

Capacidad biofungicida sobre *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill. y caracterización fitoquímica de plantas medicinales nativas de la provincia de Misiones

Silvia L. López^{1,2}, Luis F. A. Alves³, Liliana S. Celaya¹, Pablo F. Martina^{1*}

1. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones, Misiones, República Argentina.
2. Agencia Ejecutiva de Desarrollo e Innovación Tecnológica, Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología. Misiones, República Argentina.
3. Centro de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Estatal del Oeste de Paraná-Brasil (UNIOESTE).

* Autor a quien dirigir la correspondencia: pfmartina@hotmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue encontrar una alternativa a los fungicidas químicos que se utilizan actualmente en el control del hongo *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill., agente causal de muscardina blanca en *Bombyx mori* L. En este estudio examinamos 6 plantas medicinales nativas para determinar su actividad antifúngica y composición fitoquímica. La actividad antifúngica de los extractos (2 a 8 %) se evaluaron mediante el IB (índice biológico) determinado sobre el potencial de germinación, el crecimiento vegetativo y la producción de conidios. Los extractos de *Baccharis crispera* 4 y 6 % (IB = 37,2 y IB = 36,4); *Mikania cordifolia* 6 % (IB = 36,24); *Pityrogramma calomelanos* 4 % (IB = 40,4) y *Polygonum punctatum* 6 y 8 % (IB = 33,1 y IB = 35,5) resultaron activos con valores dentro del rango de toxicidad (0-41) mientras que *Schinus molle* y *Ocimum tenuiflorum* no exhibieron potencial antifúngico. La caracterización fitoquímica entre los extractos activos determinó que el contenido fenólico varía entre 62,5 a 103,7 mg GAE/g extracto, mientras que para tanino fue de 19,7 a 72,5 mg GAE/g extracto y flavonoides totales de 11,6 a 33,7 mg Qe/g extracto. Los extractos de *B. crispera*, *M. cordifolia*, *P. calomelanos* y *P. punctatum* resultaron efectivos para controlar *in vitro* a *B. bassiana*.

Biofungicidal capacity on *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill. and phytochemical characterization of native medicinal plants of the province of Misiones

Summary

The objective of this work was to find an alternative to the chemical fungicides that are currently used in the control of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill, causative agent of white muscardine in *Bombyx mori* L. In this study we examined 6 native medicinal plants to determine its antifungal activity and phytochemical composition. The antifungal activity of the extracts (2 to 8 %) was evaluated by means of the IB (biological index) determined on the potential germination, vegetative growth and the production of conidia. The extracts of *Baccharis crispera* 4 and 6 % (37.2 and 36.4); *Mikania cordifolia* 6 % (36.24); *Pityrogramma calomelanos* 4 % (40.4); and *Polygonum punctatum* 6 and 8 % (33.1 and 35.5) were active with values within the toxicity range (0-41) while *Schinus molle* and *Ocimum tenuiflorum*, they did not exhibit antifungal potential. The phytochemical characterization between the active extracts determined that the phenolic content varies between 62.5 to 103.7 mg GAE/g extract, while for tannins it was 19.7 to 72.5 mg GAE/g extract, and total flavonoids of 11.6 to 33.7 mg Qe/g extract. The extracts of *B. crispera*, *M. cordifolia*, *P. calomelanos* and *P. punctatum* were effective to control *Beauveria bassiana in vitro*.

Introducción

En la Argentina, la producción de capullos e hilo de seda puede constituir una alternativa de diversificación para pequeños y medianos productores agropecuarios (Casadio y Pescio, 2008; Basso y col., 2017).

La sericultura es una actividad basada en la agricultura

que emplea equipos e instalaciones relativamente simples y de baja tecnología. Además, las condiciones para la cría de los insectos (humedad aproximada de 70 % y temperatura de 25 °C) son favorables para el desarrollo de patógenos, especialmente bacterias, hongos y virus que pueden comprometer

Palabras clave: muscardina – *Bombyx mori* – *Baccharis crispera* – *Mikania cordifolia* – *Pityrogramma calomelanos* – *Polygonum punctatum*

Key words: muscardine – *Bombyx mori* – *Baccharis crispera* – *Mikania cordifolia* – *Pityrogramma calomelanos* – *Polygonum punctatum*

toda la cría (Porto y col., 2005; Potrich y col., 2007).

La República Argentina dispone de un único proveedor de huevos con capacidad de oferta limitada, insuficiente como para impulsar la expansión de la actividad. Es por ello que la mayoría de los productores obtienen sus propios huevos, quedando expuestos a los problemas propios de la endogamia (Basso y col., 2017). La sericultura se presenta como una alternativa productiva para la provincia de Misiones, ya que, debido a su ubicación al noreste de la Argentina, con un clima subtropical sin estación seca, presenta condiciones hídricas, edafológicas, ecológicas, sociales y culturales, ideales para el desarrollo de esta actividad (López, 2014).

En la cría del gusano, no existen medidas curativas, siempre se trabaja con la prevención de las enfermedades (Pescio y col., 2006). En este sentido, Parra (1991) enfatiza la importancia de la investigación dirigida al descubrimiento de antimicrobianos para el control de microorganismos patógenos en la cría de insectos. La desinfección previa del lugar es de suma importancia, ya que los patógenos se alojan en los lugares de cría y equipamiento (Brancalhão, 2002). A pesar de existir y ser adoptadas, las medidas preventivas utilizadas en galpones reducen las infecciones por microorganismos, pero son ineficientes y pueden presentar restricciones en su uso, por el riesgo de envenenamiento de las larvas y productores (Surendra y Surendra, 1999).

La muscardina blanca, principal enfermedad fúngica relacionada con *Bombyx mori* L. (Bombycidae), es causada por el hongo *Beauveria bassiana* ((Bals.-Criv.) Viull. (Ascomycota: Hypocreales), a la que los gusanos son susceptibles, principalmente en los primeros estadios (Amaral y Alves, 1979; Kumary col., 1999). En relación a esto, numerosos trabajos publicados evaluaron distintos tratamientos y estrategias para controlar esta enfermedad del gusano de seda, *B. mori*, en los galpones de cría. Además de los fungicidas y desinfectantes sintéticos, algunos extractos de plantas y otros productos naturales mostraron un gran potencial de uso (Mohan, 2007; Pares y Alves, 2016; Pares y col., 2017).

Además, Isaiarasu y col. (2011) demostraron *in vitro*, la eficacia de extractos acuosos y alcohólicos de las plantas *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae), *O. tenuiflorum* L. (Lamiaceae) (syn. *Ocimum sanctum* L.) y *Tridax procumbens*, como alternativas para el control de enfermedades bacterianas y fúngicas en el mejoramiento de *B. mori*. El extracto etanólico de *O. tenuiflorum* ha sido citado por su efecto promotor del crecimiento en el gusano de seda, lo que ayuda a mejorar las cualidades comerciales de la seda y se puede utilizar en la sericultura para mejorar el rendimiento (Saad y col., 2019).

La familia Asteraceae ha sido ampliamente estudiada a nivel químico debido a la gran variedad de metabolitos secundarios que produce, principalmente terpenos, cumarinas, alcaloides y sus derivados que presentan propiedades antimicrobianas (Funk y col., 2009).

Se establece que los metabolitos secundarios generalmente están presentes como mezclas de compuestos en

donde los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Espinosa y García, 2001). Sin embargo, se sabe que algunos extractos vegetales influyen de manera positiva en parámetros como el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de hongos entomopatógenos (Mamprim y col. 2014).

Misiones se caracteriza por contar con una amplia variedad de especies de plantas medicinales dentro de las cuales *Baccharis crispa* Spreng. y *Mikania cordifolia* Willd, ambas de la familia Asteraceae, han sido evaluadas por sus propiedades antifúngicas (Colares, 2010). *Polygonum punctatum* Elliot (Polygonaceae) (Amery col., 2006) y *Polygonum calomelanos* (L.) Link (Pteridaceae), han sido reportados por sus propiedades antimicrobianas (Souza, 2012) como así también *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) que además posee propiedades antioxidantes (Martins y col., 2014). En Misiones es común encontrar cultivada la especie *O. tenuiflorum* L. la cual es muy utilizada como condimento y ha sido evaluada efectivamente contra *Aspergillus flavus* (Kumar y col. 2010).

Actualmente la investigación en fitoquímica está encaminada en aislar identificar y caracterizar compuestos sintetizados por las plantas. Las propiedades antimicrobianas de los extractos pueden ser el resultado de interacciones sinérgicas de muchos fitoquímicos activos diferentes. No se conoce si la mayoría de las plantas han desarrollado metabolitos antifúngicos o si esta propiedad está restringida a determinadas especies y familias (Montes Belmont, 2009). Estudios recientes, han comprobado que se destaca la acción antifúngica de los fenoles, uno de los antioxidantes de mayor concentración que interfiere en el metabolismo microbiano, al inhibir su crecimiento (Bacon y col., 2016). El eugenol es un derivado fenólico que inhibe el crecimiento de varios organismos fúngicos patógenos (Garg y Siddiqui, 1992) ya sea solo o combinado (eugenol -timol, eugenol - carvacrol), que pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades infecciosas orales (González Escobar, 2002).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto de los extractos hidroalcohólicos de las especies *B. crispa*, *M. cordifolia*, *O. tenuiflorum*, *P. punctatum*, *P. calomelanos* y *S. molle*, sobre el hongo *B. bassiana*, agente causal de la muscardina blanca en gusanos de seda. Así mismo determinar la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles, taninos y flavonoides totales de los extractos que resultaron ser tóxicos para este hongo.

Materiales y métodos

Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Las especies colectadas fueron seleccionadas en base a revisión bibliográfica (Amat y Yajia, 1991; Gatusso, 1998; Keller y Romero, 2006; Barboza y col. 2009; Colares, 2010) y posterior identificación taxonómica tomando como re-

ferencia el Catálogo de las Plantas Vasculares del Conosur (1994) seguido de un relevamiento a campo en tres puntos de la zona sur de la Provincia de Misiones, durante los meses de enero a Julio de 2019. En el Área de Recursos Ambientales "El Zaimán" (ARA-El Zaimán) se recolectaron los ejemplares de *B. crispa* (27° 26' 19.3" S 55° 54' 8.3" O) y *P. calomelanos* (27° 26' 19.5" S 55° 54' 8.7" O), mientras que del predio de LAB INNOVACION-AEDIT los ejemplares de *M. cordifolia* (27° 23' 48.2" S 55° 58' 26.3" O), *O. tenuiflorum* (27° 23' 48.2" S 55° 58' 26.3" O) y *S. molle*. Los ejemplares de *P. punctatum* se recolectaron en la ciudad de Candelaria, a unos 20 km de la ciudad de Posadas (27° 27' 30.1" S 55° 44' 36.7" O). Para todas las muestras la recolección se llevó a cabo en horas de la mañana, fueron lavadas con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente y al resguardo de la luz, por 5 días. Un ejemplar de cada especie fue depositado en el herbario de la cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Preparación de extractos

Los extractos se prepararon de acuerdo con el método propuesto por Mamprim y col. (2014) con algunas modificaciones. Luego de pesar 10 g de cada una de las muestras se adicionaron 100 ml de etanol al 70 % para la elaboración de los extractos hidroalcohólicos. Seguidamente se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 5 días, agitando periódicamente 2 veces al día. Luego cada uno se filtró y el solvente fue evaporado con rotavapor a 45 °C. El proceso se terminó en estufa a 40 °C hasta la obtención de peso seco. Para la evaluación de toxicidad se prepararon cada uno de los extractos en concentraciones 2, 4, 6 y 8 %. Para el tratamiento control se empleó agua destilada estéril.

Obtención del inoculo de *Beauveria bassiana*

La cepa de *B. bassiana* (BbAi) se obtuvo del Laboratorio Bio-Lab-LAB INNOVACIÓN-AEDIT, de la ciudad de Posadas, Misiones. La cepa fue seleccionada por su potencial entomopatógeno y facilidad de propagación en el medio de cultivo. El hongo se cultivó en medio agar-papa-dextrosa (PDA) y se incubó a 26° C durante de 8 a 10 días. Los conidios se recogieron raspando la superficie del medio de cultivo y se almacenaron en un tubo estéril. La suspensión se preparó agregando 10 ml de solución estéril de Tween 80 (0,01 %).

Para la evaluación del efecto de los productos sobre los parámetros biológicos del hongo, se utilizó la metodología desarrollada por Silva y col. (2005) que ofrece la posibilidad de simular lo que debe ocurrir en el campo.

Germinación de conidios

Se realizó por el método de conteo directo en microscopio óptico siguiendo las recomendaciones de Oliveira y

col., (2015) y Silva y Neves (2005). Se inocularon 100 µl de suspensión fúngica $1,6 \times 10^7$ conidios/ml en el centro de las placas de Petri con medio de cultivo PDA y una vez secas se pulverizaron con 250 µl de cada uno de los extractos/placa. Luego las placas fueron incubadas a 26 ± 1 °C y 12 h de foto período por 24 h para la cuantificación de los conidios germinados y no germinados en microscopio óptico con aumento 400x, contando no más de 200 conidios en promedio, por placa.

Crecimiento vegetativo y producción de conidios

La inoculación de *B. bassiana* se realizó en tres puntos de la superficie de las placas con medio de cultivo PDA y se las incubó por 48 hs. Seguidamente se pulverizaron las placas con 250 µl de cada uno de los extractos elaborados y se volvieron a incubar por 5 días más. Los resultados se obtuvieron midiendo perpendicularmente el diámetro de dos de las colonias, de cada placa inoculada. Posteriormente, las colonias se recortaron y transfirieron individualmente a tubos de vidrio, en donde se prepararon diluciones para estimar la concentración mediante el conteo en cámara de Neubauer.

Los datos obtenidos en las evaluaciones de estos parámetros se analizaron de acuerdo al cálculo de toxicidad para test *in vitro* propuesto por Rossi-Zalaff y col. (2008), siendo $IB = 47[CV] + 43[ESP] + 10[GER]/100$, donde IB = Índice Biológico, CV = crecimiento vegetativo, ESP = esporulación y GER = germinación. Los valores del IB para la clasificación de los productos son: "T" (Tóxico): 0-41; "MT" (Moderadamente Tóxico) = 42-66 y "C" Compatible > 66.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Fueron distribuidos 100µl de la suspensión del hongo con asa de Drigalsky (1×10^3 conidios/ml) en la superficie del medio PDA y posteriormente se pulverizaron los extractos, como fue descrito anteriormente. Las placas se incubaron durante 3 días en las condiciones antes mencionadas y a continuación se cuantificaron las UFC, mediante microscopio óptico.

Para todos los tratamientos, se prepararon 5 placas, las que se consideraron repeticiones. Para el control, las placas fueron pulverizadas con agua destilada y Tween 80 (0,01 %).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en cuanto a la varianza (test F) y las medias comparadas por la prueba de Tukey, ambos con 5 % de significación utilizando el programa estadístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Caracterización fitoquímica

Para la caracterización fitoquímica se utilizaron extractos metanólicos preparados a una concentración de 4 mg/ml y se realizaron por triplicado.

Tabla 1.- Actividad de los extractos alcohólicos sobre los parámetros biológicos de *B. bassiana*

Tratamiento	C	Viabilidad (%)	CV (cm ²)	UFC	P. de conidios (x 10 ⁷)
Control	0 %	91,8 ± 11,3 ^a	1,99 ± 0,90 ^a	34 ± 19,5 ^a	38,25 ± 5,0 ^a
<i>B. crispa</i>	2 %	74,9 ± 6,1 ^b	1,46 ± 0,10 ^b	5,0 ± 2,0 ^b	13,25 ± 3,3 ^b
	4 %	49,1 ± 11,3 ^c	1,16 ± 0,10 ^d	5,2 ± 1,4 ^b	4,55 ± 1,3 ^c
	6 %	9,9 ± 3,3 ^d	1,20 ± 0,10 ^{cd}	15,4 ± 1,5 ^b	6,3 ± 3,8 ^{bc}
	8 %	5,5 ± 3,0 ^d	1,44 ± 0,10 ^{bc}	9,0 ± 1,4 ^b	8,0 ± 3,9 ^{bc}
	2 %	24,0 ± 8,1 ^c	1,57 ± 0,20 ^{ab}	11,2 ± 7,8 ^c	10,1 ± 2,2 ^b
<i>M. cordifolia</i>	4 %	35,5 ± 6,4 ^c	1,39 ± 0,20 ^b	12,2 ± 3,0 ^c	6,4 ± 4,2 ^b
	6 %	55,0 ± 23 ^b	1,05 ± 0,10 ^b	67,4 ± 5,1 ^a	7,0 ± 1,9 ^b
	8 %	56,0 ± 21,3 ^b	1,26 ± 0,40 ^b	16,2 ± 2,2 ^{ab}	6,9 ± 3,2 ^b
	2 %	44,1 ± 22,5 ^c	1,04 ± 0,10 ^c	34,6 ± 5,9 ^a	10,2 ± 1,6 ^c
<i>O. tenuiflorum</i>	4 %	38,0 ± 21,0 ^c	0,80 ± 0,10 ^c	34,4 ± 7,0 ^a	9,9 ± 2,6 ^c
	6 %	34,0 ± 38,0 ^c	0,70 ± 0,30 ^c	29,0 ± 3,5 ^b	8,5 ± 1,7 ^b
	8 %	35,5 ± 28,8 ^c	0,70 ± 0,10 ^c	28,8 ± 6,5 ^b	8,79 ± 1,6 ^b
	2 %	36,1 ± 17,0 ^b	1,28 ± 0,20 ^b	1,8 ± 2,0 ^b	27,6 ± 4,4 ^{ab}
<i>P. calomelanos</i>	4 %	20,1 ± 8,4 ^c	1,13 ± 0,10 ^{bc}	3,0 ± 3,0 ^b	10,4 ± 1,9 ^c
	6 %	9,5 ± 1 4,3 ^c	1,00 ± 0,10 ^c	5,6 ± 1,1 ^b	21,4 ± 10,6 ^{ab}
	8 %	8,4 ± 8,4 ^c	0,93 ± 0,10 ^c	6,2 ± 2,5 ^b	20,0 ± 6,3 ^{bc}
	2 %	36,2 ± 23,1 ^b	1,45 ± 0,20 ^b	55,8 ± 7,4 ^c	9,4 ± 2,0 ^b
<i>P. punctatum</i>	4 %	74,8 ± 28,0 ^a	1,13 ± 0,20 ^c	114,6 ± 13,2 ^a	9,5 ± 1,4 ^b
	6 %	26,9 ± 38,6 ^b	0,96 ± 0,10 ^c	86,8 ± 6,6 ^b	6,9 ± 3,1 ^b
	8 %	6,0 ± 3,2 ^b	1,12 ± 0,10 ^c	13,0 ± 2,5 ^d	7,5 ± 5,9 ^b
	2 %	23,9 ± 37,4 ^b	1,47 ± 0,10 ^b	98,4 ± 32,0 ^a	12,3 ± 1,4 ^b
<i>S. molle</i>	4 %	41,7 ± 61,0 ^b	1,29 ± 0,20 ^b	76,8 ± 43,0 ^{ab}	11,5 ± 5,5 ^b
	6 %	15,7 ± 24,0 ^b	1,35 ± 0,20 ^b	19,8 ± 7,2 ^c	10,4 ± 5,6 ^b
	8 %	13,1 ± 7,4 ^b	1,33 ± 0,20 ^b	39 ± 11 ^{bc}	9,2 ± 3,0 ^b

Viabilidad: viabilidad de conidios (media ± desvío estándar); **CV:** crecimiento vegetativo (media ± desvío estándar); **PC:** producción de conidios (media ± desvío estándar); **%:** Porcentaje; **UFC:** Unidad formadora de colonias; **C:** concentración de los tratamientos. Las medias seguidas de letras diferentes dentro de cada columna son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) del tratamiento de control. Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fenoles totales

El contenido total de compuestos fenólicos totales (CFT) se determinó con el reactivo Folin–Ciocalteu (Celaya y col., 2016). Los resultados de CFT se determinaron utilizando una curva de calibración realizada con ácido gálico (AG) en seis concentraciones (500,0–15,6 µg/ml). Los valores de CFT obtenidos se expresaron como concentración en mg de ácido gálico equivalente por gramo de extracto seco (mg GAE/g extracto). La recta de calibración utilizada fue la siguiente: Concentración de ácido gálico = (Absorbancia-0,05225)/0,0276

Taninos totales

Los contenidos de taninos totales (TT) se cuantificaron siguiendo la metodología propuesta por Azrul y col. (2014), con mínimas modificaciones. Previamente se preparó una solución de polivinilpirrolidona (PVPP) en agua al 10 %; 500 µl de esta solución se agregaron a 1000 µl de la mezcla de reacción FT. El set de tubos se agitó con vortex por 2 min y luego se mantuvo en la oscuridad (4-5 °C) por 15 min. Los tubos se agitaron con vortex nuevamente y se centrifugaron (2000 rpm por 10 min). La absorbancia a 750 nm, se midió en el sobrenadante en cada caso.

Flavonoides totales

Los contenidos de flavonoides totales (FT) se cuantificaron siguiendo la metodología propuesta por Yildiz-Ozturk y col (2015), con mínimas modificaciones. Se diluyeron 500 µl de extracto en metanol hasta los 2 ml. A esta mezcla se agregaron 100 µl de cloruro de aluminio y 100 µl acetato de potasio (1 M). Finalmente se adicionaron 2800 µl de agua dejando reaccionar por 30 min previo a su lectura a 415 nm.

Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* frente a DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Se utilizaron extractos disueltos en metanol a una concentración inicial de 4 mg/ml. Se mezclaron 50 µl de diluciones convenientes de infusiones (50 a 4000 µg/ml), con 1000 µl de solución de DPPH• (0,31 mM) en metanol dejando la mezcla reaccionar por 30 min en la oscuridad, y midiendo la absorbancia de la mezcla reaccionante a 515 nm (Celaya y col., 2016). La concentración de cada extracto que reduce DPPH• a la mitad, IC₅₀ (µg/ml) se calculó por regresión a partir de los datos obtenidos de porcentajes de inhibición. Quercetina se ensayó también y los resultados obtenidos se utilizaron para propósitos de comparación.

Resultados

Actividad antifúngica sobre parámetros biológicos del hongo

En general, todos los extractos afectaron los parámetros evaluados de *B. bassiana* (tabla 1). Se verificó que los extractos de *B. crispa*, *M. cordifolia*, *O. tenuiflorum*, *P. calomelanos* y *S. molle*, en todas las concentraciones, redujeron la germinación de los conidios, siendo solamente el tratamiento con *P. punctatum* en concentración 4 %, no significativo estadísticamente, en comparación con el control.

El total de los extractos provocaron reducciones en el diámetro de las colonias y en el caso de *M. cordifolia* al 2 % la reducción no fue estadísticamente significativa.

Con respecto a la producción de conidios, el extracto de *P. calomelanos* no difirió estadísticamente del control, en las concentraciones 2 y 6 %. El resto de los extractos produjeron reducciones significativas.

Los valores medios de UFC obtenidos de los extractos de *M. cordifolia* 6 y 8 %, *O. tenuiflorum* 2 y 4 %, *P. punctatum* 4 % y *S. molle* 2 y 4 % no difirieron del control. El resto de los tratamientos sufrieron variaciones, reduciendo y promoviendo un aumento significativo de UFC en el caso de *P. punctatum* 2 y 6 %.

Solo dos de estos tratamientos en concentración 2% resultaron compatibles (*O. tenuiflorum* y *P. calomelanos*) y los tratamientos con *B. crispa*, *M. cordifolia*, *P. calomelanos* y *P. punctatum*, en sus concentraciones intermedias (2 o 4 %)

Tabla 2.- Toxicidad de los extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales

Tratamiento	C	IB	Valoración
<i>B. crispa</i>	2 %	56,8	MT
	4 %	37,2 *	T
	6 %	36,4 *	T
	8 %	43,5	MT
<i>M. cordifolia</i>	2 %	50,7	MT
	4 %	43,8	MT
	6 %	36,2 *	T
	8 %	41,5	MT
<i>O. tenuiflorum</i>	2 %	77,2	C
	4 %	62,0	MT
	6 %	59,7	MT
	8 %	59,0	MT
<i>P. calomelanos</i>	2 %	66,5	C
	4 %	40,4 *	T
	6 %	48,6	MT
	8 %	45,3	MT
<i>P. punctatum</i>	2 %	48,5	MT
	4 %	44,9	MT
	6 %	33,1 *	T
	8 %	35,5 *	T
<i>S. molle</i>	2%	51,0	MT
	4%	47,7	MT
	6%	45,1	MT
	8%	43,0	MT

C: concentración; **IB:** Índice Biológico según fórmula propuesta por Rossi-Zalaff (2009). *Valores considerados tóxicos. **T:** tóxico; **MT:** moderadamente tóxico; **C:** compatible.

resultaron tóxicas para *B. bassiana*.

Con respecto a los cálculos de toxicidad, cuatro de los extractos evaluados resultaron con valores de IB = "T" en las siguientes concentraciones: *B. crispa* 4 y 6 %, *M. cordifolia* 6 %, *P. calomelanos* 4 % y *P. punctatum* 6 y 8 %. Para el extracto de *S. molle* las cuatro concentraciones resultaron "MT" así como para el extracto de *O. tenuiflorum* en sus tres concentraciones más altas (tabla 2).

Caracterización fitoquímica

En base a los resultados obtenidos de los tratamientos *in vitro*, se realizó la caracterización fitoquímica preliminar de los extractos de *B. crispa*, *M. cordifolia*, *P. calomelanos* y *P. punctatum*.

La composición de polifenoles se evaluó en relación a contenido de fenoles, taninos y flavonoides totales (tabla 3). Se verificó que los extractos de *B. crispa* y *P. calomelanos* son

Tabla 3.- Cuantificación de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y actividad antioxidante de los extractos

Tratamiento	Fenoles totales (mg GAE/g extracto)	Taninos totales (mg GAE/g extracto)	Flavonoides totales (mg Qe/g extracto)	Captura de DPPH· (IC ₅₀ µg/mL)
<i>B. crispa</i>	81,3 ± 3,6 ^b	46,1 ± 2,8 ^c	33,7 ± 1,8 ^b	82,3 ± 1,7 ^a
<i>M. cordifolia</i>	62,5 ± 2,5 ^a	32,7 ± 3,0 ^b	14,0 ± 0,4 ^a	49,0 ± 0,2 ^c
<i>O. tenuiflorum</i>	NA	NA	NA	NA
<i>P. calomelanos</i>	103,7 ± 11,1 ^b	72,5 ± 0,8 ^d	32,2 ± 0,4 ^a	10,3 ± 0,1 ^b
<i>P. punctatum</i>	63,1 ± 4,9 ^a	19,7 ± 1,4 ^a	11,6 ± 0,3 ^b	48,8 ± 2,5 ^c
<i>S. molle</i>	NA	NA	NA	NA
Q (control)				2,1 ± 0,0 ^d
CV	8,20	5,15	4,22	3,48
Media	77,6	42,84	22,8	38,5

Las medias seguidas de la misma letra, en la columna, no difieren entre sí por el test de Tukey ($p > 0,05$). **NA:** No analizado

estadísticamente iguales y presentan los mayores valores de media, para fenoles totales.

La actividad antioxidante de las especies se expresó como la capacidad de los extractos para producir una inhibición del 50 % de la actividad del radical libre y los valores se presentan en la tabla 3.

Los resultados de la capacidad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de atrapar radicales DPPH de una manera dependiente de la concentración. *P. calomelanos* mostró la mayor actividad antioxidante con una IC₅₀ de 10,30 µg/ml.

Discusión

En general, todos los extractos afectaron los parámetros evaluados de *B. bassiana*, observándose que, en diferentes grados, redujeron los valores de germinación del hongo, así como el diámetro de las colonias y la producción de conidios, ubicando a la mitad de los tratamientos en el rango de IB = MT.

La reducción en los parámetros podría explicarse por la presencia de taninos, que inhiben las enzimas de los hongos, pudiéndose unirse a los sustratos de estas enzimas, o incluso los taninos actúan sobre la membrana celular de los hongos, modificando su metabolismo (Simoes y col., 2002).

Los resultados observados que muestran un aumento significativo de UFC con los extractos evaluados, es una tendencia ya observada por otros autores en el análisis de extractos vegetales acuosos y alcohólicos (Formentini y col., 2009; Mamprim y col., 2013). Resultados justificados por la degradación y el uso de sustancias presentes en la composición de los extractos, que pueden ser utilizadas como nutrientes por el hongo (Alves, 1998).

Los extractos vegetales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber

varios con propiedades antifúngicas. Generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Montes, 2009).

La relación entre actividad de diversos extractos vegetales y su acción terapéutica contra padecimientos ocasionados por el estrés oxidativo está bien demostrada (Miller, 1993; Martínez, 2002). Esta relación podría explicar los valores IC₅₀ de *B. crispa*, *P. punctatum* y *M. cordifolia* con los valores de IB más bajos (mayor toxicidad) en los extractos.

Con respecto a los cálculos de toxicidad estos estudios tienen la ventaja de exponer al patógeno a la máxima acción de los diferentes tratamientos, hecho que no podría ocurrir en condiciones de campo (Neves y col., 2001). En estas condiciones, la inhibición del crecimiento puede no ser una buena indicación de otros efectos fungicidas, como los de la viabilidad de las esporas (Loria y col., 1983). Asimismo, una alta toxicidad *in vitro* no siempre significa que ocurrirá lo mismo en el campo, pero muestra la posibilidad de que esto ocurra (Alves y col., 1998).

No fueron encontrados estudios que evaluaran la actividad de los extractos probados en este estudio de forma *in vitro*, sobre *B. bassiana*.

Conclusiones

Los resultados permiten concluir que todos los extractos tuvieron actividad frente a los parámetros medidos de *B. bassiana*, disminuyendo los valores de germinación, crecimiento vegetativo y producción de conidios, en comparación con el control, salvo en el caso de UFC donde se registró un aumento de los valores promedios, en tres de los tratamientos realizados.

En este estudio se realizó una caracterización preliminar de los extractos que, *in vitro*, resultaron ser tóxicos (*B. crispa*, *M. cordifolia*, *P. calomelanos* y *P. punctatum*) frente a *B. bassiana*, en donde el extracto de *P. calomelanos* fue el que obtuvo la mayor capacidad antioxidante, mayor contenido de fenoles y taninos totales, así como, uno de los que mayor contenido de flavonoides ha presentado.

Es necesario avanzar en la evaluación de estos extractos a través de distintos tratamientos *in vivo* sobre los gusanos de seda, así como en la identificación de los principios activos anti fúngicos de los extractos que resultaran efectivos.

Referencias bibliográficas

- Alves, S.B.; Moino, A.; Almeida, J.E.M. (1998). "Produtos fitossanitários e entomopatogênicos" en S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos* (Cap. 8). Fealq. São Paulo (2º ed.): 217-238.
- Amaral, E.; Alves, S.B. (1979). *Insetos Úteis*. Piracicaba, São Paulo: Livroceres Ltda. 188 p.
- Amat, A.; Yajia, M. (1991). "Plantas Medicinales y Etnofarmacología en la Provincia de Misiones (Argentina)". *Acta Farmaceutica Bonaerense* 10: 153-9.
- Amer, L.S.; Jerke, G.; Horianski, M. A.; Kramer, F.L.; Jordá, G.B.; Bargardi S.; Guida, A. M. (2006). "Extractos crudos de *Polygonum punctatum* Elliot con actividad antimicrobiana". *Revista de Ciencia y Tecnología* 8 (8): 5-11.
- Azrul, L.M.; Nurulaini, R.; Adzemim, M.A.; Marina, H.; Effendy, A.W.M. (2014). "Tannins Quantification in: *Terminalia catappa* Leaves Extract and Antihelmenthic Potential Evaluation". *Journal of Natural Products* 7 (98): 103-35.
- Bacon, K.; Boyer, R.; Denbow, C.; O'Keefe, S.; Neilson, A.; Williams, R.C. (2016). "Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from Jalapeno peppers". *Food Science & Nutrition* 5: 497-503.
- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Nuñez, C.; Ariza Espinar, L.; Pacciaroni, A. del V. (2009). "Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora". *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.
- Basso, C.P.; Bargas, S. de; Bartolini, N.; Dobler, S. (2017). "Evaluación de variedades sintéticas de gusanos de seda (*Bombyx mori*) obtenidas por selección recurrente". *Agronomía y Ambiente* 37 (1): 65-71.
- Brancalhão, R.M.C. (2002). "Virus entomopatogênicos no bicho-da-seda". *Biociencia: Ciência e Desenvolvimento* 24: 54-58.
- Casadío, A.; Pescio, F. (2008). *Introducción a la Sericultura*. Red Latinoamericana de la Seda. 13 p. https://www.researchgate.net/publication/242712224_Introducción_a_la_sericultura.
- Celaya, L.S.; Viturro, C.I.; Silva, L.R.; Moreno, S. (2016). "Natural antioxidants isolated from *Schinus areira* leaves by ultrasound-assisted extraction". *International Journal of Food Studies* 5: 1-9.
- Celaya, L.S.; Viturro, C.I.; Silva, L.R. (2017). "Chemical Composition and Biological Prospects of Essential Oils and Extracts of *Aphyllcladuss partioides* Growing in Northwest Argentina". *Chemistry and Biodiversity* 14 (4).
- Catálogo de las Plantas Vasculares del Conosur, (1994). Instituto de Botánica Darwinion. Buenos Aires, Argentina. <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>
- Colares, M.N. (2010). *Mikania cordifolia* y *Mikania micrantha* (Asteraceae): *Especies medicinales nativas de las Reservas Naturales de Punta Lara e Isla Martín García, Buenos Aires, Argentina*. Tesis de Magister. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Souza T. M. (2012). *Prospecção química, atividade antioxidante, antibiótica (bactérias, fungos e protozoários) e citotóxica de Pityrogramma calomelanos (L.) Link.* Tesis de Maestría. Universidade Regional do Cariri-URCA.
- Da Silva, R.Z.; Neves, P.M. (2005). "Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and in vitro phytosanitary products". *Pest Management Science Pest Manag Sci* 61: 667-674.
- Espinosa-García, F.J., (2001). "La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal" en Anaya A. L., Espinosa-García F.J.; R. Cruz-Ortega, D. F.; Murphy, C. M. "Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas". *Plant products antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Ferreira DF. (2011). "Sisvar: a computer statistical analysis system". *Ciênc Agrotecnol.* 35: 1039-1042.
- Formentini, M.A.; Alves, L.F.A.; Pinto, F.G.S.; Mamprim, A.P. (2014). "In vitro assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Clavicipitaceae)". *Revista Brasileira de Agroecologia* 9 (1): 195-204.
- Funk, V.A.; Sussana, A.; Stuess, T.F.; Bayer, R.J. (2009). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Viena: International Association for Plant Taxonomy.
- Garg, S.C.; Siddiqui, N. (1992). "Antifungal Activity of essential oil isolates". *Pharmazie* 47: 467-8.
- Gatusso, S.J. (1998). "Las especies del Género *Polygonum* L. (Polygonaceae), presentes en la Argentina, utilizadas en medicina popular." *Rojasiana* 4 (2): 118-245.
- González Escobar, R. (2002). "Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso". *Revista Cubana de Estomatología* 39 (2): 139-156.
- Isaiarasu, L.; Sakthivel, N.; Ravikumar, J.; Samuthiravelu, P. (2011). "Effect of herbal extracts on the microbial pathogens causing flacherie and muscardine diseases in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.". *Journal of Biopesticides* 4 (2): 150-155
- Keller, H.; Romero, H. (2006). "Plantas medicinales utilizadas por campesinos del área de influencia de la Reserva Yabotí (Misiones, Argentina)". *Bonplandia* 15: 125-141.
- Kumar, V.; Singh, G.P.; Babu, A.M.; Ahsan, M.M.; Datta, R.K. (1999). "Germination, penetration and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine". *Journal of Zoology* 66 (1): 39-43.
- Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Dubey, N.K. (2010). "Chemical composition, antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial". *Food Chem Toxicol* 48: 539-43.
- Loria, R.; Galaini, S.; Roberts, D.W. (1983). «Supervivencia del inóculo del hongo entomopatogéno *Beauveria bassiana* influenciado por fungicidas". *Reinar. Entomol* 12: 1724-1726.

- López, S. L. (2014). *Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos que afectan a gusanos de seda (Bombyx mori) L. en la provincia de Misiones*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina.
- Mamprim, A.P.; Alves, L.F.A.; Bonini, A.K.; Formentini, M.A.; Martins, C.C. (2013). "Efeito de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Semina". *Ciências Agrárias* 34 (4): 1451-1466.
- Mamprim, A.P.; Alves, L.F.A.; Pinto, F.G.S.; Formentini, M.A.; Martins, C.C.; Pares, R.B. (2014). "Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae)". *Rev. Protección Veg.* [online]. 29 (2). <https://www.researchgate.net/publication/279448131>
- Martínez, F.S.; González, G.J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M.J. (2002). "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes". *Nutrición Hospitalaria* 17 (6): 271-278.
- Martins, M.d.R.; Arantes, S.; Candeias, F.; Tinoco, M.T.; Cruz-Morais, J. (2014). "Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils". *Journal of Ethnopharmacology* 151 (1), 485-492.
- Miller, J.K.; Brzezinska-Slebozinska, E. (1993). "Oxidative stress, antioxidants and animal function". *Journal of Dairy Science* 76 (9): 2812-2823.
- Mohanan, N.M.; Gupta, S.K.; Mitra, P. (2007). "Antimycotic activity of *Allium sativum* against *Beauveria bassiana*, pathogenic fungus of white muscardine disease in silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)". *International Journal of Industrial Entomology*. 14 (2): 81-85.
- Montes-Belmont, R. (2009). "Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos". *Rev. Mex. Mic.* 29. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000100010
- Neves, P.M.O.J.; Hirose, E.; Tchujo, P.T.; Moino, J.R.A. (2001). "Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides". *Neotrop Entomol.* 30 (2): 263-268.
- Parra, J.R.P. (1991). "Consumo e utilização de alimentos por insetos" en Panizzi, A.R. & Parra, J.R.P. *Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas*. Manole Saude. São Paulo, 412 p.
- Pares, R.B.; Alves, L.F.A. (2016). "Controle e prevenção da calcinose branca em *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)". *Arquivos do Instituto Biológico* 83 (1-8).
- Pares, R.B., Alves, L.F., Mamprim, A.P., Bonini, A.K. (2017). "Alternative phytosanitary products against to white muscardine in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)". *Arq. Inst. Biol.* 84. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000642015>
- Pescio, F.P.; Zunini, H.; Basso, C.P.; Divo de Sesar, M.; Frank, R.G.; Pelicano, A.E.; Vieites, C.M. (2006). *Sericicultura. Manual para la producción*. Cap. 4. Ed. INTI-Imprenta. Buenos Aires. pp. 65-101.
- Pinto Oliveira, D.G.; Pauli, G.; Mascarin, G.M.; Delalibera, I. (2015). "A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products". *Journal of Microbiological Methods* 119: 44-52.
- Porto, A.J.; Okamoto, F.; Ikuno, A.A.; Ferreira, V.C.A.; Margatho, L.F.A. (2005). "Avaliação biológica e produtiva do bichoda-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*". *Arquivos do Instituto Biológico* 72 (4): 445-453.
- Potrich, M.; Alves, L.F.A.; Brancalhão, R.C.; Dalcin, G. (2007). "Entomopatógenos associados a lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) no Estado do Paraná". *Arquivos do Instituto Biológico* 74 (4): 363-367.
- Rossi-Zalaf, L.S.; Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Neto, S.S.; Tanzini, M.R. (2008). "Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças" en Alves, S.B.; Lopes, R.B. (ed). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios* (Cap. 11) Fealq. Piracicaba: 279-298.
- Saad, M.S.I.; Elyamani, E.M.Y.; Helaly, W.M.M. (2019). "Control de enfermedades bacterianas y fúngicas que contaminan el gusano de seda de la morera, *Bombyx mori* mediante el uso de algunos extractos de plantas". *Bull Natl Res Cent* 43: 172. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0218-3>
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2002). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ta ed. Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre.
- Surendra, N.B.; Surendra, K.R.P. (1999). "Toxic impact of organo phosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L.". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42: 157-162.
- Villa-Martínez, A.; Pérez-Leal, R.; Morales-Morales, H.A.; Basurto-Sotelo, M.; Soto-Parra, J.M.; Martínez-Escudero, E. (2015). "Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales". *Acta Agronómica* 64 (2): 194-205.
- Yildiz-Ozturka, E.; Nalbantsoya, A.; Tagb, O.; Yesil-Celiktasa, O. (2015). "A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities". *Industrial Crops and Products* 77: 961-971.