

# ACTIVIDAD BIOCIDA CONTRA HONGOS, BACTERIAS Y NEMÁTODOS DE QUITOSÁN, SOLO Y FORMULADO CON EXTRACTOS DE *LARREA TRIDENTATA*

R. H. Lira Saldivar<sup>1\*</sup>, M. Hernández Suárez<sup>1</sup>, F. D. Hernández Castillo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) [rhkira@ciqa.mx](mailto:rhkira@ciqa.mx); Blvd. Enrique Reyna Hermosillo 140, Saltillo, Coah. México, CP 25253.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coah., México. CP 25235

**Abstract** – Métodos alternativos para prevenir y controlar microorganismos patógenos que causan infecciones en alimentos y humanos son demandados en el mundo. Pesticidas y antibióticos obtenidos de productos naturales ofrecen la ventaja de que son específicos para determinado organismo, no generan resistencia y son inocuos para humanos y ecosistemas. En este contexto, el biopolímero quitosán y los extractos del arbusto de gobernadora (*Larrea tridentata*) tienen amplio potencial para emplearse como opción orgánica contra microorganismos patogénicos. Por lo tanto, en este trabajo se analizó el efecto antifúngico, antibacterial y nematocida del quitosán y extractos de gobernadora solos, y en mezclas o formulaciones. Los resultados mostraron que ambos biocompuestos inhiben el crecimiento micelial y la esporulación de 9 hongos fitopatógenos causantes de numerosas enfermedades que afectan negativamente la calidad y rendimiento de cultivos de alto valor comercial; también se evidenció el efecto antibacterial contra 7 bacterias causantes de severas infecciones, algunas de las cuales han adquirido gran resistencia a los antibióticos tradicionales. Igualmente, la actividad nematocida de los productos mencionados quedó de manifiesto en experimentos *in vitro* e *in vivo* que se realizaron contra nemátodos juveniles de la especie *Nacobbus aberrans* que afecta severamente diversos cultivos agrícolas en México y otras regiones del mundo.

## Introducción

El uso de antibióticos y pesticidas sintéticos empleados contra infecciones nosocomiales y enfermedades de cultivos agrícolas, ha tenido graves consecuencias en la salud y el medio ambiente, además han provocado la generación de resistencia (8); por lo tanto, se requieren nuevas opciones orgánicas que sean mas amigables con los ecosistemas. El biopolímero quitosán obtenido principalmente de la cutícula de crustáceos es biodegradable, no tóxico, y antimicrobial; también induce la formación de barreras de defensa que limitan la incidencia de patógenos (4). El quitosán tiene un gran potencial industrial, destacándose su uso en la cosmetología (lociones, aditivos para el cabello, cremas faciales y para el cuerpo), se emplea como preservante en productos alimenticios aprovechando sus características antimicrobianas y también como antioxidante (2). Por su parte, el arbusto de gobernadora (*L. tridentata*) dominante en las zonas áridas del norte de México tiene en sus hojas una gruesa capa de resina que puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas o más (5). Esta resina contiene grandes cantidades de metabolitos secundarios como los biopolímeros fenólicos y el ácido nordihidroguaiaretico que son producidos en hojas y tallos; estos compuestos resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (6). Considerando las propiedades del quitosán y la resina de *L. tridentata*, se realizaron diversos trabajos de investigación bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo con el objetivo de analizar el efecto microbicida de soluciones de quitosán y extractos de *L. tridentata*, solos y en mezclas o formulaciones, contra bacteria causantes de graves infecciones intrahospitalarias y enfermedades en humanos; así como contra hongos fitopatógenos y nemátodos que atacan a numerosos cultivos de gran importancia económica.

## Sección Experimental

Preparación del Quitosán y Elaboración de Mezclas con Extractos de *L. tridentata*. El follaje de *L. tridentata* se colectó en poblaciones naturales de este arbusto. La resina cruda se obtuvo mediante un equipo Soxhlet y el extracto de la resina se obtuvo de hojas secadas a la sombra hasta que su contenido de humedad fue de 8% en base a peso. El follaje seco fue sumergido separadamente en los solventes orgánicos etanol y metanol durante 24 horas a temperatura ambiente y presión atmosférica; el solvente remanente fue eliminado en un rotavapor y después de le adicionó una solución acuosa alcalina, obteniendo así un producto cuya característica es ser hidrosoluble (7). Se utilizó quitosán comercial; este se disolvió en 100 ml de agua destilada, con 2 ml de ácido acético glacial y se calentó durante 24 horas con agitación constante. La solución fue ajustada a un pH de 5.5 con soluciones normales de NaOH, finalmente se le agregó 0.1 ml de Tween 80 (1). Para la elaboración de las mezclas de quitosán y extracto de *L. tridentata* en una solución de concentración conocida del biopolímero, se adicionó la cantidad del extracto adecuado a cada dosis a evaluar; las mezclas se mantenían en agitación para lograr una solución homogénea, la cual posteriormente se empleó en los diversos bioensayos.

Microorganismos Analizados. Se utilizaron siete cepas de bacterias adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC): *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. typhimurium* (ATCC 1334), *P. vulgaris* (ATCC 49132), *K. oxytoca* (ATCC 49131), *S. aureus* (ATCC 29213) y *E. faecalis* (ATCC 29212); así como tres hongos: *A. parasiticus* (ATCC 15517), *A. niger* (ATCC 6275) y *A. flavus*; éste último al igual que cinco cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y una de *C. coccodes* fueron proporcionados por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. En cuanto al trabajo con nemátodos *N. aberrans* este se realizó en el Colegio de Postgraduados, habiendo utilizado nemátodos juveniles J2 y J3-J4, extraídos de la rizósfera de plantas de tomate.

Bioensayos con Hongos, Bacterias y Nemátodos. Para el estudio de la actividad antifúngica bajo condiciones de laboratorio, los extractos fueron incorporados a medio de cultivo PDA a concentraciones en el rango de 0 a 12,000 ppm. Una vez solidificado el medio de cultivo, se tomó un explante (5 mm Ø) del hongo, mismo que se depositó al centro de la caja Petri con el medio envenenado y las placas control con PDA; se incubaron a 25°C hasta que el crecimiento llenó la caja del testigo absoluto. Para determinar el efecto antifúngico se midió el crecimiento micelial radial con un vernier y en algunos casos se determinó la esporulación del hongo. Un procedimiento similar se siguió para los bioensayos con bacterias, utilizando los medios de cultivo BHI y MHA. Se tomó cultivo de cada una de las cepas con un asa bacteriológica y se sembraron en tubos que contenían BHI, se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h; se colocaron 10 µL de este cultivo en cajas conteniendo el medio envenenado con soluciones de quitosán, extractos de *L. tridentata* y de la mezcla quitosán-*Larrea* (Q-L). En cada placa se extendió el inóculo mediante la técnica de estriado y se incubaron a 37°C por 24 h. Este procedimiento se siguió para cada cepa evaluada, realizando cada uno de los bioensayos por triplicado. Los bioensayos *in vitro* con los nemátodos se realizó en microsiracusas instaladas dentro de cajas Petri, las cuales contenían 20 nemátodos por microsiracusa; para analizar el efecto de los biocompuestos en la eclosión de masas de huevecillos se colocaron dos masas por microsiracusa en las cuales se adicionaron las dosis de los compuestos por separado y de la mezcla Q-L.

## Resultados y Discusión

Los resultados de los bioensayos con las cepas bacterianas mostraron que el efecto antibacterial del quitosán fue significativamente inferior al de los extractos de *L. tridentata*, ya que aún a las elevadas concentraciones de 16,000 ppm no se tuvo un efecto inhibidor; mientras que con el extracto EtOH de gobernadora a 1,000 ppm todas las bacterias fueron inhibidas, lo mismo sucedió al aplicar el extracto MeOH a 2,000 ppm. Cuando los extractos fueron mezclados con quitosán, se apreció una baja efectividad antibacterial y un efecto antagónico (Cuadro 1); ya que al incrementar la dosis de quitosán de 500 a 2,000 ppm la inhibición se redujo. Russel *et al.* (9) mencionan que el efecto antagónico entre compuestos puede ser debido a numerosos factores, destacando la falta de miscibilidad, así como condiciones físico-químicas que gobiernan las respuestas farmacodinámicas.

Cuadro 1. Efecto de las mezclas quitosán/*Larrea* en el crecimiento *in vitro* de siete cepas bacterianas.

| Bacterias             | 500/500 | 500/1000 | 500/2000 | 1000/500 | 1000/1000 | 1000/2000 | 2000/500 | 2000/1000 | 2000/2000 |
|-----------------------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <i>E. coli</i>        | NI      | NI       | SC       | NI       | NI        | SC        | NI       | NI        | SC        |
| <i>P. vulgaris</i>    | SC      | SC       | SC       | NI       | SC        | SC        | NI       | SC        | SC        |
| <i>K. oxytoca</i>     | NI      | SC       | SC       | NI       | SC        | SC        | NI       | SC        | SC        |
| <i>P. aeruginosa</i>  | NI      | SC       | SC       | NI       | SC        | SC        | NI       | SC        | SC        |
| <i>E. faecalis</i>    | SC      | SC       | SC       | SC       | SC        | SC        | SC       | SC        | SC        |
| <i>S. aureus</i>      | SC      | SC       | SC       | SC       | SC        | SC        | SC       | SC        | SC        |
| <i>S. typhimurium</i> | SC      | SC       | SC       | NI       | SC        | SC        | NI       | SC        | SC        |

NI = No inhibió; SC = Sin crecimiento. Se aplicó en las mezclas el extracto etanólico de *L. tridentata*

Al analizar la actividad antifúngica del quitosán y extractos de *L. tridentata* solos y mezclados contra cinco cepas del hongo *C. gloeosporioides* causante de la enfermedad antracnosis, se encontró que al aplicar quitosán a 8,000 ppm y de *L. tridentata* a 4,000 ppm, las cepas de este hongo no causaron infecciones en frutos de papaya cv. Maradol; mientras que la mezcla Q-L a las dosis 2,000-2,000 ppm tuvo el mismo efecto inhibitorio en ese hongo, por lo que la combinación de ambos bioproductos mostró un efecto sinérgico ya que la capacidad inhibitoria fue muy superior en comparación con el resultado obtenido al aplicar dichos compuestos por separado. Es importante señalar que el efecto *in vitro* de los extractos hidrosolubles de gobernadora contra las cinco cepas del hongo fitopatogénico *C. gloeosporioides* fue marcadamente fungicida, ya que al aplicar la baja dosis de 62.5 ppm la cepa 372 de este hongo inhibió por completo su crecimiento y a 1,000 ppm todas las demás cepas cesaron su crecimiento micelial (Cuadro 2); mismas que no se recuperaron cuando fueron transferidas a medio de cultivo fresco. Hasta lo mejor de nuestro conocimiento, los resultados antes señalados relacionados con las formulaciones Q-L es la primera vez que se reportan, y además han demostrado un efecto antifúngico y sinérgico. Trabajos previos realizados por diversos autores también confirman la actividad antifúngica del quitosán. Bautista-Baños *et al.* (1) encontraron que cepas de otros hongos como *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer* aisladas de papaya, presentaron una inhibición del crecimiento micelial superior al 50% a concentraciones de quitosán de 1.5% en adelante, observándose una correlación directa entre la concentración de quitosán y la inhibición del crecimiento.

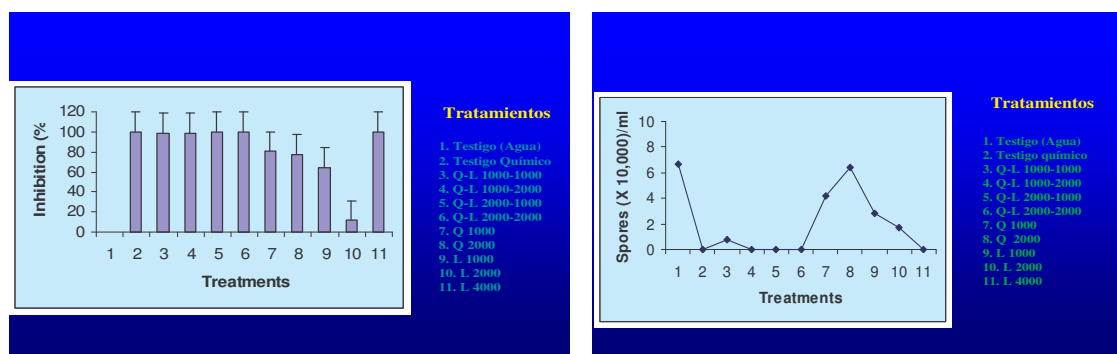
Cuadro 2. Porcentajes de inhibición *in vitro* de cinco cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* con cinco concentraciones del extracto etanólico de *Larrea tridentata*.

| Dosis (ppm) | Cepas del hongo <i>C. gloeosporioides</i> |         |         |        |         |
|-------------|---|---------|---------|--------|---------|
|             | 372                                       | 264     | 322     | 187    | CFG4    |
| 62.5        | 100 a                                     | 91.9 bc | 78.6 e  | 91.5 b | 79.3 e  |
| 125         | 100 a                                     | 95.4 b  | 81.0 de | 100 a  | 83.6 de |
| 250         | 100 a                                     | 100 a   | 82.2 d  | 100 a  | 85.9 cd |
| 500         | 100 a                                     | 100 a   | 91.0 b  | 100 a  | 91.8 bc |
| 1000        | 100 a                                     | 100 a   | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| *TQ         | 100 a                                     | 100 a   | 100 a   | 100 a  | 100 a   |

\*TQ (Testigo químico) = Benomyl (thyabendazol) a 1000 ppm

En cuanto al hongo *C. coccodes* causante de la enfermedad conocida como “punto negro de la papa”, los resultados obtenidos con las soluciones de quitosán, el extracto etanólico de *L. tridentata* y la mezcla de ambos se presentan en el Cuadro 3A y 3B. Tanto el quitosán como el extracto afectaron claramente a este hongo; asimismo, las mezclas Q-L tuvieron un efecto inhibitor del crecimiento micelial y de la esporulación del fitopatógeno. Las mezclas Q-L a las concentraciones 1000-1000, 1000-2000, 2000-1000 y 2000-2000 ppm, lograron una inhibición total del hongo (100%); este efecto resultó ser igual al del fungicida sintético comercial utilizado como testigo químico. Al analizar la actividad nematocida del quitosán y extractos de *Larrea* sobre la eclosión de huevecillos y en poblaciones juveniles (J2) del nematodo falso agallador (*N. aberrans*), los resultados indican que la mezcla Q-L a 1000-2000 ppm, mostraron actividad nematocida que resultó en una inhibición de la eclosión y en la movilidad de los nemátodos, la cual fue irreversible cuando las masas de huevecillos y los nematodos fueron transferidos en agua destilada. El mismo efecto adverso en la movilidad de los nematodos fue detectado con Carbofurán, un tóxico pesticida sintético que fue usado como el control químico. La actividad nematocida observada pudiese ser atribuida a los diversos compuestos como fenoles, flavonoides y triterpenos presentes en la resina de *Larrea*. Chitwood (3) señala que los fitoquímicos mencionados, así como isotiocianatos, glucosinolatos, glicósidos y alcaloides, entre otros, tienen un enorme potencial para el combate de nematodos y otros parásitos de las plantas.

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (A) y de la esporulación (B) del hongo *Colletotrichum coccodes* con soluciones de quitosán y extracto de *Larrea tridentata*.



## Conclusiones

Con base en los resultados antes expuestos consideramos que productos naturales como el biopolímero quitosán y extractos de *L. tridentata*, que han demostrado su efecto antifúngico, antibacterial y nematocida contra patógenos que afectan a plantas y humanos, representan buenas opciones con potencial y viabilidad comercial para prevenir y controlar microorganismos infecciosos de gran importancia económica, ya que son fuente muy importante de compuestos bioquímicos activos, además son biodegradables y relativamente no tóxicos para humanos, animales y los ecosistemas.

## Referencias

1. Bautista-Baños, S., López-Hernández, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.
2. Cheah, L., Page, B., and Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25:89-92.
3. Chitwood, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40:221-249. 2002.
4. El Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, E., Wisniewski, M., Wilson, C.L. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease* 84:243-248.
5. Lira-Saldivar, R. H., Sánchez, M. del R., Gamboa, R., Jasso, D. and Rodríguez, R. 2003a. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* extracts from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. *AGROCHIMICA* 47:54-60.
6. Lira-Saldivar, R.H., Cruz-Blasi, J., Hernández-Castillo, F.D., Jiménez-Díaz, F., Flores-Olivas, A., Gallegos-Morales, G. 2003b. Soil solarization and *Larrea tridentata* extract as a biocontrol agent on root damage and epidemiology of pepper plants. *PHYTON* 2003:59-64.
7. Lira-Saldivar, R.H., J. Cruz, F. Beltrán, and F. Jiménez. 2004. Effect of biofumigation with solarization and *Larrea tridentata* extract on soil-borne pathogens of pepper plants. *Biological Agriculture and Horticulture* 22:21-29.
8. Rivera-Tapia, JA. 2003. Resistencia a antibióticos, problema de salud publica. *Annals Medical Association Medical Hospital ABC* 48 (1): 42-47.
9. Russell E. Lewis, R.E., B.C. Lund, M.E. Klepser, E.J. Ernst, M.A. Pfaller. 1998. Assessment of Antifungal Activities of Fluconazole and Amphotericin B Administered Alone and in Combination against *Candida albicans* by Using a Dynamic *In Vitro* Mycotic Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:1382-1386.