

Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Usnea laevis* en hongos fitopatógenos

(Evaluation of the antifungal activity of the lichenic extract of Usnea laevis in phytopathogenic fungi)

Cristhina Estefanía Jaramillo O

Laboratorio de Micología Aplicada, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Central del Ecuador.
Autor para correspondencia: cristhina.j14@hotmail.com

RECIBIDO: 05 de Febrero de 2018

APROBADO: 03 de Abril de 2018

DOI: 10.22370/bolmicol.2018.33.1.1091

LA AUTORA DECLARA NO TENER CONFLICTO DE INTERESES

Palabras claves: Actividad antifúngica, extractos liquénicos, *Usnea laevis*, hongos fitopatógenos.

Key words: Antifungal activity, lichen extracts, *Usnea laevis*, phytopathogenic fungi.

RESUMEN

Los líquenes son producto de una asociación simbiótica entre un hongo y alga y/o cianobacteria; esta simbiosis produce una serie de metabolitos secundarios o sustancias liquénicas únicas, las mismas que son aisladas a partir de sus extractos y que han presentado una marcada actividad antibiótica y antifúngica. Considerando que en el Ecuador no se tienen antecedentes acerca de este tipo de estudios, el objetivo planteado fue el evaluar la actividad antifúngica del extracto liquénico de *Usnea laevis* frente a hongos fitopatógenos.

En el presente estudio las sustancias liquénicas almacenadas en el talo de *Usnea laevis* fueron extraídas con metanol y etanol. La actividad antifúngica in vitro de estos extractos fue probado frente a géneros de hongos fitopatógenos previamente aislados (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus stolonifer*); añadiéndolo al medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA) a una concentración de 0,5%; determinándose el porcentaje de inhibición. Los datos fueron analizados estadísticamente y se realizó la clasificación del extracto en base a su porcentaje de inhibición según la OILB.

El extracto metanólico y etanólico de *Usnea laevis* mostró una mayor efectividad frente a *Rhizopus stolonifer*, inhibiendo más del 50% de su crecimiento, a diferencia de *Penicillium* y *Aspergillus* cuyo porcentaje de inhibición fue mucho menor y mostraron diferencias estadísticamente significativas. El extracto liquénico fue moderadamente tóxico para *Rhizopus stolonifer*, ligeramente tóxico para *Aspergillus* sp 1 y *Penicillium* sp e ino-
cua para *Aspergillus* sp 2.

ABSTRACT

A lichen is an organism product of a symbiotic association between a fungus and algae and

/ or cyanobacteria; this symbiosis produces many secondary metabolites or unique lichen substances, which are isolated from their extracts and show a marked antibiotic and antifungal activity. Considering there is no background on this type of studies in Ecuador, the aim of this study was to evaluate the antifungal in vitro activity of *Usnea laevis* extract on phytopathogenic fungi.

The lichenic substances stored in the thallus of *Usnea laevis* were extracted with methanol and ethanol. The in vitro antifungal activity of these extracts was tested against phytopathogenic fungal genera previously isolated (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus stolonifer*). They were added to Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium at a concentration of 0.5%, and the inhibition percentage was determined. Data were statistically analyzed and the extract was classified based on its inhibition percentage according to the OILB.

Methanolic and ethanolic extracts of *Usnea laevis* showed greater effectiveness against *Rhizopus stolonifer*, inhibiting more than 50% of its growth, unlike *Penicillium* and *Aspergillus*, whose inhibition percentage was lower and showed significant differences. The liquid extract was also moderately toxic to *Rhizopus stolonifer*, slightly toxic to *Aspergillus* sp 1 and *Penicillium* sp and harmless to *Aspergillus* sp 2.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes, también llamados hongos liquenizados, son organismos que resultan de la asociación simbiótica entre un hongo y uno o más organismos autótrofos fotosintéticos, que pueden ser o un alga verde y/o una cianobacteria¹. Estos organismos presentan una alta concentración de metabolitos secundarios, que son almacenados en el talo liquénico, por lo que pueden ser conservados por largos períodos de tiempo, sin sufrir invasiones de

bacterias y hongos, manifestándose así la actividad antagonista de estas sustancias². Desde la década de los 40 diversos investigadores realizaron pruebas de la actividad antibacteriana del ácido úsnico a través de la obtención de extractos, esta sustancia es producida fundamentalmente por especies del género *Usnea*³. Estos compuestos han demostrado actividad frente a neumococos, estreptococos y estafilococos; además, presentan actividad antibiótica frente a diferentes tipos de *Mycobacterium*⁴. Otros estudios indican que muchas de estas sustancias o extractos liquénicos de diversas especies tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas de interés clínico humano⁵. Estas sustancias tienen disímiles propiedades; entre las que se destacan la inhibición del crecimiento de hongos tales como *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae*⁶. Por esta razón representa una alternativa más para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de gran importancia económica⁷. En Ecuador sin embargo, no se tienen reportes de estudios sobre la actividad antifúngica in vitro de sustancias liquénicas. Tomando en cuenta este criterio, se propone evaluar la actividad antifúngica del extracto liquénico de *Usnea laevis* frente a hongos fitopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Micología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. El material liquénico se obtuvo en el Mercado Santa Clara, ubicado en la Avenida Antonio de Ulloa - Quito 170129, Provincia de Pichincha.

Aislamiento de hongos fitopatógenos:

Los hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Rhizopus*, *Penicillium* y *Aspergillus* fueron obtenidos de frutillas, mandarinas, tomates y pan. Fueron sembradas una cepa de *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium* y dos cepas de *Aspergillus* en Agar Extracto de Malta (AEM)^{8,9} y posteriormente se aislaron y

purificaron. Los géneros fueron identificados mediante técnicas de taxonomía clásica que incluyen observación microscópica y el uso de claves taxonómicas establecidas por: Belmont (1992), Zapata 2005 y Arias y Jerez (2008).

Obtención del extracto liquénico:

La extracción de las sustancias liquénicas se realizó mediante la metodología descrita por Sánchez¹⁰. Se pesó y lavó 50 gr de la muestra de *Usnea laevis* con abundante agua y se la dejó reposar a temperatura ambiente hasta que se encontrara completamente seca. Posterior a ello se molió el material liquénico y se maceró en 300 ml de metanol al 99% por cinco días, para que el solvente pudiera extraer la mayor cantidad de sustancia posible. Se concentró el extracto total en un plato calefactor con agitación magnética y se dejó en reposo a 0°C por 24 horas. El sobrenadante fue separado del precipitado por filtración y el sólido filtrado fue lavado con cloroformo frío; a esto, se le agregó 15 ml de metanol y se calentó hasta llegar su punto de ebullición para luego filtrar en caliente. Una vez más se concentró el sólido en 5 ml de extracto metanólico el cual se dejó reposar a 0°C por 24 horas. Finalmente se separaron los cristales por filtración en frío y se lavó con metanol helado.

Prueba de la actividad antifúngica in vitro del extracto liquénico:

Para la realización de los ensayos antifúngicos se basó en la metodología descrita por Vaillant *et al*⁶ con modificaciones estandarizadas por parte del Laboratorio de Micología Aplicada-UCE, se preparó una concentración de 0,5% del extracto, que fue añadido al medio PDA fundido (Tabla 1).

Se realizó medios de cultivo PDA suplementado con la concentración de los extractos liquénicos en cajas Petri de 9 cm de diámetro, en el centro de la placa se colocó los ponchetes de hongos fitopatógenos (*Aspergillus* sp1, *Aspergi-*

llus sp2, *Penicillium* sp y *Rhizopus stolonifer*), los cuales fueron sembrados directamente de la colonia previamente aislada con tres replicas por cada extracto (etanólico y metanólico); cada cepa fue sembrada en cajas Petri diferentes. Se usó un testigo con los hongos fitopatógenos creciendo en PDA con fluconazol.

Los medios con *Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2 y *Penicillium* sp se incubaron a 24°C durante siete días y *Rhizopus stolonifer* al ser un hongo mucoral se lo incubo por cinco días, según lo indicado en la literatura¹¹, a la misma temperatura y pasado este tiempo se midieron los diámetros de las colonias tratadas y testigo para calcular el porcentaje de inhibición empleando la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = (DCC - DCT) / DCC \times 100$$

Donde:

DCC: diámetro de la colonia control.

DCT: diámetro de la colonia tratada.

Tabla 1. Preparación de la concentración del extracto de *Usnea laevis* al 0,5%.

Concentración	Cantidad de extracto	Cantidad de PDA fundido para 25 ml
0,5%	0,5 ml	24,5 ml

Los extractos liquénicos se catalogaron según los resultados de los porcentajes de inhibición obtenidos, siguiendo la escala establecida por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) tomado de Viñuela y Jaca¹² (Tabla 2). Los datos obtenidos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 2. Clasificación del extracto líquénico según su porcentaje de inhibición según la OILB.

Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial	Clasificación
<30% de mortalidad	Inocuo
30-79% de mortalidad	Ligeramente tóxico
80-99% de mortalidad	Moderadamente tóxico
>99%	Tóxico

RESULTADOS

Se tabularon los datos para cada uno de los hongos tratados con los distintos extractos, de manera tal que, para *Aspergillus* sp1 se obtuvo lo siguiente (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de inhibición del extracto etanólico y metanólico de *Usnea laevis* frente a *Aspergillus* sp1.

Extracto líquénico	% de inhibición al 0,5%
Extracto etanólico de <i>Usnea laevis</i>	35,72%
Extracto metanólico de <i>Usnea laevis</i>	47,15%

Existió una diferencia significativa entre cada uno de los extractos utilizados con respecto a *Aspergillus* sp1. En cuanto a *Aspergillus* sp2 el porcentaje de inhibición presentado fue del 0%. Por otro lado el extracto metanólico y etanólico de *Usnea laevis* en el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer* inhibió más del 50% del crecimiento del hongo a pesar de no existir una diferencia significativa entre sí (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de inhibición del extracto etanólico y metanólico de *Usnea laevis* frente a *Rhizopus stolonifer*.

Extracto líquénico	% de inhibición al 0,5%
Extracto etanólico de <i>Usnea laevis</i>	84,11%
Extracto metanólico de <i>Usnea laevis</i>	91,54%

Finalmente en cuanto a *Penicillium* sp se obtuvo un porcentaje de inhibición mínimo (Tabla 5). Cuya diferencia fue significativa en cuanto a la respuesta frente a la aplicación de los dos tipos de extractos.

En general, los extractos de *Usnea laevis* mostraron un menor porcentaje de inhibición frente a *Penicillium* sp y en *Aspergillus* sp 2 no se logró inhibir su crecimiento. Por otro lado frente a *Rhizopus stolonifer* se inhibió más del 50% de su crecimiento.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición del extracto etanólico y metanólico de *Usnea laevis* frente a *Penicillium* sp.

Extracto líquénico	% de inhibición al 0,5%
Extracto etanólico de <i>Usnea laevis</i>	33,17%
Extracto metanólico de <i>Usnea laevis</i>	45,04%

Se categorizó el extracto metanólico y etanólico de *Usnea laevis* al 0,5 % según la tabla la OILB, para cada hongo (Tabla 6).

DISCUSIÓN

La efectividad de los extractos líquénicos y la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos está influenciada por diversos factores como: especie de líquen, solvente utilizado para la extracción, concentración empleada, y características taxonómicas de las especies de hongos¹³; de manera tal, que esto podría explicar, por qué se obtuvo valores con diferencias estadísticamente significativas, entre los diferentes hongos fitopatógenos expuestos al mismo tratamiento.

En la literatura no se encontraron trabajos donde se haya empleado el extracto de *Usnea laevis* para el control de estos hongos fitopatógenos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus stolonifer*) sin embargo algunos autores demostraron el efecto antifúngico de otras especies de hongos líquenizados. Tal es el caso de un estudio realizado, en donde se logró inhibir el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus flavus* con los extractos de *Hypogym-*

Tabla 6. Clasificación del extracto líquénico según su porcentaje de inhibición según la OILB.

Hongo	Extracto de <i>Usnea laevis</i> (0,5%)	Clasificación
<i>Aspergillus</i> sp 1	Metanólico	Ligeramente tóxico
	Etanólico	Ligeramente tóxico
<i>Aspergillus</i> sp 2	Metanólico	Inocuo
	Etanólico	Inocuo
<i>Rizhopus</i> <i>stolonifer</i>	Metanólico	Moderadamente tóxico
	Etanólico	Moderadamente tóxico
<i>Penicillium</i> sp	Metanólico	Ligeramente tóxico
	Etanólico	Ligeramente tóxico

nia physodes y *Ramalina farinácea*¹⁴. Se obtuvieron también sustancias líquénicas de *Heterodermia* sp, y al evaluar la actividad antifúngica in vitro de las mismas, mostraron valores significativos en un número determinado de hongos fitopatógenos entre los que se destaca *Fusarium graminearum*¹⁵. Otro estudio realizado con *Pseudevernia furfurácea* reveló que las sustancias líquénicas presentan una actividad alelopática sobre hongos y plantas superiores, disminuyendo su velocidad de germinación,

crecimiento o inhibiendo incluso la formación de micorrizas¹⁶.

A pesar de que no se cuentan con investigaciones en donde hayan empleado *Usnea laevis*, se han realizado estudios con *Usnea barbata* frente a *Mycobacterium phlei* indicando una buena actividad, ya que se aisló el ácido úsnico presente en él y demostró tener una mejor actividad controladora con *Mycobacterium phlei* que con *Staphylococcus aureus*¹⁷.

Es importante mencionar que una de las limitaciones en el presente estudio es que no se realizó la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos realizados, pero con base a la literatura; las sustancias catalogadas como típicas en líquenes son dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos¹⁸; en especial este último es característico del género *Usnea* el mismo que fue probado en otro estudio mostrando una marcada capacidad de inhibir el crecimiento y esporulación de hongos fitopatógenos como *Aspergillus flavus*¹⁹ tal y como sucedió en la presente investigación con *Aspergillus* sp1.

Por otro lado en el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica del extracto de *Usnea laevis* al 0,5% pero de acuerdo a estudios previos se ha visto que su toxicidad y el porcentaje de inhibición puede variar de acuerdo a la concentración del extracto en el medio, por ejemplo en investigaciones previas, se evaluó la actividad fungicida de distintos extractos líquenicos en hongos fitopatógenos, obteniendo mejores resultados en aquellos que presentaron concentraciones mayores a la que se probó en este caso, mostrando así, un porcentaje de inhibición de hasta el 100% en ciertas especies²⁰, por lo que se podría probar con concentraciones mayores y así esperar obtener mejores resultados frente a las especies que presentaron un porcentaje de inhibición menor del 50%.

Otros estudios realizados indicaron que el tipo de solvente empleado para la extracción de las sustancias líquénicas es sumamente importante ya que influye en la actividad antifúngica que puede presentar el extracto. Además se ha estudiado el efecto fungicida de los extractos líquenicos de diversas especies, en donde se utilizó tres solventes (acetona, metanol y cloroformo), frente a dos especies pertenecientes al género *Aspergillus*, indicando así que se obtuvo mejores resultados en los extractos con acetona²¹; de manera tal que se recomienda utilizar además de etanol y metanol, otro tipo de solventes para resultados mejores.

Las sustancias líquénicas no son solubles en agua, si no que se ha demostrado que lo son, en solventes orgánicos. Por ejemplo, un estudio donde se utilizaron solventes como tolueno, benceno y metanol, éstos mostraron un resultado mucho más conveniente en la separación de compuestos líquenicos frente al etanol²², de manera tal, que esto explicaría porque existió una diferencia significativa en los porcentajes de inhibición de las distintas especies de hongos, entre el extracto metanólico y etanólico de *Usnea laevis*.

Con respecto a *Aspergillus* sp2 el extracto resultó inocuo y su porcentaje de inhibición fue del 0%, esto pudo deberse a que el hongo perteneciente a este género se encontraba formando parte de la contaminación de los medios de cultivo dentro del Laboratorio de Micología Aplicada antes de aislarlo y según estudios previos, se conoce que generalmente los microorganismos adquieren resistencia²³, y en el caso de este tipo de hongo, ya se había probado previamente otros métodos para su control, por ende el extracto no logró inhibir su crecimiento, caso contrario a lo que sucedió con *Aspergillus* sp1 en donde sí se evidencia cierto porcentaje de inhibición ya que éste se aisló de frutas, por lo que hipotéticamente se asume que era mucho más sensible al extracto.

Finalmente, tanto para *Penicillium* sp1 y *Rhizopus stolonifer* no se encontraron estudios previos, en donde se apliquen extractos o metabolitos secundarios obtenidos de líquenes para su control.

CONCLUSIONES

El extracto de *Usnea laevis* demostró tener una mayor actividad in vitro frente a *Rhizopus stolonifer*, inhibiendo más del 80% de su crecimiento; siendo una sustancia moderadamente tóxica para esta especie. Por otro lado, frente a *Aspergillus* sp2, el extracto resultó ser inocuo ya que se obtuvo

0% de inhibición; mientras que, para *Aspergillus* sp1 y *Penicillium* sp, la sustancia fue ligeramente tóxica y se obtuvo un porcentaje de inhibición menor del 50%, demostrando una baja actividad antifúngica.

El extracto metanólico de *Usnea laevis* mostró una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de *Aspergillus* sp1, *Penicillium* sp y *Rhizopus stolonifer*, con respecto al extracto etanólico, siendo el metanol el solvente que arrojó mejores resultados a la hora de inhibir el crecimiento de estos hongos fitopatógenos.

REFERENCIAS

- Morales Bueno P, Abram APD, Gallagher K, Valdéz Gauthier C, Robles Caycho J.** Estudio fitoquímico del líquen *Usnea* sp. Revista de Química. 1993; 7(1): 13-19.
- Hawksworth D L.** The variety of fungal algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. Botanical Journal of the Linnean Society. 1988; 96: 3.
- Toledo FJ, García A, León F, Bermejo J.** Ecología química en hongos y líquenes. Acad. Colomb. Cienc. 2004; XXVIII (109): 510-528.
- Ortega Ch M.** Bioactividad del ácido úsnico del complejo de especies de *Usnea* sp. Biotecipn. 2004; 11: 16.
- Alvarado E, Porrás G, Madrigal S, Rodríguez R.** Estudio de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos liquénicos obtenidos de *Lobaria subdissecta* y *Parmotrema latissimum*. Uniciencia. 2015; 29(2): 39-45.
- Vaillant Flores I, Romeu R, Gómez M, Ramírez R.** Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora pustulata* sobre *Rhizoctonia solani*. Revista de Ciencia y Tecnología. 2014; 21: 12-14.
- Wei X, Hae-Sook J, Keon H, Young K, Jae-Seoun H.** Antifungal activity of lichenforming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. Plant Pathol. 2008; 24 (2): 202-206.
- Carrillo L,** Hongos. Microbiología Agrícola. Bio-Nica. 2003; capítulo 7:14 p.
- Gaitán R, Salmone D, Pérez R, Mata G.** Manual Práctico del Cultivo de Setas, Aislamiento, Siembra y Producción. Instituto de Ecología A.C. 2006; capítulo 3: 7 p.
- Sánchez S.** Obtención y determinación cuantitativa de Ácido Úsnico en *Usnea* spp., en siete mercados de Quito - Pichincha – Ecuador. UCE. Ciencias Biológicas y Ambientales. 2016. 3: 55p.
- Plascencia-Tenorio I, Olalde V, Mena G, Ceja F, Venegas J, Oyoque G, Angoa V.** Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Ra Ximhai. 2012; 8:3.
- Viñuela E, Jacas J.** Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. BD UACHBC.1993; No. Folleto 14296: 23.

- 13. Pérez, M.I, L.F. Peñaranda, M.M. Herazo.** Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Universidad de Pamplona. ESP. 2010; 71 p.
- 14. Suberu, H.** Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide. African Journal of Biotechnology. 2004; 3(9): 468- 472.
- 15. Seoun, J. H, Hye, J. K, Kwang, M. L, Young, J. K.** Isolation, cultivation and antifungal activity of lichen-forming fungus *Heterodermia* sp. The Plant Pathology Journal. 2003; 19(2): 75-78.
- 16. García, S. R, Fernández, R. L, Senabre, M. M.** Influencia de las sustancias líquénicas de *Pseudevernia furfuracea* sobre la germinación, crecimiento y micorrización en plantas de *Pinus sylvestris* L. cultivadas en vivero. Secforestales. 2001; 8(1): 13-16
- 17. Bustinza, F, Caballero A.** Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. Anales del Jardín Botánico de Madrid. 1948; 7(1): 511-548.
- 18. Piovano M, J. A. Garbarino, F. A. Giannini, E. R. Correche, G. Feresin, A. Tapia; S. Zacchino, R. D. Enriz.** Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activities of Aromatic Metabolites from Lichens. Boletín Sociedad Chilena de Química. 2002; 47(3): 235-240.
- 19. Rankovic B. Kosanic, M.** Antimicrobial activities of different extracts of *Lecanora atra*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua*. Pak J. Bot. 2012; 44 (1): 429-433.
- 20. Vaillant-Flores, D. I Gómez-Peralta, M Romeu-Carballo, C. R. Ramírez-Ochoa R, Porrás-González, A.** Actividad antifúngica de extractos de tres especies de líquenes en Cuba. Agron.Mesom. 2015; 26(2):345-350.
- 21. Tiwari P, Rai H Upreti, D.K Trivedi S, Shunkla P.** Assessment of antifungal activity of some himalayan foliose lichens against plant pathogenic fungi. American Journal of Plant Sciences. 2011; 2: 841-846.
- 22. Robles Caycho, J Pastor de Abram A, Morales Bueno P.** Líquenes y sustancias líquénicas. Revista de Química. 1992; 5(1): 4-7.
- 23. Méndez-Tovar L, J Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández, V Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, et al.** Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. Revista Iberoamericana de Micología. 2007; 24(4): 320-322.