

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS DE PLANTAS INVASORAS**

**(*Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum*
y *Sophora japonica*)**



Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Elche

Junio 2024

Autora: Soriano Grimaltos, Emma

Tutora: Díaz Espejo, Gisela

Modalidad: Experimental

Departamento: Biología Aplicada. Área Botánica

COIR: 240326025706

Contenido

Resumen	6
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1 Síntesis de compuestos fitoquímicos en plantas invasoras.....	7
1.2 Oportunidad de las plantas invasoras como fuente de compuestos bioactivos antimicrobianos	8
1.3 Antecedentes y objetivos.....	8
2. Metodología	10
2.1 Especies vegetales utilizadas.....	10
2.2 Recolección y preparación de los extractos	12
2.3 Esterilización de los extractos.....	14
2.4 Preparación de los medios de cultivo.....	15
2.5. Microorganismos diana utilizados.....	15
2.6 Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados	17
3. ENSAYOS.....	18
3.1 Evaluación de la actividad antifúngica in vitro mediante la técnica de difusión en disco.....	18
3.2 Evaluación de la actividad antifúngica in vitro por contacto directo con el extracto	19
3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro mediante técnica de difusión en disco.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Rendimiento de los extractos	22
4.2 Actividad antifúngica de los extractos vegetales.....	23
4.3 Inhibición del crecimiento fúngico por contacto directo con los extractos	25
4.4 Actividad antibacteriana de los extractos vegetales.....	30
5. Conclusiones y perspectivas futuras	37
Bibliografía.....	38

Tablas

Tabla 1. Recopilación bibliográfica sobre la actividad de plantas invasoras frente a diversos hongos y bacterias.....	9
Tabla 2. Localidad, fecha de recolección y hábitat de las especies utilizadas en el estudio	13
Tabla 3. Nombre científico, procedencia y características fundamentales de los hongos diana utilizado.....	17
Tabla 4. Nombre científico, procedencia y características fundamentales de las bacterias diana utilizadas	17
Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con los extractos vegetales. El número representa la especie vegetal: 1 (<i>Heliotropium curassavicum</i>), 2 (<i>Myoporum laetum</i>), 3 (hojas de <i>Sophora japonica</i>), 4 (frutos de <i>Sophora japonica</i>).....	30
Tabla 6. Resumen de efectos por parte de los extractos vegetales sin diferenciación de método o extractante.....	34

Figuras

Figura 1. <i>Heliotropium curassavicum</i> . Vista superior de la planta representada en la izquierda. Detalle de la inflorescencia representada en la derecha. Fuente: G. Díaz. ..	10
Figura 2. <i>Myoporum laetum</i> . Detalle flor y fruto color púrpura a la izquierda. Fuentes: G. Díaz (izquierda), Ans Gorter (derecha), iNaturalist España (s.f.).....	11
Figura 3. <i>Sophora japonica</i> . A la izquierda, un ejemplo de su uso en jardinería urbana. A la derecha, detalle del fruto maduro de coloración rojiza e inmaduro de color verde. Fuente: César Fernández González, iNaturalist España (s.f.) (izquierda) y G. Díaz (derecha).....	12
Figura 4. Extractantes empleados para la obtención del extracto vegetal de plantas invasoras. Acetona, Etanol y Metanol (de izquierda a derecha).	13
Figura 5. Detalles del proceso de obtención de los extractos vegetales. Tubos en agitación (1); Proceso de centrifugado (2); Evaporación para la eliminación del extractante (3).....	14
Figura 6. Agar nutritivo (AN), medio de cultivo usado en los ensayos con bacterias (izquierda). Patata Dextrosa Agar (PDA), medio de cultivo usado en los ensayos con hongos (derecha).	15
Figura 7. Colocación de los discos de papel Whatman impregnados con el extracto, sobre las placas Petri.	19
Figura 8. Vista general de la cabina de flujo laminar con los extractos depositados sobre las placas Petri y dejándose secar (izquierda) y colocación de la porción del cultivo del hongo mediante bisturí (derecha).	20

Figura 9. Rendimiento de los extractos con diferentes extractantes. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona y M(metanol)). 22

Figura 10. Grado de inhibición de *Aspergillus niger* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona y M (metanol). Como control positivo se ha utilizado nistatina (Nis)..... 23

Figura 11. Grado de inhibición de *Aspergillus niger* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol). 23

Figura 12. Grado de inhibición de *Fusarium* sp. tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona y M (metanol). Como control positivo se ha utilizado nistatina (Nis). 24

Figura 13. Grado de inhibición de *Fusarium* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona). 24

Figura 14. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Aspergillus niger* en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 7 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona y M (metanol)). 26

Figura 15. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 10 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol). 27

Figura 16. Colonias de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA con extractos de plantas invasoras a los 10 días de inicio del cultivo. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol)..... 28

Figura 17. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Fusarium* sp. en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 10 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol)..... 28

Figura 18. Colonias de *Fusarium* en medio PDA con extractos de plantas invasoras a los 7 días de inicio del cultivo. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol)..... 29

Figura 19. Diámetro de la zona de inhibición de *Escherichia coli* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol). 31

Figura 20. Diámetro de la zona de inhibición de *Micrococcus luteus* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol). 32

Figura 21. Cultivos de *Micrococcus luteus* en medio AN. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol.)..... 32

Figura 22. Diámetro de la zona de inhibición de *Staphylococcus epidermidis* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol). 33

Figura 23. Cultivos de *Staphylococcus epidermidis* en medio AN. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol)..... 33

Resumen

La síntesis de compuestos con capacidad fitoquímica en plantas invasoras destaca como mecanismo clave en la capacidad invasiva de estas especies. Estos compuestos, con potencial antimicrobiano, ofrecen una alternativa prometedora frente a la creciente resistencia a los antibióticos, además de promover una agricultura más ecológica.

En el presente estudio se ha analizado la capacidad antibacteriana y antifúngica de tres especies invasoras: *Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum* y *Sophora japonica*. Para ello, se obtuvieron los extractos mediante extractantes como etanol, acetona y metanol, y se examinó su potencial antimicrobiano frente a tres bacterias (*Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*) y tres hongos (*Fusarium* sp., *Phytophthora citrophthora* y *Aspergillus niger*).

En definitiva, los extractos que mejores resultados proporcionaron fueron *Myoporum laetum* y los frutos de *Sophora japonica*. *Heliotropium curassavicum* y hojas de *Sophora japonica* también detuvieron el desarrollo de las colonias, pero en menor medida.

Palabras clave: plantas invasoras, extractos, antimicrobiano, antifúngico, extractantes, compuestos fitoquímicos.

Abstract

The synthesis of compounds with phytochemical capacity in invasive plants highlights the invasive capacity of these species as a key mechanism. These compounds, with antimicrobial potential, offer a promising alternative to growing antibiotic resistance, as well as promoting greener agriculture.

In the present study, the antibacterial and antifungal capacity of three invasive species has been analyzed: *Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum* and *Sophora japonica*. To this end, extracts were obtained using extractants such as ethanol, acetone and methanol, and their antimicrobial potential against three bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*) and three fungi (*Fusarium* sp., *Phytophthora citrophthora* and *Aspergillus niger*) was examined.

In short, the extracts that had the best results were provided by *Myoporum laetum* and the fruits of *Sophora japonica*. *Heliotropium cum* and leaves of *Sophora japonica* also stopped the development of colonies, but to a lesser extent.

Key words: invasive plants, extracts, antimicrobial, antifungal, extractants, phytochemical compounds.

1. Introducción

1.1 Síntesis de compuestos fitoquímicos en plantas invasoras

Durante milenios los agentes transportadores de semillas habían sido únicamente elementos bióticos y abióticos de la naturaleza, como el viento, las corrientes oceánicas o los animales. Hoy en día, en un mundo cada vez más interconectado, donde los vínculos a escala mundial son imprescindibles y progresivamente más rápidos, la acción humana, ha provocado un aumento exponencial en la introducción de especies fuera de su área de distribución nativa (Fan y Marston, 2009), denominadas especies exóticas. Tras su introducción, para que una especie exótica se convierta en invasora deberá superar una serie de fronteras ambientales y reproductivas. Así, se consideran especies exóticas invasoras (EEI) aquellos organismos (plantas, animales, patógenos y otros organismos) alóctonos en un ecosistema determinado que pueden causar perjuicios económicos, ambientales o afectar negativamente a la salud humana (Convenio de Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica-CBD, 2007). Para ello, estas especies poseen un conjunto de mecanismos de carácter invasivo, entre los cuales destaca la alelopatía (Gioria et al., 2023).

La definición más ampliamente reconocida proviene de la Sociedad Internacional de Alelopatía (Macías et al., 2020). Este enfoque propone el término "alelopatía" para abordar el estudio de cualquier proceso en el que metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos.

Además, La "hipótesis de las nuevas armas" explica cómo el éxito de la invasión está determinado por las armas bioquímicas de las plantas (Qu et al., 2021). Las "armas" mencionadas son exudados de raíces fitotóxicos y/o antimicrobianos que inhiben directamente el crecimiento de las plantas nativas o de los microorganismos asociados y promueven nuevas interacciones microbianas entre la planta y el suelo.

En este sentido, son numerosos los trabajos que constatan la producción de fitoquímicos en especies invasoras (Mohamed y Omer, 2009; He et al., 2016; Si et al., 2016; Cha et al., 2017; Ihtesham et al. 2019; Pothiraj et al., 2021).

1.2. Oportunidad de las plantas invasoras como fuente de compuestos bioactivos antimicrobianos

En los últimos años, informes elaborados por la Organización Mundial de La Salud (OMS) han señalado un aumento del 82% en infecciones resistentes, lo que supone una amenaza a nivel mundial. Ante tal riesgo, la comunidad científica ha depositado especial interés en la búsqueda de alternativas eficientes (Camacho, 2023). Por lo tanto, los compuestos sintetizados por plantas con potencial antimicrobiano son una excelente opción para abordar la problemática de la creciente resistencia a los antibióticos (Zhu, 2021; Murugaiyan et al., 2022).

Además, es de suma importancia considerar la necesidad progresiva de instaurar un cambio en relación con los pesticidas utilizados en la agricultura, ya que los plaguicidas químicos vigentes representan un impacto ambiental adverso significativo.

La mayoría de los estudios sobre compuestos bioactivos vegetales se basan en especies raras, escasas o incluso en riesgo de extinción, por lo que la obtención de material vegetal resulta difícil. En cambio, las plantas invasoras son muy abundantes localmente, de rápido y vigoroso crecimiento y su erradicación da lugar a grandes cantidades de biomasa. Por tanto, el estudio de actividad antimicrobiana en plantas invasoras supondría aprovechar un problema ambiental para obtener un beneficio ecológico y social (Máximo et al., 2020).

1.3 Antecedentes y objetivos

Este trabajo se enmarca en una investigación más amplia desarrollada en el área de Botánica del Departamento de Biología Aplicada, para investigar la posible actividad antimicrobiana *in vitro* de las especies invasoras con presencia local. Ya que la investigación en España en este tema es muy limitada, se pretende hacer un barrido de las especies con potencialidad biocida. Con el propósito de exponer los hallazgos relevantes, se ha llevado a cabo una recopilación de los resultados previos frente a distintos hongos y bacterias (García, 2019; Pérez, 2019; Díez, 2022, Verdú, 2022; Sanchís, 2023) (tabla 1).

Plantas invasoras	Microorganismos							
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<i>Sclerotinia</i>
<i>Acacia farnesiana</i>	x	x	x	x	x	x	x	n.e.
<i>Acacia saligna</i>		x	x	x			x	x
<i>Caesalpinia gilliesii</i>	x	x	x	x	x	x		n.e.
<i>Carpobrotus edulis</i>			x	x	x		x	n.e.
<i>Eucalyptus globulus</i>	x	x	x		x	x	x	n.e.
<i>Lantana camara</i>		x	x	x			x	x
<i>Mirabilis jalapa</i>	x	x	x	x	x			
<i>Nicotiana glauca</i>				x			x	x
<i>Oxalis pescaprae</i>					x		x	n.e.
<i>Rabinia pseudoacacia</i>		x	x	x	x		x	
<i>Ricinus communis</i>		x	x	x			x	x
<i>Schinus molle</i>			x		x	x	x	n.e.
<i>Schinus terebenthifolius</i>	x	x	x		x	x	x	n.e.
<i>Solanum bonariense</i>		x	x	x	x		x	n.e.
<i>Zygophyllum fabago</i>		x			x		x	n.e.
<i>Ailanthus altissima</i>		x	x	n.e.	x	x	x	n.e.
<i>Araujia sericifera</i>				n.e.				n.e.
<i>Datura innoxia</i>		x	x	n.e.	x	x	x	n.e.

n.e = no evaluado

Tabla 1. Recopilación bibliográfica sobre la actividad de plantas invasoras frente a diversos hongos y bacterias.

De acuerdo con lo expuesto, se plantean los siguientes **objetivos**:

- Objetivo principal: examinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas invasoras.
- Objetivos específicos:
 - Seleccionar las especies invasoras a estudiar y localizarlas en el medio natural.
 - Preparar extractos de las plantas mediante diferentes solventes para análisis y evaluar su rendimiento.
 - Examinar *in vitro* la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos

2. Metodología

2.1 Especies vegetales utilizadas

Las tres especies en la que se centra este estudio son: *Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum* y *Sophora japonica*, incluidas en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (CEEEI, 2023) y en el Atlas de Plantas Invasoras de España (Sanz-Elorza et al., 2004), de donde se ha obtenido la siguiente información. La información taxonómica y el área geográfica de origen se ha obtenido de IPNI (2024).

***Heliotropium curassavicum* L. :**

Familia: *Boraginaceae*

Origen: Australia, Hawái y América tropical y subtropical

Tipo biológico: caméfito reptante. Planta sufruticosa, con tallos flexuosos de hasta 70 cm y hojas pequeñas de variada morfología (desde forma espatulada hasta obtusa). Presenta inflorescencias en forma de racimo curvado con flores blancas con sépalos de 1-2 mm (figura 1). Florece que junio a octubre.

Actualmente, en España se extiende a lo largo de toda la zona del mediterráneo, Baleares y Canarias, probablemente debido a su naturaleza termófila. Se puede encontrar en suelos salobres y perturbados en zonas costeras, y no parece causar problemas de conservación (Sanz-Elorza et al., 2004). Se considera una planta tóxica.



Figura 1. *Heliotropium curassavicum*. Vista superior de la planta representada en la izquierda. Detalle de la inflorescencia representada en la derecha. Fuente: G. Díaz

***Myoporum laetum* G.Forst. (Siempreverde)**

Familia: *Scrophulariaceae*

Origen: Nueva Zelanda

Tipo biológico: Fanerófito. Arbusto perenne de hasta 8 m, con hojas alternas lanceoladas, elípticas u obovadas y carnosas. Inflorescencias densas con flores blancas, que florece a finales de invierno o principios de primavera y presenta unos frutos de 7-10x4-5 mm, de color púrpura oscuro (figura 2).

Existe cierta controversia taxonómica en relación con las especies pertenecientes al género *Myoporum*. Mientras que algunos especialistas argumentan que *M. acuminatum* y *M. tenuifolium* son equivalentes a *M. laetum* (Castroviejo, 1986-2012), otros defienden la idea de que deberían ser tratadas como especies independientes (Chinnock, 2007, IPNI 2024)). No obstante, por lo que respecta al Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras, se reconocen estas sinonimias con *M. laetum* Forst., Fl. Ins. Austr. 44, 1786.

Se trata de un arbusto usado con fines ornamentales, debido principalmente a su resistencia a la sequía. De forma invasiva, en nuestro país suele ocupar áreas litorales con alta exposición solar Andalucía, Cataluña, Valencia, Canarias, Baleares, el litoral gallego y la región de Murcia. Además, se considera una planta tóxica para el ganado pro provocar problemas hepáticos.



Figura 2. *Myoporum laetum*. Detalle flor y fruto color púrpura a la izquierda. Fuentes: G. Díaz (izquierda), Ans Gorter (derecha), iNaturalist España (s.f.)

***Sophora japonica* L. (= *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott) (Árbol pagoda)**

Familia: *Fabaceaceae*

Origen: Centro y sur de China. El nombre de esta especie, conocida como *Sophora japonica*, puede llevar a confusión ya que la planta no procede del Japón, sino de China y Corea.

Tipo biológico: macrofanerófito caducifolio. Es un árbol caducifolio, con altura de hasta 25 m y tronco de corteza rugosa y parda. Sus hojas son pecioladas y posee

inflorescencias en panícula muy ramificadas, con flores amariposadas de color blanco amarillento y frutos en lomento de color rojizo en la madurez (figura 3).

Su floración estival y su capacidad para resistir temperaturas extremas y ambientes con mala calidad del aire, lo convierte en un árbol ideal para ser empleado en jardinería urbana. Tanto por su uso en zonas metropolitanas como la resistencia a condiciones extremas, convierten a *S. japonica* en una especie alóctona invasora en varios continentes. En España, concretamente, aparece naturalizada tanto en vías como calles de hasta 10 provincias del país, incluidas Valencia y Murcia. Presenta compuestos tóxicos, perjudiciales para la fauna herbívora. Quizás, por la misma razón, bacterias y hongos difícilmente pueden atacarlo (Sanz-Elorza et al., 2004).



Figura 3. *Sophora japonica*. A la izquierda, un ejemplo de su uso en jardinería urbana. A la derecha, detalle del fruto maduro de coloración rojiza e inmaduro de color verde. Fuente: César Fernández González, iNaturalist España (s.f.) (izquierda) y G. Díaz (derecha)

2.2 Recolección y preparación de los extractos

- **Recolección y preparación del material vegetal:**

Con el fin de simplificar la identificación de cada especie en las diversas fases del estudio, asignamos un número de registro de cada muestra: Hojas de (1) *Heliotropium curassavicum*, (2) *Myoporum laetum*, (3) *Sophora japonica* y (4) frutos de *Sophora japonica*.

Se realizaron diversas salidas de campo con el fin de localizar las especies objeto de estudio. La recolección del material vegetal se realizó durante los meses de octubre y diciembre. Para cada especie se seleccionaron al menos 3 individuos sanos y se recogieron hojas, y en su caso frutos de tres partes de la planta (zona basal, media y superior).

Nombre científico	Numero de registro	Localidad de recolección	Coordenadas	Hábitat	Fecha de recolección
<i>Heliotropium curassavicum</i>	1	Parque natural de El Hondo, Elche	38,1875769 °N, -0,7873088°O	Saladar	27/10/2023
<i>Myoporum laetum</i>	2	La Zenia, Orihuela, Alicante	37,9274720 °N, -0,7218233 °O	Jardín público	13/11/2023
<i>Sophora japonica</i> (hojas y frutos)	3 - Hojas 4 - Frutos	La Ñora, Murcia	37,9944070 °N, -1,1916777°O	Jardín público	16/12/2023

Tabla 2. Localidad, fecha de recolección y hábitat de las especies utilizadas en el estudio

El material fresco se almacenó en bolsas de papel y en un plazo de aproximadamente 24h se procedió a enjuagarlo con agua destilada. A continuación, se extendieron sobre papel de filtro y se dejaron secar en una estufa a temperatura inferior a 40°C, para evitar la posible degradación de compuestos. Posteriormente, se separaron las hojas del tallo, y también el fruto en el caso de *S. japonica* y se trituró en un molinillo marca Braun® hasta conseguir una especie de polvo fino suficientemente homogéneo. Una vez molida cada muestra, se almacenaron en botes rotulados en oscuridad.

- **Preparación de los extractos:**

Se emplearon tres extractantes: Etanol de la marca J.T.Baker® 99.5%, Acetona marca Applichem PANREAC al 99% y Metanol Applichem PANREAC al 90% (figura 4).

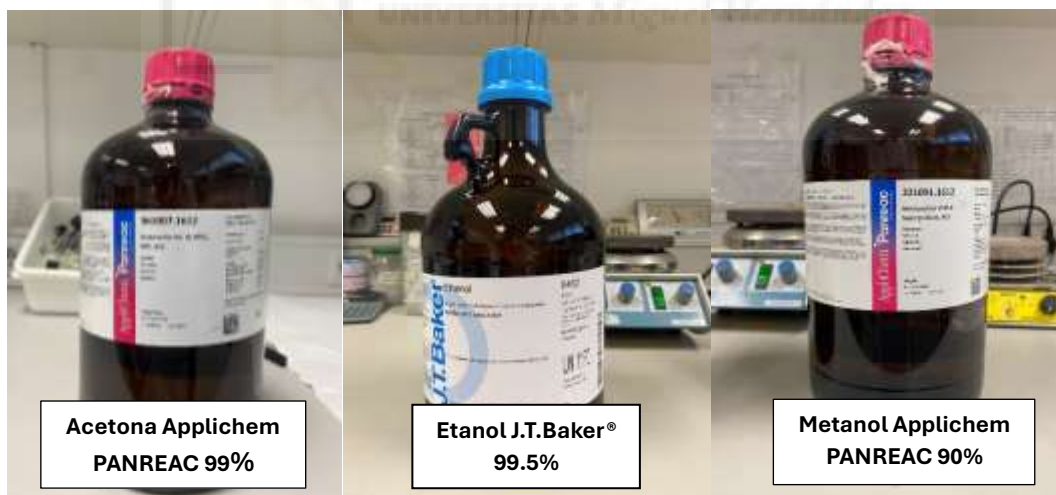


Figura 4. Extractantes empleados para la obtención del extracto vegetal de plantas invasoras. Acetona, Etanol y Metanol (de izquierda a derecha).

Para preparar los extractos, se utilizaron 3 gramos de muestra vegetal junto con 30 mL de extractante (concentración 1:10 peso:volumen) que se colocaron en tubos de plástico de 50 cc. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio para protegerlos de la luz y se mantuvieron en un agitador VWR® durante 24 horas (figura 5).

Posteriormente, se centrifugaron utilizando una centrifuga modelo Heraeus Labofuge 400 durante 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante fue decantado en tubos limpios previamente pesados para obtener el rendimiento de la extracción.

Con el fin de eliminar el extractante, los tubos fueron dispuestos bajo un chorro de aire en una campana extractora a temperatura ambiente hasta que se evaporara por completo. Luego, los extractos fueron pesados nuevamente para calcular el porcentaje de rendimiento utilizando la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso residuo}}{\text{Peso seco original del material vegetal}} \right) \times 100$$

Para la reconstitución de los extractos, se utilizó etanol para aquellos extraídos con etanol, acetona para los extraídos con acetona, y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) para los extraídos con metanol, con el objetivo de limitar su toxicidad. Se preparó una solución stock de 50 mg/mL, la cual se conservó a 4°C y en oscuridad hasta su uso.



Figura 5. Detalles del proceso de obtención de los extractos vegetales. Tubos en agitación (1); Proceso de centrifugado (2); Evaporación para la eliminación del extractante (3).

2.3 Esterilización de los extractos

Los extractos se esterilizan mediante filtros de membrana de acetato de celulosa estériles SCA grade, CHM® de 2,5 cm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro. El proceso se realiza en condiciones estériles en cabina de flujo y consiste en tomar el

extracto con jeringa que se inserta en el filtro y se traspasa a tubos de cristal estériles, que se conservaron a 4°C durante los ensayos.

2.4 Preparación de los medios de cultivo

- **Agar Nutritivo (AN) marca CONDA®**

Se emplea como medio de cultivo de bacterias, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una proporción de 23 gramos de medio por litro de agua destilada. Se disuelve mediante el uso de un agitador magnético, se esteriliza en autoclave a 120° durante 20 minutos y se vierten en placas Petri de 9 cm de diámetro (figura 6).

- **Patata Dextrosa Agar (PDA) marca CONDA®**

Se emplea como medio de cultivo para hongos. En este caso, la proporción de preparación es 39 gramos de medio por litro de agua destilada. Igualmente, se disuelve con el agitador magnético, se esteriliza en autoclave a 120° durante 20 minutos y se vierte en placas Petri de 9 cm de diámetro (figura 6).



Figura 6. Agar nutritivo (AN), medio de cultivo usado en los ensayos con bacterias (izquierda). Patata Dextrosa Agar (PDA), medio de cultivo usado en los ensayos con hongos (derecha).

2.5. Microorganismos diana utilizados

Para evaluar la actividad antimicrobiana se seleccionaron como microorganismos diana los hongos *Phytophthora citrophthora*, *Aspergillus niger* y *Fusarium*, no patógenos en humanos y cepas no patógenas de las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*.

Phytophthora, es un género parásito perteneciente al grupo Oomycota, conocido por causar graves enfermedades en los cultivos, ya que presenta inhibidores de proteasa que interfieren con aquellas propias de la planta parasitada y debilitan su respuesta de defensa para permitir su entrada e infección (Trillas y Segarra, 2009). *Phytophthora citrophthora* produce la podredumbre parda en cítricos.

Aspergillus niger es un hongo filamentoso anamórfico (fase asexual). Puede considerarse tanto un saprófito como patógeno oportunista (Métraux et al., 2009). Se caracteriza por actuar como colonizador en múltiples sustratos, que en condiciones de alta humedad y temperatura es capaz de convertirse en parásito invasor, produciendo podredumbres.

Fusarium spp. es un grupo muy complejo de especies y variedades de hongo filamentoso anamórfico (fase asexual) que producen enfermedades sistémicas como marchitamientos o podredumbres en muchos cultivos. *Fusarium oxysporum*, que coloniza tomate y bananas principalmente, puede secretar metabolitos antifúngicos para ser tróficamente superior a otros hongos presentes (Shepherd, 2011).

Staphylococcus epidermidis forma parte de la microbiota de la piel y membranas mucosas humanas, considerada inofensiva, aunque puede producir infecciones hospitalarias de carácter ocasional debido a su capacidad para generar biopelículas. (Otto, 2009).

Micrococcus luteus es una bacteria perteneciente a la familia *Micrococcaceae*, es un tipo de bacteria cocoide, gram positiva, con actividad catalasa y oxidasa. Abunda como saprófita en entornos naturales como suelos, superficie de plantas y recursos hídricos. Generalmente, se considera colonizador habitual de piel humana y mucosa orofaríngea, que puede producir enfermedades como endocarditis, infecciones pulmonares, especialmente en personas con sistema inmunológico débil (Zhu et al., 2021).

Escherichia coli es una enterobacteria que vive en el intestino, ampliamente utilizada en experimentos en laboratorio. Ciertas cepas son consideradas patógenas oportunistas ya que pueden causar enfermedades en huéspedes con sistemas debilitados. Además, esta bacteria sirve como importante indicador de contaminaciones fecales en el monitoreo de la calidad del agua, y puede aparecer en ambientes agrícolas (Jang et al., 2017).

2.6 Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados

- **Hongos:**

Las especies parásitas se obtuvieron de colecciones de cultivo, mientras que los saprófitos/oportunistas se aislaron de alimentos de origen vegetal con muestras de colonización fúngica. Para ello, tras recoger porciones de hifas del hongo, estas se sembraron en placas Petri con medio de cultivo PDA. A continuación, se llevó a incubación durante 3 a 5 días, y posteriormente se aislaron de nuevo y trasladaron a un medio fresco. En todos los casos, se repicaron periódicamente en medio fresco.

Nombre científico	Procedencia	Características
<i>Fusarium sp.</i>	Colección de cultivos de Takii, S.L. Lda. Silvia Miguel	Parásito vascular
<i>Phytophthora citrophthora</i> CECT2353	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia	Parásito vascular
<i>Aspergillus niger</i> UMH18005	Bulbos de <i>Allium cepa</i> (cebolla)	Saprófito Patógeno oportunista

Tabla 3. Nombre científico, procedencia y características fundamentales de los hongos diana utilizados.

- **Bacterias:**

Por razones de seguridad, las cepas bacterianas empleadas son no patogénicas de colección utilizadas para la docencia. Los cultivos, proporcionados por Rocío Valera, se trasladaron a placas Petri con medio de agar nutritivo (AN), se incubaron a 36 °C, repicándose a medio fresco periódicamente y conservándose a 4°C.

Nombre científico	Procedencia	Características
<i>Escherichia coli</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Gram negativa Enterobacteria
<i>Micrococcus luteus</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Gram positiva Saprófito
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Gram positiva Piel y mucosas

Tabla 4. Nombre científico, procedencia y características fundamentales de las bacterias diana utilizadas

3. ENSAYOS

3.1 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* mediante la técnica de difusión en disco.

Se siguió la técnica estandarizada de difusión en disco o método Kirby-Bauer (Bauer, 1996), según los protocolos descritos por el Clinical Laboratory Standard Institute (Cantón et al., 2007; CLSI, 2010), que consiste en detectar la posible inhibición del crecimiento del micelio del hongo alrededor de discos de papel impregnados con el extracto.

El diseño experimental de este ensayo incluye la evaluación de 4 tipos de material vegetal (hojas de *Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum*, *Sophora japonica* y frutos de *Sophora japonica*) tratadas con 3 extractantes (etanol, metanol y acetona), junto con tres controles negativos (etanol, DMSO y acetona) y el antifúngico nistatina como control positivo. En total, 16 tratamientos por 3 hongos (*Aspergillus niger*, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium* sp.), con 3 repeticiones por tratamiento.

El ensayo se realizó en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo descendente, y todo el material utilizado (hisopos, pinzas, tubos, puntas de pipeta, asas, discos de papel, etc.) se esterilizó previamente en autoclave, así como los extractos y controles negativos, por filtración (apartado 2.3).

Por otro lado, se procedió a la preparación del inóculo. En el caso de *Fusarium* y *Phytophthora*, se agregó 5 mL de agua estéril en una placa Petri con un cultivo stock y se recogió con una pipeta, para depositarlo posteriormente en un tubo y agitarlo durante 10-15 segundos con un agitador tipo vórtex de la marca Heidolph. En cuanto a *Aspergillus*, para reducir la hidrofobicidad, se utilizó un tubo con 5 ml de agua y 2 gotas de Tween 20 marca Sigma-Aldrich al que se añadió una pequeña porción de un cultivo stock tomada con un asa de Kolle. Después, se ajustó la turbidez a 0,6 unidades McFarland para *Phytophthora* y 0,4 para *Fusarium* y *Aspergillus* utilizando un densitómetro Biosan DEN-1, añadiendo más agua o inóculo dependido del valor obtenido. Se estima que esto corresponde a un inóculo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias (Cantón et al., 2007; Martos et al., 2012).

La inoculación de las placas consistió en sembrar en césped en tres direcciones con un hisopo estéril impregnado en el inóculo. Los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos se aplicaron sobre discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25 μ l por disco. Asimismo, se impregnaron discos con 25 μ l de los correspondientes controles negativos (etanol, acetona y DMSO); para el control positivo

de nistatina se utilizaron discos estériles precargados con 100 IU, de la marca BioRad®. Los discos se colocaron de forma equidistante a razón de 4 por placa con ayuda de pinzas estériles (figura 7).



Figura 7. Colocación de los discos de papel Whatman impregnados con el extracto, sobre las placas Petri.

Las placas se sometieron a un choque frío a 4°C durante dos horas para permitir la difusión de los compuestos; posteriormente se incubaron en una estufa a 28°C entre 24 y 72 horas, dependiendo de la cepa fúngica.

Finalmente, se midió el halo de inhibición formado alrededor de los discos con una regla milimetrada.

3.2 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* por contacto directo con el extracto

El procedimiento consiste en la aplicación directa de extractos sobre el medio de cultivo y posterior inoculación con el hongo a fin de determinar el efecto sobre el crecimiento del micelio.

En cuanto al diseño experimental se evaluaron cuatro tipos de material vegetal (hojas de *Heliotropium curassavicum*, *Myoporum laetum*, *Sophora japonica* y frutos de *Sophora japonica*), con tres extractantes (etanol, acetona y metanol), cada uno de ellos con sus correspondientes controles negativos (etanol, acetona y DMSO), además de cultivos sin ningún aditivo, como control positivo. Esto supone 16 tratamientos, para tres hongos (*Aspergillus*, *Phytophthora* y *Fusarium*). El ensayo se realizó por duplicado. De modo que se prepararon un total de 96 placas Petri con medio PDA (Patata Dextrosa Agar).

Las condiciones de trabajo se mantuvieron estériles dentro de una cabina de flujo durante todo el proceso, y todos los materiales empleados (pinzas, bisturí, puntas de

pipeta, etc.) se esterilizaron mediante autoclavado. El procedimiento consistió en la aplicación de 600 µl de cada uno de los extractos sobre el centro de cada placa que se extendió desde el centro hacia los bordes con un asa de Drigalski. Las placas se dejaron abiertas hasta que los extractos se secaron completamente, momento en el cual se colocó una porción de aproximadamente 8 mm de un cultivo activo del hongo de al menos 7 días en el centro de la placa, utilizando un sacabocados (figura 8).

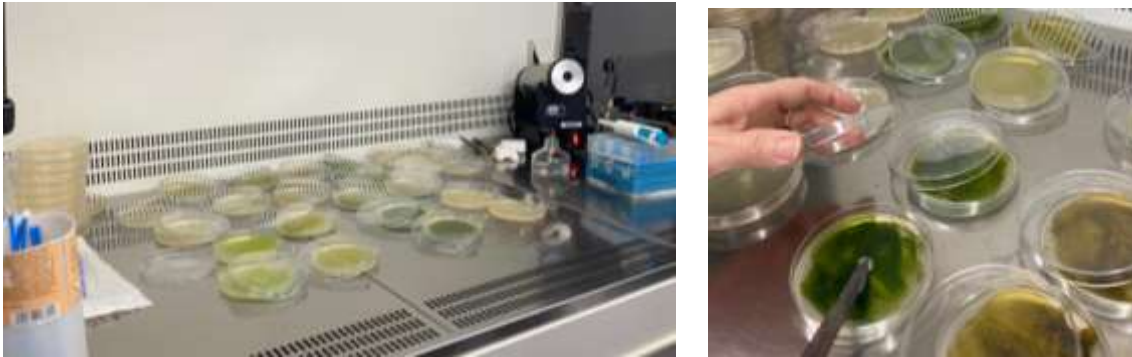


Figura 8. Vista general de la cabina de flujo laminar con los extractos depositados sobre las placas Petri y dejándose secar (izquierda) y colocación de la porción del cultivo del hongo mediante bisturí (derecha).

En el caso de los tratamientos con DMSO, éste se diluyó en agua estéril en una proporción de 40:60, con el fin de evitar posibles efectos inhibitorios del solvente, detectados en algunos ensayos previos. Posteriormente, las placas se incubaron en una estufa a 28 °C durante un período de 7-10 días, hasta que las colonias ocuparon toda la superficie de la placa. Se midió el diámetro de cada colonia con regla milimetrada cada 2-3 días para poder elaborar una curva de crecimiento de los hongos para cada tratamiento. En caso de que se presentaran colonias con formas irregulares, se tomaron al menos dos medidas y se calculó el promedio.

3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* mediante técnica de difusión en disco.

Se empleó la técnica de difusión en disco o método Kirby-Bauer (Bauer, 1996), siguiendo el protocolo M02-A12 establecido por el Clinical Laboratory Standard Institute (Cantón et al, 2007; CLSI, 2018). Este método tiene como objetivo detectar posibles halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de discos impregnados con el extracto

El diseño experimental consiste en la evaluación de cuatro tipos de material vegetal (hojas de *Heliotropium curassavicum*, *Myoporium laetum*, *Sophora japonica* y frutos de

Sophora japonica) utilizando tres extractantes (etanol, acetona y metanol) frente a tres bacterias (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*). Con el propósito de comparar efectos significativos, se incluyeron controles negativos (etanol, metanol y dimetilsulfóxido (DMSO) y como controles positivos se utilizó Ampicilina, Amoxicilina y Cloranfenicol. Esto supone 18 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento, para cada bacteria.

Todo el proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar. Se utilizó como medio de cultivo Agar Nutritivo (AN), apropiado para el crecimiento óptimo de las bacterias. Los materiales empleados fueron esterilizados en autoclave (tubos, puntas de pipeta, asas de siembra, discos de papel Whatman, hisopos pinzas, bisturí, etc.) Los extractos y controles negativos también fueron esterilizados, mediante filtración (apartado 2.3.) Los inóculos bacterianos se prepararon justo antes de su utilización. Para ello, se toma una pequeña porción de colonia bacteriana en cultivo con un asa de Kolle y se transfiere a un tubo estéril con 5 ml de agua esterilizada. se agita durante 10-15 segundos utilizando un agitador tipo vórtex de la marca Heidolph. La turbidez de la suspensión se ajusta a 0,5 unidades McFarland utilizando un densímetro Biosan DEN-1, lo que corresponde a un inóculo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias (Cantón et al., 2007; Martos et al., 2012).

Para inocular las placas, se impregna un hisopo estéril en el inóculo, procurando eliminar el exceso de sobrenadante mediante presión contra la pared del tubo. y se siembra en césped en tres direcciones.

Seguidamente, se aplican los extractos de los diferentes tratamientos sobre discos de papel Whatman tipo AA de 6 mm de diámetro, a razón de 25 μ l por disco para los controles negativos se impregnan discos con la misma cantidad de los extractantes (etanol, acetona y DMSO); para los controles positivos se emplean discos BioRad® ya impregnados con Amoxicilina (25 μ g), Ampicilina (10 μ g) y Cloranfenicol (30 μ g). Se colocaron 4 discos por placa, de forma equidistante, con ayuda de pinzas estériles.

Con el fin de facilitar la difusión de los extractos, las placas se sometieron a un choque frío de 4°C durante dos horas. Posteriormente, se incuban en una estufa a 37°C durante 24 o 48 horas, según la cepa. Finalmente, se midió el halo de inhibición formado alrededor de los discos con una regla milimetrada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rendimiento de los extractos

Los rendimientos obtenidos en este trabajo son acordes a los valores obtenidos en otros trabajos. Tal y como se observa en la figura 9, los extractos con mayor rendimiento son aquellos obtenidos con metanol, lo cual concuerda con trabajos previos (Mostafa et al., 2018; García, 2019; Pérez, 2019; Díez, 2022, Verdú, 2022; Sanchís, 2023).

En concreto, de entre todos los extractos metílicos destaca el extracto del fruto de *Sophora japonica*, con un rendimiento del 32,17%. Sin embargo, teniendo en cuenta que el extracto de *Heliotropium curassavicum* es del 9,17%, el rango de los extractos tratados con metanol es bastante amplio. Le siguen los extractos etílicos, que oscilan entre 4,75% y 9,17% y en último lugar, los extractos con acetona, que rondan valores entre 3% y 5,75%.

Sin embargo, hay que considerar también otros factores (Eloff, 1998). En su estudio, considera que la acetona es el extractante más apropiado en comparación con el metanol y etanol, debido a sus ventajas como la volatilidad, miscibilidad con disolventes tanto polares como apolares y toxicidad baja.

No ocurre lo mismo con el metanol, conocido por su notable toxicidad, por lo que es habitual reconstituir los extractos y realizar los controles con dimetil sulfóxido (DMSO). Además, la exposición al metanol podría ocultar las propiedades fitoquímicas inhibitorias de los estudiados, siendo el propio metanol el compuesto inhibidor del crecimiento de las colonias.

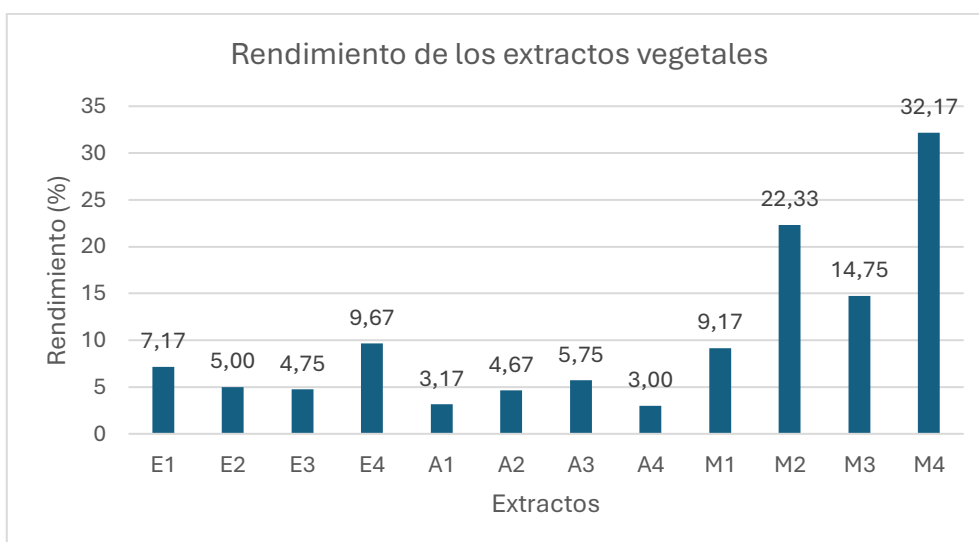


Figura 9. Rendimiento de los extractos con diferentes extractantes. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol).

4.2 Actividad antifúngica de los extractos vegetales

En general, no se obtuvo una inhibición patente del crecimiento del micelio con los extractos en las condiciones y con la metodología de difusión de disco ensayadas. Además, los resultados deben interpretarse con precaución, pues algunos controles mostraron inhibición puntual.

Respecto a *Aspergillus niger*, los extractos con etanol demostraron una ligera actividad inhibidora, donde las zonas de inhibición variaron entre 0,9 y 1,2 cm, mientras que los extractos con acetona y metanol no exhibieron ninguna actividad inhibidora (figura 10 y 11).

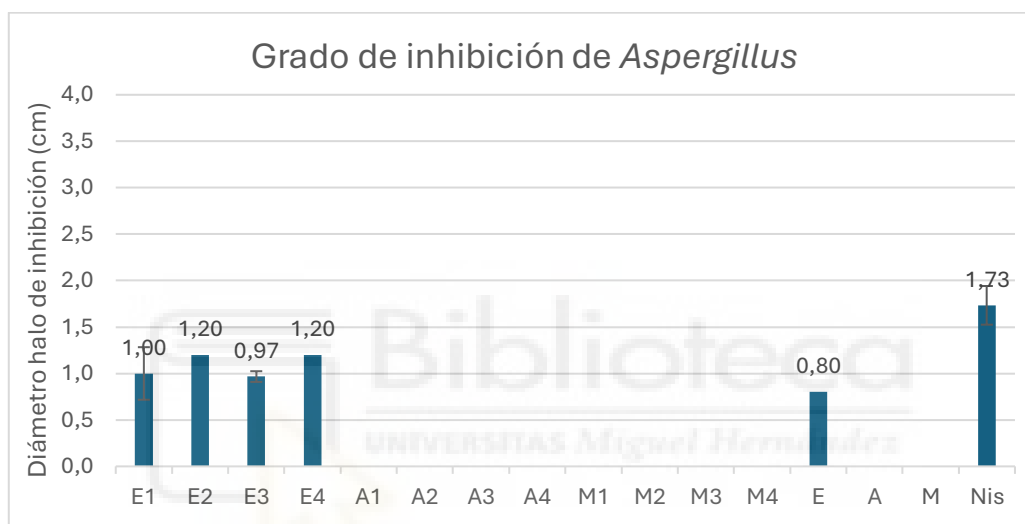


Figura 10. Grado de inhibición de *Aspergillus niger* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol). Como control positivo se ha utilizado nistatina (Nis)

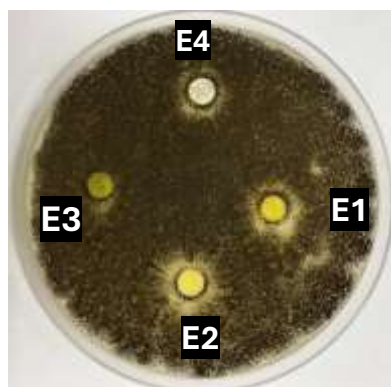


Figura 11. Grado de inhibición de *Aspergillus niger* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol).

En el caso de *Fusarium*, los tratamientos con etanol y con acetona mostraron también una actividad moderada con zonas de inhibición que oscilaron entre 0,9 y 1,9 cm (figura 12 y 13). Siendo los extractos del fruto de *Sophora japonica* con etanol (E4) y el de sus hojas con acetona (A3), aquellos que producen mayor inhibición en *Fusarium*.

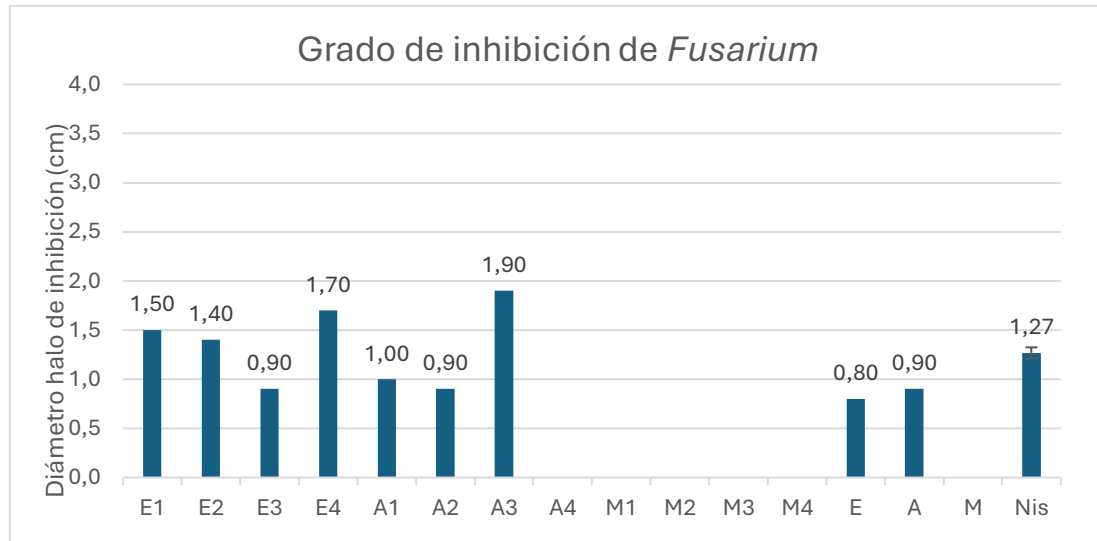


Figura 12. Grado de inhibición de *Fusarium* sp. tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol). Como control positivo se ha utilizado nistatina (Nis).

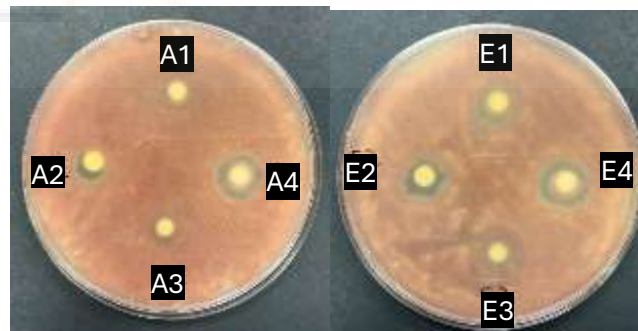


Figura 13. Grado de inhibición de *Fusarium* tras ensayo con técnica de difusión en disco. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona).

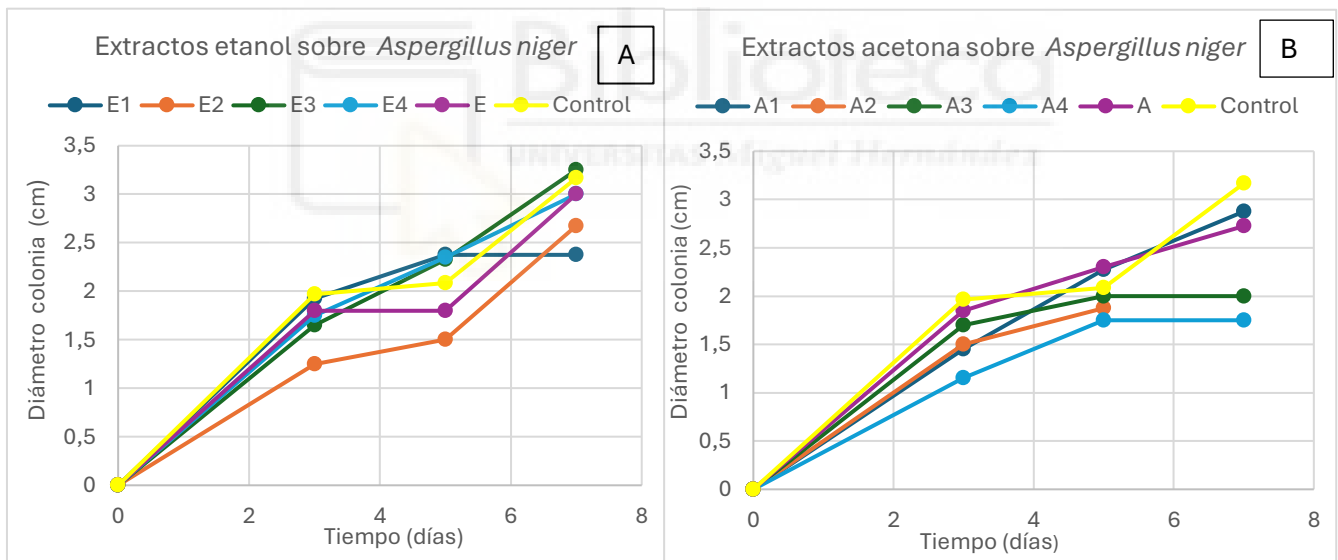
Sin embargo, de *Phytophthora* no se consiguió obtener un crecimiento suficiente para evaluar los efectos, probablemente debido a un problema con el inóculo.

4.3 Inhibición del crecimiento fúngico por contacto directo con los extractos

4.3.1 *Aspergillus niger*

Las características de este hongo en cultivo, con abundancia de conidios que inician de forma muy rápida múltiples colonias dispersas en la placa, hace que sea complicado obtener conclusiones, pues fue difícil obtener una única medida de diámetro de la colonia.

Sin embargo, con mucha prudencia y teniendo en cuenta esta limitación, podemos observar (figura 14) cierta inhibición con los extractos de *Heliotropium curassavicum* en etanol y metanol (E1 y M1), con *Myoporium laetum* (E2, A2, M2) y con los de *Sophora japonica*, usando acetona (A4).



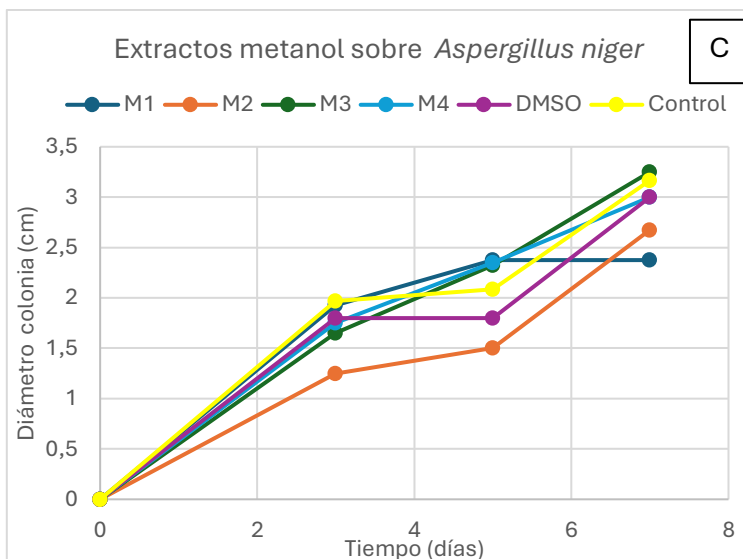


Figura 14. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Aspergillus niger* en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 7 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol).

4.3.2 *Phytophthora citrophthora*

Tras analizar las curvas de crecimiento de *Phytophthora* (figura 15) se puede observar claramente el efecto inhibitorio de algunos extractos. En particular, destacan los extractos de *Myoporium laetum* con etanol y acetona (E2 y A2) y los frutos de *Sophora japonica* con todos los solventes (E4, A4 y M4).

De entre los extractos evaluados, los que mostraron una mayor inhibición fueron A2, obtenido de *Myoporium laetum* usando acetona, y el M4, derivado de los frutos de *Sophora japonica* con metanol.

En todos ellos, se observó un aspecto de la colonia diferente al control, con menor cantidad de hifas aéreas lo que puede interpretarse como un síntoma de estrés en esta especie (figura 16).

Sin embargo, en contra de lo esperado, los extractos de *Heliotropium curassavicum* (E1, A1 y M1) y de las hojas de *Sophora japonica* (E3, A3 y M3) tuvieron un cierto efecto estimulante, con medidas de diámetro de la colonia superiores a los controles, lo que podría deberse a la presencia de nutrientes en estos extractos.

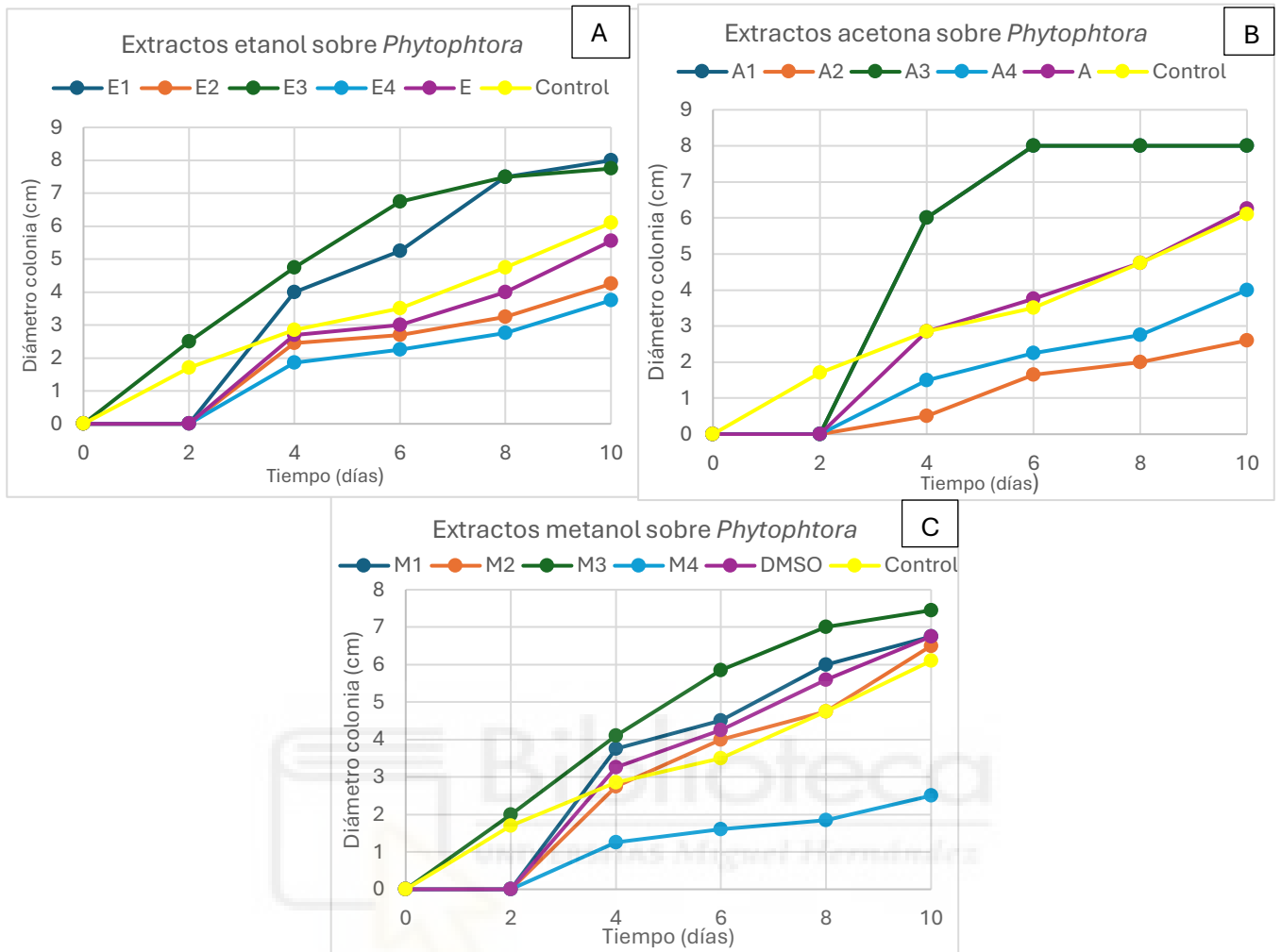


Figura 15. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 10 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol).

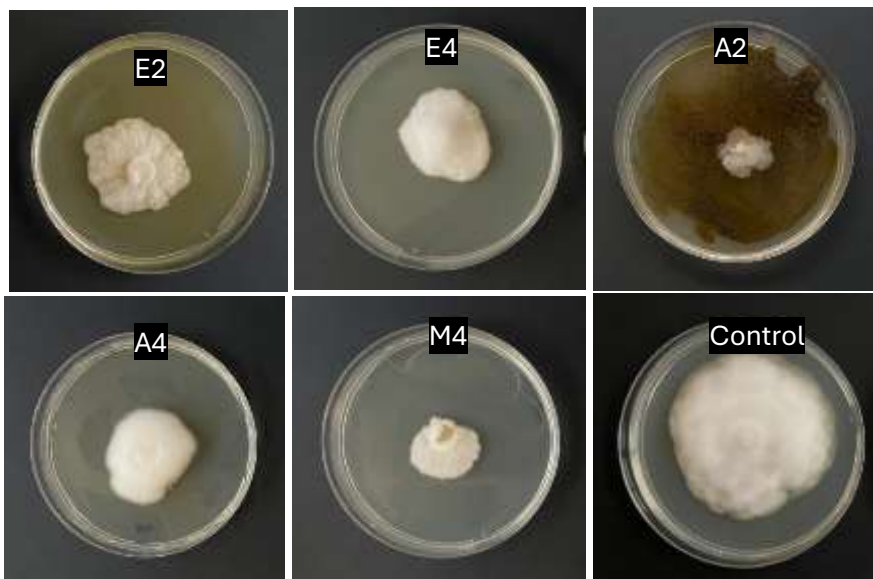


Figura 16. Colonias de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA con extractos de plantas invasoras a los 10 días de inicio del cultivo. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol).

4.3.3 *Fusarium* sp.

En el caso de *Fusarium*, hemos observado (figura 17) resultados de inhibición con la mayoría de los extractos. Específicamente, los extractos derivados de *Myoporum laetum* tratados con etanol y acetona (E2 y A2), inhibieron de forma evidente a *Fusarium* sp. Por otro lado, los extractos derivados de los frutos de *Sophora japonica* utilizando etanol, acetona y metanol (E4, A4 y M4), mostraron una inhibición algo menor.

Los controles de DMSO (dimetilsulfóxido) resultaron tener niveles de inhibición similar a sus extractos, por ello consideramos que su inhibición también se deba al extractante. Sin embargo, observamos diferencias en la coloración de las colonias, lo que implica cierto estrés adicional provocado por el extracto de frutos de *Sophora japonica*.

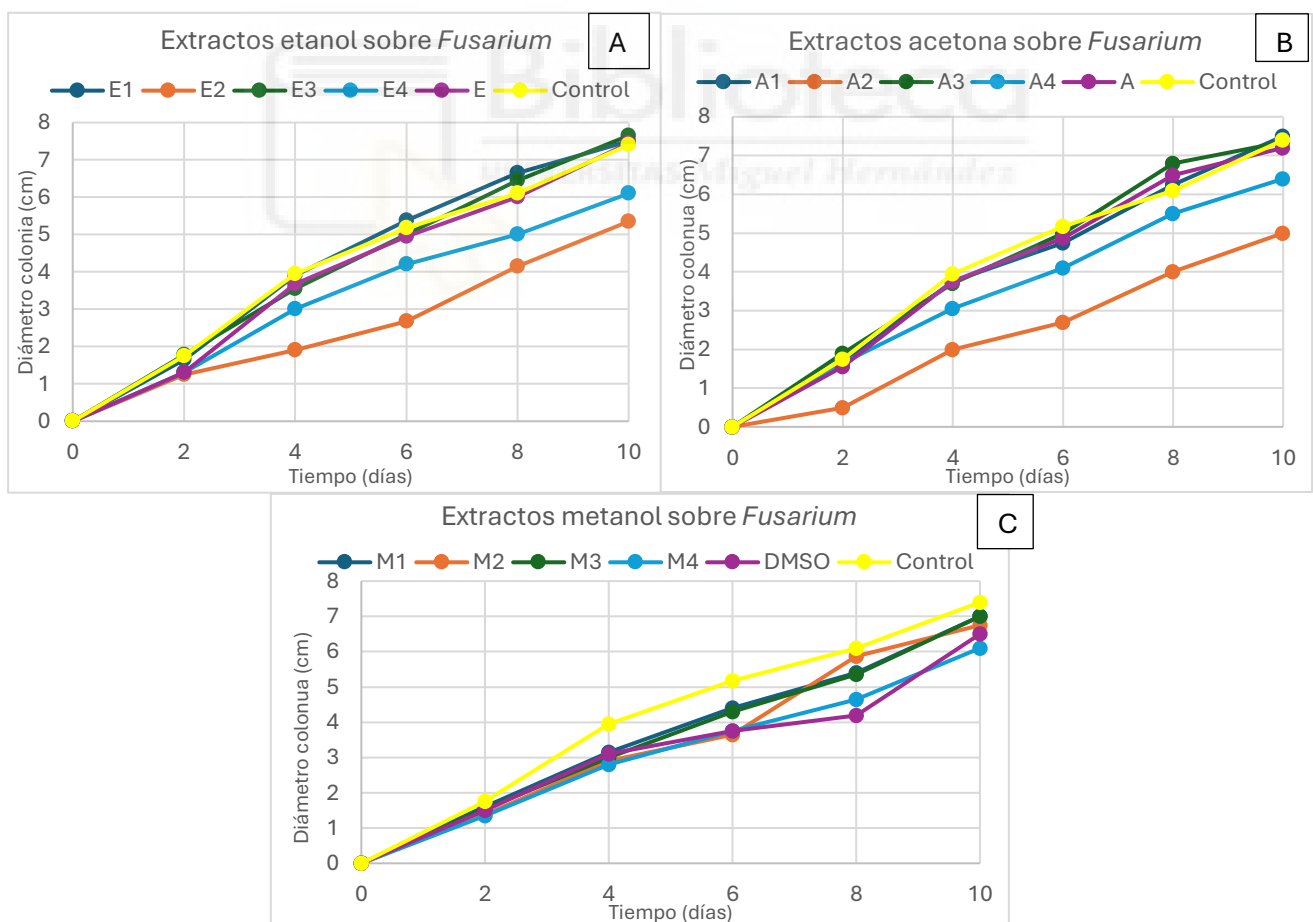


Figura 17. (A, B y C) Crecimiento del micelio de *Fusarium* sp. en medio PDA tratadas con extractos de especies invasoras durante 10 días. Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona) y M (metanol).

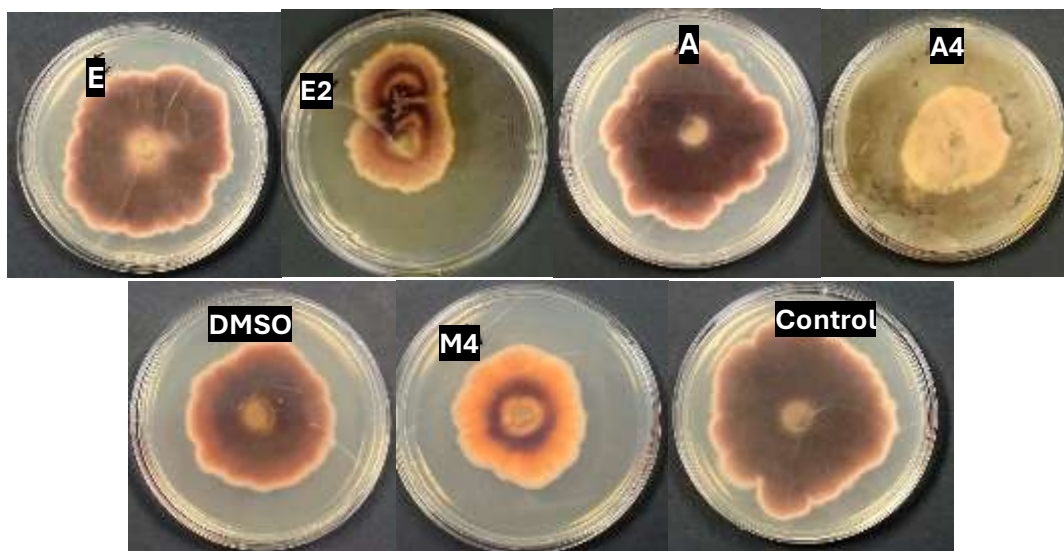


Figura 18. Colonias de *Fusarium* en medio PDA con extractos de plantas invasoras a los 7 días de inicio del cultivo. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol).

4.3.4 Porcentajes de inhibición

Aplicando la siguiente fórmula, se calcularon los porcentajes de inhibición provocada por los extractos

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Diámetro control} - \text{Diámetro extracto}}{\text{Diámetro control}} \cdot 100$$

La tabla 5 muestra que los mayores valores de porcentajes de inhibición corresponden con aquellos extractos que hemos destacado en el análisis de las curvas de crecimiento previas. De este modo, los extractos de *Heliotropium curassavicum* mostraron niveles de inhibición, a los siete días de incubación, con porcentajes que varían entre el 25% para el extracto de etanol (E1) y 37% de metanol (M1) sobre *Aspergillus niger*. El mismo hongo, también fue inhibido en un 37% y 44,7% por los extractos de acetona de hojas y frutos de *Sophora japonica* (A3 y A4), respectivamente. Siendo este último, el extracto más efectivo.

Por otro lado, el extracto de acetona de hojas de *Sophora japonica* (A3), inhibe en mayor medida a *Phytophthora citrophthora*, logrando una reducción del 82% en su crecimiento a los cuatro días de incubación. Además, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium* coinciden en ser ambos, sensibles a la acción de los extractos derivados de *Myoporum laetum* y frutos de *Sophora japonica*. En concreto, destacan el extracto con metanol de los frutos de *Sophora japonica* (M4), que inhibe el crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en un 61%, y el tratado con acetona de *Myoporum laetum* (A2), que detiene crecimiento de *Fusarium* en un 32%.

Tiempo	Extractos	<i>Aspergillus</i> (%)	Tiempo	Extractos	<i>Phytophthora</i> (%)	Tiempo	Extractos	<i>Fusarium</i> (%)	
3	E1	0,8	4	E1	14,0	4	E1	1,3	
	E2	36,5		E2			51,9		
	E3	16,1		E3			10,1		
	E4	11,0		E4			24,1		
	E	8,5		E			7		
	A1	11		A1	82		A1	5,1	
	A2			A2	47		A2	49,4	
	A3			A3	4		A3	6,3	
	A4			A4	56		A4	22,8	
	A	5,9		A	DMSO		5	A	20,3
	M1	8		M1	4		M1	24,3	
	M2	26		M2	56		M2	24,1	
	M3	14		M3	4		M3	29,1	
M4	3	M4	61	M4	21,5				
DMSO	16	DMSO	16	DMSO	2				
7	E1	25	8	E1	32	8	E1	32	
	E2	15,5		E2			42,1	E2	18
	E3	5,3		E3			16	E3	2
	E4	5,3		E4			58	E4	34
	E	9,2		E			42,1	E	10
	A1	37		A1	61		A1	11	
	A2			A2	4		A2	4	
	A3			A3	12		A3	24	
	A4			A4	24		A4	31	
	A	14,0		A	DMSO		9	A	DMSO
	M1	37		M1	9		M1	11	
	M2	21		M2	9		M2	4	
	M3	21		M3	9		M3	12	
M4	27	M4	9	M4	24				
DMSO	9	DMSO	9	DMSO	31				

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con los extractos vegetales. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*).

4.4 Actividad antibacteriana de los extractos vegetales

4.4.1 *Escherichia coli*

Aunque se observó un pequeño halo de inhibición alrededor de los discos con los extractos de etanol (E1, E2, E3 y E4), esta podría atribuirse en parte al solvente utilizado como extractante, ya que se observó similar inhibición en el control correspondiente (figura 19).

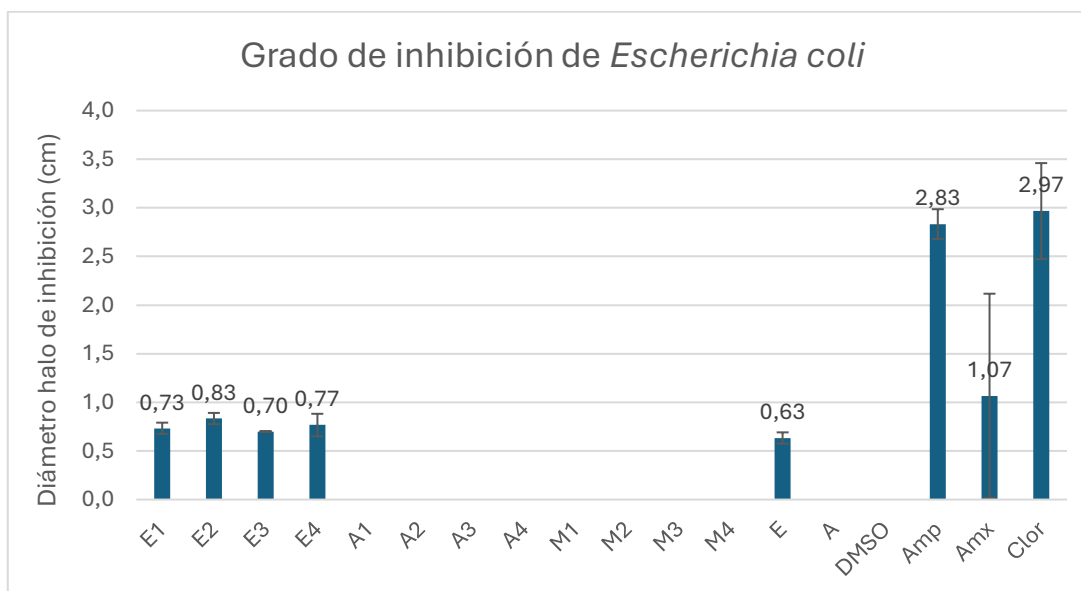


Figura 19. Diámetro de la zona de inhibición de *Escherichia coli* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporum laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol).

4.4.2 *Micrococcus luteus*

A diferencia de *Escherichia coli*, en *Micrococcus luteus* (figura 20 y 21) se observó una inhibición prácticamente generalizada.

Cabe remarcar la capacidad de inhibición que poseen todos los extractos de *Myoporum laetum* (E2, A2 y M2).

Por otro lado, también muestran inhibición, pero en menor medida los extractos con etanol del resto de especies (E1, E3 y E4), así como el extracto de *Heliotropium curassavicum* con acetona (A1) y el de los frutos de *Sophora japonica* con metanol (M4).

En este caso, los controles de acetona, etanol y DMSO no muestran ningún halo de inhibición, así que descartamos que la actividad antibacteriana sea debida a los extractantes.

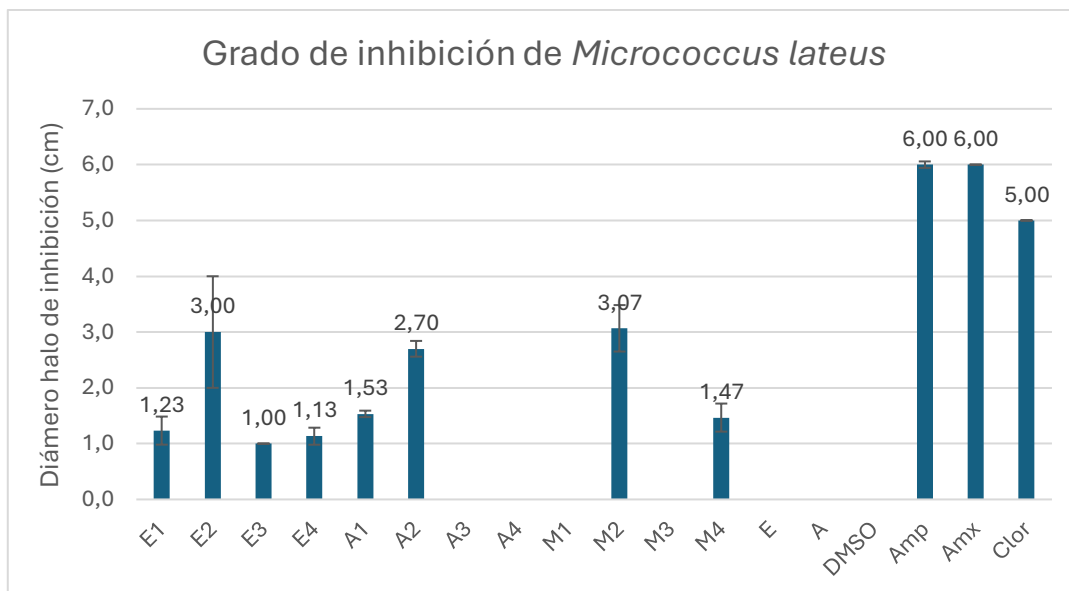


Figura 20. Diámetro de la zona de inhibición de *Micrococcus luteus* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol).



Figura 21. Cultivos de *Micrococcus luteus* en medio AN. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol.)

4.4.3 *Staphylococcus epidermidis*

En este caso (figura 22 y 23), se observa cómo todos los extractos etanólicos muestran cierta inhibición. Sin embargo, aunque solo en parte, esta podría atribuirse al solvente utilizado, ya que el control de etanol también manifiesta actividad inhibitoria. En cualquier caso, el efecto inhibitorio de los extractos se encuentra por encima de los valores del control correspondiente.

Una vez más, *Myoporium laetum* resultó ser la especie que produce mayor halo de inhibición en todos los tratamientos (E2, A2 y M2) siendo el extracto con metanol es el más eficiente.

La bacteria también se muestra sensible a la acción de los extractos con acetona tanto de *Heliotropium curassavicum* (A1) como frutos de *Sophora japonica* (A4). También los extractos con metanol de *Sophora japonica* (M3 y M4), tanto de hojas como de frutos tuvieron efecto inhibitorio.

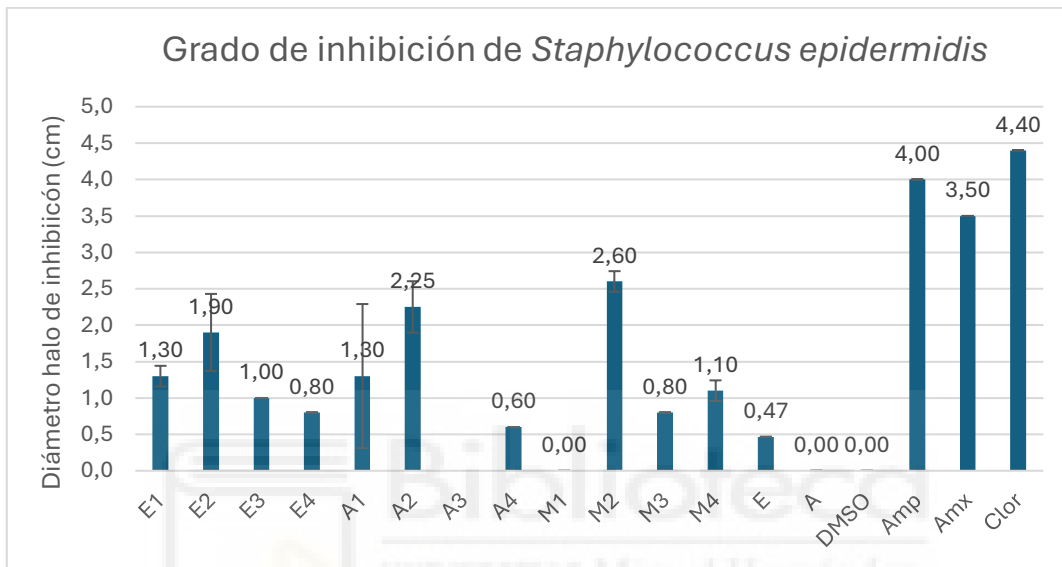


Figura 22. Diámetro de la zona de inhibición de *Staphylococcus epidermidis* tras el tratamiento con extractos de plantas invasoras: Los números corresponden con la especie vegetal, siendo 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*) y 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante y antibiótico utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol), DMSO (dimetilsulfóxido), Amp (Ampicilina), Amx (Amoxicilina) y Clor (Cloranfenicol).



Figura 23. Cultivos de *Staphylococcus epidermidis* en medio AN. El número representa la especie vegetal: 1 (*Heliotropium curassavicum*), 2 (*Myoporium laetum*), 3 (hojas de *Sophora japonica*), 4 (frutos de *Sophora japonica*). La letra representa el extractante utilizado: E (etanol), A (acetona), M (metanol).

En general, se observó actividad antimicrobiana de los extractos de plantas invasoras (tabla 8), con efectos variables según el extractante, el microorganismo diana y la especie y órgano de la planta invasora.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Heliotropium curassavicum</i>						
<i>Myoporum laetum</i>						
<i>Sophora japonica</i> (hojas)						
<i>Sophora japonica</i> (fruto)						

Tabla 6. Resumen de efectos por parte de los extractos vegetales sin diferenciación de método o extractante.

Aunque metanol es el extractante que más rendimiento produjo en términos de biomasa, no fue así en cuanto a efecto antagónico sobre los hongos o bacterias, por lo que habría que replantearse su uso. Aunque metanol se ha utilizado mucho para elaborar extractos de plantas, puede ser más interesante para organismos como algas, cianobacterias o plantas vasculares con limitación de biomasa inicial; no es éste el caso de las plantas invasoras, que producen gran cantidad de biomasa. Además, el uso de metanol plantea el problema de su extrema toxicidad por ingestión o inhalación. Habitualmente el extracto suele disolverse con dimetilsulfóxido (Mostafa et al., 2018) de amplia polaridad, miscible tanto en agua como en disolvente orgánicos. Sin embargo, en algunos casos se han detectado efectos totalmente inhibitorios sobre hongos (Petruccioli et al., 2020; Verdú, 2022; Díez, 2022), en particular cuando se aplica directamente a elevadas concentraciones, por lo que no sería válido para ensayos de crecimiento en placa; sí, con reservas, para ensayos de difusión en disco debido a que es poco difusible en medios de cultivo, o utilizando DMSO diluido, como hemos hecho en este trabajo.

El microorganismo diana es también clave para detectar actividad antimicrobiana. En general los efectos fueron más generalizados sobre bacterias, al menos sobre las bacterias gram positivas ensayadas, resultados que coinciden con trabajos previos (García, 2019; Pérez, 2019; Díez, 2022; Verdú, 2022; Sanchís, 2023), lo que podría deberse a la menor complejidad de la pared celular de éstas. Este hecho podría explicar en parte la mayor susceptibilidad de las plantas a las enfermedades producidas por bacterias gram negativas, pues los mecanismos de defensa parecen ser menos eficaces frente a este tipo de bacterias. Además, es conocido que *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus* son más sensibles a antibióticos y otras sustancias que *Escherichia coli* (He et al., 2016; Si et al., 2016; Cha et al., 2017). En cuanto a los hongos, claramente *Phytophthora citrophthora* mostró la mayor sensibilidad a los extractos. En la misma línea, esto podría deberse a que se trata de un Oomiceto, (llamados coloquialmente

pseudohongos) caracterizado por poseer un micelio con hifas no tabicadas y pared celular sencilla formada por celulosa, a diferencia de *Fusarium* o *Aspergillus*, que son Eumicetos (hongos verdaderos), con paredes complejas formadas por quitina-glucano. Además, *Aspergillus* posee hifas con paredes gruesas, pigmentadas, que le confieren gran resistencia, lo que explicaría los resultados obtenidos.

Por otro lado, la ausencia de efectos en hongos con el test de difusión de disco no significa necesariamente que no existan, pues si se han comprobado con el test de contacto directo. Aunque el test de difusión de disco es apropiado para bacterias y permite ensayar diferentes tratamientos de manera rápida y eficaz (Cantón et al., 2007), resulta controvertido con los hongos. Esto se debe a que plantea diversos problemas metodológicos tales como la dificultad de obtener un inóculo homogéneo y equiparable entre especies, la aparente fragilidad a la fragmentación de especies como las ensayadas *Phytophthora citrophthora* o *Fusarium* (con crecimiento heterogéneo y disperso tras la siembra en césped). En este sentido, recientemente diversos autores han manifestado también la conveniencia de revisarlo o utilizar otros métodos para la evaluación de actividad antifúngica de extractos de plantas (Eloff, 2019; Durand et al., 2021).

En cuanto a las plantas invasoras ensayadas, los mejores resultados se obtuvieron con *Myoporum laetum* y frutos de *Sophora japonica* no solo por ser efectivos en la mayoría de los microorganismos, sino porque su inhibición cuantitativa y cualitativamente fue superior. Presumiblemente estas especies difieren en su contenido de fitotoxinas, compuestos activos y metabolitos secundarios con posibles propiedades antimicrobianas.

Sophora japonica mostró actividad antimicrobiana frente a la mayoría de los microorganismos ensayados, siendo mayor esta actividad con los extractos de frutos que con los de hojas. Es esta una especie de la que se conoce previamente su uso medicinal o tóxico. Es altamente reconocida en la medicina tradicional china, de donde es originaria. Su aplicación es principalmente hemostática; sin embargo, ofrece muchas más propiedades interesantes (He et al., 2016). El extracto de *S. japonica* exhibe una clara acción bactericida, ante bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Cabe destacar que varios de los trabajos precedentes coinciden en su capacidad de detener el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (He et al., 2016; Si et al., 2016; Cha et al., 2017). Los componentes activos responsables de dicha inhibición se atribuyen a un grupo de flavonoides, isoflavonoides y sus glucósidos. La quercetina, el kaempferol, isorhamnetina, genisteína, soforicósido y especialmente la rutina, son los

más destacados (Cha et al., 2017). Su efecto bacteriostático podría deberse a la capacidad de estos para atenuar ciertas endotoxinas y exotoxinas bacterianas. Como es el caso de la quercetina, que es capaz de disminuir la síntesis de la toxina alfa de *Staphylococcus aureus*, causante de la formación de poros con acción citotóxica (López y Sánchez, 2018). Sin embargo, existe una carencia de estudios significativos sobre la capacidad antifúngica de esta especie. Por consiguiente, se requiere una mayor investigación en este ámbito.

Myoporum laetum también mostro una actividad antimicrobiana generalizada, tanto frente a bacterias como hongos. Esta especie se reconoce como tóxica en diversos estudios (Denz y Hanger, 1961; Raposo et al., 1998a; Raposo et al., 1998b). Así, el aceite esencial extraído de las hojas de contiene sesquiterpenoides, algunos de los cuales son tóxicos, especialmente aquellos que contienen cetonas furanosesquiterpenoides, como la ngaiona. Estos compuestos, que pueden causar toxicidad en el hígado, los riñones y los pulmones y se concentran principalmente en las partes aéreas de la planta, como las hojas (Mohamed y Omer, 2009) podrían ser también responsables del efecto biocida sobre microorganismos.

Aunque en menor medida que los anteriores, *Heliotropium curassavicum* también parece tener cierta actividad antimicrobiana, aunque menor a lo esperado, de acuerdo a algunos trabajos previos. La evaluación fitoquímica de este planta muestra la presencia alcaloides, saponinas, fenólicos, flavonoides, esteroides, taninos y terpenoides, partir de los cuales se ha basado la medicina tradicional durante siglos (Pothiraj et al., 2021). Estos compuestos activos son capaces de detener el crecimiento de cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, siendo *E. coli* aquella que posee mayor porcentaje de inhibición (Pothiraj et al., 2021). Sin embargo, en otra investigación (Ihtesham et al., 2019), se ha observado que, aunque existe cierta inhibición, esta es considerablemente menor en comparación con las cepas de *S. aureus*. *H. curassavicum* es la única especie de las examinadas, de la cual existe información previa sobre su capacidad antifúngica. Su extracto crudo inhibe el crecimiento de cepas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* (Ihtesham et al., 2019), aunque en nuestro caso no observamos este efecto, posiblemente por cuestiones metodológicas.

5. Conclusiones y perspectivas futuras

Las conclusiones obtenidas tras la realización y análisis de los resultados obtenidos en el estudio son las siguientes:

- Los extractos con metanol producen el mayor rendimiento, especialmente el extracto del fruto de *Sophora japonica*. Aunque esto es útil en términos cuantitativos, es más importante considerar su efectividad en producir inhibición y sobre todo aspectos de seguridad en su manipulación.
- En general no se ha observado una tendencia generalizada en cuanto a la efectividad de los extractantes. En *Heliotropium curassavicum*, el extracto obtenido con metanol fue el más eficaz en inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger*, mientras que los extractos con etanol y acetona mostraron capacidad de inhibición contra *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*. En el caso de *Myoporum laetum*, los extractos etanólicos fueron efectivos en la inhibición de *Fusarium* y *Phytophthora*, mientras que el extracto con metanol mostró una capacidad antibacteriana frente *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los extractos en etanol y metanol de las hojas de *Sophora japonica* han demostrado una inhibición leve de los microorganismos ensayados. Los extractos obtenidos con etanol y metanol, y en menor medida acetona de los frutos de *Sophora japonica*, mostraron una excelente inhibición del crecimiento tanto de los hongos como de las bacterias ensayadas.
- Si se han observado claras diferencias en la capacidad antimicrobiana según la especie invasora y la parte de la planta evaluadas. Los mejores resultados se obtuvieron de los extractos de *Myoporum laetum* y frutos de *Sophora japonica* no solo por ser efectivos en la mayoría de los microorganismos patógenos, sino porque su inhibición cuantitativa y cualitativamente fue superior.

Como objetivos y perspectivas futuras, planteamos la posibilidad de optimizar las técnicas empleadas y concentraciones de extractantes, analizar los compuestos fitoquímicos de estas especies molecularmente y, por último, examinar a fondo estudios acerca de la conservación de las propiedades de los extractos vegetales antes de su aplicación.

Bibliografía

- Camacho L. A., (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista española de salud pública*, 97, e202302013.
- Cha, J., Yun, S., Eun, Jang, J., Choi, S., (2017). Antimicrobial Activity of *Sophora Japonica* Extract Against Oral Bacteria. *Journal of Oral Biology*, 4(1), 9.
- 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 Ibérica de Micología*. 15.
- CLSI., (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI., (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th Edition. CLSI document M02. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Convention on Biological Diversity-CBD, (2007). Guide to the Global Taxonomy Initiative, CBD Technical Series # 27. www.cbd.int/gti/taxonomy.shtml. Consultado el 4 de noviembre de 2023.
- Denz, F. A., Hanger, W. G., (1961). The liver toxin in *Myoporium laetum*. *Journal of Pathology*, 81(1), 91-99.
- Eloff, J. N., (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 1-8.
- Eloff, J.N., (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19:106
- Fan, P., Marston, A., (2009). How can phytochemists benefit from invasive plants? *Natural product communications*, 4(10).
- Gioria, M., Hulme, P. E., Richardson, D. M., Pyšek, P., (2023). Why are invasive plants successful? *Annual Review of Plant Biology*, 74(1), 635-670.
- He, X., Bai, Y., Zhao, Z., Wang, X., Fang, J., Huang, L., Zhang, M., Zhang, Q., Zhang, Y., Zheng, X., (2016). Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 160-182.
- Ihtesham, Y., Khan, U., Ullah, I., Khan, W., Qureshi, R. A., (2019). In vitro antibacterial and antifungal potential of methanolic crude extracts of some *Heliotropium* spp. *Advances y Medical Plant Research*, 7(3), 79-84.
- IPNI, (2024). International Plant Names Index. En <http://www.ipni.org>. The Royal Botanic Gardens., Kew. Harvard University Herbaria and Libraries and Australian National Herbarium. Consultado el 23 de abril de 2024.
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T., Ishii, S., (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570-581.

- Raposo, J.B., Méndez, M.C., Riet-Correa, F., de Andrade, G.B., (1998a). Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in sheep. *Vet Hum.Toxicol.*, 40(3), 132-135.
- Raposo, J.B., Méndez, M.C., de Andrade, G.B., Riet-Correa, F., (1998b). Experimental intoxication by *Myoporum laetum* in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 40(5), 275-277.
- López, G. C., Sánchez, C. A. C., (2018). Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 131-135.
- Macías, F. A., Durán, A. G., Molinillo, J. M. G., (2020). Allelopathy: The Chemical Language of Plants. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* (pp. 1-84). En: Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Asakawa, Y, Liu, J., (2020). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 112. Springer Nature.
- 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 73, 53-56.
- Métraux, J., Jackson, R. W., Schnettler, E., Goldbach, R., (2009). Chapter 2 Plant Pathogens as Suppressors of Host Defense. En: Kader, J. C., Delseny, M., (2011). *Advances in botanical research*. Academic Press. (pp. 39-89).
- Mohamed, S. M., and Omer, E. A. E. F., (2009). Seasonal variation in the volatile oil of *Myoporum laetum* leaves. *Aust. J. Chem*, 25, 1779-1786.
- Petrucelli, V., Brasili, E., Varone, L., Valletta A., Pasqua, G., (2020), Antifungal activity of dimethyl sulfoxide against *Botrytis cinerea* and phytotoxicity on tomato and lettuce plants, *Plant Biosystems*, 154 (4): 455-462.
- Pothiraj, C., Paulraj, B., Shanthi, R., Gobinath, M., Babu, R. S., Munirah, A. A., Hatamleh, A. A., Kumar, K. R., Veeramankandan, V., and Arumugam, R., (2021). Evaluating antimicrobial activities of *Acanthus ilicifolius* L. and *Heliotropium curassavicum* L against bacterial pathogens: an *in-vitro* study. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1927-1934.
- Qu, T., Du, X., Peng, Y., Guo, W., Zhao, C., Losapio, G., (2021). Invasive species allelopathy decreases plant growth and soil microbial activity. *PLoS one*, 16(2), e0246685.
- Si, C., An, L., Xie, D., Liu, C., Chen, X., Wang, G., Huo, D., Yang, Q., Hong, Y., (2016). New acylated flavonol glycosides with antibacterial activity from root barks of *Sophora japonica*. *Wood Science and Technology*, 50(3), 645-659.
- Trillas, M. I., Segarra, G., (2009). Interactions between nonpathogenic fungi and plants. *Advances in Botanical Research*, 51, 321-359.
- Van Der Werf, H. M., (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 60(2-3), 81-96.
- Máximo, P., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Lourenço, A., (2020). Invasive Plants: Turning Enemies into Value. *Molecules*, 1;25 (15), 3529.
- Murugaiyan, J., Kumar, P. A., Rao, G. S., Iskandar, K., Hawser, S., Hays, J. P., Mohsen, Y., Adukkadukkam, S., Awuah, W. A., Jose, R. A. M., Sylvia, N., Nansubuga, E. P.,

Tilocca, B., Roncada, P., Roson-Calero, N., Moreno-Morales, J., Amin, R., Kumar, B. K., Kumar, A., . . . Van Dongen, M. B. M., (2022). Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics*, 11(2), 200.

Otto, M., (2009). *Staphylococcus epidermidis* — the «accidental» pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(8)

Zhu, M., Zhu, Q., Yang, Z., Liang, Z., (2021). Clinical Characteristics of Patients with s Bloodstream Infection in a Chinese Tertiary-Care Hospital. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3), 321-326.

