% con ácido acético al 0.5% para el reconocimiento de flavonoides y leucoantocianinas; y 20 mL de extracto fueron fraccionados con diclorometano y agua obteniéndose una fase orgánica y una acuosa para el reconocimiento de saponinas, terpenos, esteroides, quinonas, lactonas, taninos y antocianinas. Finalmente a 10 g de hojas frescas picadas se les adicionó un volumen de ácido clorhídrico (HCl) al 2% hasta cubrir el material totalmente, se calentó por 5 minutos para la identificación de alcaloides. El extracto etanólico concentrado se sometió a fraccionamiento líquido-líquido con diclorometano (CH_2Cl_2) y posteriormente con acetato de etilo (AcOEt), este procedimiento se repitió varias veces hasta el agotamiento del extracto monitoreado en cromatografía en capa delgada y revelando con vainillina/ H_2SO_4 .

2.4 Evaluación de Actividad Antifúngica.

La actividad Antifúngica in Vitro del extracto etanólico total y fracciones separadas diclorometánica y acetato de etilo se ensayó por el test de crecimiento radial en placas y por la técnica de dilución en agar, determinándose el porcentaje de inhibición del crecimiento del microorganismo en cada extracto. Métodos descritos por la NCCLS [7] y estandarizados en el Laboratorio de Bioensayos de la Pontificia Universidad Javeriana.

2.5 Preparación de los extractos: el extracto etanólico total fue diluido en dimetilsulfóxido a una concentración de 1 g/ mL, se realizó primeramente un ensayo preliminar probando el extracto etanólico a una concentración de 6.66 mg/mL; las fracciones fueron

tratadas con dimetilsulfóxido de igual manera ensayándose concentraciones de 3.33, 6.66, 10 y 13.33 mg/mL.

2.6 Especie fúngica: la especie utilizada en el ensayo *Fusarium oxysporum* fue donada por el laboratorio de Bioensayos de la Pontificia Universidad Javeriana.

2.7 Controles: como control negativo se utilizó el vehículo dimetilsulfóxido y como control positivo se empleó griseofulvina (0.05 mg/mL).

2.8 Medio de cultivo: el medio de cultivo empleado fue PDA (agar-papa-dextrosa) que es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y coloración de la colonia, por su alto contenido en carbohidratos condiciona un mayor crecimiento teniendo en cuenta que la esporulación suele retrasarse hasta un mes. Para su preparación se adicionaron 200 gramos de papa en un litro de agua destilada, hirviendo durante un minuto, decantándose y aforrándose a un volumen de un litro, agregándole también 20 gramos de dextrosa, 15 gramos de agar- agar y un gramo de sulfato de amonio; luego de la preparación se autoclave 15 minutos a 15 libras de presión.

2.9 Dilución en agar: Una vez esterilizado el medio de cultivo se dejó enfriar a una temperatura de 50 °C, adicionando inmediatamente en cajas de petri estériles (90 mm de diámetro) 15 mL de medio junto con la cantidad de extracto a ensayar, evitando la formación de burbujas y rotando la caja en direcciones diferentes para su homogenización.

2.10 Inoculación: luego de la solidificación del medio, con ayuda de un sacabocado de 0.6 mm de diámetro se tomó un disco de hongo y se inoculó en el centro de la caja de petri hasta completar el número de placas con todas las concentraciones a estudiar. Las placas se incubaron a 25 °C durante 6 días.

2.11 Lectura: se midió el diámetro en milímetros de la zona de crecimiento del hongo en cuatro direcciones a intervalos de dos días tomando como resultado el valor promedio de estas mediciones.

Este ensayo se realizó cuatro veces por duplicado determinándose el porcentaje de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo para el extracto etanólico total y las fracciones ensayadas de la siguiente manera:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo}}{\text{En el extracto X 100}} \div \text{Diámetro del control negativo}$$

% de inhibición = 100-% de crecimiento

2.12 Interpretación: los resultados obtenidos se evaluaron considerándose activo los extractos que presentaron un porcentaje de crecimiento menor o igual al 80 y un porcentaje de inhibición mayor o igual al 20 [8].

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto etanólico de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides (L.) poit* indican la presencia, de alcaloides, flavonoides, antocianinas, terpenos y lactonas, los cuales se encuentran reportados dentro de la fitoquímica de la especie [9].

Los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto etanólico total y fracciones diclorometano y acetato de etilo se muestran en las tablas donde se aprecia el crecimiento de las especies microbianas y se evidencia la respuesta de inhibición de los extractos junto con los controles ensayados.

La Tabla 1, presentan los resultados promedios del ensayo Antifúngico preeliminar con el extracto etanólico, observándose un diámetro de crecimiento mayor al control positivo y negativo, un porcentaje de inhibición menor al 20 % con respecto al control negativo; teniendo en cuenta estos resultados se ensayaron las fracciones a distintas concentraciones junto con la repetición del ensayo para el extracto etanólico.

Tratamiento	[] en mg/mL	% Crecimiento	% Inhibición
Extracto en EtOH	6.66	95.85	9.42
Control (+)Griseofulvina	0.05	60.52	59.53
Control (-) dimetilsulfóxido	100µL	100µL	0

Tabla 1. Promedio del % de Crecimiento y % de Inhibición del hongo *Fusarium oxysporum* en el ensayo Antifúngico preeliminar

La Tabla 2, presenta el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, observando que las fracciones y el control positivo presentan un porcentaje de inhibición por encima del 20%; el extracto etanólico produjo un porcentaje de inhibición por debajo del 20%. Los resultados obtenidos en el ensayo de Actividad Antifúngica muestran que el extracto etanólico total no es activo presentando un porcentaje de inhibición inferior al 20% ; la fracción Diclorometano, Acetato de etilo y el control positivo Griseofulvina tienen actividad antifúngica con porcentajes de inhibición por encima del 20%.

Tratamientos	[] en mg/mL	p.h.c (mm)	% crecim	% Inhib
Extracto en EtOH	6.66	44.92	105.52	3.28
Fracción en Diclorometano	3.33	12.56	28.28	71.71
	6.66	12.87	29.34	70.66
	10.00	10.95	31.73	78.26
	13.33	11.25	29.45	70.55
Fracción en Acetato de etilo	3.33	30.87	69.43	30.56
	6.66	24.5	55.68	44.32
	10.00	16.43	32.61	67.39
	13.33	17.18	44.92	55.08
Control (+) ⁺	1,66E-4	26.75	60.19	39.80
	3,31E-4	29.25	66.69	33.30
	4,95E-4	27.81	55.24	44.75
	6,57E-4	24.37	63.71	36.28
Control (-) ⁺⁺	50 µL	44.43	100	0
	100 µL	43.93	100	0
	150 µL	50.5	100	0
	200 µL	38.31	100	0

Tabla 2. Promedio del halo de Crecimiento (p.h.c), % de Crecimiento y % de Inhibición de *Fusarium oxysporum* con los extracto y controles ensayados

Crecim: crecimiento
 Inhib: inhibición
⁺Grseofulvina, ⁺⁺dimetilsulfóxido

Mediante la prueba de contraste al comparar el comportamiento en conjunto de todos los tratamientos se encuentran diferencias significativas entre todos los tratamiento. Al aplicar el análisis de varianza también se encuentran diferencias significativas.

La curva de regresión ajustada para el crecimiento del hongo en las fracciones Diclorometano y Acetato de etilo (Fig. 1 y 2.) muestran un comportamiento lineal donde el crecimiento depende de las concentraciones con una relación inversamente proporcional, presentando *Fusarium oxysporum* menor crecimiento en las concentraciones 10 y 13.33 mg/ mL. El crecimiento del hongo en el control positivo GRF y control negativo DMS es polinómico dándose un menor crecimiento en las concentracion13.33 mg/mL y mayor crecimiento para el control positivo en 6.66 mg/mL, para el control negativo 10 mg/mL.

Según el análisis de varianza existen diferencias significativas en los porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo en los tres tratamientos (fracción Diclorometano, Acetato de etilo y control positivo GRF) por lo que cada uno tiene una acción diferente frente al hongo. En términos generales la Fracción Diclorometano y Acetato de etilo tienen mayor inhibición del crecimiento fúngico con respecto al control positivo, siendo la fracción diclorometano a una concentración de 10 mg/mL la que tiene mayor capacidad Antifúngica. (Fig. 3 y 4)

Se conoce que las actividades Antifúngica está relacionada con los metabolitos secundarios tipo terpenos, alcaloides y flavonoides [1,10]

Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* en los extractos evaluados

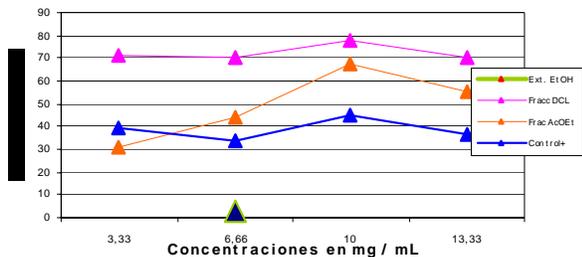


Figura 1. Grafico del % Inhibición de los extractos en *Fusarium oxysporum*

Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* en los extractos evaluados

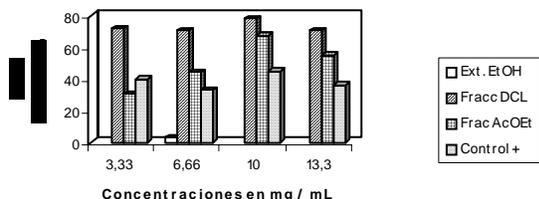
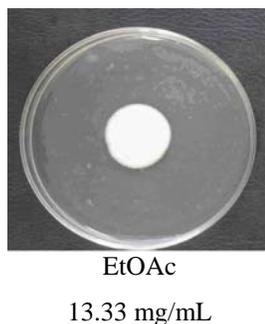


Figura 2. Gráfico en barra %Inhibición de los extractos evaluados



Figura 3. Crecimiento de *Fusarium Oxysporum* en la fracción Diclorometano

[5][5]



EtOAc
13.33 mg/mL

Figura 4. Crecimiento de *Fusarium Oxysporum* en la fracción Acetato de etilo

4. CONCLUSIONES

El extracto etanólico total de las hojas de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit, carece de actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* en las condiciones ensayadas a una concentración de 6.66 mg/mL.

La fracción Diclorometano presentó mayor actividad antifúngica que el extracto etanólico y la fracción acetato de etilo contra *Fusarium oxysporum* en las condiciones ensayadas a las concentración de 6.66, 10.00 y 13.33 mg/mL

5. AGRADECIMIENTOS

Dr. Rubén Darío Torrenegra. Director del grupo de Investigación Fitoquímica Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en el desarrollo de la Actividad biológica.

Oscar Vergara. Profesor de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de Sucre por su asesoría en el análisis estadístico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] PREGO M, DIAZ J, MERINO F, 1999. Actividad antifúngica de la capsicina frente a varios hongos fitopatógenos. Memorias, XIII Reunión Nacional de Sociedad Española de Fisiología Vegetal.
- [2] ASOCIACIÓN DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS, 2001 Plantas Medicinales y Conocimientos Tradicionales de las Mujeres Zenú. San Andrés de Sotavento. p115
- [3] PAYO A, VELEZ H, MARTINEZ, 2001. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Crotón* L. Revista Cubana de Farmacia. 35(3): 203-206
- [4] CACERES A, 1996. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Edición1ª. Universitaria. Vol.1. P 46, 317
- [5] DE LA ROSA C, MÁRQUEZ R, MENDOZA D, PRIETO E, ANILLO G, 2005. Actividad Antiinflamatoria y Antifúngica de *Thevetia ahouai*. Revista de Actualidades Biológicas.27(1):31-34.
- [6] MARTINEZ J, MOLINA N, BOUCOURT E, 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2 (1): 12-14.
- [7] GARCIA J.A, CANTON R, GARCIA, J, 2002. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a

los Antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología

- [8] AYALA M, BOZZI B, 1998. Evaluación de la Actividad Antifúngica de los extractos de la raíz de *Pentacalia corymbosa* contra *Alternaria sp.* *Trichoderma viridae* y *Fusarium oxysporum*. Pontificia Universidad Javeriana. p35
- [9] MÁRQUEZ R, MERCADO A, VARGAS C, DE LA ROSA C, 2005. Actividad Antibacterial de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (ultimorrial). *Revista de Actualidades Biologicas.*27 (1):21-25.
- [10] LOPEZ R, ALVAREZ M, LOPEZ T, GONZALEZ J, 1997. Actividad antifúngica in vitro de *Pinus caribaea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1): 25-29