

Actividad antimicrobiana de extractos crudos bioactivos de raíces de *Morinda royoc* L. crecidas en Cuba



Antimicrobial activity of bioactive crude extracts of *Morinda royoc* L. roots grown in Cuba

<https://eqrcode.co/a/9Yi4UI>

Geaisy Angela Cid Valdés*, Claudia Linares Rivero, Maribel Rivas Paneca, Janet Quiñones-Gálvez, Yanelis Capdesuñer Ruiz †

¹Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, Carretera a Morón, Km 9 1/2, Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba.

RESUMEN: Este trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos crudos de raíces de *Morinda royoc* L., ricos en antraquinonas bioactivas, sobre dos bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), dos bacterias patógenas de humanos (*Bacillus licheniformis* y *Stenotrophomonas maltophilia*) y tres hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani* Kühn, *Stemphylium solani* Webber y *Sarocladium oryzae* Sawada). El extracto se preparó a una concentración de 10 mg·ml⁻¹, previamente obtenido por el método de extracción en Soxhlet. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar para las bacterias y el de microdilución para los hongos. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el extracto fue efectivo para inhibir más del 50 % del crecimiento de *Xanthomonas campestris* sin diferencias significativas entre las diferentes dosis usadas. Bajo las mismas condiciones, se alcanzó una inhibición ca. del 50 % del crecimiento de las bacterias *Bacillus licheniformis* y *Stenotrophomonas maltophilia* a las 48 horas de exposición a las dosis 150 y 450 µg respectivamente. Por otro lado, los hongos estudiados mostraron susceptibilidad al extracto después de las 48 horas de incubación. La mayor actividad antifúngica se logró frente a *Rhizoctonia solani*, con una reducción ca. 50 % de su crecimiento frente a las concentraciones 1,25 y 2,5 mg·ml⁻¹ sin diferencias significativas. Después de 72 horas de incubación no se observó actividad inhibitoria del extracto en el crecimiento de los hongos. De todos los patógenos estudiados en este trabajo, *Pectobacterium carotovorum* fue el único que no mostró susceptibilidad frente a las dosis de extracto usadas.

Palabras clave: extractos crudos, patógenos, actividad inhibitoria, porcentaje de inhibición, antraquinonas bioactivas.

ABSTRACT: The aim of this work was to determine the *in vitro* antimicrobial activity of the anthraquinone-rich crude extract of *Morinda royoc* L. roots. Its inhibitory activity was tested on two plant-pathogen bacteria (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), two human-pathogen bacteria (*Bacillus licheniformis* and *Stenotrophomonas maltophilia*) and three plant-pathogen fungi (*Rhizoctonia solani* Kühn, *Stemphylium solani* Webber and *Sarocladium oryzae* Sawada). The extract was prepared at 10 mg·ml⁻¹, previously obtained by Soxhlet extraction method. To evaluate the antimicrobial activity on bacteria, the agar diffusion method was used, whereas the microdilution method was developed to evaluate the inhibitory activity against fungi. The results obtained from this study demonstrated that the anthraquinone-rich extract was effective in inhibiting more than 50 % of *Xanthomonas campestris* growth without significant differences between the different doses. After 48 hours and under the same conditions, growth inhibition ca. 50 % of *Bacillus licheniformis* and *Stenotrophomonas maltophilia* was observed at the doses of 150 and 450 µg, respectively. On the other hand, all the selected fungi in this study showed susceptibility to the extract after 48 hours of incubation. The highest antifungal activity was achieved on *Rhizoctonia solani*, with a growth reduction ca. 50 % at concentrations of 1.25 and 2.5 mg·ml⁻¹. After 72 hours of incubation, no significant differences were observed in the growth of any of the three fungi. From all the pathogens selected for this study, only *Pectobacterium carotovorum* showed no susceptibility to any of the evaluated doses of the extract.

Key words: crude extracts, pathogens, inhibitory activity, inhibition percentage, bioactive anthraquinones.

*Autor para correspondencia: Geaisy Angela Cid Valdés. E-mail: geaisycid@gmail.com

Recibido: 18/10/2019

Aceptado: 22/03/2020

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una fuente de productos naturales con una amplia diversidad en la síntesis de innumerables compuestos con estructuras, funciones y distribución variadas, de las cuales el hombre realiza una provechosa utilización (1). Estas, producen un gran número de metabolitos de importancia comercial que se usan en las industrias farmacéuticas, alimenticias, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (2, 3).

La especie *Morinda royoc* L., perteneciente a la familia *Rubiaceae*, produce una gran cantidad de metabolitos secundarios con propiedades medicinales reconocidas desde la antigüedad (4). Los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en sus raíces son las antraquinonas, las cuales son las biomoléculas más frecuentes entre el grupo de quinonas vegetales (5). Presentan una amplia gama de actividades biológicas demostradas que incluye actividad antifúngica, antimicrobiana, anticancerígena y antioxidante (6, 7, 8) sobre patógenos que afectan a las plantas y al hombre (9, 10).

Numerosos cultivos de importancia agrícola son anualmente afectados por patógenos cada vez más favorecidos por los cambios medioambientales y la resistencia a pesticidas químicos, lo que representa pérdidas significativas y amenaza a la seguridad alimentaria. Esta situación se presenta en bacterias como *Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*, las cuales ocasionan las enfermedades del tizón común bacteriano del frijol y la pudrición blanda en tubérculos, respectivamente. Por otro lado, cultivos de importancia económica como los de la familia *Solanaceae* y *Poaceae* son también frecuentemente afectados por hongos como *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani* y *Sarocladium oryzae*. La necesidad de los agricultores de proteger los cultivos y disponer de pesticidas más efectivos y ecológicos, impulsa a la biotecnología en la investigación y desarrollo de productos bioactivos provenientes de plantas y el uso del cultivo *in vitro* para la producción de variedades más resistentes a enfermedades. Sin embargo, las técnicas actuales de cultivo *in vitro* son ocasionalmente susceptibles y limitadas por

la aparición de patógenos en vitroplantas resultado de la incorrecta manipulación por parte de los operarios. Actualmente se emplean algunas estrategias para minimizar estos efectos negativos. Sin embargo, los productos químicos continúan desempeñando el papel fundamental. Estos dos escenarios convergen en la pérdida de rendimientos de los cultivos y en el uso excesivo de productos sintéticos, los cuales se traducen en grandes pérdidas económicas. Por lo tanto, constituye una necesidad desarrollar investigaciones en el uso de productos naturales de plantas con actividad biológica no solo frente a fitopatógenos en condiciones de campo, sino también frente a patógenos de humanos que afectan las vitroplantas. En este trabajo se investigó la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos crudos, ricos en antraquinonas bioactivas provenientes de raíces de *M. royoc* frente a *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus licheniformis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani* y *Sarocladium oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de compuestos bioactivos provenientes de raíces de *M. royoc* L.

Los extractos crudos, ricos en antraquinonas bioactivas se obtuvieron a partir de raíces de plantas de *M. royoc* L. que crecen en la costa norte de la Provincia de Ciego de Ávila, Cuba (longitud: 076°29'7.01", latitud: N21°13'36.01"). Se utilizó el aparato Soxhlet de extracción descrito por Ahmad *et al.* (11). La extracción se desarrolló durante dos horas con aproximadamente tres ciclos·h⁻¹ a 70°C, en la proporción sólido-líquido 1:30 (m:v) y con el uso de etanol 80 % (v:v) como solvente de extracción. Los extractos obtenidos se filtraron con papel de filtro Whatman No.4 Ø15 cm. Posteriormente se concentraron al 30 % en un rotavaporador (Rotadex, Heidolph 94 200) a temperatura controlada de 60°C y se almacenaron en frascos ámbar y a temperatura ambiente hasta su utilización.

Para el análisis cuantitativo se determinaron los indicadores correspondientes a rendimientos

de extracción y contenido de antraquinonas. El rendimiento se calculó una vez obtenidos los extractos y se expresaron en miligramos de extracto crudo por gramo de masa fresca inicial (mg EC·g⁻¹MF). El contenido de antraquinonas se determinó a partir de la lectura de absorbancia a 430 nm según Han *et al.* (12) en un espectrofotómetro Cary1 Bio UV-Vis. Para el cálculo se utilizó el coeficiente de extinción molar (CEM) de 5 500 M⁻¹·cm⁻¹ referente a la alizarina, de acuerdo a lo descrito por Schulte *et al.* (13).

Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*

La actividad antibacteriana de los extractos crudos se determinó en el Centro de Bioplasmas de la Universidad “Máximo Gómez Báez” de Ciego de Ávila, Cuba. Se utilizó el método de difusión en agar según Bauer *et al.* (14) con el uso de discos de papel de un centímetro de diámetro. Las bacterias frente a las cuales se determinó la actividad antimicrobiana del extracto fueron: *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Bacillus licheniformis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Las primeras dos se aislaron en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba y las últimas dos en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de Villa Clara, Cuba. Una vez aisladas, se suspendieron en agua destilada estéril y se determinó la absorbancia correspondiente a cada una a 620 nm (DO₆₂₀=0,1).

Las dosis de extracto que se estudiaron fueron 15, 30 y 45 µl, que correspondieron a 150, 300 y 450 µg de extracto crudo, respectivamente. Se añadieron 200 µl de cada solución con el patógeno en placas Petri con medio de cultivo líquido para bacterias Luria Bertani (LB) (15). Para cada bacteria se realizaron los controles correspondientes a: **1)** control de susceptibilidad a antibiótico (Kanamicina, 50 mg·ml⁻¹, 10 µl) y **2)** control de solvente (etanol comercial 80 % (v:v), 25 µl). Las placas Petri se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el área y el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada patógeno. Para ello se

registraron los diámetros de las circunferencias formadas por la actividad inhibitoria del extracto a las diferentes dosis y los controles. El porcentaje de inhibición del crecimiento de cada bacteria se calculó en relación al diámetro formado por la actividad inhibitoria del extracto a las diferentes dosis y el diámetro de la actividad inhibitoria del control de susceptibilidad a antibiótico (Kanamicina, 50 mg·ml⁻¹).

Determinación de la actividad antifúngica *in vitro*

La actividad antifúngica de los extractos de antraquinonas se determinó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de la Provincia Camagüey, Cuba. Se determinó la actividad inhibitoria de los mismos frente a aislados puros monospóricos procedentes del cepario del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey, Cuba. Los patógenos utilizados fueron los hongos: *Rhizoctonia solani* Kühn, *Stemphylium solani* Webber y *Sarocladium oryzae* Sawada.

Se utilizó el método de microdilución en placas descrito por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (16). Se cuantificó el crecimiento de los patógenos en un espectrofotómetro Multiskan de placas ELISA de 96 pocillos. Se utilizó el medio de cultivo caldo papa dextrosa (CPD) (Difco, MD, USA) para hongos. El extracto crudo de raíces de *M. royoc* se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) 3 %. En cada pocillo de la placa se colocaron 100 µl del medio de cultivo. Se añadió 100 µl del extracto crudo y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas desde 2,5 µg·µl⁻¹ hasta 10⁻² µg·µl⁻¹ (2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 µg·µl⁻¹). Por último, se agregó 100 µl de la suspensión con los diferentes patógenos.

En todos los casos se establecieron los siguientes controles: **1)** control de esterilidad del medio de cultivo (200 µl de medio de cultivo), **2)** control de crecimiento de cada patógeno (100 µl de medio de cultivo y 100 µl de la suspensión del patógeno) y **3)** control de solvente (DMSO) (100 µl de medio de cultivo, 100 µl de patógeno y 100 µl de DMSO 3 % con diluciones seriadas).

Las placas con cada uno de los tratamientos se incubaron a 28°C durante 120 horas. El crecimiento de los hongos se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm (DO_{595nm}). Se realizaron evaluaciones sucesivas cada 24 horas durante la etapa de activo crecimiento de los patógenos y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) basado en las densidades ópticas del control de solvente y la de los diferentes tratamientos cada 24 horas.

Análisis Estadístico

En todos los casos se repitieron los tratamientos por triplicado para la confiabilidad de los datos. Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos según la prueba Kolmogórov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas según Levene. Se realizó el análisis ANOVA de un factor y las medias se contrastaron con la prueba Tukey para $p \leq 0,05$. Se realizó la transformación no lineal $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$ de los datos expresados en porcentajes para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el SPSS (Versión 20 para Windows, SPSS Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*

El extracto de antraquinonas bioactivas proveniente de raíces de *M. royoc* fue efectivo para la inhibición del crecimiento de las bacterias *B. licheniformis* (A), *S. maltophilia* (B) y *X. campestris* (C). Sin embargo, no tuvo actividad inhibitoria en el crecimiento de *P. carotovorum* (D) en ninguna de las dosis evaluadas. (Fig. 1)

Las bacterias *B. licheniformis* y *X. campestris* no mostraron diferencias significativas en el área de inhibición del crecimiento a las diferentes dosis de extracto estudiadas en cada caso. Sin embargo, el extracto fue más efectivo para la inhibición del crecimiento de *X. campestris* (3,28 cm²) a 150 µg que para *B. licheniformis* (1,85 cm²) a la misma dosis de extracto. La bacteria *S. maltophilia* presentó diferencias significativas en la inhibición del crecimiento a las diferentes dosis, con la mayor inhibición (1,69 cm²) frente a

450 µg. El extracto no fue efectivo para la inhibición del crecimiento de la bacteria *P. carotovorum* en ninguna de las dosis estudiadas. (Fig. 2)

En términos del porcentaje de inhibición del crecimiento (Tabla 1), el extracto crudo de *M. royoc* presentó actividad inhibitoria, frente a la bacteria *B. licheniformis*, sin diferencias estadísticas significativas entre las dosis estudiadas y con respecto al control de antibiótico. Sin embargo, frente a *S. maltophilia*, se observó que el efecto inhibitorio aumentó al aumentar la dosis de extracto. Por otro lado, la mayor actividad inhibitoria del extracto se alcanzó frente a la bacteria *X. campestris*, sin diferencias significativas entre las diferentes dosis estudiadas. Estos resultados permitieron sugerir la posibilidad de que el extracto de raíces de *M. royoc* pudiera tener mayor actividad inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos del tipo xanthomonas que patógenos de humanos. En posteriores ensayos se estudiarán menores concentraciones y dosis de extracto que permitan determinar la mínima concentración inhibitoria del mismo.

La actividad inhibitoria del extracto se pudiera atribuir a que las antraquinonas presentan diferentes mecanismos de acción para inhibir directamente el crecimiento de las bacterias. Pueden modular las propiedades físicas de las membranas (17) y formar complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas de las bacterias, lo que a menudo conduce a la inactivación de las mismas y a la pérdida de sus funciones o pueden inhibir la síntesis de las proteínas bacterianas al bloquear el ribosoma A (18). Domingo y López (19) informaron, en una revisión relacionada con la acción antimicrobiana de compuestos de plantas, que la presencia, la posición y el número de los grupos hidroxilo (OH) en la estructura central está relacionado directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está relacionado con una mayor toxicidad. El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhídricos o por interacciones no específicas con proteínas.

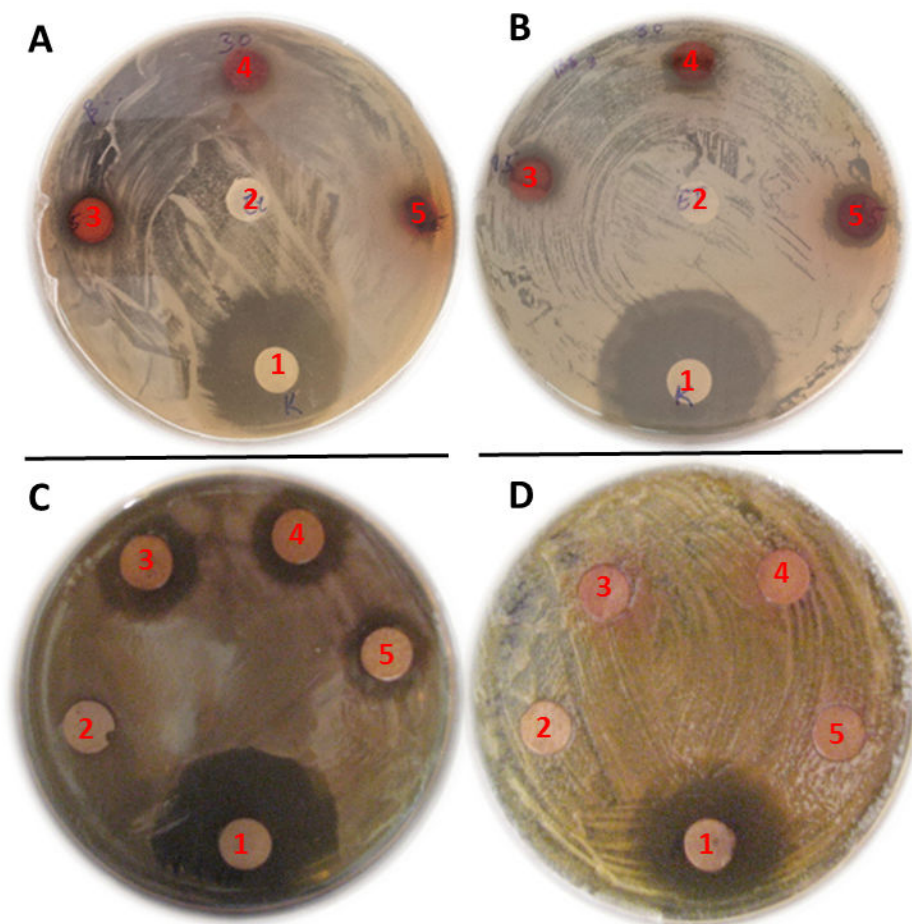


Fig. 1. Actividad inhibitoria del extracto crudo de raíces de *M. royoc* en el crecimiento de las bacterias: **A:** *B. licheniformis*, **B:** *S. maltophilia*, **C:** *X. campestris* y **D:** *P. carotovorum*. La distribución de los controles y tratamientos evaluados en cada placa se mencionan a continuación: **1:** Control de antibiótico (Kanamicina, 50 mg·ml⁻¹), **2:** Control de solvente (etanol 80 %), **3, 4 y 5:** 150, 300 y 450 µg de extracto crudo respectivamente. (Las barras representan 10 cm de diámetro de las placas en todos los casos). *Inhibitory activity of the crude extract of M. royoc roots on bacterial growth* : **A:** *B. licheniformis*, **B:** *S. maltophilia*, **C:** *X. campestris* y **D:** *P. carotovorum*. The controls and treatments were distributed in each plate as follow: **1:** Antibiotic control (Kanamycin, 50 mg·ml⁻¹), **2:** Solvent control (ethanol 80 %), **3, 4 and 5:** 150, 300 and 450 µg of the crude extract respectively. (Bars represent 10 cm diameter of the plates in all cases).

La diversidad en el porcentaje de inhibición de estas bacterias por acción del extracto pudiera estar relacionado con la actividad antimicrobiana que presentan las antraquinonas *per se* en las plantas y las concentraciones a las que se encuentran en las células con la que actúan directamente frente a los microorganismos. La acción de estos compuestos pudiera diferir para cada uno de ellos en relación con su concentración en la planta y los niveles expresados por la misma para inhibir la acción de cada patógeno en particular. Esto pudiera ser un aspecto a tener en cuenta para los criterios de

selección de concentraciones a estudiar en los ensayos de actividad biológica *in vitro*. Relacionado con esto, Mondal *et al.* (20) realizaron un estudio de los sesquiterpenos producidos en las hojas de algodón en respuesta a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* donde encontraron que las cantidades del compuesto dentro y en los alrededores de las células de la planta infectadas eran significativamente superiores a la concentración que se utilizó para la determinación *in vitro* de su actividad antibacteriana frente a este patógeno.

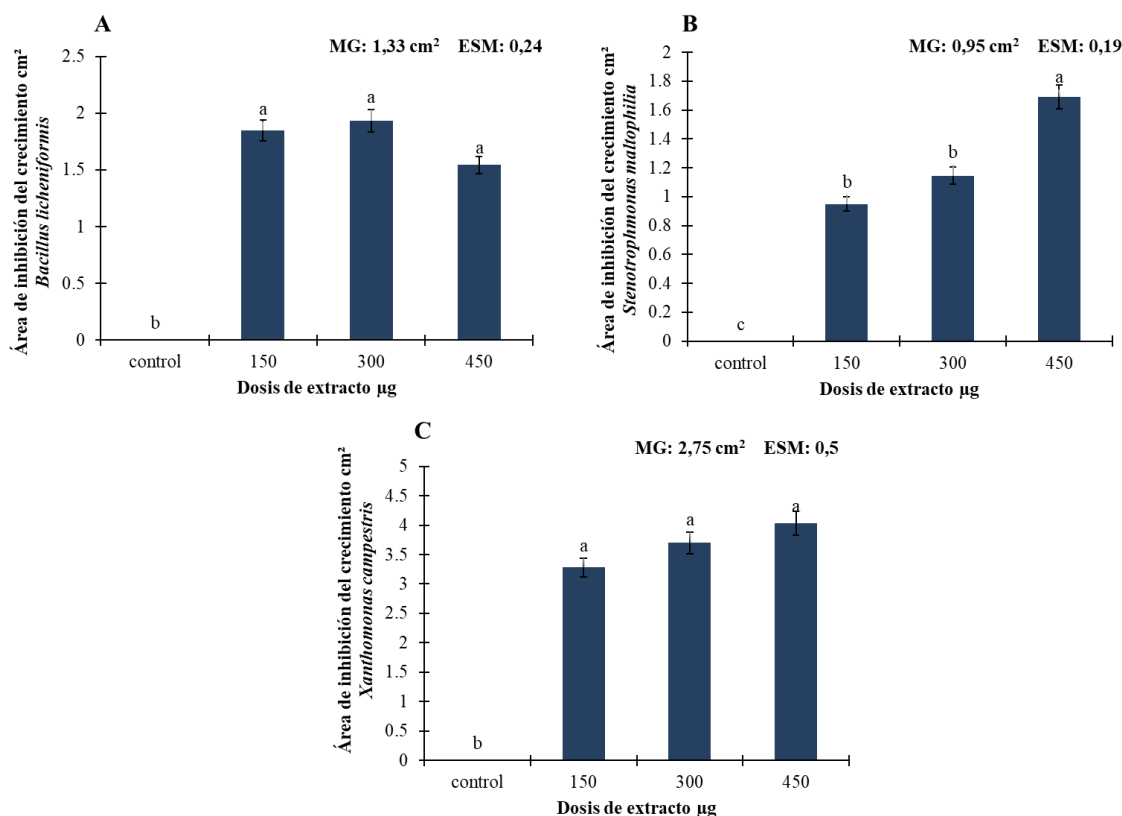


Fig. 2. Área de inhibición del crecimiento de las bacterias **A:** *B. licheniformis*, **B:** *S. maltophilia* y **C:** *X. campestris* a las diferentes dosis de extracto de raíces de *M. royoc* evaluados por el método difusión en agar. **Growth inhibition area of A:** *Bacillus licheniformis*, **B:** *Stenotrophomonas maltophilia* and **C:** *Xanthomonas campestris* at different doses of the extract of *M. royoc* roots evaluated by the agar diffusion method. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor y tukey, $p \leq 0,05$, $n=3$).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las bacterias *B. licheniformis*, *S. maltophilia* y *X. campestris* expuestas a 150, 300 y 450 µg de extracto de raíces de *M. royoc*. **Growth inhibition percentage of B. licheniformis, S. maltophilia and X. campestris against 150, 300 y 450 µg of the extract M. royoc roots.**

Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (%)			
Dosis de Extracto	<i>B. licheniformis</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>X. campestris</i>
150 µg	48	34 b	61
300 µg	50	38 b	65
450 µg	44	46 a*	68
Media General	47,3	39,9	64,7
ESM	1,76	3,53	2,03

* Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n=3$). Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2 \arccos(y/100)^{0,5}$. Se presentan los valores no transformados.

Hasta la actualidad, no existen otras evidencias que respalden la actividad antibacteriana de extractos antraquinónicos de *M. royoc* frente a las bacterias objetos de este estudio. Sin embargo, existen referencias de compuestos con similar naturaleza química y en otras especies de plantas que inhiben el crecimiento de los mismos. De acuerdo con Ciafardini y Zullo (21), compuestos fenólicos provenientes de olivos de Leccino obtuvieron 50 % de actividad inhibitoria a la concentración de 2,5 mg·ml⁻¹ frente a *X. campestris*. Extractos clorofórmicos de *Semecarpus anacardium* inhibieron el crecimiento de *B. licheniformis* (9 mm) según Mohanta *et al.* (22). Por otro lado, Vidigal *et al.* (23), obtuvieron 57 % de inhibición de *S. maltophilia* a partir de 256 mg·l⁻¹ del compuesto epigallocatequina-3-gallata (EGCg), extraída de *Camellia sinensis*. Según Betts *et al.* (24), la presencia de polifenoles en *Acinetobacter baumannii* también permitió la inhibición de estos tipos de bacterias.

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron determinar la actividad inhibitoria de los extractos de antraquinonas bioactivas de raíces de *M. royoc* frente a importantes bacterias que afectan tanto el cultivo *in vitro* de plantas (*B. licheniformis* y *S. maltophilia*) como a cultivos de importancia agrícola (*X. campestris*), lo cual es un tema poco abordado en la literatura y abre la posibilidad del uso de los extractos en el control de enfermedades de los cultivos (25).

Determinación de la actividad antifúngica *in vitro*

R. solani obtuvo su máximo crecimiento a las 48 horas de incubación, a partir del cual se mantuvo constante (Fig. 3A). Por otro lado, el extracto fue efectivo en la inhibición del crecimiento del hongo desde las primeras 24 horas de incubación a las concentraciones de 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 y 0,08 µg·µl⁻¹ (Fig. 3B). Durante las primeras 24 horas de exposición del hongo al extracto, este logró una inhibición ca. 30 % de su crecimiento. Sin embargo, la mayor actividad inhibitoria del extracto, ca. 50 %, se alcanzó a las 48 horas de incubación, sin diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos a las 72 horas (Fig. 3C, D).

La mínima concentración del extracto en la que se obtuvo la mayor inhibición de *R. solani* fue 1,25 µg·µl⁻¹. Después de 72 horas de exposición, el extracto fue menos efectivo en su actividad (datos no presentados).

Goss *et al.* (26) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de extractos fenólicos de *Moringa oleifera* en la inhibición de *R. solani* y solo obtuvieron el 50 % de actividad inhibitoria con el aumento de la concentración del extracto a 300 µg·µl⁻¹. Estos autores refieren que el aumento de la concentración implicó un aumento del ingrediente activo que actuó sobre el hongo afectando de esta manera los procesos fisiológicos y, en consecuencia, el crecimiento del hongo. Sin embargo, con fines prácticos y de producción a mayor escala, elevadas concentraciones del extracto conllevarían a poca factibilidad económica. Por otro lado, Anfoka *et al.* (27), obtuvieron entre 27-40 % de actividad inhibitoria de extractos crudos y fraccionados, ricos en compuestos fenólicos provenientes de *Olea europaea* L. a la concentración de 1 µg·µl⁻¹, similar a los resultados obtenidos en este trabajo. Otros estudios de investigación en el mismo tema afirman que cada extracto de plantas, independiente del compuesto bioactivo que presentan en común, puede tener actividad antimicrobiana específica y diferente modo de acción frente a estos tipos de hongos (28).

Al igual que el anterior, *S. solani* alcanzó su máximo crecimiento a las 48 horas sin diferencias estadísticamente significativas a partir de este tiempo de incubación (Fig. 4A). En cuanto a la actividad del extracto, este solo fue efectivo, a las mayores concentraciones evaluadas, a partir de las 48 horas de incubación. La máxima inhibición del crecimiento de *S. solani*, ca. 35 %, se alcanzó a la concentración de 2,5 µg·µl⁻¹ a las 72 horas (Fig. 4B, C). Después de transcurrido este tiempo, el extracto no mostró actividad (datos no presentados).

Al-Mughrabi (29) estudió la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de diferentes partes de la planta *Euphorbia macroclada* frente a diferentes fitopatógenos, entre ellos, *Alternaria solani* y *S. solani* y obtuvo 16,9 % y 47,1 % de actividad inhibitoria frente a los mismos respectivamente. Por otro lado,

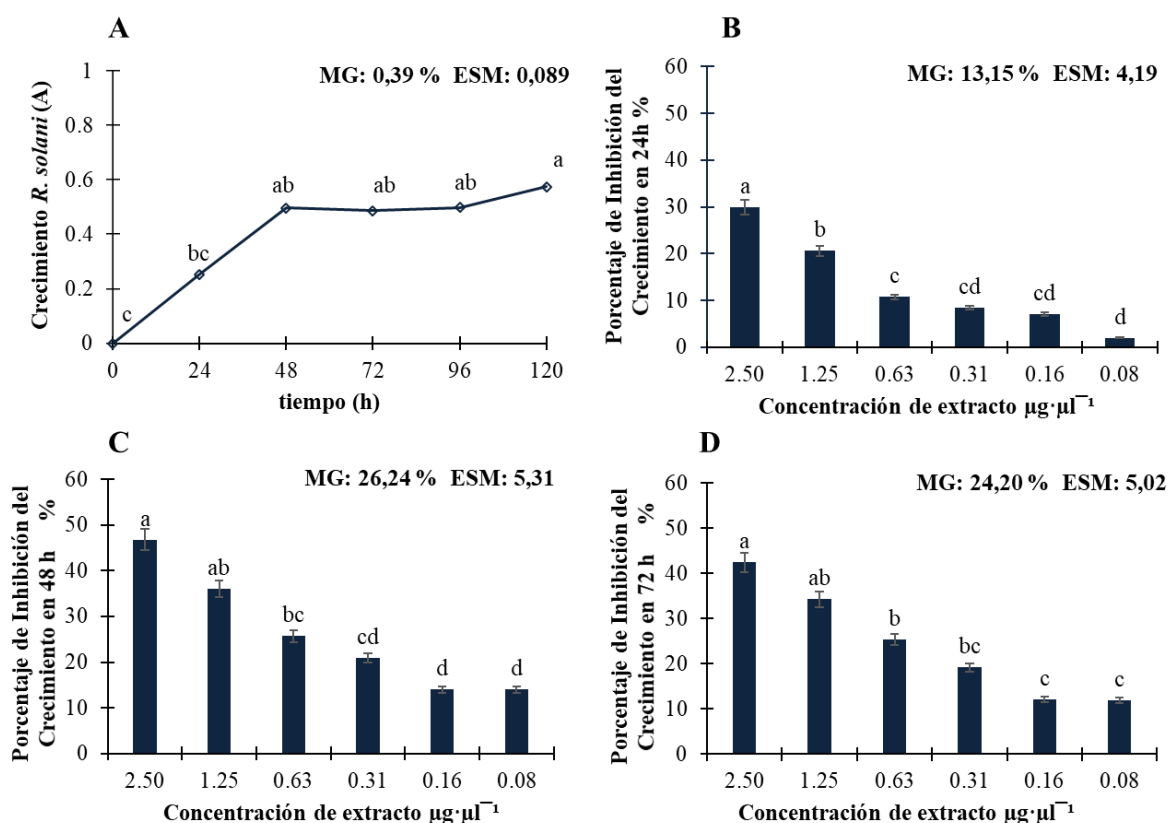


Fig. 3. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de extracto antraquinónico de raíces de *M. royoc* frente al hongo *R. solani*. **A:** Fases del crecimiento de *R. solani*, **B:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 24 horas de incubación, **C:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 48 horas de incubación y **D:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 72 horas de incubación. *Antifungal activity of different concentrations of the anthraquinone-rich extract from M. royoc roots against R. solani. A: Growth phases of R. solani, B: Growth Inhibition Percentage at 24 hours of incubation, C: Growth Inhibition Percentage at 48 hours of incubation and D: Growth Inhibition Percentage at 72 hours of incubation. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n=4$). Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2\arccos(y/100)^{0.5}$.*

Anfoka *et al.* (27), informaron bajos porcentajes de inhibición del crecimiento (1,2 %-10,7 %) de *S. solani* en un estudio de la actividad antimicrobiana de extractos crudos y fraccionados, ricos en compuestos fenólicos provenientes de *Olea europaea* L. y concentrados a $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Sin embargo, Iglesias *et al.* (30) determinaron la actividad antifúngica de extractos etanólicos de hojas de *Citrus* spp frente a *S. solani* y obtuvieron 100% de inhibición del patógeno cuando aplicaron concentraciones del extracto por encima de $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

El máximo crecimiento de *S. oryzae* se alcanzó a partir de las 96 horas de incubación sin diferencias estadísticas representativas con respecto al último período de tiempo evaluado

(Fig. 5A). Frente a este hongo, el extracto solo mostró actividad inhibitoria a las dos concentraciones más altas que se evaluaron, 1,25 y $2,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. A partir de las 24 horas, el extracto inhibió ca. 15 % del crecimiento a la concentración de $2,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Sin embargo, no existieron diferencias significativas durante todo el período de incubación establecido (Fig. 5B, C, D). El extracto tuvo un ligero incremento de su actividad inhibitoria a la concentración de $1,25 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a partir de las 24 horas, pero no logró, en ninguno de los casos, una inhibición superior al 20 %.

Estos resultados demostraron que el extracto a bajas concentraciones no es efectivo para la inhibición del crecimiento de *S. oryzae* a las

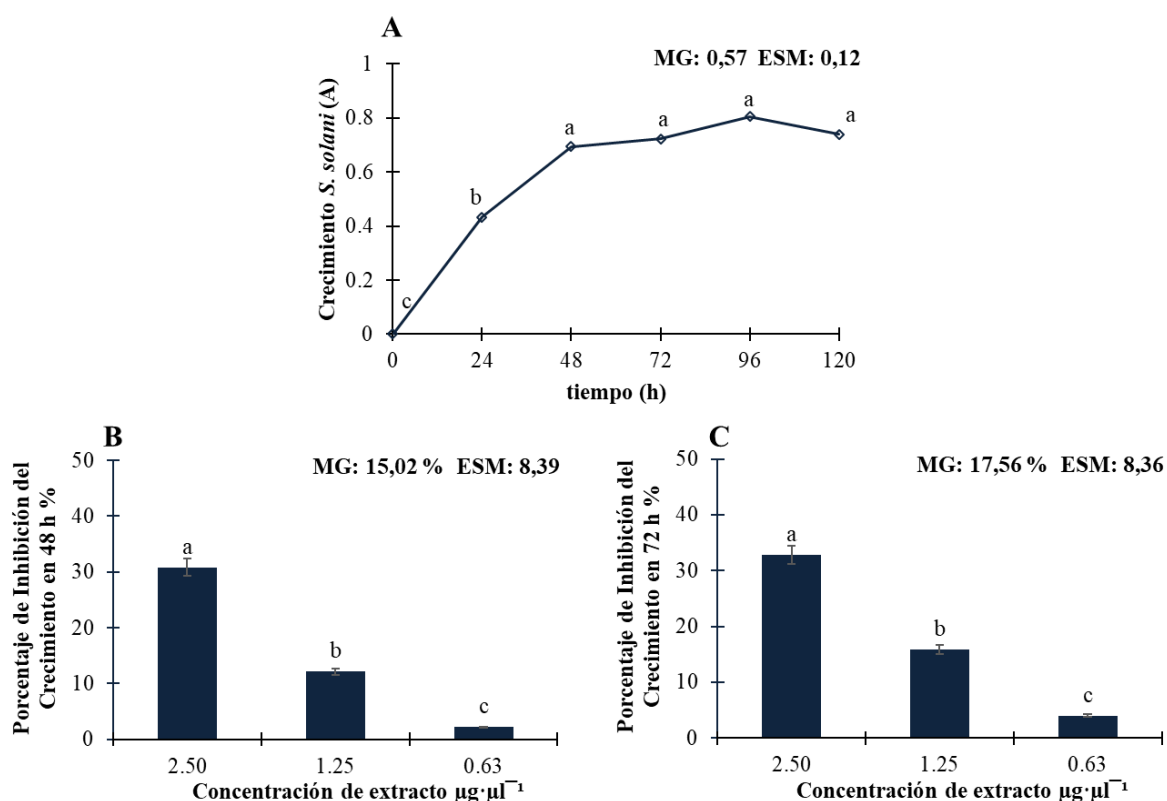


Fig. 4. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de extracto antraquinónico de raíces de *M. royoc* frente al hongo *S. solani*. **A:** Fases del crecimiento de *S. solani*, **B:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 48 horas de incubación y **C:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 72 horas de incubación. *Antifungal activity of different concentrations of the anthraquinone-rich extract from M. royoc roots against S. solani. A: Growth phases of S. solani, B: Growth Inhibition Percentage at 48 hours of incubation and C: Growth Inhibition Percentage at 72 hours of incubation. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n=4$). Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2\arccos(y/100)^{0.5}$*

condiciones dadas. Para conocer la posible eficacia de extractos de *M. royoc* frente a este hongo, se necesitarán estudiarse concentraciones más elevadas del mismo que garanticen el 50 % de inhibición del crecimiento. Sin embargo, esta práctica, en muchas ocasiones es rechazada debido a la poca factibilidad que existe en usar productos que solo son activos a muy elevadas concentraciones.

En estudios previos realizados por Natrajan y Lalithakumari (31) se logró actividad antifúngica de extractos de hojas de *Lawsonia inermis* ricos en compuestos 2-hidroxi-1,4 naftoquinonas. Estos extractos, a la proporción 1:40 (m:v), lograron un 50 % de inhibición del crecimiento del hongo *Drechslera oryzae* con reducción del crecimiento del ADN total, ARN, síntesis de

proteínas y asimilación de oxígeno. Estos investigadores atribuyen la actividad inhibitoria de estos tipos de compuestos a que provocan pérdida de energía al afectar el sistema respiratorio de las células. Otro estudio realizado por Meera y Balabaskar (32) demostró que extractos fenólicos de diferentes plantas, entre ellas *Aloe vera* y *Moringa oleifera* solo obtuvieron actividad inhibitoria de *S. oryzae* por encima del 50 %, cuando aumentaron la concentración de los extractos un 50 % de su concentración inicial.

A pesar de los resultados diversos en la actividad antifúngica de extractos crudos de *M. royoc*, estos constituyen un punto de partida para conocer su posible potencial antimicrobiano frente a estos tipos de fitopatógenos tan

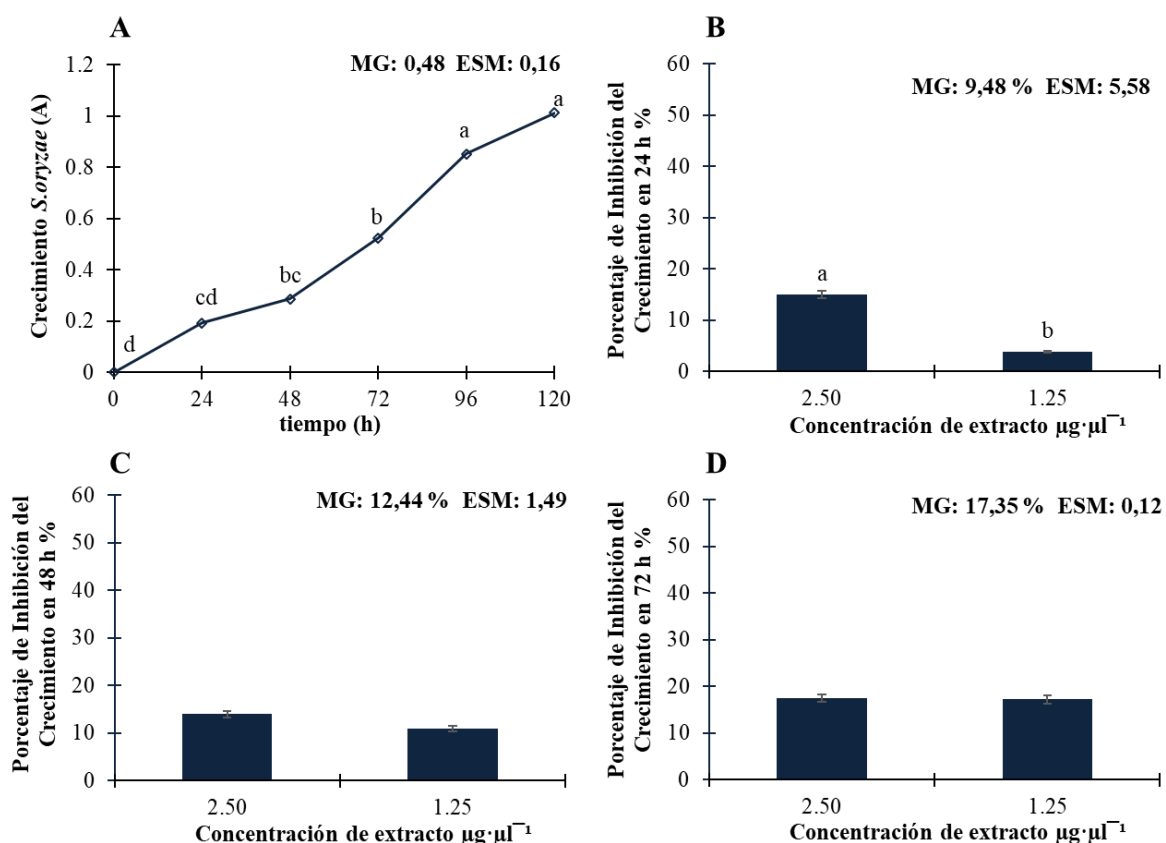


Fig. 5. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones de extracto antraquinónico de raíces de *M. royoc* frente al hongo *S. oryzae*. **A:** Fases del crecimiento de *S. oryzae*, **B:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 24 horas de incubación, **C:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 48 horas de incubación y **D:** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) a las 72 horas de incubación. *Antifungal activity of different concentrations of the anthraquinone-rich extract from M. royoc roots against S. oryzae. A: Growth phases of S. solani, B: Growth Inhibition Percentage at 24 hours of incubation, C: Growth Inhibition Percentage at 48 hours of incubation and D: Growth Inhibition Percentage at 72 hours of incubation. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n=4$). Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2\arccos(y/100)^{0.5}$.*

frecuentes en importantes cultivos. Posteriores estudios en el tipo de aplicación y concentración del extracto, se llevarán a cabo con el objetivo de incrementar su actividad antifúngica frente a estos patógenos.

Estudios relacionados con la purificación de las antraquinonas bioactivas a partir de estos extractos, con el objetivo de incrementar su actividad antimicrobiana, también se han llevado a cabo. Sin embargo, en trabajos realizados por otros investigadores frente a patógenos que afectan al hombre se pudo comprobar que los extractos crudos presentan mayor actividad antimicrobiana que las antraquinonas puras, posiblemente por efecto sinérgico (4). Dicho

efecto de estos tipos de biomoléculas también se informó por Krolicka *et al.* (33) frente a patógenos que afectan a las plantas. Mediante la combinación de dos o más moléculas en un extracto, como es el caso de las antraquinonas fisona y crisofanol, se logró actividad inhibitoria contra los hongos que afectan a plantas de *Cucumis sativus* L. y *Triticum aestivum* (34). Aparejado a este sinergismo, se encuentra el hecho de que la purificación de compuestos es un proceso costoso que dificulta su posterior producción a gran escala.

De forma general, se pudo concluir que de los siete patógenos evaluados en este trabajo, solo uno (*X. campestris*) mostró más del 50 % de

inhibición del crecimiento por acción del extracto y otros tres (*B. licheniformis*, *S. maltophilia* y *R. solani*) tuvieron inhibición ca. de un 50 %. Sobre el resto, el extracto tuvo poca actividad (< 35 % frente *S. solani* y *S. oryzae*) o ninguna (*P. carotovorum*). Estudios posteriores se desarrollarán para incrementar la actividad inhibitoria del extracto frente a estos patógenos y ampliar su posible potencial antimicrobiano frente a enfermedades que afectan a cultivos de importancia para la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto Nacional P131LH0030101: Bioprospección y propagación de plantas promisorias para la salud animal y vegetal en la región Centro-Oriental de Cuba. Agradecemos la colaboración del Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal por su financiación y supervisión. Agradecemos, además, la colaboración del Dr. Reinaldo Trujillo del Laboratorio de Ingeniería Metabólica y el Ing. Jorge García Brizuela del Laboratorio de Computación Aplicada, ambos laboratorios del Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, por sus contribuciones en la colecta y preparación del material vegetal utilizado en este estudio.

REFERENCIAS

1. Ringuelet J. Productos naturales vegetales. La Plata: D - Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; 2013.
2. Gandhi S, Mahajan V, Bedi Y. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*. 2014; 241(2):303-317.
3. Shahzad A, Sharma S, Siddiqui S. Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers. Cham: Springer; 2016.
4. Borroto J, Trujillo R, Waksman N, Hernández M, Salazar R. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011; 16 (1): 34-42.
5. Busto V, Calabró-López A, Rodríguez-Talou J, Giulietti A, Merchuk J. Anthraquinones production in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures: Down scale of shear effects. *Biochemical Engineering Journal*. 2013; 77:119-128.
6. Olaoluwa O, Aiyelaagbe O, Irwin D, Reid M. Novel anthraquinone derivatives from the aerial parts of *Antigonon leptopus* Hook & Arn. *Tetrahedron*. 2013;69(33):6906-6910.
7. Barrera Vázquez M, Comini L, Martini R, Núñez Montoya S, Bottini S, Cabrera J. Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014;21(2):478-484.
8. Perassolo M, Cardillo A, Mugas M, Núñez Montoya S, Giulietti A, Rodríguez Talou J. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*. *Industrial Crops and Products*. 2017; 105:124-132.
9. Mishra B, Kishore N, Tiwari V, Singh D, Tripathi V. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family *Rutaceae*). *Fitoterapia*. 2010;81(2):104-107.
10. Kamiya K, Hamabe W, Tokuyama S, Hirano K, Satake T, Kumamoto-Yonezawa Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*. 2010;118(3):725-730.
11. Ahmad A, Alkarkhi A, Hena S, Siddique B, Dur K. Optimization of Soxhlet extraction of *Herba leonuri* using factorial design of experiment. *International Journal of Chemistry*. 2010;2(1).
12. Han Y, Van der Heijden R, Verpoorte R. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the *Rubiaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001; 67 (3): 201-220.
13. Schulte U, El Shagi H, Zenk M. Optimization of 19 *Rubiaceae* species in cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Rep*. 1984; 3 51-54.

14. Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966;45(4):493-496.
15. Bertani G. Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1951; 62 (3): 293.
16. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago M. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and european committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre yeast one and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(5):1782-1786.
17. Alves D, Pérez-Fons L, Estepa A, Micol V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochemical Pharmacology*. 2004;68(3):549-561.
18. Pandey R, Mishra A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010; 160 (5): 1356-1361.
19. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*. 2003; 16 (4): 385-393.
20. Mondal K, Dureja P, Prakash Verma J. Management of *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum-induced blight of cotton through phenolics of cotton *Rhizobacterium*. *Current Microbiology*. 2001;43(5):336-339.
21. Ciafardini G, Zullo B. Antimicrobial activity of oil-mill waste water polyphenols on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* spp. *Annals of Microbiology*. 2003; 53 (3): 283-290.
22. Mohanta T, Patra J, Rath S, Pal D, Thatoi H. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical screening of oils and nuts of *Semecarpus anacardium* Lf. *Scientific Research and Essays*. 2007; 2 (11): 486-490.
23. Vidigal P, Müsken M, Becker K, Häussler S, Wingender J, Steinmann E, Kehrmann J, Gulbins E, Buer J, Rath P. Effects of green tea compound epigallocatechin-3-gallate against *Stenotrophomonas maltophilia* infection and biofilm. *PloS one*. 2014; 9 (4): e92876.
24. Betts J, Kelly S, Haswell S. Antibacterial effects of theaflavin and synergy with epicatechin against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011;38(5):421-425.
25. Singh U, Pandey V, Wagner K, Singh K. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Canadian Journal of Botany*. 1990;68(6):1354-1356.
26. Goss M, Mafongoya P, Gubba A. *Moringa oleifera* extracts effect on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* growth. *Asian Research Journal of Agriculture*. 2017;6(1):1-10.
27. Anfoka G, Al-Mughrabi K, Aburaj T, Shahrour W. Antifungal activity of olive cake extracts. *Phytopathologia mediterranea*. 2001; 40 (3): 240-244.
28. Vinale F, Ghisalberti E, Flematti G, Marra R, Lorito M, Sivasithamparam K. Secondary metabolites produced by a root-inhabiting sterile fungus antagonistic towards pathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;50(4):380-385.
29. Al-Mughrabi K. Antimicrobial activity of extracts from leaves, stems and flowers of *Euphorbia macroclada* against plant pathogenic fungi. *Phytopathologia mediterranea*. 2003; 42 (3): 245-250.
30. Iglesias D, Ojito K, Linares C, Portal O. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Stemphyllium solani* Weber. *Centro Agrícola*. 2017; 44 (3): 5-12.
31. Natrajan R, Lalithakumari D. Antifungal activity of the leaf extract of *Lawsonia inermis* on *Drechslera oryzae*. *Indian Phytopath*, 1987; 40 (3): 390-395.
32. Meera T, Balabaskar P. Antifungal activity of botanicals against *Sarocladium oryzae* causing rice sheath rot disease. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. 2012; 2 (1): 121-127.

33. Krolicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romanik G, Kaminski M, Lojkowska E. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;42(3):216-221.
34. Yang X, Yang L, Wang S, Yu D, Ni H. Synergistic interaction of physcion and chrysophanol on plant powdery mildew. *Pest Management Science*. 2007;63(5):511-515.

Declaración de los autores: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Geesy Angela Cid Valdés:** Colectó el material vegetal que se usó en el experimento. Desarrolló los protocolos de extracción del compuesto bioactivo y la evaluación de la actividad antimicrobiana. Participó en el diseño de la investigación y en la recolección de los datos. Realizó el procesamiento estadístico, las búsquedas de información y la redacción del manuscrito. **Yanelis Capdesuñer Ruiz:** Propuso los protocolos de actividad biológica correspondientes que se desarrollaron en la investigación. Participó en el diseño y en las pruebas realizadas para la obtención de los resultados. Contribuyó con la interpretación de los mismos y el procesamiento estadístico. Realizó una revisión crítica y aportó sus conocimientos en el proceso de redacción del manuscrito. **Claudia Linares Rivero:** Contribuyó con el diseño de la investigación y las pruebas realizadas para la obtención de los resultados. Participó en la recolección de los datos, en la interpretación de los mismos y el procesamiento estadístico. Realizó búsquedas de información sobre el tema. **Maribel Rivas Paneca:** Participó en la preparación previa del material vegetal usado en la investigación. Colaboró en la preparación de los materiales de laboratorio para la obtención del extracto y el ensayo de actividad biológica. **Janet Quiñones-Gálvez:** Aprobó el tema de investigación para la obtención de los resultados. Participó en el diseño del experimento, en la interpretación y procesamiento de los datos. Contribuyó con la búsqueda de información, realizó una revisión crítica del manuscrito y la aprobación final del mismo.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)