

EFECTO SINÉRGICO DE TANINOS Y FLAVONOIDES PRESENTES EN *TERMINALIA CATAPPA* L. SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN Y *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC.

Ray Espinosa Ruiz,¹ Lidcay Herrera Isla,¹ Luis Ramón Bravo Sánchez,¹ Maykel Hernández Aro,¹ Sinesio Torres García,¹ Yordanis Ramos González¹ y Manuel Espinosa Mill²

¹ Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carretera a Camajuaní, Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, rayer@uclv.edu.cu

² Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Carretera de Camajuaní 99, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la existencia o no de sinergia en el efecto alelopático de taninos y flavonoides presentes en hojas de almendro de la India (*Terminalia catappa* L.) sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, se desarrolló un trabajo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Se realizó una separación de estos metabolitos con Sephadex LH-20 y se probaron varias concentraciones (100 %, 75 %, 50 % y 25 %). Los experimentos biológicos arrojaron la existencia de un efecto sinérgico evidenciado en el extracto inicial donde el nivel de inhibición en el crecimiento micelial fue mayor que el de los metabolitos por separados. La dilución del 25 % no produjo efecto inhibitorio en ninguno de los dos hongos. *R. solani* fue más susceptible a la acción de los extractos en las diferentes concentraciones.

Palabras claves: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Terminalia catappa*, taninos, flavonoides

ABSTRACT

With the main aim of determining either the existence or not of synergy in the allelopathic effect of tannins and flavonoids in *Terminalia catappa* L. leaves on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, a work was developed in the Agriculture Sciences Faculty of the Central University Marta Abreu from Las Villas Cuban province. An isolation of these metabolites was made with Sephadex LH-20 and many dissolutions were probed (100 %, 75 %, 50 % and 25 %). The biological experiments have shown the existence of a synergetic effect in the primary extract where the inhibition level of the mycelial growth was higher than the isolated metabolites. The dilution at 25 % did not show an inhibitory effect in any fungi. *R. solani* was more susceptible to the action of the extracts at different concentrations.

Key words: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Terminalia catappa*, flavonoid, tannin

INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos sustanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos impactan de manera significativa en la sostenibilidad de la agricultura. En la naturaleza existe un número significativo de plantas que producen gran diversidad de metabolitos secundarios, muchos de ellos pueden ser tóxicos para patógenos y plagas. Este fenómeno, denominado *alelopatía*, fue descrito por Hans Molish en 1937 para referirse a los efectos beneficiosos o perjudiciales que son, directa o indirectamente, el

resultado de compuestos químicos que, liberados por la planta, ejercen su acción sobre otro organismo [Sampietro, 2003].

En estudios con extracto acuoso de hojas verdes del almendro de la India (*Terminalia catappa* L.), se determinó que existe efecto alelopático negativo sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos del suelo *R. solani* y *S. rolfsii* a la concentración de 0,5 g de materia seca/mL [Espinosa, 2007]. El tamizaje fitoquímico

arrojó solamente la presencia de taninos y flavonoides; pero se desconoce si existe efecto sinérgico entre los metabolitos que componen el extracto acuoso inicial. Varios estudios evidencian la acción sinérgica de las sustancias que se encuentran en un extracto crudo en función de un efecto determinado [Clares, 2011; Junio *et al.*, 2011].

Por esta razón el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en hojas de *T. catappa* sobre los hongos *R. solani* y *S. rolfsii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se colectaron hojas verdes adultas de *T. catappa* en la Estación Experimental Álvaro Barba de la Universidad Central de Las Villas, en enero de 2011. Se secaron en estufa a 35 °C con recirculación de aire durante cinco días y luego se molinaron a un tamaño de partícula máximo de 0,5 mm.

En el estudio se empleó un extracto acuoso inicial que contenía de forma conjunta los metabolitos taninos y flavonoides, además un segundo y tercer extractos con sus aislamientos individuales a partir del extracto inicial. También se utilizaron varias concentraciones para determinar el nivel de inhibición en el crecimiento micelial de los hongos, y por tanto la existencia o no de efecto sinérgico entre compuestos tánicos y flavonoides al compararlos con el extracto inicial.

El extracto acuoso inicial se obtuvo a partir de 60 g de material vegetal seco y 600 mL de agua destilada, se le aplicó ultrasonido en un rango de frecuencia de 10 a 12 kHz por 15 min [Palma *et al.*, 2006], se filtró y posteriormente se redujo el volumen en rotoevaporador hasta 60 mL. La concentración final del extracto fue de 1 g/mL. Este concentrado se consideró como solución madre para obtener, a partir de ella, las concentraciones de estudio.

A este extracto se le realizó un tamizaje fitoquímico según la Norma Ramal de Salud Pública 311/98 [Minsap, 1998]; se corroboró solamente la presencia de taninos y flavonoides.

Para la separación de los metabolitos se empleó la metodología propuesta por Hagerman (2005). Para ello se empleó el procedimiento anterior para obtener un extracto inicial, se llevó completamente a sequedad y el residuo se redisolvió en 20 mL de etanol 95 %. Se procedió a una separación en *batch* (separación en lote) con

60 g de Sephadex LH-20 como fase sólida adsorbente en la extracción. Este material tiene una gran afinidad por los taninos cuando se encuentran en medio alcohólico [Moreno *et al.*, 2008; Hagerman, 2005]. Para lograr una buena unión entre el Sephadex y los taninos, la mezcla se colocó en agitador rotatorio durante 5 min a 500 r.p.m.; pasado este tiempo se filtró a vacío para separar el Sephadex del alcohol.

Para garantizar la separación y obtención de los flavonoides se lavó tres veces el Sephadex con 100 mL de etanol 95 %. Se empleó la cromatografía de capa fina (TLC) entre cada uno de los lavados para determinar el final del proceso, y se utilizó como fase móvil la mezcla tolueno-acetona-ácido fórmico (6:6:1) en placa de Silicagel 60 F₂₅₄. Se evidenció la salida de los flavonoides del sistema cuando no se observaron manchas en la placa, y los taninos quedaron en el punto de aplicación [Hagerman, 2005]. Las observaciones se realizaron bajo una lámpara UV (254 nm).

Después de comprobar la retención de los taninos en el Sephadex se procedió a eluir con acetona 70 %. Este reactivo es capaz de extraer los componentes tánicos retenidos en el lecho. El proceso se repitió cuatro veces con 100 mL del eluyente. También se utilizó cromatografía de capa fina bajo las mismas condiciones anteriores para comprobar la salida completa de los taninos del Sephadex.

De esta forma se obtuvo un extracto alcohólico que contenía los flavonoides de la muestra, así como uno acetónico con los taninos. Ambos se llevaron a sequedad y resuspendieron en 60 mL de agua destilada. La concentración final de cada extracto fue de 1 g/mL. Estos se consideraron como solución madre para obtener las diferentes concentraciones de estudio.

Para comprobar la existencia o no de sinergia entre los metabolitos en estudio fue necesario preparar varias concentraciones de los extractos. Se tomó como concentración máxima (100 %) la de 0,5 g/mL. Según fue referido anteriormente esta concentración, provocó inhibiciones elevadas en el crecimiento de los hongos en estudio. Se conformaron diluciones inferiores con la correspondiente adición de agua destilada del 75, 50 y 25 %, que equivalen a 0,375 g/mL; 0,25 g/mL; y 0,125 g/mL, respectivamente. En la tabla se muestran las cantidades de extracto (solución madre) y agua destilada para la conformación de las concentraciones.

Preparación de las concentraciones de trabajo

Concentración (%)	Extracto (mL)	Agua destilada (mL)
100	15	15
75	11,1	18,9
50	7,5	22,5
25	3,75	26,25
0 (Testigo)	0	30

Para determinar el efecto de cada uno de los extractos a las diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de los hongos se empleó el método de envenenamiento del medio de cultivo [Puente *et al.*, 2003]. Para ello se esterilizaron cuatro erlenmeyers (uno para cada concentración) con 2 g de agar-dextrosa-saboraud y el agua destilada propia de cada dilución. Pasado un tiempo de enfriamiento y antes de la solidificación del medio, se adicionó el correspondiente volumen de solución madre de cada extracto, esterilizado a través de un filtro con membrana miliporo (ϕ poro = 0,2 μ m). De esta forma quedaron en los medios de cultivo los extractos (inicial, tánico y de flavonoides) a las concentraciones de trabajo.

Se repartieron 5 mL del medio en placas de 50 mm de diámetro, y en cada una se sembró un disco del hongo de ϕ = 1 cm, y se incubaron a 28 ± 1 °C en condiciones de oscuridad. Se midió el diámetro de la colonia cada 24 h hasta que los testigos cubrieron sus placas. Con los resultados de las mediciones se calculó el Índice de Respuesta Alelopática (IRA) para identificar los efectos provocados por los taninos [Wang *et al.*, 2006].

$$T > M \quad IRA = \left(\frac{M}{T}\right) - 1$$

$$T = M \quad IRA = 0$$

$$T < M \quad IRA = 1 - \left(\frac{T}{M}\right)$$

donde:

T: Testigo

M: Muestra

El experimento se realizó a través de un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas para cada uno de los tratamientos. Los datos se procesaron a través del programa estadístico SPSS 11.5 para Windows. Las comparaciones se establecieron entre las diferentes concentraciones para un mismo hongo, así como iguales diluciones para los dos hongos. Se empleó la prueba no

paramétrica de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significación del 95 % para determinar las variaciones significativas en los diferentes niveles de comparación.

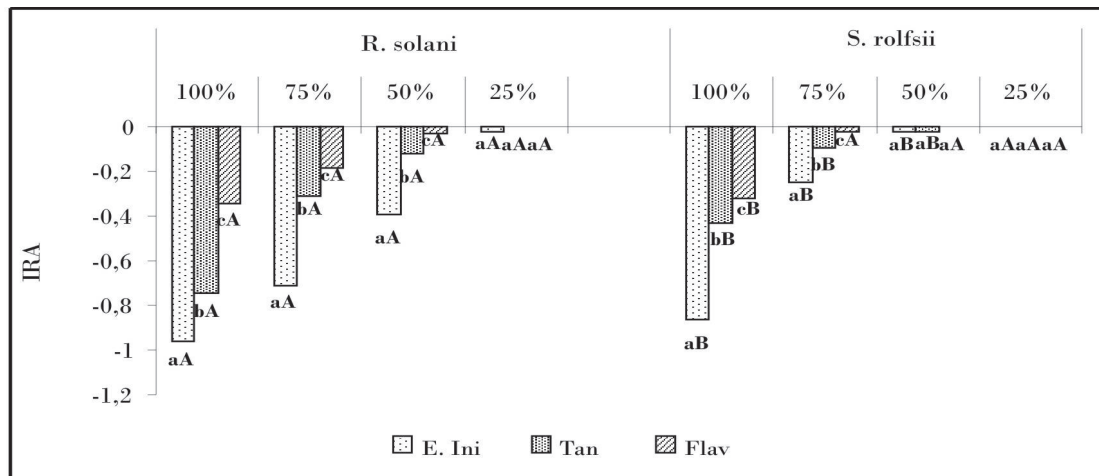
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración del 100 % ejerció de forma general una fuerte inhibición sobre el crecimiento de los hongos. Entre los tres extractos probados sobre *R. solani* existen diferencias significativas (*Fig.*). Esto puede ocurrir cuando las concentraciones de los agentes alelopáticos es el suficiente para ejercer su efecto, pues la sustancia debe permanecer en contacto y a una concentración adecuada con el receptor, el tiempo suficiente para ejercer su acción [Sampietro, 2003]. Sin embargo, en *S. rolfsii* la diferencia entre los extractos se hace más marcada, el extracto inicial fue el de mayores valores inhibitorios. Este indujo, entre los dos hongos, efectos mayores en *R. solani*. El extracto acuoso inicial de *T. catappa* posee efecto fungistático a este nivel sobre *R. solani* y *S. rolfsii* [Mlambo *et al.*, 2009].

La concentración del 75 % provocó inhibiciones menores que las observadas anteriormente. Para el primer hongo se diferencian los efectos producidos por taninos y flavonoides. Los taninos fueron los de mayores efectos inhibitorios en comparación con los flavonoides, pero ambos con valores inferiores a los alcanzados por el extracto inicial. Comportamiento similar se evidenció en *S. rolfsii*, pero con inhibiciones menos pronunciadas respecto a las observadas en *R. solani*. Se destaca el efecto casi nulo de flavonoides a este nivel.

En ensayos biológicos con extractos de plantas alelopáticas la concentración es un factor importante. Algunos estudios demuestran que para un mismo microorganismo la disminución de la cantidad de sustancia por unidad de volumen induce diferentes respuestas. En la mayoría de ellos cuando esta aumenta se evidencian efectos inhibitorios más elevados. Tal es el caso del extracto del puerro (*Allium porrum* L.). Al evaluarse su actividad sobre la viabilidad de esclerosios de *Sclerotium cepivorum*, las concentraciones máximas inhibieron la germinación de estos; por el contrario, las concentraciones más bajas no provocaron efectos sobre este proceso [Argüello *et al.*, 2009].

Otros autores reafirman la variabilidad de efectos que producen los compuestos alelopáticos sobre el desarrollo fungoso. Pueden existir extractos en los cuales los niveles de aleloquímicos no estén acordes para ocasionar un resultado radical [Utkhede, 2006].



Índice de Respuesta Alelopática de los hongos en medios de cultivo envenenados.

Letras minúsculas desiguales indican diferencias significativas entre los extractos de una misma concentración para un mismo hongo.

Letras mayúsculas desiguales indican diferencias significativas entre los dos hongos para un mismo extracto a una misma concentración

El género *Terminalia* comprende una amplia cantidad de especies, muchas de ellas con efectos sobre varios microorganismos. Los flavonoides y taninos presentes en *T. arjuna* inhiben el desarrollo de bacterias del género *Staphylococcus*. Extractos enriquecidos en estos metabolitos demostraron que la actividad se incrementa según la concentración [Vijayalakshmi *et al.*, 2011]. *Terminalia superba* induce efectos inhibitorios en diferentes concentraciones sobre este mismo género [Kuetz *et al.*, 2010]. Sin embargo, los taninos hidrolizables presentes en el extracto metanólico de *Terminalia chebula* poseen actividad citotóxica en un rango de concentración determinado, la actividad decrece al disminuir la cantidad de sustancia y, en contraste, esta se mantiene sin diferencias al elevarse fuera de dicho rango [Lee *et al.*, 1995].

En el caso de la concentración del 50 % los efectos fueron bajos y menores que los observados en los casos anteriores para ambos hongos. La inhibición producida por los taninos fue mayor que la de los flavonoides en *R. solani*. En *S. rolfsii* ambas indujeron efectos extremadamente bajos y similares. Se aprecian diferencias entre los extractos al compararlos en cada una de sus concentraciones entre los dos hongos. *S. rolfsii* fue el menos afectado.

En el 25 % se observaron efectos despreciables en cuanto a la inhibición de ambos hongos. La concentración de metabolitos secundarios es esencial en los estudios

alelopáticos, pues de esto depende el efecto que provocan [Elzawely *et al.*, 2006].

Es de destacar que al igual que ciertos metabolitos causan la muerte de algunos microorganismos, existen otros que son capaces de sobrevivir, y por tanto adaptarse a diferentes condiciones. Se han aislado varios hongos de diferentes tejidos de especies de *Terminalia* con síntomas de enfermedades. En este caso se encuentran *Phoma herbarum* en *T. arjuna* y *T. paniculata*, *Colletotrichum dematium* en *T. bellirica*, *Macrophomina phaseolina* en *T. tomentosa*, y *Pestalotiopsis versicolor* en *T. chebula*. Aunque estos microorganismos persisten durante todo el año en la infección de la planta, solamente es en la época lluviosa cuando se incrementa drásticamente la enfermedad [Shivanna y Mallikarjunaswamy, 2009]. Este comportamiento puede deberse a varios factores. En un primer momento el cambio de las condiciones del medio ambiente que favorece el desarrollo de la enfermedad; por otro lado, las condiciones climáticas pueden inducir un cambio en el metabolismo de la planta de forma tal que varíen las concentraciones de los metabolitos secundarios [Lorenzo y González, 2010]. Es posible que los valores inhibitorios de los metabolitos de estas plantas varíen en función de las condiciones climáticas, y pasen a niveles de baja incidencia sobre los hongos, lo que permite que se refuerce y extienda la enfermedad.

Varios hongos pueden degradar diversas sustancias y convertirlas en fuentes de carbono para su metabolismo. Algunos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma* pueden tomar el ácido tánico como única fuente de carbono, siempre y cuando las condiciones del medio no permiten otra alternativa. Las concentraciones de este tipo de metabolitos influyen en este proceso, pues deben ser bajas; además, el medio debe estar en completa aerobiosis y considerablemente acidificado [Serrano *et al.*, 2010].

De forma general se puede decir que todas las concentraciones provocaron inhibiciones excepto la más baja (25 %). El extracto inicial indujo inhibiciones mayores. Este comportamiento indica que en el extracto inicial se conjugan los efectos de los metabolitos estudiados, los cuales por sí solos no alcanzan los valores de inhibición tan elevados. De esta forma se evidencia el efecto sinérgico entre los compuestos en el extracto inicial. Diversos estudios plantean que es posible encontrar interacción entre los componentes de un extracto para ejercer una acción determinada [Clares *et al.*, 2011]. Además, las inhibiciones fueron más pronunciadas en *R. solani* en comparación con *S. rolfsii*, lo que indica su mayor susceptibilidad a la aplicación del extracto. Los hongos en función de su especie y características pueden desarrollar diversos mecanismos para permanecer en un determinado hábitat. Por esta razón se puede observar resistencia o no en unos y otros ante la aplicación de diferentes productos [Beltrán y Ogura, 2007].

CONCLUSIONES

- Existe efecto sinérgico de los metabolitos en el extracto inicial sobre el crecimiento de *R. solani* y *S. rolfsii*.
- Todas las concentraciones provocaron inhibiciones excepto la más baja (25 %).
- En todos los casos el extracto inicial indujo las mayores inhibiciones.
- Al disminuir las concentraciones los efectos inhibitorios se hacen cada vez menos pronunciados.
- *R. solani* fue más susceptible a la acción de los extractos.
- Los flavonoides provocaron las inhibiciones más bajas.

REFERENCIAS

Argüello, E. V.; E. Yossen; M. Conles: «Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la supervivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*», *Agriscientia* XXVI (1): 23-27, Argentina, 2009.

Beltrán, M. J.; T. Ogura: «Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿factores de virulencia y resistencia a los fungicidas», *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (1): 50-58, México, 2007.

Clares, J. A.; A. R. Canchos; Y. Mejía: «Screening fitoquímico, evaluación de la actividad antiulcerosa y citostática de los extractos obtenidos de las hojas de *Rumex crispus* L. cotormaza», <http://www.BuenasTareas.com> (Consultado: 20 de diciembre de 2011).

Elzawely, A.; T. Xuan; S. Tawata: «Allelopathic Activity and Identification of Allelochemicals From *Rimex japonicus* Houltt.», *Allelopathy Journal* 16 (2): 209-216, India, 2006.

Espinosa, R: «Efecto alelopático negativo de los metabolitos secundarios presentes en *Terminalia catappa* L., *Tagetes erecta* L. y *Tectona grandis* L. sobre los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc.», tesis en opción al título de Máster en Agricultura Sostenible, Departamento de Agronomía, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba, 2007.

Hagerman, A. E: «Tannin Chemistry», *The Tannin Handbook*, Oxford University. <http://www.muohio.edu.com> (Consultado: 12 de junio de 2005).

Junio, H. A.; A. A. Sy-Cordero; K. A. Etefagh; J. T. Burns; K. T. Micko; T. N. Graf; S. J. Richter; R. E. Cannon; N. H. Oberlies; N. B. Cech: «Synergy-Directed Fractionation of Botanical Medicines: a Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*)», *J Nat Prod.* 74 (7): 1621-1629, EE. UU., 2011.

Kuete, V.; T. K. Tabopda; B. Ngameni; F. Nana; T. E. Tshikalange; B. T. Ngadjui: «Antimycobacterial, Antibacterial and Antifungal Activities of *Terminalia superba* (Combretaceae)», *Journal of Ethnopharmacology* 120: 494-501, Holanda, 2010.

Lee, S. H.; S. Y. Ryu; S. U. Choi; C. O. Lee; Z. No; S. K. Kim; J. W. Ahn: «Hydrolysable Tannins and Related Compound Having Cytotoxic Activity from the Fruits of *Terminalia chebula*», *Archives of Pharmacal Research* 18 (2): 118-120, Alemania, 1995.

Lorenzo, P.; L. González: «Aleopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales», *Ecosistemas* 19 (1): 79-91, Vigo, España, 2010.

Minsap: «Medicamentos de origen vegetal: Extracto fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos», Norma Ramal de Salud Pública 311/98, La Habana, 1998.

Mlambo, V.; F. L. Mould; T. Smith; E. Owen; J. L. Sikosana; I. Mueller: «In Vitro Biological Activity of Tannin from *Acacia* and Other Tree Fruits: Correlation with Colorimetric and Gravimetric Phenolic Assays», *South African Journal of Animal Science* 39 (2): 131-143, Sudáfrica, 2009.

Moreno, M. B.; A. Sánchez; R. Quevedo; M. L. Pabón; J. E. Carulla: «3-O-al-rhamnopiranosilflavonoides y otros derivados fenólicos de hojas de *Calliandra calothyrsus* Meissner. (mimosaceae)», *Revista Colombiana de Química* 37 (3): 287-295, Colombia, 2008. Palma, M.; Z. Piñeiro; M. Rostagno; C. Barroso: «Ultrasound-Assisted Extraction of Compounds From Foods», *Ultrasonics Sonochemistry* 4: 135-138, Holanda, 2006.

Puente, M.; K. Allaert; L. Herrera; N. Suárez; S. Torres; C. Pérez; M. Rodríguez: «Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre algunos hongos fitopatógenos del suelo», *Centro Agrícola* 30 (1): 64-68, Cuba, 2003.

Sampietro, D. A.: «Definición de aleopatía. Futuro Verde», http://www.pwp.007mundo.com/futuroverde/documentos_658.htm (Consultado: 10 de noviembre de 2003).

Serrano, S. I.; C. Ragagnin de Menezes; E. Franciscon; E. da Costa dos Santos; L. R. Durrant: «Degradation of Lignosulfonic and Tannic Acids by Ligninolytic Soil Fungi Cultivated Under Icroaerobic Conditions», *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (3): 693-699, Brasil, 2010.

Shivanna, M. B.; G. E. Mallikarjunaswamy: «Fungal Diseases and Their Effect on Phytochemical Constituents of Medicinally Important *Terminalia* species in Bhadra Wildlife Sanctuary, Karnataka, India», *Journal Indian Phytopathology* 62 (1): 37-43, India, 2009.

Utkhede, R: «Soil Sickness, Replant Problem or Replant Disease and its Integral Control», *Allelopathy Journal* 18 (1): 23-38, India, 2006.

Vijayalakshmi, A.; A. Tripura; V. Ravichandiran: «Development and Evaluation of Anti-Acne Products from *Terminalia arjuna* Bark», *International Journal of ChemTech Reseve:arch* 3 (1): 320-327, EE. UU., 2011.

Wang, Z.; P. Christie; Q. Chen; X. Liu; L. Xie; C. Bai; V Li: «Allelopathyc Potencial and Chemical Constituents of Volatil Oil from *Praxelis clematidea*», *Allelopathy Journal* 18 (2): 225-236, India, 2006.