INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA.

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL.

“Biofungicídas a partir de raíces de neem **(***Azadirachta indica* Juss**)”**

Asesor:

Dr. Gutiérrez Miceli Federico Antonio.

Revisores:

Dr. Rincón Rosales Reiner.

Dr. Montes Molina Joaquín A.

Residente:

Vera Hidalgo Alan Francis.

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a junio del 2011.

Índice.

I.	Introducción.	5
II.	Justificación.	6
III.	Objetivos.	7
3.1	Objetivo General.	7
3.2	Objetivos Específicos.	7
IV.	Caracterización del área de participación.	8
4.1	Misión.	8
4.2	Visión.	8
V.	Problemas a resolver.	8
VI.	Alcances y limitaciones.	9
VII.	Fundamento teórico.	10
7.1	Uso de extractos vegetales como antifúngicos biológicos.	10
7.2	Características generales de la especie *Azadirachta indica* Juss	11
7.2.1	Descripción botánica del genero *Azadirachta indica*.	11

7.2.2 Categorías taxonómicas de *Azadirachta indica* 12

7.2.3 Características ambientales 13

7.3 Consideraciones Químicas del Neem 13

7.3.1 Antecedentes químicos de la especie *Azadirachta indica* Juss. 14

7.4 Antifúngicos comerciales. 15

7.4.1 Captan. 15

7.5 Hongos fitopatógenos. 16

7.5.1 Generalidades del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.* 16

VIII. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas. 18

8.1 Preparación del material vegetal 18

8.2 Métodos de extracción del material vegetal. 18

8.3 Medición de fenoles totales. 19

8.3.1 Preparación de los reactivos. 19

8.3.2 Extracción de fenoles. 19

8.3.3 Análisis de fenoles totales. 20

8.4 Bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos de Neem (*Azadirachta indica* Juss) por el método de disco. 21

8.5 Bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos de Neem (*Azadirachta indica* Juss) por el método de dispersión. 22

IX. Resultados. 24

9.1 Resultados del bioensayo por el método de disco. 24

9.2 Resultados de bioensayo por el método de dispersión. 26

X. Conclusiones. 28

XI. Recomendaciones. 28

XII. Referencias bibliográficas. 29

XIII. Anexos. 32

I. Introducción.

Algunos hongos filamentosos han causado muchas pérdidas en todo tipo de plantaciones y, aunque se han venido utilizando un sin número de productos sintéticos para controlarlos, no ha sido posible erradicarlos totalmente. Estos hongos poseen mecanismos evolutivos muy complejos que les permite adaptarse a nuevas condiciones impuestas por el medio ambiente. Desafortunadamente los productos químicos que se han venido utilizando para el control de este tipo de hongos, han producido un alto impacto ambiental por su agudo grado de toxicidad y contaminación, además de causar efectos secundarios en las personas que los manipulan, pues los residuos tóxicos se bioacumulan en el organismo generando graves patologías (Perfect *et al.*, 1999).

Por otro lado, al estudiar los mecanismos biológicos, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas y producen compuestos químicos como acción de defensa. Estos mecanismos bilógicos se proyectan en el estudio de extractos vegetales y en la obtención de metabolitos secundarios de alto valor agregado para su implementación en el control de plagas a nivel agrícola, debido a la resistencia generada por parte de los microorganismos a fungicidas comerciales utilizados en el control de enfermedades fitopatológicas (Cowan, 1999; Hernández et al., 2007).

En la actualidad se ha estimulado la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, varios de los cuales, han mostrado ser efectivos contra fitopatógenos tanto in vitro como in vivo, además de ser una alternativa biológica, sostenible y económica que genera un menor impacto ambiental (Celis et al., 2008).

Estos extractos han sido estudiados para la obtención de compuestos fitoquímicos con actividad antimicrobiana, insecticida o farmacéutica. Este estudio tiene como fundamento aprovechar de una forma alterna y biológica la raíz del árbol *Azadirachta indica Juss* comúnmente conocido como Neem, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el sur y sureste de Asia y en la mayor parte de las regiones subtropicales del mundo. Este árbol es conocido por sus propiedades medicinales en humanos y por su control de plagas en cultivos agrícolas, ya que contiene diversos agentes bioactivos contra hongos e insectos principalmente (Gil, 2002).

La presente investigación se efectuó en el laboratorio de biotecnología vegetal del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez en donde se realizó el estudio de la actividad antifúngica in vitro de los extractos provenientes de la raíz de la planta *Azadirachta indica* Juss (Neem) contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis en diversos cultivos.

II. Justificación.

La biodiversidad encontrada dentro de los extractos de diferentes plantas, ha resultado en el descubrimiento de un gran número de productos bioactivos con aplicación en diferentes campos. Para la fitoprotección de cultivos agrícolas, se han encontrado compuestos con potencial biocontrolador, que pueden inhibir el crecimiento o interferir con eventos relacionados con la patogénesis de fitopatógenos, contribuyendo así con la disminución de la resistencia a los fungicidas químicos empleados comúnmente y minimizando los efectos negativos de ambos factores (patógeno y productos químicos), sobre las cosechas.

Las propiedades de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) han sido corroboradas por la ciencia actual y se puede obtener provecho de todas las partes del árbol. El aceite de Neem es utilizado en la agricultura biológica por biodegradable y no tóxico; se cree que puede sustituir a los insecticidas petroquímicos. Es repelente de insectos, antibacterial, antiinflamatorio, antihelmíntico, antimalárico, antiviral, antioxidante, entre otras.

Estos beneficios potenciales pueden ser descubiertos mediante bioensayos de los extractos de la raíz del árbol *Azadirachta indica* y de su actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* que beneficiaría en el futuro a un gran número de productores y comercializadores del campo agroindustrial del país.

III. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto biofungicída del extracto de la raíz de neem (*Azadirachta* indica Juss) sobre el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos.

- Preparación de extractos vegetales, provenientes de la raíz de neem (*Azadirachta indica* Juss), obteniendo diluciones del extracto.

- Evaluación de los extractos de neem, mediante el método de dispersión y el método de disco en Agar, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC), utilizando como microorganismo modelo *Colletotrichum gloeosporioides.*

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del extracto de la raíz de neem sobre la cepa del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

IV. Caracterización del área en que participó.

La realización del proyecto, se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología vegetal ubicado en el edificio “E”, del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en la carretera panamericana Km. 1080, en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. En dicho laboratorio se llevan a cabo actividades enfocadas a la investigación científica y tecnológica principalmente en su modalidad de residencia profesional, tesis de licenciatura y tesis de maestría.

4.1 Misión del ITTG.

Formar de manera integral profesional de excelencia en el campo de la ciencia y tecnología con actitud empresarial respecto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

4.2 Visión del ITTG.

Ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

V. Problemas a resolver.

Existe una gran incidencia de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* en el sector agropecuario, que ocasiona bajas considerables en el rendimiento y la productividad de los cultivos, no solo por enfermedades que desencadena durante la pre- y postcosecha, sino porque la mayoría de veces, han tratado de controlarlo con productos químicos, ocasionando además de deterioro ambiental, problemas de salud para quienes aplican y consumen los productos tratados con ellos, junto con el desarrollo de resistencia en el fitopatógeno, resultando en pérdidas de la rentabilidad de los cultivos.

Esta situación plantea la necesidad de buscar otro tipo de estrategias de control de este fitopatógeno, que evite el empleo de químicos de elevado costo en el tratamiento de estos. Mediante de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto de la raíz de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) que por su amplio reservorio de compuestos bioactivos, pueden ser aplicados de manera preventiva, para el control natural de este hongo fitopatógeno.

VI. Alcances y limitaciones.

7.2.1.1 Alcances.

En la realización del trabajo se obtuvo buenos resultados del bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem por el método de dispersión que en el bioensayo por el método de disco y en los análisis del extracto para determinar los fenoles totales por el tratamiento con solvente (acetona acuosa 70% v/v).

7.2.1.2 Limitaciones.

Existieron limitaciones a la falta disponibilidad de materiales y reactivos necesarios para la cuantificación por espectrofotometría, y en la estandarización del volumen de la suspensión del hongo al inocular y la cuantificación de las esporas inoculadas en cada bioensayo, las cuales se continuaran posteriormente.

VII. Fundamento teórico.

7.1 Uso de extractos vegetales como antifúngicos biológicos.

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se ha empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas (Hernández, L. y Rodríguez, M., 2001). Además, diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, entre otros (Cowan, 1999; Hernández et al., 2007).

Los hongos constituyen el grupo más importante entre los agentes casuales de tipo infectivo que provocan enfermedades en las plantas. El número exacto de hongos fitopatógenos se desconoce, pero se estima en un número superior a diez mil especies, pertenecientes a diversas categorías taxonómicas (Ascolflres, 1995).

Por otra parte, el control con plantas se ha utilizado hace mucho tiempo y su funcionamiento se basa en repeler insectos y agentes vectores de enfermedades. Las plantas empleadas con estos fines son hierbas aromáticas, malezas que por los metabolitos secundarios y/o principios activos, favorecen o desfavorecen condiciones de desarrollo de otras plantas o cultivos y previenen enfermedades (Celis et al., 2008). Los tipos de control que se usan con mayor frecuencia se hacen con plantas acompañantes, plantas repelentes o con cultivos trampa, los que se hallan combinados para obtener un beneficio mutuo (Flores et al., 2006).

Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas con propiedades fungicidas. Las cumarinas están clasificadas como antifúngicas y antibacterianas. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas, se incorporan a la pared vegetal para aumentar su rigidez e impedir la entrada de patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por las plantas después de la infección y en actividad inhibitoria de microorganismos patógenos, se ha identificado un grupo importante, la pisatina, un flavonoide sintetizado como reacción a la infección por hongos, siendo esta la primera fitoalexina aislada y caracterizada (Gil, 2002).

Por otro lado, aquellas que hacen parte de la respuesta hipersensible, como es el caso de algunos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente eliminando directamente al microorganismo patógeno y/o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxigeno que son toxicas para la misma célula vegetal, las cuales sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Es así, como

algunos metabolitos secundarios contribuyen en parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos (Sepúlveda et al., 2003).

Ante la necesidad e importancia de reducir el uso de químicos y productos agrícolas, que influyen en la calidad de las plantas, se ha dado cada vez más importancia a los extractos naturales como controladores, con el fin de dar nuevas alternativas, teniendo en cuenta los sistemas de defensa de las plantas, con la ventaja de ser biodegradables y contribuyendo, además, a preservar el medio ambiente y la biodiversidad (Flores et al., 2006).

7.2 Características generales de la especie *Azadirachta indica.*

El árbol de Neem se encuentra distribuido por el continente africano, asiático, en la parte central y sur del continente americano y Oceanía, la mayor parte de ellos en el sudeste de Asia y al sur de Sahara. Actualmente en 78 países existe Neem y se calcula que en todo el mundo existen entre 64 y 91 millones de ejemplares. En 9 países se utilizan materias activas provenientes de este árbol (Ramos, 2002).

Por otra parte se estima que en Colombia existen más de 100000 árboles de Neem, en los departamentos del Huila, Caquetá, Cauca, Nariño y Antioquia (Capataz et al., 2007), usados con fines investigativos y rurales para el control biológico de plagas. Adicionalmente este árbol tiene usos en reforestación ya que no requiere condiciones ambientales y nutricionales exigentes.

En Colombia la planta es usada como fertilizante orgánico, ya que es de mayor calidad que el estiércol vacuno, porcino o de otras fuentes animales. También, como abono es apreciado por aportar nutrientes y no permitir la proliferación de insectos en el mismo, gracias a sus propiedades insecticidas y repelentes, especialmente contra ciertos insectos como las termitas o comejenes y algunos nemátodos. En el departamento del Huila es común esta práctica, especialmente en los cultivos de arroz (AUPEC, 1997).

7.2.1 Descripción botánica del genero *Azadirachta indica*.

El nombre científico del Neem es *Azadirachta indica,* pertenece a la familia Meliácea. Es un árbol de crecimiento rápido, de hoja perenne, que alcanza alturas de hasta 20 metros en condiciones óptimas, con un diámetro medio de la copa de 5 a 10 metros, destacando su sistema radicular por tener una raíz pivotante muy desarrollada (Ramos, 2002). Además el árbol logra su máxima producción de frutos a los 10 años y llegan a vivir más de 100.

Dentro de la representación botánica, se describe: de corteza gris, o gris oscura, áspera, café rojiza en su interior, de hojas compuestas imparipinadas alternas de 20 a 38 centímetros de largo, y provistas de 8 a 19 folíolos alternados u opuestos, ovalo-lanceolados, oblicuos o subfalciformes, falciforme-lanceolados, brillantes; las flores son blancas o amarillo-pálido, pequeñas, olorosas, numerosas en largas panículas axilares, hermafroditas; (Figura 1), el fruto es una drupa pequeña, indehiscente en forma de nuececilla, verdes, amarillas cuando maduran, aromático, oblongo u ovoide-oblongo, de 1.3 a 1.8 centímetros de largo, con una sola semilla exalbuminosa (Muñoz, 2001).

Figura 7.1. Follaje de *Azadirachta indica* (Investigadores, 2008)

7.2.2 Categorías taxonómicas de *Azadirachta indica.*

Según recopilación de Parrotta, 1995, Muñoz, 2001 y Biswas et al., 2002

Reino:	Vegetal.
División:	Embriofitas.
Subdivisión:	Angiospermas.
Clase:	Dicotiledóneas.
Orden:	*Rutales.*
Suborden:	*Rutinae.*
Familia:	*Meliaceae.*
Subfamilia:	*Melioideae.*
Género:	*Azadirachta.*
Especie:	*Indica*
Sinonimia:	*Melia indica* Juss, *Melia azadirachta* L.
Nombre común:	Neem, nim, limba, nimba, mimba, margosa, lila india, cinamomo, kohomba.

7.2.3 Características ambientales.

El Neem puede resistir bien la sequía y años extremadamente secos con precipitaciones de 150 mm así como periodos secos de 6 a 9 meses (Tabla 1), aunque en estudios realizados en la India se observó que en años muy secos el árbol respondió con caída de hojas, mientras que a temperaturas, por debajo de 10°C, es muy difícil que se produzca fructificación (Ramos, 2002).

Tabla 7.1. Factores climáticos y del suelo que tolera *A. Indica* (Ramos, 2002).

Límites	Intervalo	Límites inferiores	Óptimo	Superiores
Lluvia (mm)	<300	500-800	1800	2000-2500
Temp. (ºC)	4	10-20	27	40-49
Arcilla (%)	<25	25-45	>45	>70
Arena (%)	<50	50-75	>75	>85

El rendimiento del árbol puede variar entre 30 y 100 kg de frutos dependiendo de las lluvias, insolación, el tipo de suelo y de variedad. En la India, de los 18 millones de árboles existentes se obtienen 3.5 millones de toneladas de semillas de las cuales se pueden extraer 700, 000 toneladas de aceite de estas, mientras que solo se produce 150, 000 toneladas de aceite al año (Ramos), siendo esto un impedimento para la obtención de principios activos durante todo el año, debido a que la planta solo fructifica en determinado periodo de tiempo por lo que seria de gran ayuda aprovechar su forraje.

7.3 Consideraciones Químicas del Neem.

El Neem contiene cientos de compuestos químicos, de especial interés, los terpenoides, compuestos por C, H y O; la presencia del oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Actualmente se conoce la existencia de unos 100 terpenoides. En el Neem, el más activo es la Azadiractina, de la que existen varios tipos que varían desde la Azadiractina A a la Azadiractina K (Angulo, 2004, Damaria, 2004 y Ramos et al. 2004).

Entre los principales compuestos bioactivos del Neem se encuentran: nimbidina, nimbidato de sodio, nimbolida, gedunina, Azadiractina, acido gálico, margolona y polisacáridos. Tiene además características destacables como resistencia a algunos insectos por tratarse de una mezcla de componentes bioactivos. Además

de ser sistemático a través de las raíces cuando se aplican al suelo, es decir de fácil absorción por parte de las raíces hasta llevarlo a las hojas, sobre todo por acción de la radiación ultravioleta, con un persistencia de 4 a 8 días y posibilidad de sinergismo con otros productos a base de *Basillus thuringiensis* (Salazar y Pariacote, 2004).

También se han aislado constituyentes como: diterpenos, triterpenoides, polifenoles, compuestos sulfurosos, y poliacetatos derivados (Arshass et al, 1996). Estos extractos están compuestos en su mayoría por productos del metabolismo secundario, como terpenoides, fenoles, aminoácidos no esenciales y alcaloides (Govindachari, et al 1998). Estudios adicionales han mostrado que los extractos en metanol al 90% por HPLC revelan mayor presencia de triterpenoides. Donde la actividad inhibitoria de hongos se atribuye a fracciones de triterpenoides en el caso de semillas (Govindachari et al 1998 y Verma et al 2007).

En forma pura algunos de los triterpenoides tienen una actividad antifúngica muy baja o nula, mientras que en combinación de varios de ellos muestra una excelente actividad contra algunos hongos. Según la literatura los triterpenoides obtenidos de fracciones metabólicas pueden ser antifúngicos, aditivos y tener efectos sinérgicos. Por lo tanto la concentración necesaria para inhibir cada hongo debe ser trabajo independiente (Govindachari et al 1998). Además la margosa tiene valor fuente de agentes antibacterianos, antivirales y nematicidas, por lo que se hace necesario ampliar su estudio para el campo agrícola (Arshass et al, 1996).

7.3.1 Antecedentes químicos de la especie *Azadirachta* indica Juss.

Más de 100 metabolitos terpenicos son reportados de semillas/frutos del árbol de neem (*Azadirachta indica Juss).* Varios métodos han sido descritos para la extracción de estos componentes activos en formas crudas o semicrudas para ser utilizado en vehículos comercialmente aceptables ya sea en forma líquida y/o formulaciones solidas (Damaria et a., 2004).

Un sin número de compuestos han sido identificados en las hojas a partir de extractos fitoquímicos usando solventes de diferentes polaridades entre los que se encuentran: vilasina-3-acetil-7-tigloil-lactona, 3-desacetil-3cinnamoil-azadiractina, 3-deacetil-salanina, 6-desacetilnimbinena, ASH, Azadiractina, Azadiractina-A, nimbina, salanina, Beta-sitosterol, Calcio, Carbohidratos, Fibra, Hiperosido, Isoazadirolide, Magnesio, Nimbaflavona, Nimbadiol, Fósforo, Proteinas, Quercetina, Quercitrina, Rutina y Vilasanin entre otros (Figura. A). (Williams et al, 2007).

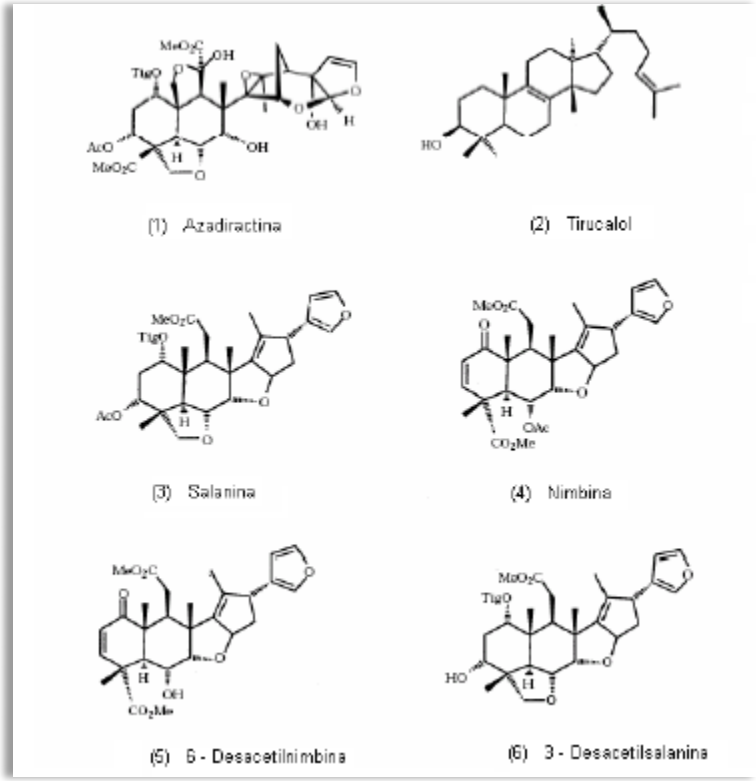

Figura.7.3. Estructura química de los principales compuestos aislados de material foliar del árbol *Azadirachta indica Juss* (Johnson et al, 1996).

7.4 Antifúngicos comerciales.

Para evaluar la actividad antifúngica de las plantas, es necesario emplear un control positivo con los fungicidas comerciales para tomarlos como un punto de referencia, aunque ha sido estudiada la resistencia adoptada por parte de los microorganismos a estos en el control de enfermedades fitopatológicas (Márquez et al, 2007). Los diversos métodos de control disponibles, esencialmente el control químico, presentan problemas en cuanto a eficiencia, costo e impacto negativo al ambiente (Marcano et al, 2005).

7.4.1 Captan.

Características

Fungicida preventivo de amplio espectro con actividad preventiva y curativa y absorción por vía radicular y foliar. Se transloca a los tejidos tanto por tratamientos de semillas como al suelo o foliar. Estimula la vegetación, mejora el aspecto (coloración) de los frutos, aumenta el tamaño de las naranjas y protege y favorece

la cicatrización de heridas de pedrisco. La persistencia del tratamiento es de 12-14 días que se reduce a 4 días con lluvia continuada.

Modo de acción
Interfiere el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo miceliar. No controla oídios.

7.5 Hongos fitopatógenos.

Varias enfermedades de las plantas se deben a la acción de hongos fitopatógenos que han mostrado ser específicos para el órgano al que se unen, mientras que algunos colonizan parte aéreas otros pueden invadir tejidos, por mecanismos de adhesión, penetración e invasión, dejando consigo el deterioro de la planta. La mayoría de los hongos fitopatógenos producen tubos germinales a partir de esporas, en un proceso muy parecido a la germinación de semillas en las plantas, ya que se encuentran sujetas a factores ambientales como luz, agua, temperatura, y nutrientes. En este proceso las esporas se desplazan hacia la zona de penetración finalizando en el enquistamiento de la espora y su adherencia a la planta.

La penetración puede ser de forma mecánica, por digestión enzimática o a través de aberturas naturales o heridas causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.) prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.) o ataques por insectos.

Muchos de los hongos fitopatógenos se caracterizan por tener un periodo de latencia antes de invadir el tejido vegetal, entre las medidas de control biológico se han usado extractos contra el ataque de hongos como: Sclerotina sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Fusarium roseum y *Colletotrichum gloeosporioides.*

7.5.1 Generalidades del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

Las especies de *Colletotrichum* sp. causantes de la antracnosis en diversos cultivos, exhiben dos fases principales de nutrición, durante la colonización de la planta; la fase inicial biotrófica en la cual se obtienen los alimentos de las células vivas huésped, y la segunda fase tardía necrotrófica donde los alimentos se obtienen de las células hospederas muertas a causa del ataque del patógeno (Bailey *et al.*, 1992). La fase biótrofa es de corta duración y en ésta se asegura el establecimiento del patógeno, sin daños severos en el tejido vegetal. La expresión

enzimática para degradar la pared vegetal está estrictamente limitada durante esta fase y la planta hospedera parece no reconocer al patógeno. En consecuencia no se desencadena respuesta de defensa (Perfect *et al.*, 1999). A la fase necrótrofa se asocia la aparición de los síntomas de la antracnosis, con una estrecha relación entre dicha aparición, el incremento en la expresión enzimática para degradar la pared celular vegetal y la virulencia del patógeno (Centis *et al.*, 1997).

El crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* sp. presenta algunas similitudes con el desarrollo necrotrofo, en lo que se refiere a la expresión enzimática (Shih *et al.*, 2000), la rápida colonización y utilización de la fuente de alimento y la producción de amonio en respuesta a pH ácido *in vitro*, incrementando de esta forma el pH hasta obtener el nivel óptimo para la actividad pectato liasa (Mendgen y Hahn, 2000). Se ha reportado (Drori *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000), para algunos hongos asociados a la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) pre y poscosecha de frutos, el incremento del pH del medio, tanto en el crecimiento necrótrofo como en el saprófito, la relación directa que existe entre este fenómeno y la activación de enzimas relacionadas con la degradación de pectinas; así como (Benito *et al.*, 2000) la importancia de estos factores en el desarrollo de la patogenicidad de hongos y bacterias. Sin embargo, también se reporta (Centis *et al.*, 1997) que el gen clpg2 de *Colletotrichum lindemuthianum*, que codifica una endopoligalacturonasa, se expresa durante todos los estadíos de la infección y es inducible en cultivo por la adición de pectina incluso a pH ácido.

La búsqueda de alternativas duraderas para el control de enfermedades vegetales y que además sean amables con el ambiente, como es el caso del uso de elicitores fúngicos (moléculas derivadas del hongo que son capaces de estimular mecanismos metabólicos de defensa vegetal) requiere, entre otros, del conocimiento de la biología y de las características óptimas de cultivo del patógeno.

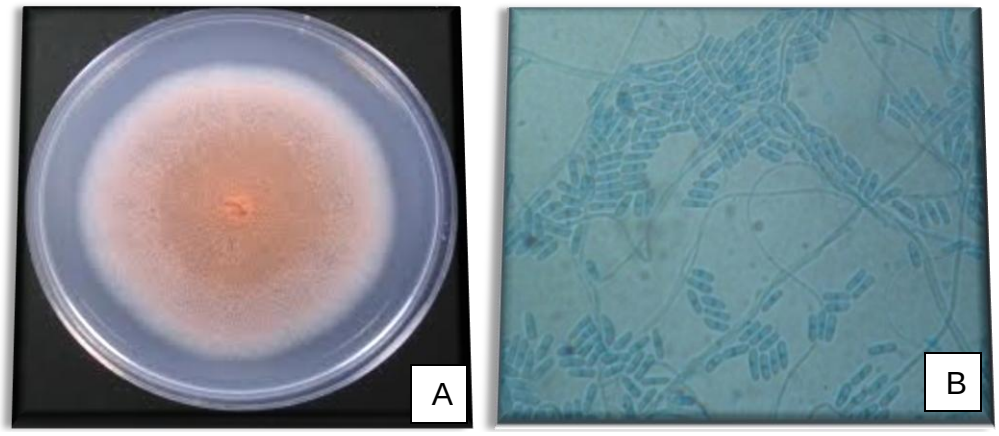

Figura 7.5 *Colletotrichum spp.* en Agar PDA; A) Macroscópica, B) Microscópica

VIII. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.

8.1 Preparación del material vegetal.

Figura 8.1 Tallos y raíces secas de Neem.

La muestra se seco a temperatura ambiente, se molió finamente en un molino de cuchillas con el objeto de obtener mayor área de contacto del solvente haciendo el proceso extractivo más eficiente, y se procedió a la obtención del extracto y diluciones.

8.2 Métodos de extracción del material vegetal.

Los métodos de extracción del material vegetal deben obedecer a la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y al propósito de investigación, en la búsquedas de sustancias para la comprobación de la actividad biológica, la extracción del material vegetal frecuentemente se realiza con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo, etc.) y baja reactividad. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los compuestos presentes. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados (Tood, 1998).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana polaridad y alta polaridad el acetato de etilo, etanol y acetona (Torrenegra, 1983).

8.3 Medición de fenoles totales. Uso del Método de Folin-Ciocalteu, basado en Makkar et al. (1993).

8.3.1 Preparación de los reactivos.

1. El reactivo Folin-Ciocalteu (1 N). Diluir del reactivo Folin-Ciocalteu (N 2) disponibles en el mercado con un volumen igual de agua destilada. Transfiera a una botella café y almacenar en un refrigerador (4 ° C). Debe ser de color amarillo dorado. No lo utilice si se vuelve verde oliva o verde.

2. Carbonato de sodio (20%). Pesar 40 g de carbonato de sodio.10 H2O, que se disuelven en unos 150 ml de agua destilada, y completar el volumen hasta 200 ml con agua destilada.

3. Solución patrón de ácido tánico (0,1 mg / ml). Disolver 25 mg de ácido tánico obtenido de Merck en 25 ml de agua destilada y luego diluir 1: 10 en agua destilada (utilizar siempre una solución recién preparada).

8.3.2 Extracción de fenoles.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se tomaron 1gr de muestra seca de la planta (raíces, tallo) se coloca en un tubo falcón de aproximadamente de 50ml al cual se le agrego 10ml de acetona acuosa al 70% v/v, agitando durante 2 horas en un agitador orbital, el contenido del vaso es entonces transferido a tubos de centrífuga y se centrifuga durante 10 min aproximadamente a 3000 g. Los extractos fueron analizados inmediatamente, y se conservaron las muestras en refrigeración y oscuridad. Para el ensayo colorimétrico se utilizó el método Folin-Ciocalteu, el cual determina la cantidad de fenoles solubles totales.

8.3.2 Preparación de la curva de calibración.

Tomar 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μl de la solución estándar de ácido tánico en tubos de ensayo de 5 ml de vidrio por separado. A continuación agregue una cantidad suficiente de agua destilada para llevar el volumen a 500 μl, para esta solución añadir 250 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y 1.25ml de la solución de carbonato de sodio al 20% (volumen final será de 2 ml, la concentración de ácido tánico será 0 a 0.1 μg). Vortex los contenidos e incubar a temperatura ambiente en condiciones oscuras. Después de 40 minutos leer la absorbencia a 725 nm contra el blanco de reactivo.

8.3.3 Análisis de fenoles totales.

Tomar alícuotas adecuadas de la muestra por encima del extracto en tubos de ensayo y hacer el volumen de 500 μl con agua destilada. Añadir 250 μl del reactivo Folin-Ciocalteu (1N) y luego de 3 minutos se le agregó 1.25ml de la solución de carbonato de sodio al 20% (p/v), se agitó y después de la incubación durante 40 minutos en condiciones de oscuridad, las muestras se leyeron a 725 nm en un espectrofotómetro ultravioleta visible. Los valores obtenidos fueron contrastados con una curva patrón de ácido tánico, tomado como sustancia de referencia.

8.4 Bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem (*Azadirachta indica Juss*) por el método de disco.

Se cortaron discos de papel filtro (Whatman No. 2 de 2.5 cm de diámetro) preparando cajas petri con medio PDA a un pH de 3.5. Se prepararon las diferentes soluciones del extracto a concentraciones de 33, 66, 83, 116 ppm; los discos de papel filtro, previamente estériles, son embebidos en las disoluciones respectivas, evaporando los restos de solvente en las máximas condiciones de esterilidad. Se inocularon 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en cada caja petri, agregando luego un disco con la solución de prueba. Las placas son incubadas a 30°c por 5-7 días. Se evaluaron realizando las mediciones de los diámetros de los halos en donde existían y se analizaron los resultados comparando con el control positivo embebido con captan al 15 % y un control negativo embebido solo con agua destilada estéril, mediante la medición del diámetro del círculo. Cada tratamiento se evaluó por cuadriplicado.

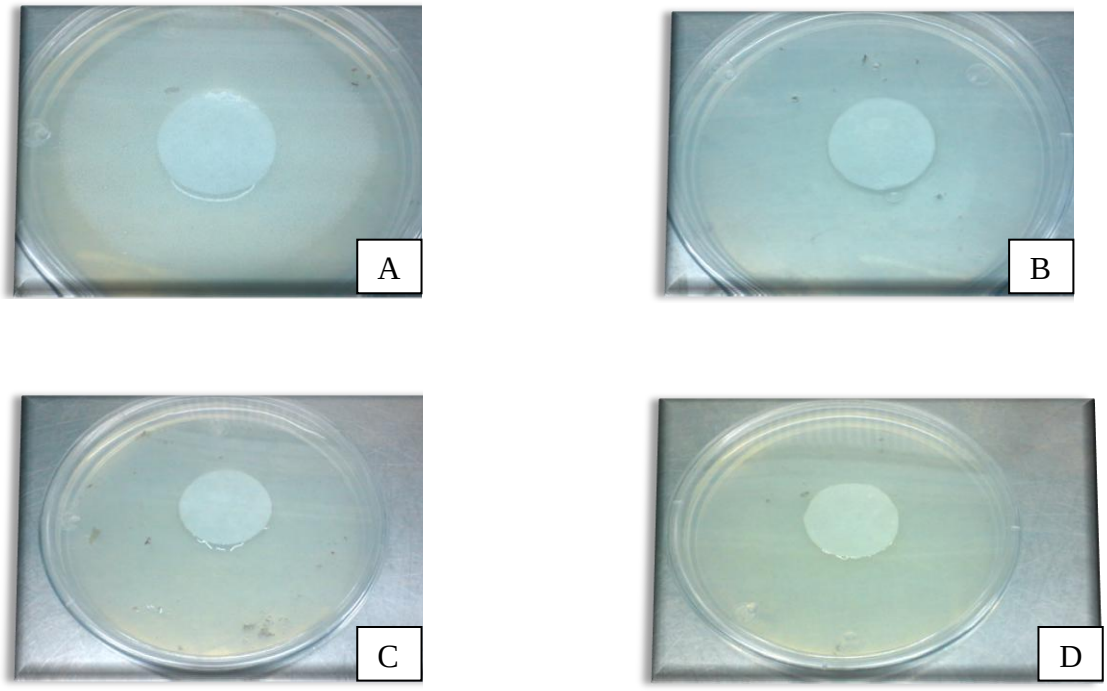

Fig. 8.4.1 .- Disco de papel filtro embebido con: A) agua destilada estéril, B) solución de captan al 15%, C) extracto de neem [33 ppm], D) extracto de neem [66 ppm], inoculado con 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en una caja petri con medio PDA a un pH de 3.5.

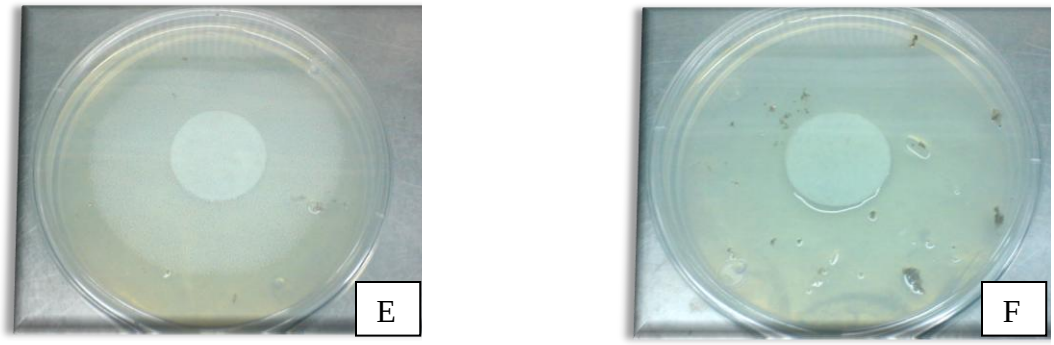

Fig. 8.4.2.- Disco de papel filtro embebido con: E) extracto de neem [83 ppm], F) extracto de neem [116 ppm], inoculado con 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en una caja petri con medio PDA a un pH de 3.5.

8.5 Bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem (*Azadirachta indica Juss*) por el método de dispersión.

Se prepararon cajas petri con medio PDA a un pH de 3.5. Se prepararon las diferentes soluciones del extracto a concentraciones de 33, 66, 83, 116 ppm; se dispersaron con una varilla acodada sobre el medio 200 μl del extracto con sus respectivas concentraciones cubriendo toda la superficie de la caja petri. Se inocularon 200 μl de una suspensión del hongo *colletotrichum gloeosporioides* en cada caja petri, Las placas son incubadas a 30°c por 5-7 días. Se evaluaron observando si existía crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y se analizaron los resultados comparando con el control positivo dispersando captan al 15 % y un control negativo dispersando solo agua destilada estéril sobre el medio. Cada tratamiento se evaluó por cuadriplicado.

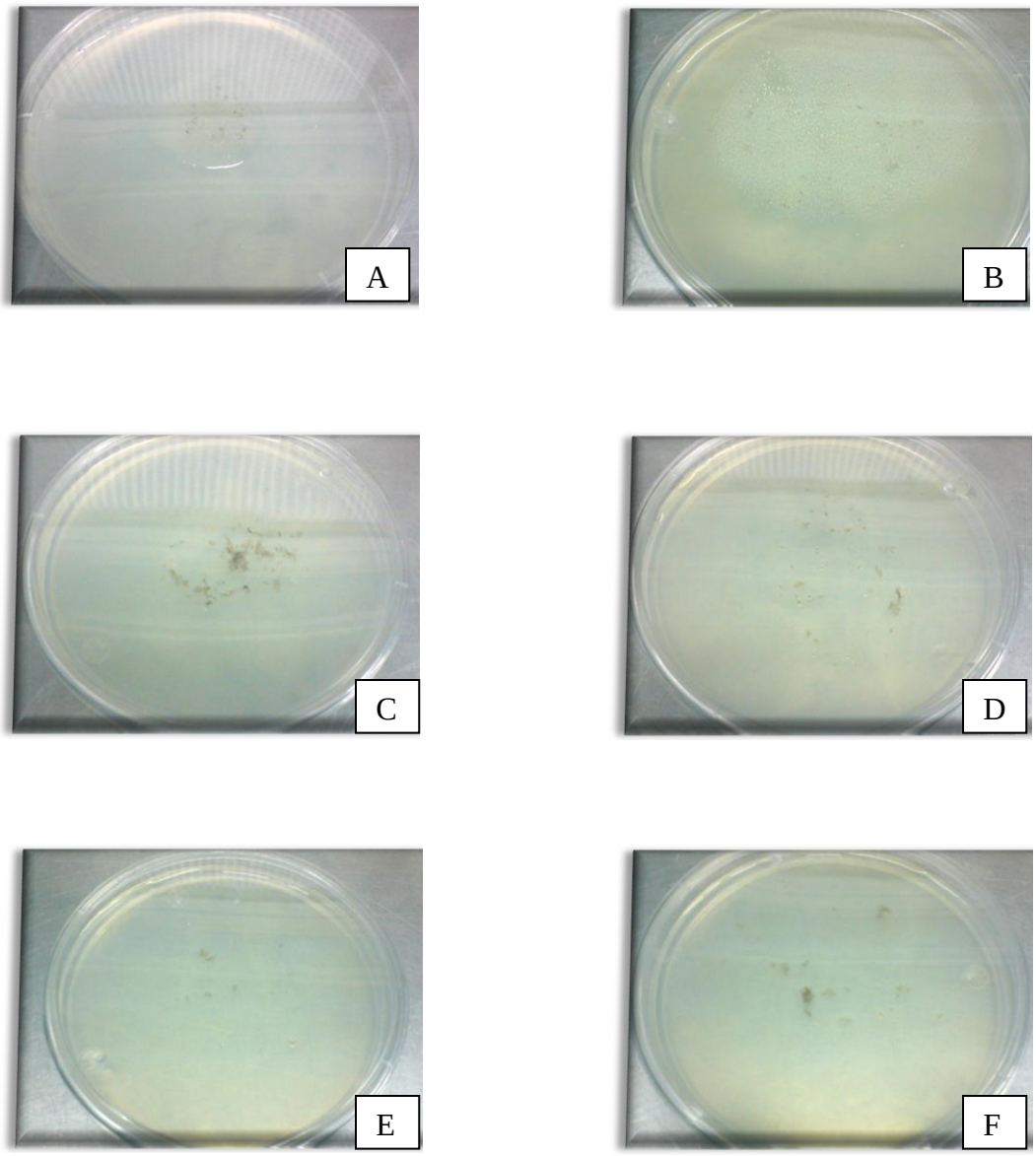

Fig. 8.5.- Caja petri con medio PDA a un pH de 3.5, con 200 μl de: A) agua destilada estéril, B) solución de captan al 15%, C) extracto de neem [33 ppm], D) extracto de neem [66 ppm], E) extracto de neem [83 ppm], F) extracto de neem [116 ppm], disperso sobre la superficie del medio e inoculado con 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

IX. Resultados.

En los ensayos microbiológicos contra el hongo fitopatógeno se observa que el medio de cultivo empleado para realizar los ensayos biológicos (PDA ®) es un medio apto para valorar el aspecto morfológico y coloración de la colonia, por su alto contenido de carbohidratos que condiciona un mayor crecimiento.

9.1 Resultados del bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem por el método de disco.

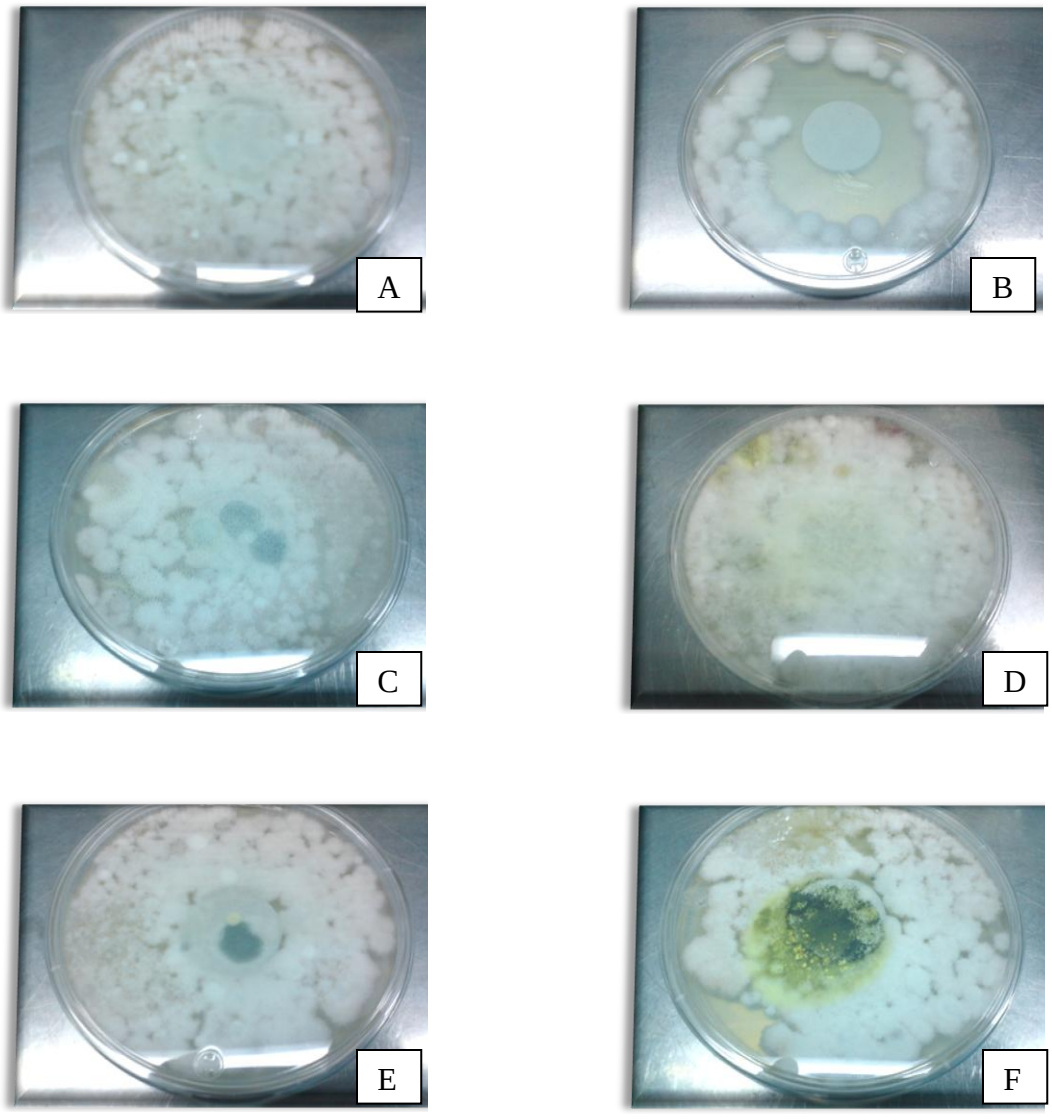

Fig. 9.1.- Disco de papel filtro embebido con: A) agua destilada estéril, B) solución de captan al 15%, C) extracto de neem [33 ppm], D) extracto de neem [66 ppm],

E) extracto de neem [83 ppm], F) extracto de neem [116 ppm], inoculado con 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en una caja petri con medio PDA a un pH de 3.5.

En la figura 9.1 se resumen los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del crecimiento en PDA ® por el método del disco del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* a los 5 días transcurridos después de su inoculación. En el control negativo con agua destilada estéril *Colletotrichum gloeosporioides* alcanza su crecimiento máximo en el quinto día, por lo tanto las diluciones del extracto, se evaluaron hasta ese día debido a que no presentaron ningún efecto inhibitorio sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

En cuanto al comportamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* frente al control positivo con captan al 15%, se observó la determinante acción fungicida de este producto químico, al no permitir el crecimiento del hongo en lo mínimo. Este fungicida interfiere el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo miceliar.

9.2 Resultados del bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem por el método de dispersión.

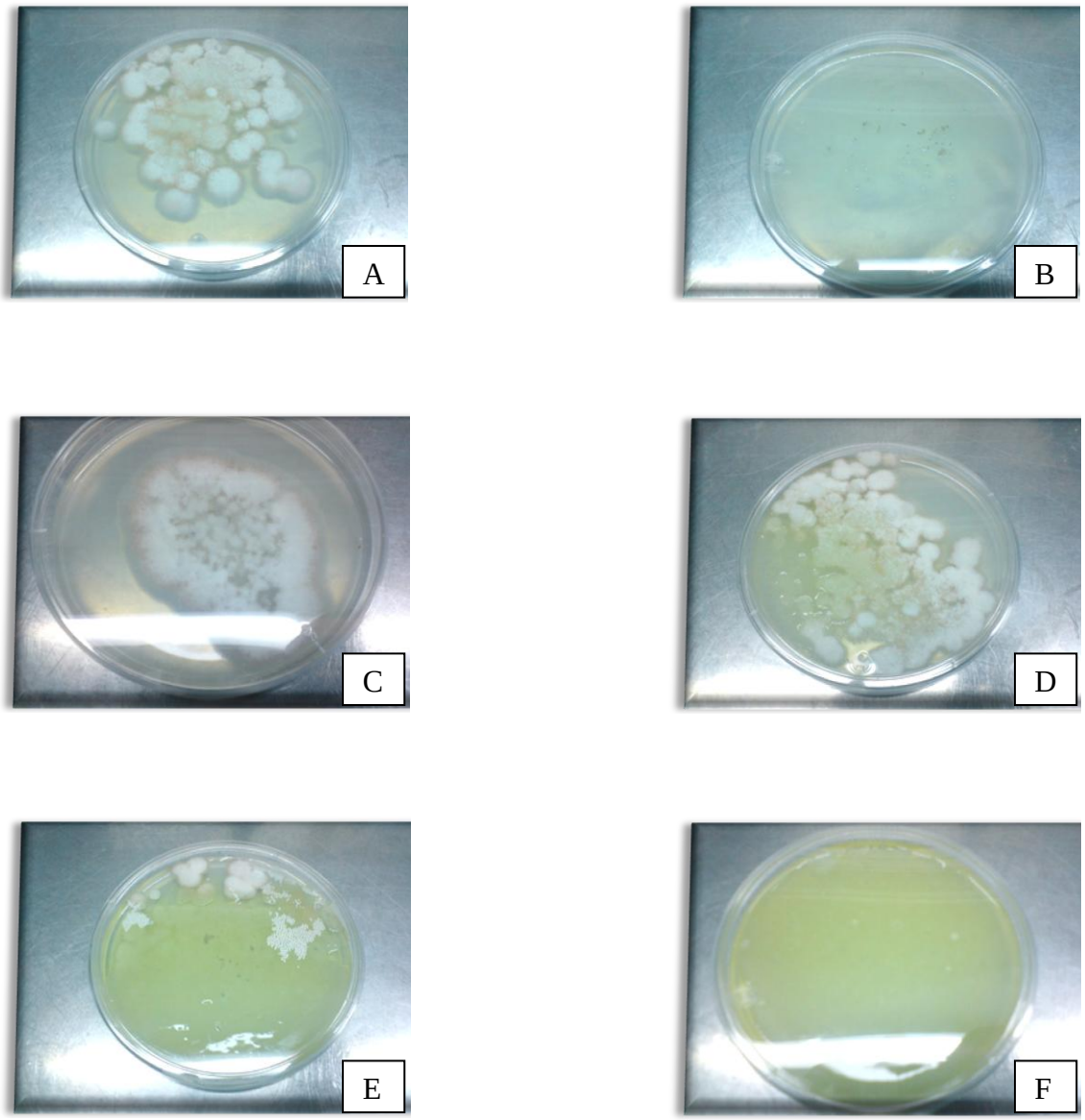

Fig. 9.2.- Caja petri con medio PDA a un pH de 3.5, con 200 μl de: A) agua destilada estéril, B) solución de captan al 15%, C) extracto de neem [33 ppm], D) extracto de neem [66 ppm], E) extracto de neem [83 ppm], F) extracto de neem [116 ppm], disperso sobre la superficie del medio e inoculado con 200 μl de una suspensión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

Cuadro 9.2.- Resultados del bioensayo para determinar la actividad antifúngica de los extractos crudos de la raíz de neem por el método de dispersión basado en el crecimiento del hongo.

Fungicida y Extracto.	Crecimiento del Hongo (5 Días)
Sin Fungicida / Extracto	xxxx
Extracto de Neem [33 ppm]	xxx
Extracto de Neem [66 ppm]	xxx
Extracto de Neem [83 ppm]	xx
Extracto de Neem [116 ppm]	x
Captan [15% p/v]	---

XXXX = crecimiento muy abundante
XXX = crecimiento poco abundante
XX = crecimiento abundante
X = crecimiento regular
--- = crecimiento nulo

En la figura 9.2 y en el cuadro 9.2 se resumen los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del crecimiento en PDA ® por el método de dispersión del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* a los 5 días transcurridos después de su inoculación. En el control negativo con agua destilada estéril *Colletotrichum gloeosporioides* alcanza un crecimiento muy abundante al quinto día, por lo tanto las diluciones del extracto, se evaluaron hasta ese día debido a que presentaron crecimiento en las concentraciones más bajas como se aprecia en el cuadro 9.2, por lo tanto el efecto inhibitorio sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* fue muy poco a esas concentraciones.

En cuanto al comportamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* frente al control positivo con captan al 15%, se observó la determinante acción fungicida de este producto químico, al no permitir el crecimiento del hongo en lo mínimo. Este fungicida interfiere el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo miceliar, demostrando que a una concentración de 15% p/v, es suficiente para ejercer una inhibición del 100%.

X. Conclusiones.

- En el bioensayo por el método de disco no se logro observar actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en ninguna de las concentraciones empleadas del extracto de la raíz de Neem (*Azadirachta indica* Juss).

- En el bioensayo por el método de dispersión, se logro observar una ligera actividad antifúngica *in vitro contra* el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en las distintas concentraciones empleadas del extracto de Neem (*Azadirachta indica* Juss).

- El extracto de la raíz de Neem (*Azadirachta indica* Juss) a una concentración de 116 ppm, presento el mejor efecto fungicida contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en el bioensayo por el método de dispersión.

- Al comparar ambos bioensayos, se puede observar que el método por dispersión presento mejores resultados como fungicida contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* a pesar que no se logro la inhibición completa del hongo con las concentraciones empleadas, por lo tanto nos sugiere que el extracto de la raíz de Neem podría utilizarse como preventivo contra el crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides.*

XI. Recomendaciones.

- Probar concentraciones más altas para el método de disco y el método por dispersión.

- Estandarizar y cuantificar el volumen de inoculo (esporas/ml).

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de los bioensayos evaluados.

- Realizar pruebas *in vivo* de cada uno de los tratamientos, empleando como control positivo un agente utilizado actualmente a nivel industrial.

- Probar la actividad antifúngica en otras presentaciones diferentes a extractos.

XII. Referencias bibliográficas y virtuales.

1. Ascolflores. 1995. Simposio Internacional, “El manejo integrado de plagas y enfermedades en floricultura”. Bogotá D.C. pp 5-8

2. Angulo, M., Gardea, A., Vélez, R., García, R., Carrillo, A., Cháidez C., Partida J. 2004. Contenido de Azadiractina A en semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. Revista fitotécnica Mexicana. 27 (004): 305-311.

3. Arshaas, M., Neaemul, S., Ahmad, I., Tabassum, R., Anbreen, B. 1996. Toxic of neem Leaves Extrac (NLX) compared with malathion (57 E.C.) Agains late 3rd Instar larvae of culex Fatigans (Wild Strain) By Who Method. Tr. J. of Zoology. 22: (1998) 213-218.

4. Bailey Ja, O’Connell Rj, Pring Rj, Nash C. 1992. Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. En: *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control (Bailey Ja y Jeger MJ, Eds.). CAB International Wallingford; 88-120.

5. Benito Ep, Arranz M, Eslava A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Rev Iberoam Micol; 17: S43-S46.

6. Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., Bandyopadhyay, U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current science. 82 (11): 1336-1345.

7. Capataz, J., Orozco, F., Vergara, R., Hoyos, R., 2007 Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera Frgiperda* J.E Smith en condiciones de laboratorio. Revista Fac. Nal. Medellín. 60 (1): 3715-3715.

8. Celis, A., Mendoza, C., Pachón M., Cardona, J., Delgado, W. y Cuca, L. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia piperaceae. Una Revisión. Agronomía Colombiana. 26 (1): 97-106.

9. Centis Si, Guillas N, Séjalon Mt, Esquerré-tugayé. 1997. Endopolygalacturonase Genes from *Colletotrichum*: Cloning of clpg2 and comparison of its expression to that of clpg1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. Molecular plant microbe interactions. 10: 769 -775.

10. Cowan, M. 1999. Plan Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 10:564-582

11. Damaria, S., Sridhar, S., Raman, K. y Chandrasekaran, M. 2004.Storage stable pesticide formulations containing azadirachta. bangalore. India. United states patent. US 6.811.780 B1

12. Drori n, Kramer-haimovich H, Rollins J, Dinoor A, Okon Y, Pines O, Prusky D. 2003. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. Appl environ microbiol. 69: 3258-3262

13. Flores, Y., Mujica, Y., y Rondón. 2006. evaluación *in vitro* de tres controladores del hongo *Scelrotium Rolfsii*. Memoria de la fundación la salle de ciencias naturales. 166:141-149

14. Gil, P. 2002. Productos Naturales. Universidad pública de Navarra. España.

15. Govindachari, T., Suresh, G., Masilami, S. 1999. Antifungal activity of *Azadirachta indica* leaf hexane extrac. Centre for Agrochemical Research. SPIC Science Foundation. 70 (4): 417-420.

16. Govindachari, T., Suresh G., Gopalakrishan, G., Banumathy, B., Masilamani. 1998. Identification of antifungal from the seed oil of *Azadirachta indica*. Phytoparasitica. 26:2.

17. Johnson, S., Morgan, E., Peiris, C. 1996. Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seeds of neem (Azadirachta indica). Annals of botany. 78:383-388.

18. Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K., and Becker, K. (1993) Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* **61**, 161–165.

19. Marcano, D., Vargas, N. y Pire, A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicota*. Revista de la facultad de agronomía. 22(4):315-324.

20. Márquez, L., De la Rosa, C., Mercado, A. 2007. Actividad antifúngica del extracto en etanol de las hojas frescas de Pedialanthus tithymaloides L Poit (ULTIMORRAL). Scientia et tecnica. 13(33:155-159.

21. Mendgen K, Hahn M. 2000. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. trends plant sci; 1-4.

22. Muñoz, S. 2001. El aceite de neem *Azadirachta indica* A. Juss, y su relación con el control de la roya de la hoja de trigo *Var. Baviacora*. Instituto Tecnológico Agropecuario.

23. Parrotta, J., Chaturvedi, A. 1995. *Azadirachta indica* A. Juss Margosa, neem Meliaceae Familia de la caoba. 65-72.

24. Perfect Se, Hughes Hb, O'Connell Rj, Green Jr. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal genet biol; 27:186-198.

25. Prusky D, McEvoy JL, Leverentz B, Conway WS. 2001. Local Modulation of Host pH by *Colletotrichum species* as a mechanism to increase virulence. molecular plant- microbe interaction. 14: 1105-1112.

26. Ramos, C, González, V., Soto, M., Engleman, E., Rodríguez, D. 2004. Variación en el contenido de Azadiractina en frutos de Margosa durante su desarrollo. Revista fitotécnica mexicana. 27 (1): 81-85.

27. Salazar, E., Pariacote. 2004. Control parasitario en caprinos usando extracto acuoso de semillas de Nim (*Azadirachta indica* A Juss). Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, (INIA). Estación Falcón, Venezuela. 12 (1) 82 – 85.

28. Shih J, Wei Y, Goodwin Ph. 2000. A Comparation of the Pectate lyase Genes *Pel-1* and *Pel-2* of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression on culture and during necrotrophic infection. Gene. 243: 139 -150.

29. Torrenegra, R. 1983. Introducción al análisis moderno. Pontificia Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá.

30. Torrenegra, R., Pedrozo, J. 1993. Palmitolactona de Ageratina viscosa. Phytochemistry. 3:342.

31. Verma, V., Gond, S., Kumar, A., Kharwar, R., Strbel, G. 2007. The endophytic mycoflora of bark, laefand stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). Microbial Ecology Springer science. 54: 119- 125.

32. Yakoby N, Kobiler I, Dinoor A, Prusky D. 2000. pH regulation of pectate lyase modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. Appl environ microbiol. 66: 1026-1030.

XIII. Anexos.

Curva de Calibración.

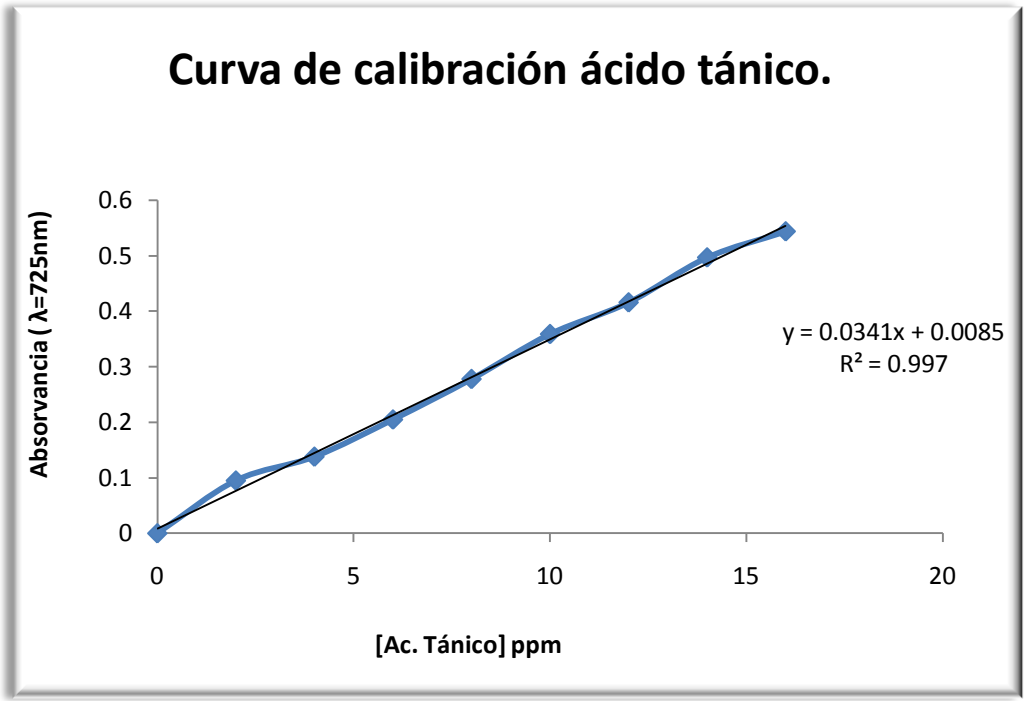

Fig. 13.1.- Grafica de acido tánico, empleado como sustancia de referencia para determinar fenoles totales del extracto.

$$y = 0.0341x + 0.0085$$

$$x = \frac{y}{0.0341} - 0.0085$$

y: es la absorvancia del extracto a una longitud de onda de 725 nm
x: es la concentración de fenoles totales del extracto.

$$y = 0.396$$

$$x = \frac{0.396}{0.0341} - 0.0085 = 11.6\ ppm$$

Para el cálculo de la concentración de fenoles totales en el extracto de neem se realizo una dilución, se tomaron .7ml del extracto y se aforaron a volumen 10ml con agua destilada en un matraz aforado de 10 ml. Para conocer la concentración real de fenoles totales en el extracto se emplea la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \ldots\ldots \text{ ec. 1}$$

Donde;
C_1 = concentración inicial
V_1 = volumen inicial
C_2 = concentración final
V_2 = volumen final

$$C_1 * (0.7 \text{ ml}) = (11.6\text{ppm}) * (10\text{ml})$$

$$C1 = \frac{(11.6\ ppm)(10ml)}{(0.7\ ml)} = 165.7\ ppm$$

Donde C_1 es la concentración de fenoles del extracto concentrado.

Cuadro 13.1.- En esta tabla se observan las distintas concentraciones de las diluciones realizadas al extracto, para ser empleadas en los bioensayos. (Las concentraciones fueron calculadas con la ec. 1)

Volumen de extracto. (ml)	Volumen Final de la Solución. (ml)	Concentración de la solución (ppm)
7	10	116
5	10	83
4	10	66
2	10	33