



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA DE
EXTRACTOS DE PLANTAS INVASORAS
(*Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana
glauca* y *Ricinus communis*)**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Elche

Julio 2019

Autor: Óscar García Fiol

Modalidad: Experimental

Tutora: Gisela Díaz Espejo

Departamento de Biología Aplicada. Área Botánica.

Agradecimientos:

Tengo mucho que agradecer, a todos los que de alguna forma u otra han recorrido este camino, a mi lado prestándome su apoyo, sus conocimientos e intuyendo en cada momento, cuando necesitaba esas palabras de ánimo para poder continuar. Gracias a todos.

A mi tutora y guía en este trabajo, Gisela, sin tí no hubiese descubierto lo increíble que llega a ser un trabajo de investigación. Siempre te estaré agradecido.

A toda mi familia, que siempre han estado en el momento oportuno, a cualquier hora y dedicándome lo mejor. A ellos, mi mayor agradecimiento, porque vuestra ayuda, apoyo y paciencia, por todo ello, doy las gracias a mis abuelos, a mis padres, a mi hermano y a mi novia. A todos decirles, que sin ellos hoy no sería quien soy.

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
I.INTRODUCCIÓN	
1.1. Las plantas como fuente de compuestos antimicrobianos.....	2
1.2. Plantas invasoras.....	2
1.3. Microorganismos patógenos y oportunistas	3
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
III. METODOLOGÍA	
3.1. Especies vegetales utilizadas.....	5
3.2. Recolección y preparación del material vegetal	9
3.3. Preparación de los extractos vegetales.....	10
3.4. Preparación de los medios de cultivo.....	12
3.5. Aislamiento y cultivo de los hongos utilizados	12
3.6. Preparación del inóculo	13
3.7. Evaluación de la capacidad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco	14
3.8. Evaluación de la inhibición del crecimiento de los hongos mediante aplicación directa del extracto	16
3.9. Cultivo de las bacterias utilizadas	16
3.10. Evaluación de la capacidad antifúngica mediante técnica de difusión en disco.....	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Rendimiento de los extractos.....	18
4.2. Capacidad antifúngica de los extractos de plantas.....	19
4.3. Inhibición del crecimiento del micelio por aplicación directa de los extractos.....	20
4.4. Capacidad antibacteriana de extractos de plantas.....	28
V. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	32
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	33

Resumen:

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que les confieren entre otras funciones, la de protección contra patógenos. Muchas plantas invasoras tienen efectos tóxicos o alelopáticos y podrían ser una alternativa para la obtención de compuestos antimicrobianos.

En este trabajo se ha evaluado la actividad antifúngica y antibacteriana de las especies invasoras *Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*, utilizando extractos en metanol, acetona y etanol procedentes de sus hojas. Se utilizó la técnica de difusión en disco frente a seis hongos y tres bacterias. Además se realizó un ensayo para evaluar la inhibición del crecimiento del micelio de los hongos.

Todas las especies inhibieron en más de un 25% el crecimiento del micelio de los hongos *Alternaria* y *Phytophthora*. *Lantana camara* además inhibió el crecimiento de *Botrytis* y *Fusarium* y *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis* el de *Sclerotinia*. Respecto de las bacterias, los extractos metanólicos fueron los más efectivos para inhibir su crecimiento. Concretamente, *Acacia saligna*, *Lantana camara* y *Ricinus communis* mostraron capacidad antibacteriana sobre *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Abstract:

Plants synthesize secondary metabolites that provide them with protection against pathogens. Many invasive plants show toxic or allelopathic effects and could be an alternative for obtaining antimicrobial compounds.

In this study we have evaluated the antifungal and antibacterial activity of the invasive species *Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* and *Ricinus communis*, using extracts in ethanol, methanol and acetone from their leaves. The disc diffusion technique was used against six fungi and three bacteria. Moreover, an assay to evaluate the inhibition of fungal mycelium growth was carried out.

All the invasive species inhibited the growth of fungal mycelium of *Alternaria* and *Phytophthora* in more than 25%. Indeed, *Lantana camara* inhibited the growth of *Botrytis* and *Fusarium* and *Nicotiana glauca* and *Ricinus communis* of *Sclerotinia*. Regarding bacteria, methanolic extracts were the most effective in inhibiting their growth. Specifically, *Acacia saligna*, *Lantana camara* and *Ricinus communis* showed antibacterial capacity against *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus epidermidis*.

Palabras clave/Key words: hongos/fungi, metabolitos secundarios/secondary metabolites, bacteria/bacterium, efecto alelopático/allelopathic effect, plantas invasoras/invasive plants, extractante/extractant.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Las plantas como fuente de compuestos antimicrobianos

Además de producir metabolitos primarios, las plantas destinan otra cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que no parecen tener una función directa en los procesos vitales, pero que cumplen otras funciones. Entre ellas destaca las estrategias de defensa o competencia que las plantas desarrollan en condiciones de estrés biótico y abiótico. Son capaces de sintetizar enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o de inactivar tóxicos de origen microbiano. Este tipo de respuesta se realiza por medio de la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como las fitoalexinas (Croteau *et al.*, 2000; Vivanco *et al.*, 2005; Ávalos y Pérez, 2009). Entre estos compuestos que forman parte del metabolismo secundario se encuentran fenoles, terpenoides, compuestos nitrogenados o alcaloides (Harbone, 1997; Strack, 1997).

La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Agrios, 2005).

1.2. Plantas invasoras

Una planta invasora es aquella especie exótica que se establece en hábitats o ecosistemas naturales o seminaturales de los que no son originarias. Las especies introducidas que han llegado a naturalizarse tanto en ecosistemas antropizados como naturales y manifiestan un crecimiento poblacional expansivo pueden convertirse finalmente en invasoras (Sanz-Elorza *et al.*, 2001; Dana *et al.*, 2004). Por tanto, son agentes de cambio y amenaza de la biodiversidad nativa (UICN 1999). Las plantas invasoras pueden afectar de forma negativa a los ecosistemas (Mack *et al.*, 2000) y tiene fuertes repercusiones sobre la economía, la sociedad y la salud pública (Andreu y Vilà, 2007), pudiendo llegar a producir la extinción de especies autóctonas (Fagundez y Barrada, 2007).

La capacidad de invasión depende de varios factores, no solo de la especie introducida. Pueden también influir el hábitat, el clima, las especies nativas u otras invasoras que pueden acelerar dicha invasión (Simberloff y Von Holle 1999; Richardson *et al.* 2000; Pyšek y Richardson 2010). Algunas de estas especies compiten con las nativas mediante sustancias alelopáticas (Callaway y Aschehoug 2000; Ens *et al.* 2009).

1.3. Microorganismos patógenos y oportunistas

Las bacterias son microorganismos procariotas, unicelulares, con una pared celular compuesta por peptidoglicano, que constituyen uno de los grupos más abundantes en el ambiente (Vélez *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008). La supervivencia de las bacterias es variable, dependiendo de su diversidad estructural y metabólica (De la Rosa *et al.*, 2002). Algunas bacterias producen enfermedades en plantas, animales o en seres humanos.

Los hongos son organismos eucarióticos, heterótrofos, que carecen de clorofila, productores de esporas, generalmente microscópicos, con paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes y en su gran mayoría filamentosos ramificados (Agrios, 2005). La mayoría de los hongos patógenos tienden a tener una especificidad hacia una parte de la planta que van a hospedar. Los hongos oportunistas, sin embargo, aunque desarrollan un modo de vida saprofito, pueden provocar daños en las plantas si se producen las circunstancias necesarias para ello. Estas pueden ser condiciones ambientales como temperatura, humedad o estados de susceptibilidad de la planta. Son los principales causantes de enfermedades en cultivos y postcosecha, provocando importantes pérdidas económicas (Agrios, 2005).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los microorganismos patógenos y/o oportunistas son considerados como uno de los principales causantes de pérdidas en cultivos, en productos cosechados o almacenados, repercutiendo en la economía de la zona afectada y produciendo a nivel alimentario riesgos toxicológicos e impactos sobre la salud pública. Los métodos más utilizados para la prevención o control son el uso de diversos pesticidas de origen sintético. Estos tienen efectos colaterales, como es la acumulación en el suelo y en las plantas de residuos químicos, ocasionando la aparición de patógenos resistentes y la producción de efectos negativos hacia la salud y el medio ambiente. En la actualidad se buscan alternativas más seguras que puedan reemplazar a los métodos actuales usando para ello productos biodegradables y carentes de toxicidad.

Entre éstos cabe destacar la búsqueda de compuestos antimicrobianos y antifúngicos procedentes de plantas. Así por ejemplo, Mostafa *et al.* (2018) investigaron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, en disco de agar con extractos etanólicos, demostrando la existencia de actividad bactericida. Pardo *et al.* (2011) se centraron en la actividad antifúngica de la *Lantana camara* frente a 6 especies de *Candida spp*, detectando flavonoides en tallos y hojas, con

efectos antifúngicos. Díaz Dellavalle *et al.* (2011) utilizaron 10 especies de plantas, evaluando la actividad antifúngica frente al hongo *Alternaria spp.*; el resultado fue la inhibición del crecimiento, con resultados muy similares a los efectos fungicidas químicos.

Tradicionalmente, las investigaciones se han centrado principalmente en especies reconocidas por sus propiedades terapéuticas o medicinales. Sin embargo, son mucho más escasos los estudios que utilizan plantas invasoras como fuente potencial de compuestos, a pesar de que en muchas especies invasoras se han descrito propiedades tóxicas y alelopáticas. Además, por su abundancia y rápido crecimiento las plantas invasoras serían una fuente importante de material vegetal, sin poner en riesgo la flora autóctona.

Según lo expuesto, planteamos los siguientes **objetivos**:

Objetivo principal:

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas invasoras.

Objetivos específicos:

- Objetivo previo: Seleccionar las especies invasoras en función de su potencial toxicidad y abundancia en la zona, localizarlas y recolectarlas.
- Obtener los extractos foliares utilizando distintos extractantes y evaluar la conveniencia de cada uno.
- Evaluar la capacidad antifúngica de los extractos obtenidos
- Evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos obtenidos.

III. METODOLOGIA

3.1. Especies vegetales utilizadas

Las especies utilizadas en este estudio se han seleccionado a partir de la información contenida en el Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España, publicado por el Ministerio de Medio Ambiente (Sanz *et al.* 2004) por su referenciada capacidad alelopática y/o toxicidad. Se tuvo en cuenta también la abundancia en la zona de estudio y la disponibilidad a la hora de su recolección.

Acacia saligna (Labill.). H.L. Wendl. (figura 1)

Se incluye en la familia Mimosaceae (Leguminosae)



Figura 1: *Acacia saligna*

Se trata de una especie originaria de Australia y de Tasmania, que se introdujo con fines ornamentales en jardines. Tiene un crecimiento muy rápido y es una especie tolerante a un amplio rango de tipos de suelo y clima, que se ha adaptado muy bien al clima mediterráneo, particularmente a suelos arenosos y salinos. Puede desplazar a la vegetación autóctona por sus propiedades alelopáticas. Se trata de un arbolillo o arbusto de hasta 10 m. de altura, de corteza grisácea, con hojas linear-lanceoladas a elípticas inflorescencias formando cabezuelas con 30-70 flores cada una. El fruto es una legumbre que contiene varias semillas de color marrón oscuro a negro. Se reproduce por sus abundantes semillas, viéndose favorecida por los incendios, al ser estimulada la semilla por el calor. También se reproduce de forma vegetativa por chupones.

Lantana camara L. (figura 2)

Pertenece a la familia Verbenaceae.



Figura 2: *Lantana camara*

Se trata de una especie originaria de América tropical, de Georgia y Florida, hasta el norte de Argentina.

Se introdujo como arbusto ornamental en zonas con clima cálido. Soporta bien los incendios. Produce efectos alelopáticos sobre las especies preexistentes. Muy tóxica, rehusada por la mayoría de los herbívoros. Puede ser venenosa para el ganado, habiéndose descrito reacciones de fotosensibilización y accidentes en niños al ingerir sus semillas. Se trata de un arbusto perennifolio de hasta 2 m, que puede crecer también como planta trepadora. Las hojas son opuestas, ovadas a oblongas, con el margen aserrado y con abundantes glándulas. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo corimbo de 2-3 cm y presentan coloración variada (amarillo, naranja o rojo). Puede llegar a producir hasta 12000 frutos por planta. Se reproduce de manera sexual y vegetativa, rebrota fácilmente de cepa, de ramas caídas o rotas y tienen capacidad de enraizar fácilmente.

Nicotiana glauca R.C. Graham (figura 3)

Pertenece a la familia Solanaceae.



Figura 3: *Nicotiana glauca*

Se trata de una especie originaria de Argentina, Paraguay y Bolivia, que se introdujo como planta ornamental en regiones cálidas. Se ha naturalizado de forma expansiva en ambientes ruderales, ramblas, suelos removidos, principalmente en zonas áridas y próximas al mar. Todas las partes de la planta son tóxicas, pues contienen distintos compuestos de nicotina.

Es un arbusto o arbolillo perennifolio de 7 m. de altura, de corteza pardo-grisácea. Las ramas son frágiles y quebradizas. Hojas de olor desagradable, alternas, ovals a lanceoladas, pruinosas. Flores agrupadas en panículas terminales, de 3-4 cm de longitud, amarillas, de corola tubular con cinco lóbulos. Fruto en cápsula con numerosas semillas (entre 10.000 y 1.000.000) de color negro. Puede florecer prácticamente durante todo el año en zonas cálidas. Se reproduce por semillas, de dispersión anemócora a corta distancia e hidrocóra a larga distancia por su flotabilidad de las cápsulas, creciendo las plántulas muy rápidamente. Rebrotta fácilmente de raíz.

Ricinus communis L. (figura 4)

Incluida en la familia Euphorbiaceae.



Figura 4: *Ricinus communis*

Se trata de una especie con un origen bastante controvertido, debido a su cultivo desde hace más de 4000 años. La hipótesis más aceptada la sitúa en Etiopía y Somalia. Se introdujo como planta principalmente medicinal y oleaginosa. La faceta ornamental no fue considerada hasta hace unos pocos siglos. Planta termófila que requiere climas cálidos sin heladas, soportando bien las sequías. Muy nitrófila, naturalizada en zonas litorales mediterráneas en ambientes ruderales, eriales, escombreras, ramblas, etc. Las semillas y las hojas contienen la toxoalbúmina ricina, el alcaloide ricinina, y otros compuestos tóxicos. Puede provocar alergia, anafilaxia, lesiones cutáneas y problemas digestivos por manipulación y en el ganado.

Es un arbusto o pequeño arbolillo hasta 3 m., aunque puede llegar a los 7 m. Tallo hueco, pruinoso. Hojas grandes (10-50 cm de diámetro), con peciolo rojizo, lobuladas, margen dentado. Inflorescencias de tipo panícula. Flores unisexuales, las femeninas de color rojo. Fruto en cápsula globosa, cubierta de espinas o púas. Se reproduce por semillas, de crecimiento muy rápido.

3.2. Recolección y preparación del material vegetal

Tras varias salidas al campo para localizar las áreas de crecimiento de las especies seleccionadas, se establecieron las localidades de muestreo de *Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis* (Tabla 1). El material vegetal se recolectó en abril de 2019. En cada caso se seleccionaron tres individuos y se recogieron hojas de tres partes de cada planta (zona basal, media y superior), que se mezclaron para formar una muestra compuesta que se guardó en bolsas de papel convenientemente rotuladas. Las hojas dañadas, en mal estado o con síntomas de enfermedad se eliminaron.

Tabla 1. Localidades de recolección de las especies vegetales utilizadas en el estudio para la obtención de extractos.

Número de registro	Nombre científico	Nombre común	Familia	Localidad	Descripción localidad
1	<i>Acacia saligna</i>	Acacia de hoja azul, Acacia de hoja de sauce	Mimosaceae (Leguminosae)	Benidorm 38°33'15.1"N 0°07'54.4"W	Solar en abandono
2	<i>Lantana camara</i>	Bandera española, Lantana	Verbenaceae	Benidorm 38°32'49.3"N 0°07'57.3"W	Zona ajardinada
4	<i>Nicotiana glauca</i>	Tabaco moruno, Aciculito, Calenturero, Gandul, Bobo, Venenero	Solanaceae	Benidorm 38°33'15.1"N 0°07'54.4"W	Solar en abandono
6	<i>Ricinus communis</i>	Ricino, Higuera del infierno, Higuera infernal, Catapucia mayor, Higuerrillo	Euphorbiaceae	Benidorm 38°31'46,1"N 0°06'28,0"W	Ladera vertiente al mar

Las muestras se procesaron antes de 24 h. En el laboratorio, se separaron las hojas de los tallos y se procedió a su lavado en el fregadero. El último lavado se realizó con agua destilada. Se secaron con papel secante y se depositaron en bandejas, una para cada especie, donde se dejaron secar a temperatura ambiente y evitando la luz directa. Una vez seco el material, se trituró hasta convertirlo en polvo fino en un molinillo Braun ® (figura 5), con cuidado de limpiar adecuadamente las cuchillas y el depósito después de triturar cada especie. Cada muestra ya molida se introdujo en frascos cerrados y enumerados, con sus

respectivas etiquetas identificativas y se guardaron en una zona oscura para su posterior uso.

Figura 5: Molinillo para la trituración de las muestras



3.3. Preparación de los extractos vegetales

El material triturado se pesó y colocó en tubos de centrifuga de 50 ml de volumen a concentración 1:10 g/ml (1g de material vegetal y 10 ml de extractante). En nuestro caso se utilizó 3 g de material vegetal y 30 ml de extractante. Como extractantes se utilizó acetona TQCHEM al 99,9%, etanol AppliChem Panreac al 96% y metanol AppliChem Panreac al 90%.

Los tubos se cerraron y dispusieron en una gradilla que se colocó en un agitador de movimiento OVAN® (figura 6) durante 24 horas, evitando la luz directa.



Figura 6: Agitador de movimiento OVAN con las muestras en gradilla

A continuación, se procede a centrifugar los tubos durante 10 minutos a 3500 rpm en una centrifuga Heraeus Labofuge® 400 (figura 7).

Se decanta el sobrenadante en tubos limpios convenientemente rotulados y pesados previamente.



Figura 7: Centrifuga Heraeus Labofuge 400

Para concentrar los extractos se siguieron distintos procedimientos según la naturaleza del extractante.

Los extractos con acetona se dejaron evaporar a temperatura ambiente bajo chorro de aire en campana extractora.

En el caso del etanol, y debido a la dificultad de evaporación en tubos, se procedió a colocarlos en placas Petri de vidrio con el fin de aumentar la superficie de evaporación, depositándolas en la campana extractora.

Los extractos con metanol, y los de acetona que no habían evaporado por completo, se evaporaron bajo presión de vacío en un rotavapor Heidolph® a 39°C (figura 8). Para ello, cada extracto se coloca en un balón de cristal de 250 ml de capacidad, pesado previamente, que se introduce en un baño de agua a la temperatura indicada, haciéndolo girar. Se cierran las llaves de paso para conseguir el vacío y se mantiene así hasta que el vapor ha condensado completamente en el serpentín de destilación y ya no evapora más.

Finalizado el proceso de evaporación, los extractos se pesaron de nuevo para calcular el porcentaje de rendimiento:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso residuo}/\text{peso seco original material vegetal seco}) \times 100$$

Los extractos fueron reconstituidos con etanol (en el caso del extractante etanol), acetona (en el caso del extractante acetona) y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) (en el caso del extractante metanol), preparando una solución stock a 100 mg/ml que se conservó a 4°C hasta su uso. A partir de la solución stock se prepararon diluciones a 20 mg/ml para etanol y acetona y 50 mg/ml para metanol-DMSO.



Figura 8: Rotavapor Heidolph utilizado para concentrar los extractos

3.4. Preparación de los medios de cultivo

- PDA (por las siglas en inglés Potato Dextrosa Agar).

El procedimiento consiste en añadir 39 g del medio de cultivo (DIFCO ®) en un litro de agua destilada. Con ayuda de un agitador magnético en caliente se mezcla hasta su correcta disolución.

El último paso es su esterilización. Para ello, se llenan frascos de vidrio que se colocan en el autoclave a 120°C durante 20 minutos. Una vez autoclavado el medio se deja enfriar a una temperatura aproximada de 45°C y después se procede al llenado de placas de 9 cm de diámetro en la cabina de flujo (figura 9).

- AN (Agar nutritivo)

Según las instrucciones del fabricante, se añade 23 g de medio de cultivo (DIFCO ®) a 1 litro de agua destilada. Con ayuda de un agitador magnético y calor, se mezcla hasta su correcta disolución. Para su esterilización, los frascos se autoclavan a 120°C durante 20 minutos. Finalizado el paso anterior, se dejan enfriar a una temperatura aproximada de 45°C y se procede al llenado de las placas de 9 cm de diámetro en el interior de la campana de flujo laminar (figura 9).

3.5. Aislamiento y cultivo de los hongos utilizados

El aislamiento de los hongos utilizados en este ensayo se realizó a partir de alimentos de origen vegetal, tales como frutos de limón, fresa, cebolla o naranja, con indicios visibles de

daños físicos o colonización fúngica. El material se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas.

En condiciones de esterilidad, se tomaron con asa de Henle pequeñas porciones de hifas o esporas visibles en el material, y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA.



Figura 9: Cabina de flujo con las placas para el cultivo

Se rotularon las placas convenientemente y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente de 25°C. Tras 3-7 días de incubación, dependiendo del crecimiento observado, se seleccionaron porciones de las colonias iniciales de crecimiento homogéneo y sin signos de contaminación y se repicaron en nuevas placas Petri con medio PDA. Los hongos, identificados de forma provisional según caracteres morfológicos, fueron: *Alternaria* sp. (cepa UMH 18007), *Aspergillus niger* (cepa UMH 18005), *Botrytis cinerea* (cepa UMH 18008), *Sclerotinia* sp. (cepa UMH 18009).

Además, en este trabajo se han utilizado los hongos *Fusarium* sp., proporcionado por el Dr. J.A. Pascual a partir de la colección de cultivos del CEBAS-CSIC, Murcia y *Phytophthora citrophthora*, proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia.

Los hongos se conservaron a 4°C correctamente identificados para su posterior utilización, pasándose a medio fresco periódicamente.

3.6. Preparación de los inóculos fúngico y bacteriano

Para preparar los inóculos fúngicos se siguió el protocolo para hongos filamentosos M38 A, del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008; Cantón *et al.* 2007) modificado. Para ello se partió de cultivos de 7 días crecidos a una temperatura de 25°C. Se procede a

tomar pequeñas porciones de las colonias con un asa de cultivo previamente esterilizada. Esta se suspende en un tubo con 5 ml de agua estéril y se agita en un agitador de tubos Heidoph Reax ® durante 10-15 segundos, midiendo posteriormente su turbidez con un densitómetro Biosan® DEN-1 y ajustando la turbidez a 0,5 unidades McFarland añadiendo agua estéril o colonias del hongo según fuera necesario (figura 10). En trabajos previos (Cantón et al. 2007), se ha comprobado que una turbidez de 0,5 unidades McFarland corresponde a un rango de 70-80 % de transmitancia medida a 530 nm, y a una densidad del inóculo de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias por ml, suficiente para garantizar un crecimiento homogéneo en el medio de cultivo (Martos et al 2012).



Figura 10: Densitómetro McFarland DEN-1

3.7. Evaluación de la capacidad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco

Para evaluar la capacidad antifúngica de los extractos de plantas obtenidos se utilizó la técnica de difusión en disco o método de Kirby-Bauer (Bauer, 1966) adaptada para hongos filamentosos según el protocolo M51-A descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010).

Diseño experimental: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca*, *Ricinus communis*) obtenidos con dos extractantes (etanol y acetona) frente a 6 hongos (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Phytophthora*). El control positivo utilizado fue el fungicida Nistatina y como controles negativos se utilizó etanol y acetona. Esto supone un total de 11 tratamientos por cada hongo, con tres repeticiones para cada uno de ellos.

Tanto los extractos de las plantas como los controles acetona y etanol se esterilizaron previamente por filtración utilizando filtros de membrana de 25 mm de diámetro y 0,45 μ m de tamaño de poro, de la marca CHM®.

Utilizando el método descrito anteriormente (apartado 3.6), se preparó cada inóculo fúngico inmediatamente antes de su uso. A continuación, se impregna un hisopo estéril en el

inóculo, y se elimina el sobrenadante contra la pared del tubo; luego se aplica en cada placa de Petri, siguiendo el método de extensión en tres direcciones. Se inocularon 9 placas por hongo, que se dejaron secar unos minutos.

Para la aplicación de los extractos se usaron discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave. Cada disco se impregnó con 25 μ L del extracto correspondiente, que es la cantidad de absorción que admite el disco. Teniendo en cuenta que los extractos tenían una concentración de 20 mg/ml, la cantidad de extracto en cada disco es de 500 μ g. La misma cantidad de los extractantes etanol y acetona se añadió a otros discos. Para el control nistatina se utilizaron discos Biorad® de 6,5 mm de diámetro ya impregnados con 100 IU de producto.

Cada disco con el tratamiento correspondiente se toma con pinzas estériles y se deposita en las placas preinoculadas con el hongo. Se colocaron 4 discos por placa, debidamente rotuladas. Todo el procedimiento se realizó en la cabina de flujo laminar (figura 11).

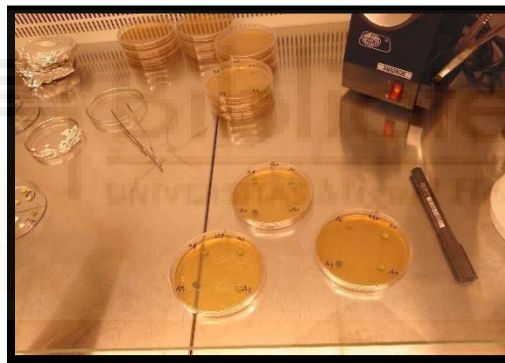


Figura 11: Placas con 4 discos impregnados con extractos

Es importante esperar 15 minutos con luz ultravioleta con cada cambio de hongo, con el fin de eliminar las posibles esporas, evitar transferencias y contaminación.

El ensayo se repitió de idéntica manera, utilizando el extractante metanol reconstituido en dimetilsulfóxido DMSO. En este caso, la cantidad de extracto por disco fue de 1250 μ g, ya que los extractos se prepararon a 50 mg/ml. Como control negativo se utilizó DMSO.

Las placas se incubaron en oscuridad a una temperatura de 28°C. Se observaron diariamente, con luz directa y por ambos lados de la placa, fondo claro y con fondo negro. Transcurridos 3 días, se evaluó el crecimiento fúngico midiendo el diámetro de los halos de inhibición con una regla milimetrada.

3.8. Evaluación de la inhibición del crecimiento de los hongos mediante aplicación directa del extracto

En este caso se evaluó el efecto de la aplicación de los extractos en el medio de cultivo sobre el crecimiento de las colonias de los hongos.

Diseño experimental: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca*, *Ricinus communis*) obtenidos con dos extractantes (etanol y acetona) frente a 6 hongos (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Phytophthora*). Como controles negativos se utilizó acetona y etanol, el control positivo consistía en placas sin ningún aditivo. Esto supone un total de 11 tratamientos por hongo, con tres repeticiones para cada uno.

Tanto los extractos de las plantas como los controles acetona y etanol se esterilizaron previamente por filtración utilizando filtros de membrana de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro, de la marca CHM®.

Se añadió 600 µL de cada extracto y los controles etanol o acetona a las correspondientes placas con medio PDA. Las placas se dejaron secar durante unos minutos. Posteriormente, con ayuda de un sacabocados y el bisturí, se inocularon las placas colocando en el centro de cada placa un disco de cultivo de 8 mm de diámetro obtenido de un cultivo del correspondiente hongo de al menos 7 días. Todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Las placas se incubaron en oscuridad y a una temperatura de 28°C. El diámetro de la colonia se midió cada dos días con una regla milimetrada, con luz directa y por ambos lados de la placa, con fondo claro y con fondo negro.

3.9. Cultivo de las bacterias utilizadas.

Las bacterias utilizadas en este estudio son *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*, proporcionadas por R. Valera y la Dra. M. Torreblanca, del área de Microbiología del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández. Por cuestiones de bioseguridad, se trata de cepas no patogénicas de uso docente. (Figura 12). Estas cepas se han conservado a 4°C en medio de cultivo agar nutritivo, repicándose a medio fresco periódicamente.



Figura 12: Cultivos stock de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*.

3.10. Evaluación de la capacidad antibacteriana mediante la técnica de difusión en disco

Para evaluar la capacidad antibacteriana de los extractos de plantas obtenidos se utilizó la técnica de difusión en disco o método de Kirby-Bauer (Bauer, 1966) según el protocolo M02-A12 descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2015).

Diseño experimental: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca*, *Ricinus communis*) obtenidos con tres extractantes (etanol, acetona y metanol) frente a 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*). Como control positivo se utilizó los antibióticos amoxicilina, ampicilina y cloranfenicol y como controles negativos se utilizó etanol, acetona y DMSO. Esto supone un total de 18 tratamientos por cada bacteria, con tres repeticiones para cada uno de ellos.

Tanto los extractos de las plantas como los controles acetona, etanol y DMSO se esterilizaron previamente por filtración utilizando filtros de membrana de 25 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro, de la marca CHM®.

Los inóculos se prepararon utilizando el método descrito anteriormente (apartado 3.6), inmediatamente antes de su uso. Se impregna el inóculo con un hisopo estéril, eliminando el sobrante contra la pared del tubo y se siembra en tres direcciones en cada una de las placas Petri.

Se impregnaron discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave, con 25 μL del extracto correspondiente. La misma cantidad de los extractantes etanol, acetona y DMSO se añadió a otros discos. Para los controles con antibióticos se utilizaron discos Biorad® de 6,5 mm de diámetro ya impregnados con 25 μg de Amoxicilina (AMX), 10 μg de Ampicilina (AM) o 30 μg de cloranfenicol (C) respectivamente.

Cada disco con el tratamiento correspondiente se toma con pinzas estériles y se deposita en las placas preinoculadas. Se colocaron 4 discos por placa, debidamente rotuladas. Todo el procedimiento se realizó en la cabina de flujo laminar.

Las placas con los discos se dejaron 2 horas en frío para permitir la difusión de los extractos. Posteriormente, las placas se incubaron en estufa a una temperatura de 37 °C.

Los resultados se valoraron a las 24 horas y 48 horas, midiendo el diámetro de la zona de inhibición con una regla milimetrada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento de los extractos

Los datos obtenidos de las plantas seleccionadas, en relación con los extractantes, se ilustra en la Figura 13. El mayor rendimiento con el extractante etanol se obtuvo en la especie *Acacia saligna*, seguido de la especie *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*, ambos con valores similares. El porcentaje más bajo resultó en la especie *Lantana camara*. Con el extractante acetona se obtuvo un rendimiento alto en la especie *Acacia saligna*, siendo el valor más bajo, la especie *Nicotiana glauca*. El mayor rendimiento con el extractante metanol fueron la especie *Nicotiana glauca* y *Acacia saligna*. El resultado menor fue con la especie *Lantana camara*.

Se pudo apreciar que de entre los disolventes seleccionados el metanol fue el de mayor rendimiento.

Los valores obtenidos (2-23%) están en el rango del rendimiento reportado en otros trabajos. Así, Mostafa *et al.* (2018) obtienen rendimientos del 3 al 9% para extractos etanólicos de tomillo, granado, comino o zingiber, y Mdee *et al.* (2009) obtienen entre 4 y 5 % para *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* o *Ricinus communis* con acetona y DMSO. Los tres extractantes utilizados son compuestos orgánicos que extraen los compuestos con un amplio rango de polaridades. La acetona es un disolvente orgánico que extrae tanto componentes hidrófilicos como lipofílicos, por lo que es muy utilizada para hacer extractos de plantas, además de por su facilidad para evaporar. El metanol es el extractante que rindió mayor cantidad de producto.

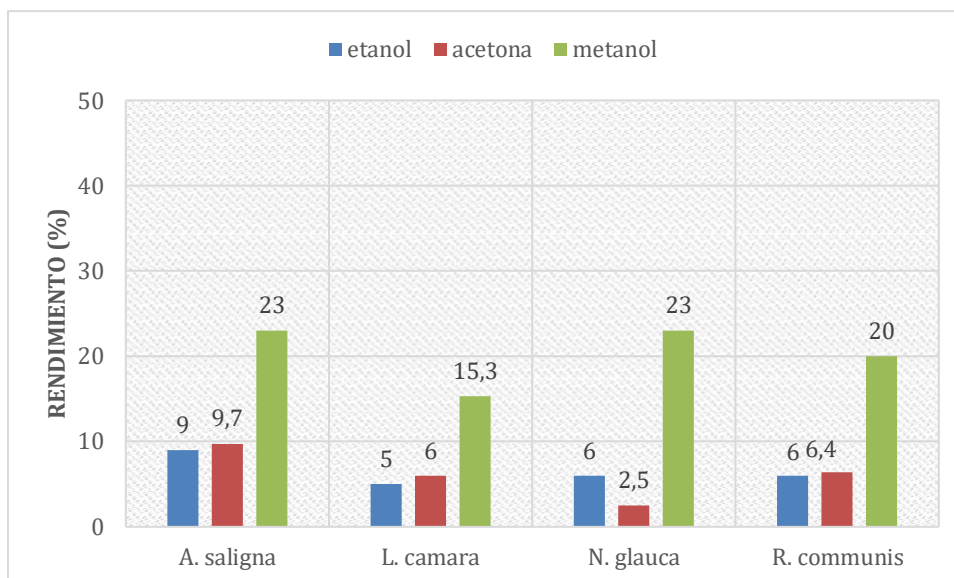


Figura 13: Rendimiento de los extractos obtenidos de plantas con diferentes extractantes

4.2. Capacidad antifúngica de los extractos de plantas

Se apreció crecimiento homogéneo de todas las especies de hongos por toda la placa, pero apenas se formaron zonas de inhibición. Únicamente en *Fusarium* con *Acacia* y *Ricinus* y en *Phytophthora* con *Acacia* se observaron halos muy pequeños (1,2 y 1,5 cm respectivamente). Sin embargo, los hongos utilizados resultaron en mayor o menor medida ser sensibles al antibiótico control nistatina, lo que evidencia la validez metodológica del ensayo (Tablas 2 y 3).

Por su reacción frente a nistatina podría decirse que *Alternaria*, *Botrytis* y *Phytophthora* son los hongos más sensibles, seguidos de *Sclerotinia*.

Nuestros resultados contrastan con los de otros autores. Así, Khan y Yadav (2011), con el método en pocillo de agar, observaron capacidad antifúngica de extractos de hojas de *Ricinus communis* frente a *Candida*, También Mdee *et al* (2009), con un ensayo de microdilución en serie con disolvente acetona, observaron que extractos de hojas de *Lantana camara* y *Nicotiana glauca* inhibían el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*. Sin embargo, el crecimiento de *Aspergillus niger* no pudo ser inhibido con extractos de 29 plantas de Finlandia que contenían flavonoides y otros compuestos fenólicos (Rauha *et al.* 2000).

Aunque no se ha podido demostrar actividad antifúngica de las especies invasoras ensayadas, no se puede concluir que las plantas carezcan de dichos componentes activos, ya que los resultados podrían variar si se modificaran algunas condiciones experimentales, como la concentración del extracto, el método de extracción, el solvente o las condiciones experimentales, entre otros factores.

Tabla 2: Diámetro de la zona de inhibición del crecimiento en hongos producido por extractos de plantas a las 72 horas de iniciado el cultivo. E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona. Los datos son medias de tres repeticiones \pm desviación típica.

Halos de inhibición (cm)	<i>Alternaria sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>Sclerotinia sp.</i>
E1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1,4 \pm 0,81	1,5 \pm 0,87	0 \pm 0
E2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
E4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
E6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1,2 \pm 0,7	0 \pm 0	0 \pm 0
A1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Etanol	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Acetona	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Nistatina	3,07 \pm 0,15	2,07 \pm 0,42	2,72 \pm 0,56	2 \pm 0,2	2,73 \pm 0,25	2,27 \pm 0,21

Tabla 3: Diámetro de la zona de inhibición del crecimiento en hongos producido por extractos de plantas a las 72 horas de iniciado el cultivo. M1 *Acacia saligna*-metanol, M2 *Lantana camara*-metanol, M4 *Nicotiana glauca*-metanol, M6 *Ricinus communis*-metanol. Los datos son medias de tres repeticiones \pm desviación típica.

Halos de inhibición (cm)	<i>Alternaria sp.</i>	<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>Sclerotinia sp.</i>
M1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
M2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
M4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
M6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
DMSO	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Nistatina	3,02 \pm 0,12	2 \pm 0	2,83 \pm 0,29	1,13 \pm 0,15	2,67 \pm 0,29	2,9 \pm 0,1

4.3. Inhibición del crecimiento del micelio por aplicación directa de los extractos

Ante los resultados del anterior ensayo, nos propusimos aumentar la cantidad del extracto añadido al medio de cultivo. Por otro lado, se tiene evidencia que la capacidad de difusión en agar de los compuestos antimicrobianos puede depender de la naturaleza de los mismos, de su tamaño, peso molecular o polaridad. Por eso, en este ensayo se añadió directamente

el extracto en el medio de cultivo, con el fin de favorecer el contacto entre el micelio del hongo y el extracto.

Valoración de *Alternaria* (Figuras 14 a y b y Figura 15): Se observa inhibición con los extractos de etanol, en cambio con los extractos de acetona no. Además, en todos los extractos etanólicos hay menor densidad de micelio aéreo y mayor pigmentación que en el control, lo que puede representar una respuesta de estrés.

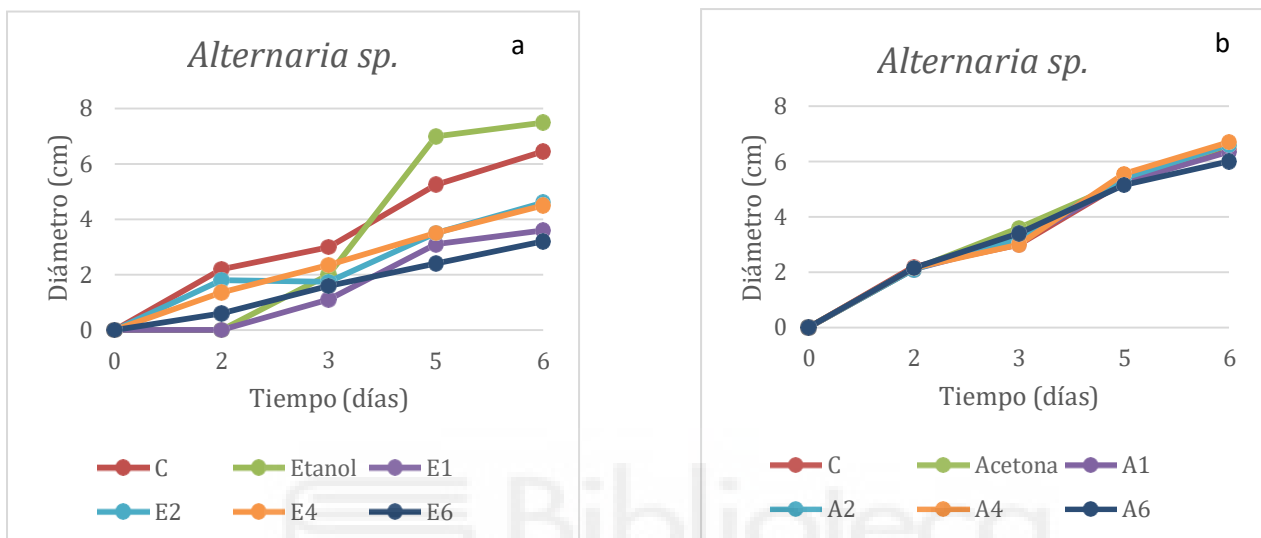


Figura 14 a y b: Crecimiento del hongo *Alternaria sp.* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

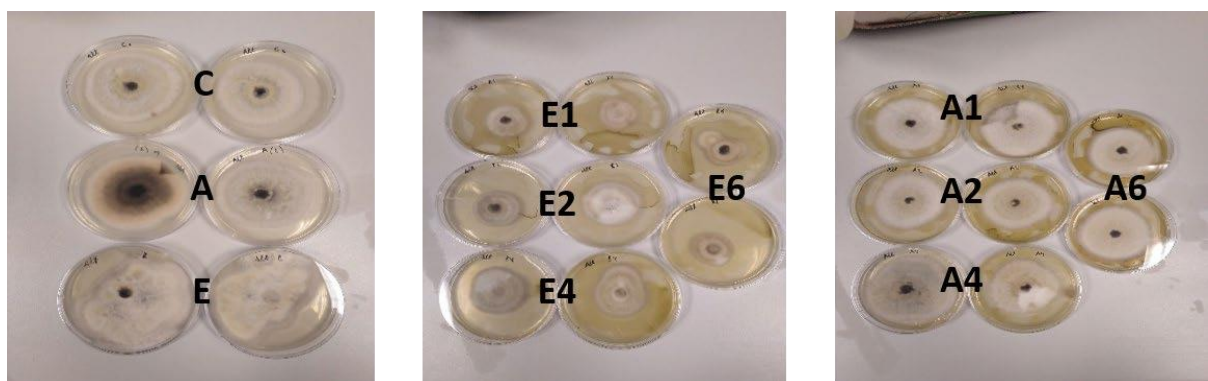


Figura 15: Crecimiento del hongo *Alternaria sp.* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, A acetona, E etanol, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Valoración de *Aspergillus* (Figuras 16 a y b): No hay inhibición del crecimiento con ninguno de los extractos. Únicamente se observó una distribución de las colonias más dispersa con algunos tratamientos, en comparación con las placas control, que presentaban mayor densidad de colonias.

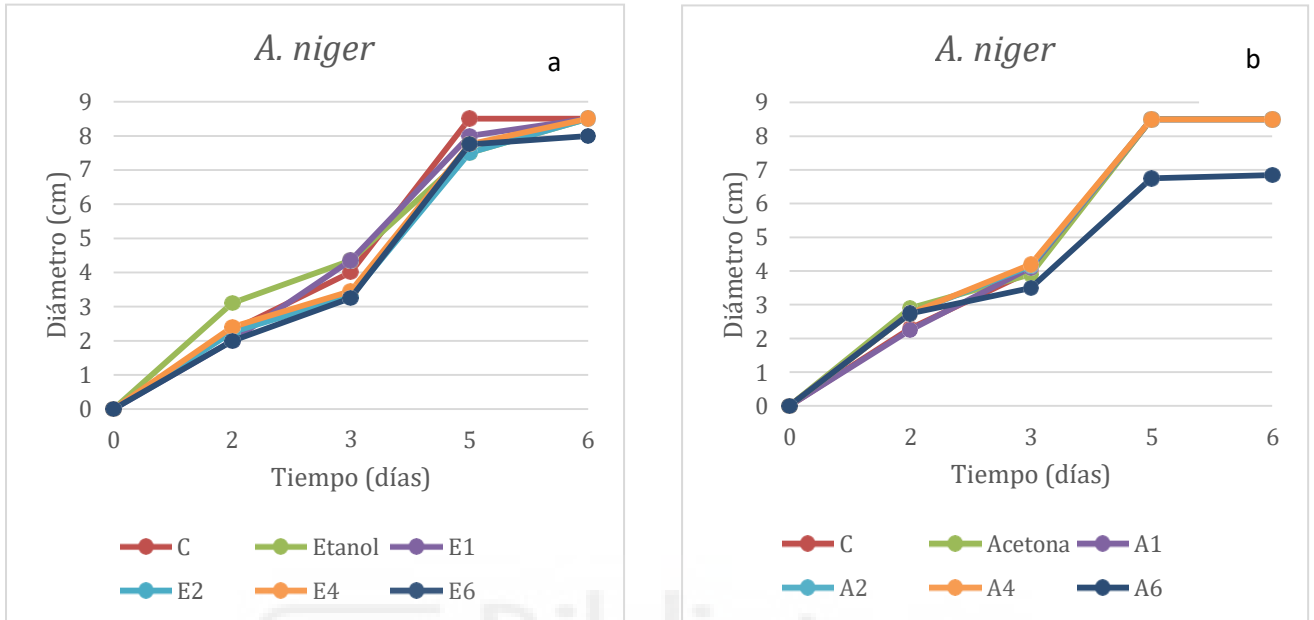


Figura 16 a y b: Crecimiento del hongo *Aspergillus niger* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Valoración de *Botrytis* (Figuras 17 a y b y Figura 18): El hongo creció formando colonias dispersas, lo que dificultó la medida del diámetro de la colonia; sin embargo, se observó inhibición en los tratamientos A2 y A4. No hubo inhibición con los extractos etanólicos.

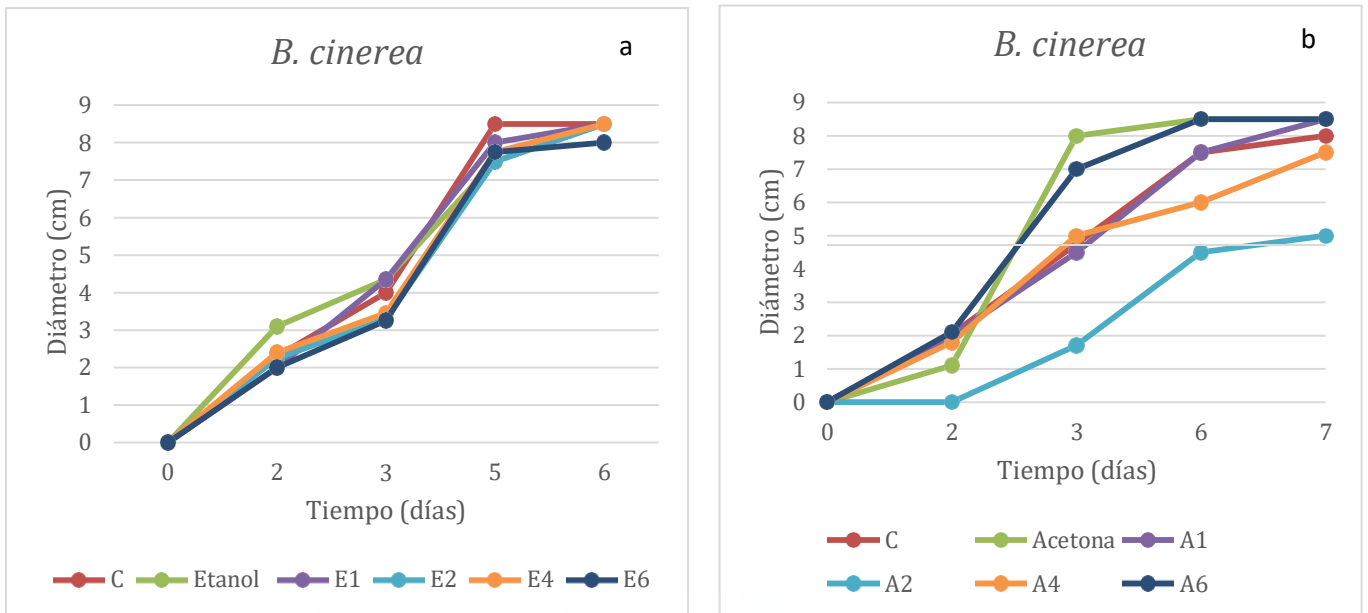


Figura 17 a y b: Crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*- acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

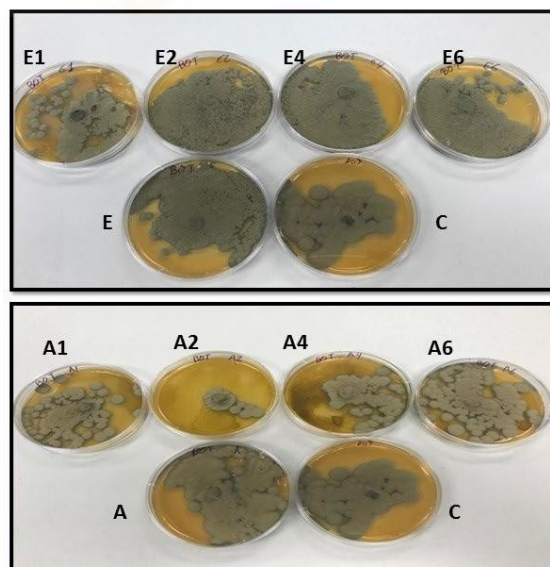


Figura 18: Crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E etanol, A acetona, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Valoración de *Fusarium* (Figuras 20 a y b y Figura 21): El diámetro de las colonias fue ligeramente inferior al del control con los extractos de acetona. Además, se apreció variación en el aspecto de las mismas, con menor densidad de las hifas y ausencia de coloración.

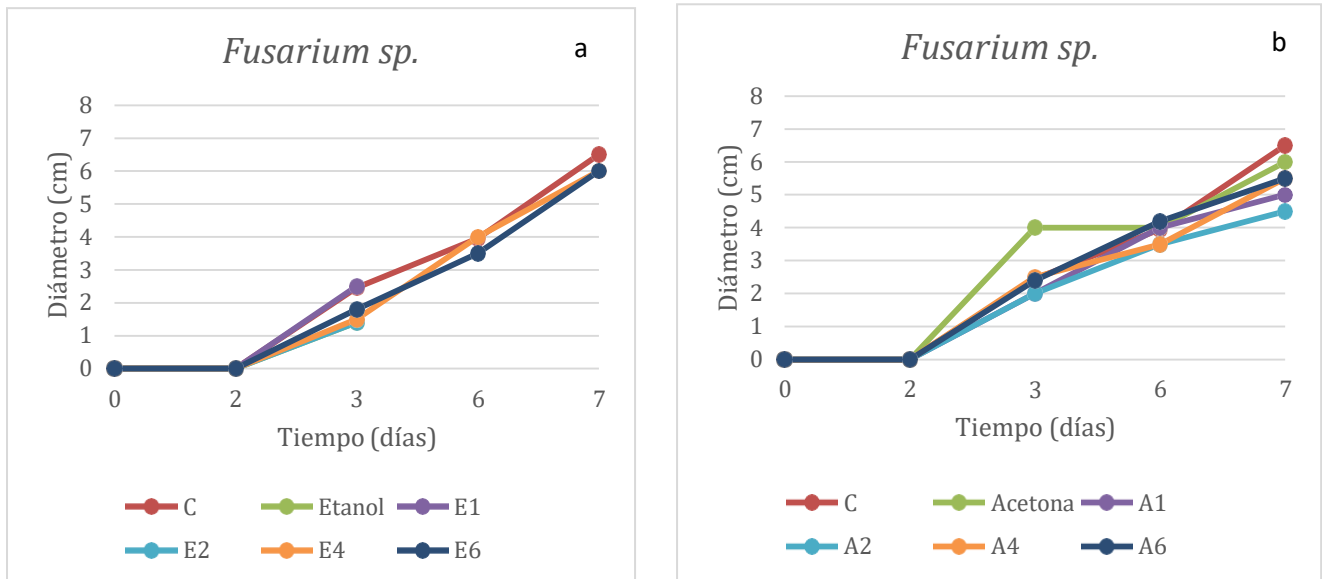


Figura 20 a y b: Crecimiento del hongo *Fusarium sp.* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*- etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

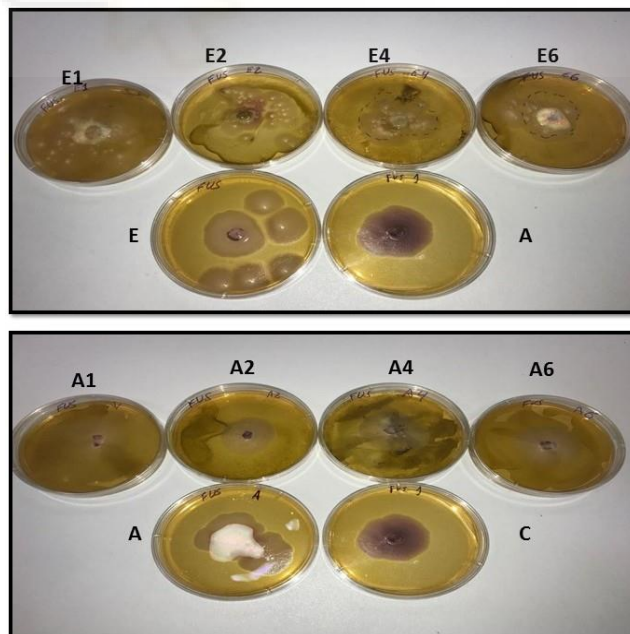


Figura 21: Crecimiento del hongo *Fusarium sp.* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. Ccontrol, E1 *Acacia saligna*- etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Valoración de *Phytophthora* (Figuras 22 a y b y Figura 23): Los extractos de todas las especies utilizadas, tanto en etanol como acetona produjeron inhibición del crecimiento

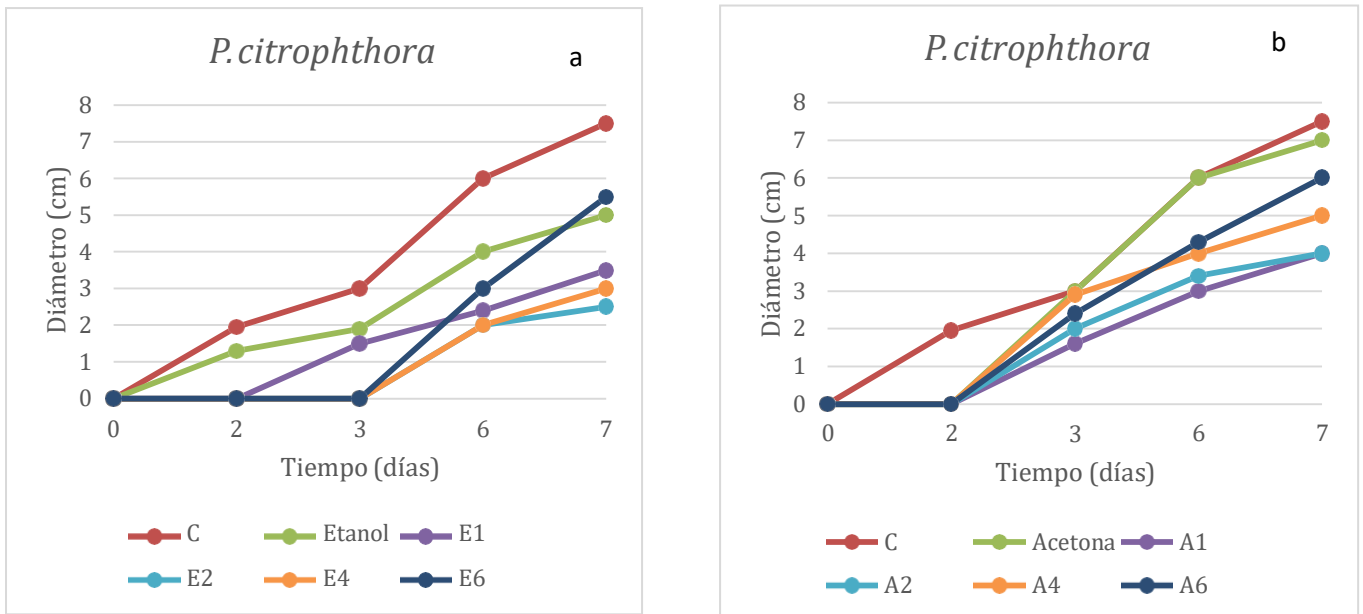


Figura 22 a y b: Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

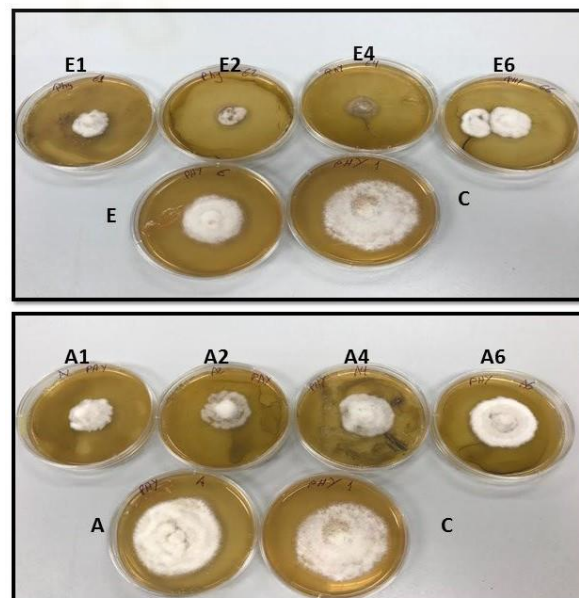


Figura 23: Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, A acetona, E etanol, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Valoración de *Sclerotinia*: (Figuras 24 a y b y Figura 25): Se observó inhibición en los extractos de etanol.

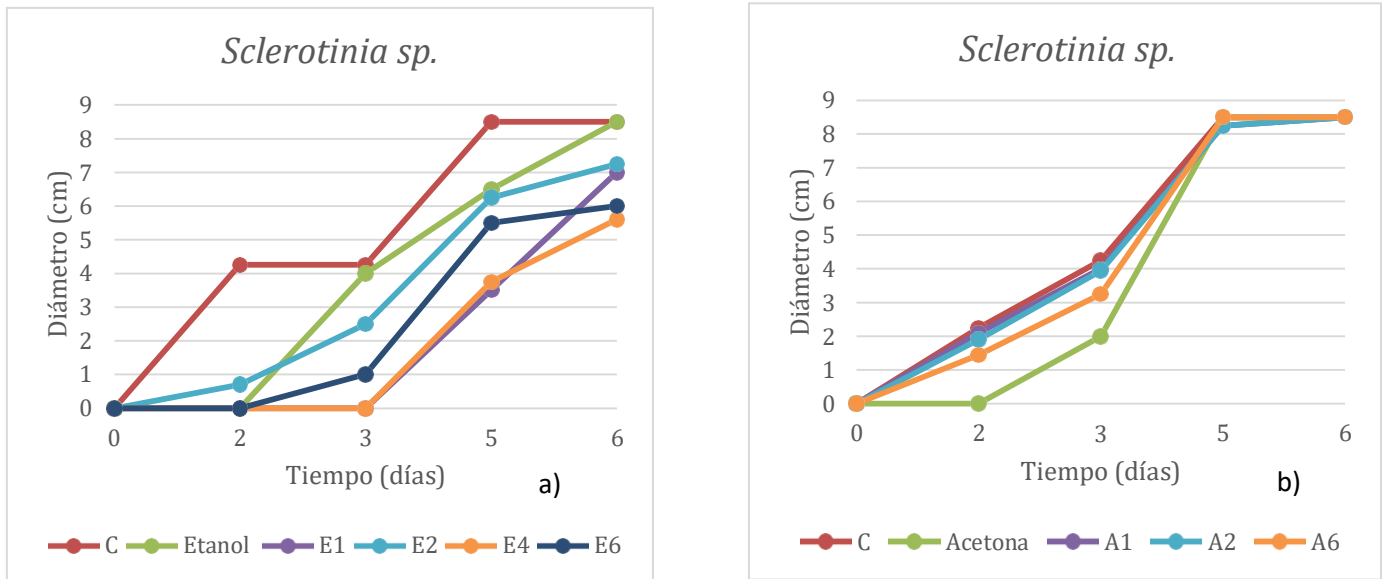


Figura 24 a y b: Crecimiento del hongo *Sclerotinia* sp. en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, E1 *Acacia saligna*- etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona

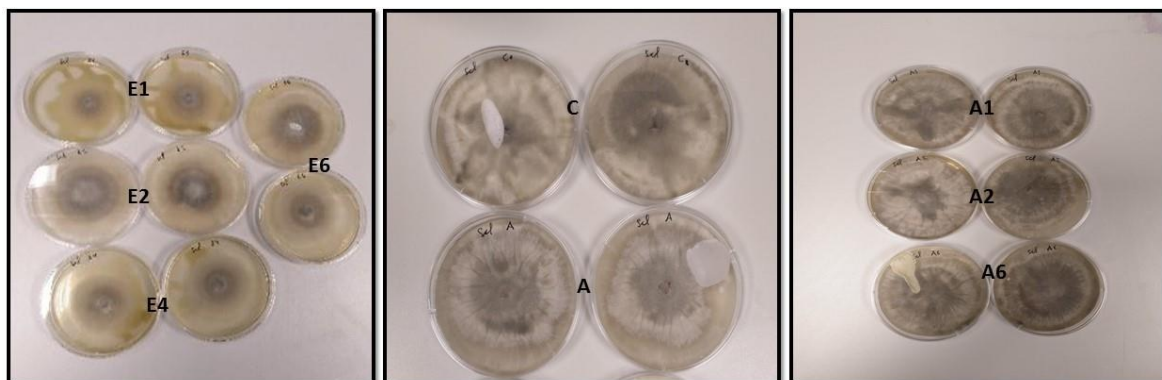


Figura 25: Crecimiento del hongo *Sclerotinia* sp. en medio PDA con diferentes extractos de plantas. C control, A acetona, E1 *Acacia saligna*- etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*- etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control (Tablas 4 y 5):

$$\text{Porcentaje inhibición} = \frac{\text{Diámetro colonia en control} - \text{diámetro colonia en tratamiento}}{\text{diámetro colonia en control}} \times 100$$

Tabla 4: Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con el extractante etanol. E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol

% INHIBICIÓN		<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>Sclerotinia sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>
Día 2	Etanol	0	0	43	37	6	33
	E1	0	0	0	50	100	63
	E2	18	0	43	100	39	42
	E4	14	0	39	100	100	22
	E6	19	0	27	100	76	47
Día 4	Etanol	12	0	-	33	24	0
	E1	6	6	-	60	59	41
	E2	12	0	-	67	26	33
	E4	9	0	0	67	56	33
	E6	9	0	11	50	35	54
Día 6	Etanol	0	0	-	33	0	0
	E1	0	0	-	53	18	44
	E2	0	0	0	67	15	29
	E4	0	0	8	60	34	30
	E6	6	0	8	27	29	50

Tabla 5: Porcentaje de inhibición con el extractante acetona. A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*- acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona.

% INHIBICIÓN		<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>Sclerotinia sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>
Día 2	Acetona	3	0	0	0	53	0
	A1	0	5	18	47	6	0
	A2	0	64	18	33	7	0
	A4	0	0	0	3	0	0
	A6	13	0	2	20	24	0
Día 4	Acetona	0	0	0	0	0	0
	A1	0	0	0	50	3	0
	A2	0	40	11	43	3	0
	A4	0	20	11	33	0	0
	A6	21	0	0	28	0	2
Día 6	Acetona	0	0	8	7	0	0
	A1	0	0	23	47	0	2
	A2	0	35	31	47	0	0
	A4	0	6	15	33	0	0
	A6	19	0	15	20	0	7

En la Tabla 4 se observa que los hongos que presentan mayor inhibición a lo largo de los días con el extractante etanol son *Phytophthora*, *Sclerotinia* y *Alternaria*. Cabe destacar que al principio del cultivo se produjo inhibición total en el hongo *P. citrophthora* con los extractos de *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis* y en *Sclerotinia sp.* con los extractos de *Acacia saligna* y *Nicotiana glauca*. El único hongo que no presentó inhibición durante todo el ensayo fue *B. cinerea*.

En la Tabla 5, se observa que el efecto inhibitorio de los extractos en acetona en *Alternaria* apenas era perceptible, en cambio, sí se apreció un importante efecto inhibitorio en *Phytophthora* con el extracto de *Acacia saligna* y *Lantana camara*. En *Botrytis* con el extracto *Lantana camara*, el efecto inhibitorio fue evidente en el transcurso de los días.

Estos resultados demuestran que la cantidad del extracto aplicado, así como el contacto directo con el mismo influye notablemente en la capacidad de inhibición del crecimiento del hongo. Por tanto, se puede afirmar que estas especies de plantas invasoras poseen potencialmente capacidad antifúngica.

4.4. Capacidad antibacteriana de extractos de plantas

En la Figura 26 y Tabla 6 se muestran las medidas de las zonas de inhibición observadas en tres bacterias, producidas por los extractos de plantas.

Los extractos de etanol o acetona no produjeron zona de inhibición para *E.coli* ni *M. luteus*. En *S. epidermidis* se observó una pequeña inhibición en el extractante de etanol de *Ricinus communis* y *Acacia saligna*.

Sin embargo, los extractos metanólicos sí presentaron una clara actividad antibacteriana: *Acacia saligna* y *Ricinus communis* inhibieron a las tres bacterias ensayadas; *Lantana camara* inhibió a *M. luteus* y *S. epidermidis* mientras que *Nicotiana glauca* solo produjo un pequeño halo de inhibición en *S. epidermidis*.

Ricinus communis es una planta tóxica cuya actividad frente a otras bacterias se ha demostrado previamente (Khan y Yadav, 2011). También extractos de *Lantana camara* han demostrado actividad antibacteriana (Cochrane, 1999).

Los controles etanol, acetona y DMSO dieron resultados negativos de inhibición, lo que valida los resultados obtenidos. Además, todos los antibióticos usados como control produjeron zonas de inhibición muy patentes, destacando las de *M. luteus* y las de *S. epidermidis* con cloranfenicol, por lo que puede decirse que son las más sensibles en las condiciones ensayadas. La bacteria que presentó mayor sensibilidad ante los antibióticos

fue *Micrococcus luteus*. En otros trabajos se ha observado también que algunas especies de *Staphylococcus* (como *S. aureus*) son más susceptibles a extractos de plantas que *E. coli* (Subramaian *et al.* 2006, Mostafa *et al.*, 2018). También Cochrane (1999), en un estudio con plantas exóticas de Florida observó que *S. aureus* era la bacteria inhibida por el mayor número de especies de plantas. Parece ser que los extractos de plantas son más efectivos frente a bacterias Gram +, ya que tienen una pared menos compleja que las Gram - como *E. coli*. (Wong, 2015). Esto explicaría el que las plantas sean más susceptibles a enfermedades producidas por bacterias Gram -, y que se hayan encontrado pocos extractos efectivos frente a éstas.

Tabla 6: Diámetro de la zona de inhibición del crecimiento en bacterias producido por extractos de plantas. E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona, M1 *Acacia saligna*-metanol, M2 *Lantana camara*-metanol, M4 *Nicotiana glauca*-metanol, M6 *Ricinus communis*-metanol. Los datos son medias de tres repeticiones \pm desviación típica.

Halo de inhibición (cm)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
E1	0 \pm 0	0 \pm 0	1,1 \pm 0
E2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
E4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
E6	0 \pm 0	0 \pm 0	1,3 \pm 0
A1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
M1	1 \pm 0	1,1 \pm 0,1	1,63 \pm 0,12
M2	0 \pm 0	1,73 \pm 0,23	1,1 \pm 0,12
M4	0 \pm 0	0 \pm 0	0,9 \pm 0
M6	1,5 \pm 0	2,27 \pm 0,06	2,2 \pm 0
Ampicilina	2,7 \pm 0,14	5 \pm 0	3 \pm 0
Amoxicilina	2,2 \pm 0	5 \pm 0	2,7 \pm 0
Cloranfenicol	4 \pm 0	5,75 \pm 0,35	4,5 \pm 0
Etanol	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Acetona	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
DMSO	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

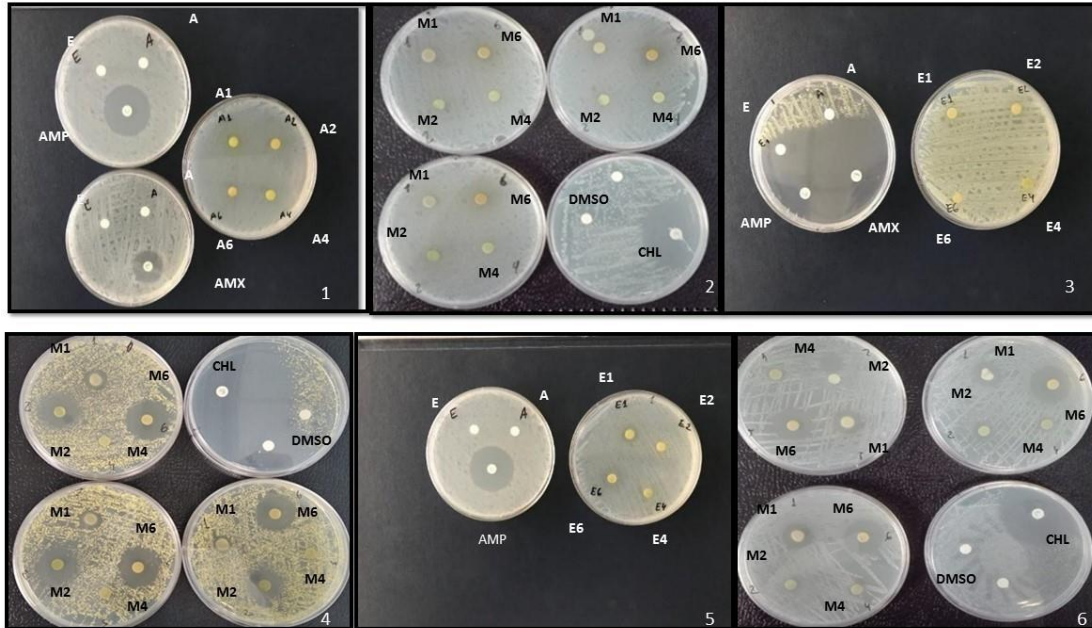


Figura 26: Valoración en la capacidad antibacteriana de extractos en etanol, acetona y metanol frente a 3 especies de bacterias mediante la técnica de difusión de disco en medio AN. 1 *Escherichia coli*, 2 *Escherichia coli*, 3 *Micrococcus luteus*, 4 *Micrococcus luteus*, 5 *Staphylococcus epidermidis*, 6 *Staphylococcus epidermidis*, E etanol, A acetona, DMSO dimetilsulfóxido, E1 *Acacia saligna*-etanol, E2 *Lantana camara*-etanol, E4 *Nicotiana glauca*-etanol, E6 *Ricinus communis*-etanol, A1 *Acacia saligna*-acetona, A2 *Lantana camara*-acetona, A4 *Nicotiana glauca*-acetona, A6 *Ricinus communis*-acetona, M1 *Acacia saligna*-metanol, M2 *Lantana camara*-metanol, M4 *Nicotiana glauca*-metanol, M6 *Ricinus communis*-metanol, AMOX amoxicilina, AMP ampilicina, CHL cloranfenicol.

En este trabajo se ha confirmado que las plantas invasoras podrían producir compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. Como se ha sugerido previamente, son especies que prosperan en un medio donde no han evolucionado gracias a distintos mecanismos, entre los que se encuentran la producción de toxinas y compuestos alelopáticos (Capuccino y Arnason, 2006). Se ha comprobado incluso que la capacidad antimicrobiana de especies invasoras es mayor que la de especies autóctonas, para el mismo género de planta (Anzlovar y Dolenc, 2013).

Sin embargo, no es fácil comprobar experimentalmente la capacidad antimicrobiana de un extracto vegetal, ya que puede depender de diferentes factores. Las propiedades fitoquímicas de un extracto pueden variar según aspectos relacionados con los individuos recolectados, tales como condiciones ecológicas, geográficas, edad de la planta, momento de la recolección (Suwanmanee *et al.*, 2014). Además, hay muchos aspectos metodológicos que afectan a la actividad de un extracto. Este trabajo es un ensayo preliminar para identificar especies con potencial actividad antimicrobiana, pero abre muchos interrogantes para investigaciones futuras.

Se ha comprobado que el solvente utilizado influye en la actividad antimicrobiana. En general, los extractos con metanol reconstituidos con DMSO, además de ser más rentables en cuanto a obtención de cantidad de extracto, fueron más efectivos que los extractos con etanol o acetona, tendencia que coincide con otros trabajos (Subramanian *et al.*, 2006).

Otro factor es la dosis del extracto, y su forma de aplicación a los microorganismos. En los ensayos en los que se aplicó el extracto con elevadas dosis directamente sobre el medio, se observó mayor efecto inhibitorio que cuando estos mismos extractos se aplicaron sobre un disco para permitir su difusión en el medio de cultivo. Por eso, aumentando la concentración o dosis del extracto podrían observarse efectos diferentes. Son necesarios estudios sobre la concentración inhibitoria mínima (MIC, por las siglas en inglés Minimum Inhibitory Concentration) para profundizar sobre este aspecto. Al aplicar el extracto sobre el medio de cultivo, éste entra en contacto directo con las hifas del hongo, lo que favorece su posible acción fungitóxica (Dana *et al.*, 2010). Además, la capacidad de migración en el agar de los posibles compuestos antimicrobianos depende de su naturaleza, polaridad o tamaño de la molécula y esto influye en el tamaño de las zonas o halos de inhibición. Sería interesante por tanto realizar análisis fitoquímicos para determinar la naturaleza de los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

El microorganismo diana es también crítico para detectar esta actividad. En este trabajo, las bacterias, particularmente las Gram +, fueron más susceptibles que los hongos, y entre

estos, los que mostraron más sensibilidad fueron *Phytophthora citrophthora*, *Sclerotinia*, *Fusarium* sp., y en menor medida, *Alternaria*. Se da la circunstancia que *Phytophthora* es un Oomiceto, a diferencia del resto que Eumicetos; tiene, por tanto hifas sin tabiques, con una pared celular más sencilla formada por celulosa, a diferencia de los hongos verdaderos que tienen una pared celular compleja, formada por quitina-glucano. Esto podría influir en su mayor susceptibilidad a compuestos antimicrobianos (alcaloides, terpenoides, fenoles, taninos, etc) que interaccionan con componentes de la membrana celular microbiana causando su ruptura y posterior muerte celular. Los hongos más resistentes, *Aspergillus niger* y *Botrytis* son hongos de paredes celulares gruesas y pigmentadas, que producen una enorme cantidad de esporas, y considerados saprófitos oportunistas, con una enorme capacidad de supervivencia, como se ha demostrado en trabajos similares (Rauha *et al.*, 2000).

V. Conclusiones y Proyección futura

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El método de difusión de disco en medio PDA y AN es adecuado para evaluar la capacidad antifúngica y antibacteriana respectivamente de extractos de plantas. Sin embargo, es necesario optimizar la concentración y dosis de aplicación del extracto para visualizar los resultados, particularmente con hongos.
- Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de algunas especies de plantas invasoras. Concretamente:
 - Extractos etanólicos de *Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis* mostraron capacidad antifúngica sobre el crecimiento de los hongos *Alternaria*, *Phytophthora* y *Sclerotinia*, con porcentajes de inhibición entre 30 y 60% con *Nicotiana glauca*.
 - Extractos acetónicos de *Acacia saligna* y *Lantana camara* mostraron capacidad antifúngica con el hongo *Phytophthora*, con porcentajes de inhibición del 47%.
 - Respecto de las bacterias, los extractos metanólicos fueron más efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano que los extractos en etanol o acetona. Concretamente, *Ricinus communis*, *Acacia saligna* y *Lantana camara*, mostraron capacidad antibacteriana sobre *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*. En menor medida, los extractos etanólicos de *Acacia saligna* y *Ricinus communis* inhibieron a *Staphylococcus epidermidis*.

Como perspectivas futuras se plantea:

- Realizar análisis fitoquímicos para determinar la naturaleza de los metabolitos secundarios de los extractos, responsables de la actividad antimicrobiana.
- Optimizar el método de extracción a partir del material vegetal (triturado, tiempo y temperatura de extracción, utilización de otros solventes, concentración, reconstitución).
- Utilizar otros métodos para comprobar la actividad antimicrobiana (técnica de difusión de pozillo, mínima concentración inhibitoria, etc.)
- Ampliar el rango de microorganismos diana a otras especies fúngicas y bacterianas.

VI. Bibliografía

Agrios, G. N. 2005. Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 pp.

Andreu, J., Vilà, M. 2007. Análisis de la gestión de las plantas exóticas en los espacios naturales españoles. *Ecosistemas* 16(3):109-124.

Anzlovar, S., Dolenc, J. 2013. Antibacterial and antifungal activity of aqueous and organic extracts from indigenous and invasive species of goldenrod (*Solidago spp.*) grown in Slovenia. *Phyton* 54 (1). 135-147

Avalos, A. y Perez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (España)* 2(3):119-145.

Bauer, A.W. 1966. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4):493-496.

Callaway, R. M., Aschehoug, E. T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science* 290: 521-523.

Cantón, E., Martín, E., Espinel-Ingroff, A. 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología* 15.

Cappuccino, N., Arnason, J.T. 2006. Novel chemistry of invasive exotic plants. *Biology Letters* 2: 189-193.

CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard document M38-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- CLSI. 2010. Method for Antifungal Disk Diffusion susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2015. Performance Standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohrane, C.B. 1999. Antibacterial and antifungal screening of Florida's exotic invasive plant species. En: Florida's Garden of Good and Evil David T. Jones and Brandon W. Gamble (Eds.). South Florida Natural Resources Center.
- Croteau, R., Kutcahn, T. M., Lewis, N.G. 2000. Natural products. En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants .B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones. (Eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.
- Dana, E.D., García de Lomas, J. Sánchez, J. 2010. Effects of the aqueous extracts of *Zygophyllum fabago* on the growth of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* and *Pythium aphanidermatum*. *Weed Biology and Management*, 10: 170- 175.
- Dana, E.D., Sobrino, E., Sanz-Elorza, M. 2004. Plantas invasoras en España: un nuevo problema en las estrategias de conservación. En: *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España: Taxones prioritarios* (eds. A. Bañares et al.), 1007-1027, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España.
- De la Rosa, M., Mosso, O., Ullán, C. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental* 5: 375-402.
- Díaz Dellavalle, P.D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Dalla Riza, M. 2011. Antifungal activity of medical plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* SPP. *Chilean journal of agricultural research* 71(2).
- Ens, E., French k, Bremner, J. 2009 Evidence for allelopathy as a mechanism of community composition change by an invasive exotic shrub, *Chrysanthemoides monilifera spp. rotundata*. *Plant Soil* 316: 125-137.
- Fagúndez, J., Barrada, M. 2007. Plantas invasoras de Galicia. Consellería de Medio Ambiente, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela. 209 pp.
- Harbone, J.B. 1997. Biochemical plant ecology. *Plant Biochemistry*. 503-516.

- IUCN.1999. Especies Invasoras Exóticas, Cuarta Reunión del Órgano Subsidiario de Asesoramiento Científico, Técnico y Tecnológico. International Union for Conservation of Nature. Montreal.
- Khan, J.A., Yadav, K.P., Assessment of Antifungal Properties of *Ricinus communis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences 11: 1-3
- Mack, R. N., Simberloff, D., Lonsdale W. M., Evans. C., M. Clout., Bazzaz F. A. 2000. Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences and control. Ecological Applications 10: 689-710
- Martos, A.I., Martín-Mazuelos, E., Romero, A., Serrano, C., González, T., Almeida, C., Puche B., Cantón, E., Pemán, J., Espinel-Ingroff, A. 2012. Evaluation of disk diffusion method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 73(1):53-6.
- Mdee, L.K., Masoko, P., Eloff, J.N., 2009. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. South African Journal of Botany 75 (2): 375-379.
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., Bakri, M.M. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi Journal of Biological Sciences 25: 361-366.
- Pardo, A.K., Arenas, J.J., Gómez, M., Lora, F.M., Gomez, J.E. 2011. Determination of antifungal activity of extracts of *Lantana camara* against *Candida* spp. Infectio, 15 (4): 235-242
- Pyšek, P., Richardson, D.M., 2010. Invasive species, environmental change and management, and health. Ann Rev Env Resources 35:25-55.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology, 56 (1): 3-12
- Sanz, M., Dana, E., Sobrino, E. 2004. Las especies invasoras. En *Plantas Alóctonas Invasoras en España* (pp.50,108,208,258) Madrid: Ministerio de Medio Ambiente.
- Sanz-Elorza, M., Sobrino, E., Dana, E.D. 2001. Aproximación al listado de plantas alóctonas invasoras reales y potenciales en España, 22: 121-131.
- Strack, D. 1997. Phenolic Metabolism. Plant biochemistry, pp. 388-416.

- Subramanian, S., D.S. Kumar, P. Arulselvan and G.P. Senthilkumar, 2006. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of ethanolic extract of *Aloe vera* leaf gel. J. Plant Sci., 1: 348-355.
- Suwanmanee, S., Kitisin, T., Luplertlop, N. 2014 *In Vitro* Screening of 10 Edible Thai Plants for Potential Antifungal Properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2014: 1-7 b.
- Vélez, P. A., Camargo, C. Y. 2008. Comportamiento aerodinámico y viabilidad de las partículas biológicas. Re´takvn 1(1):44-56.
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola- Vargas, V. M., Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia: 68-75.
- Wong, K.Y., Vikram, P., Chiruvella, K.K., Mohammed, A. 2015. Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria* sps (Rubiaceae). Journal of King Saud University - Science, 27 (4): 302-311.

