



Estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de materiales compuestos basados en complejos de inclusión de polifenoles contra *Phytophthora cinnamomi*

Petruta Mihaela Matei¹, Laura Buzón-Durán², Eduardo Pérez-Lebeña², Jesús Martín-Gil², Beatrice Michaela Iacomì¹, M. Carmen Ramos-Sánchez³, Pablo Martín-Ramos^{4,*}

- ¹ Department of Bioengineering of Horticultural and Viticultural Systems, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Bulevardul Mărăști 59, București 011464, Rumania; petruta.matei@horticultura-bucuresti.ro (P.M.M.); b.iacomì@yahoo.fr (B.M.I.)
- ² Departamento de Ingeniería Agroforestal, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, España; laura.buzon.duran@gmail.com (L.B.-D.); eplebena@gmail.com (E.P.-L); mgil@iaf.uva.es (J.M.-G.)
- ³ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Río Hortega, SACYL, Calle Dulzaina, 2, 47012 Valladolid, España; mramoss@saludcastillayleon.es
- ⁴ Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), EPS, Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte, s/n, 22071 Huesca, España; pmr@unizar.es

Resumen: El hongo *Phytophthora cinnamomi* es responsable de la podredumbre radical en una amplia gama de hospedantes, produciendo grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial. En el caso de España, es responsable de enfermedades como la ‘seca’ de la encina y el alcornoque, o la ‘tinta’ del castaño. En este estudio se han investigado diferentes compuestos de inclusión de polifenoles-estevisido dispersados en una solución hidroalcohólica de oligómeros de quitosano, con aplicación como complejos naturales bioactivos para reemplazar a los fungicidas sistémicos convencionales. Los polifenoles ensayados *in vitro* han sido curcumina, ácido ferúlico, ácido gálico y silimarina. Se han ensayado tres concentraciones (125, 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), con y sin nanopartículas de plata (AgNPs), y se han encontrado diferencias notables en la inhibición del crecimiento del micelio, con valores de CE_{50} y CE_{90} que han oscilado entre 171 y 373,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y entre 446,2 y 963,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, observándose un rendimiento superior de los preparados a base de ácido ferúlico con AgNPs y de silimarina sin nAg. Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la adición de AgNPs, pese a su actividad antimicrobiana, no siempre da lugar a sinergismos. En el caso de *P. cinnamomi*, se ha encontrado un comportamiento antagonístico inesperado para dos de los polifenoles (curcumina y silimarina), un comportamiento aditivo para el ácido ferúlico y un comportamiento sinérgico para el ácido gálico. Los preparados referidos pueden ser prometedores para aplicaciones de protección de cultivos y masas forestales contra *P. cinnamomi*.

Palabras clave: antifúngico; nanoplata; podredumbre radical; polifenoles; sinergismo

1. Introducción

Phytophthora cinnamomi es un oomiceto que vive en el suelo nutriéndose gracias a materia en descomposición y que produce una fitopatología (micosis) que afecta a cientos de huéspedes, una condición llamada “podredumbre de la raíz” o “muerte regresiva”. Este patógeno es una de las especies más invasivas del mundo y afecta a una variedad de familias de plantas: coníferas, pastos, helechos, plantas ornamentales y cultivos alimentarios como la piña o el aguacate [1]. Su expansión ha sido atribuida al fenómeno del Cambio Climático [2]. Entre los síntomas de infección por *P. cinnamomi* figuran: marchitamiento, disminución del tamaño del fruto, muerte de brotes jóvenes, clorosis de las hojas y canchales del tallo [3].

En el caso de España, *P. cinnamomi* es responsable de enfermedades como la ‘seca’ de la encina y el alcornoque, o la ‘tinta’ del castaño [4].

Actualmente, no existe un tratamiento que erradique la muerte regresiva por *P. cinnamomi*, incluyendo la inyección al tallo de fosfitos (que son elicitores que actúan de manera indirecta como fungicidas) [5] o la pulverización foliar con metalaxyl+mancozeb (fungicidas con actividad por contacto y sistémica).

Como alternativa a estos agentes convencionales de tratamiento existe la posibilidad de utilizar complejos naturales bioactivos ricos en polifenoles. En este estudio se han investigado diferentes compuestos de inclusión de polifenoles-esteviósido dispersados en una solución hidroalcohólica de oligómeros de quitosano. Los polifenoles ensayados *in vitro* han sido curcumina, ácido ferúlico, ácido gálico y silimarina, a diferentes concentraciones, con y sin nanopartículas de plata (AgNPs).

2. Material y métodos

2.1. Reactivos

La curcumina (CAS 458-37-7), el ácido ferúlico (CAS 1135-24-6), el ácido gálico (CAS 149-91-7) y la silimarina (MDL MFCD01776359) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). El esteviósido (CAS 57817-89-7) se adquirió de Wako (Osaka, Japón). Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd. (Hangzhou, China) suministró el quitosano de peso molecular medio (MMWC). Todos los reactivos se utilizaron sin purificación adicional.

Los oligómeros de quitosano se prepararon a partir del MMWC de acuerdo con el procedimiento propuesto por Sun, *et al.* [6]: primero se solubilizaron 10 g de MMWC en 500 mL de ácido acético (1%) con agitación constante a 60 °C y, una vez disueltos, se obtuvieron oligómeros de quitosano (con MW <2 kDa) por degradación oxidativa con H₂O₂ (0,3 mol·L⁻¹).

2.2. Preparación y caracterización de los compuestos de inclusión de polifenoles y composites bioactivos

Los procedimientos para la preparación de compuestos de inclusión de polifenoles, mediante separación en un sistema bifásico acuoso asistida por microondas, y para la preparación de los compuestos con oligómeros de quitosano en solución hidroalcohólica fueron los mismos que los referidos previamente en Matei, *et al.* [7], asegurando así la comparabilidad de los resultados.

Para el medio basado en oligómeros de quitosano dispersos en solución hidroalcohólica, se agregaron 10 mg de oligómeros de quitosano de 2 kDa, 60 mg de esteviósido y 10 mg de uno de los polifenoles (curcumina, ácido ferúlico, ácido gálico o silimarina) a 40 mL de solución hidroalcohólica (1:1 v/v de agua destilada y etanol). Las mezclas se sometieron a irradiación con microondas (a 80 °C; rampa de calentamiento: 5 °C·min⁻¹) y a agitación durante 20 minutos en un horno microondas Ethos-One (Milestone, Sorisole, BG, Italia). Los productos resultantes se aislaron por centrifugación (2500 rpm) y se almacenaron a 4 °C.

Los composites se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión, con resultados de caracterización coherentes con los descritos en la patente P201731489 [8].

2.3. Aislado fúngico y condiciones de crecimiento

El aislado MYC43 de *Phytophthora cinnamomi* fue suministrado por el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura—Instituto del Corcho, Madera y Carbón Vegetal, España. El aislado se mantuvo en tubos con medio patata-dextrosa-agar (PDA), suministrados por Merck Millipore (Darmstadt, Alemania), almacenados a 4 °C. Se realizaron nuevos subcultivos para obtener el inóculo para las pruebas de sensibilidad *in vitro* transfiriendo tapones de hifas a placas de Petri con PDA como medio.

2.4. Pruebas *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial

La actividad biológica de los materiales compuestos se determinó mediante el método de dilución en agar: se incorporaron alícuotas de las soluciones madre de los diversos tratamientos en el medio de PDA para obtener concentraciones finales de 125, 250 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los discos miceliales de patógeno (8 mm de diámetro), retirados de los márgenes de un cultivo de 7 días, se transfirieron luego a las placas de PDA, empleando placas que contenían solo el medio de PDA como control. Se realizaron tres réplicas por tratamiento.

La inhibición del crecimiento micelial (o la eficacia del compuesto analizado) para cada tratamiento y concentración después de 7 días de incubación, en la oscuridad, se calculó de acuerdo con la fórmula: $((d_c - d_t)/d_c) \times 100$, donde d_c corresponde al diámetro promedio de la colonia de hongos en el control y d_t al diámetro promedio de la colonia de hongos tratada con el compuesto ensayado [9].

Los resultados se expresaron también como concentraciones efectivas CE_{50} y CE_{90} (es decir, aquellas concentraciones que redujeron el crecimiento del micelio en un 50% y un 90%, respectivamente), que se determinaron mediante la regresión de los valores de inhibición del crecimiento radial (%) frente a los valores \log_{10} de las concentraciones de los compuestos antifúngicos.

2.5. Análisis estadístico

Los datos de los resultados obtenidos en este documento y de los informados en un estudio previo con AgNPs [7] se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación *post hoc* de las medias se utilizó el test de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 ($p < 0,05$). Todos los análisis se realizaron con el software IBM SPSS Statistics v.25.

3. Resultados y discusión

La bioactividad de los distintos tratamientos se estudió *in vitro* controlando el crecimiento radial del micelio (Figura 1).

Los resultados de crecimiento radial del micelio se muestran en la Figura 2, comparando los tratamientos sin AgNPs con los tratamientos con AgNPs recogidos en la referencia [7]. El aumento de la concentración de los complejos de inclusión de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ condujo a una reducción del crecimiento micelial en todos los casos.

Se puede observar que la adición de AgNPs sólo mejoró de forma notable la actividad de los compuestos a base de ácido gálico. Para los compuestos a base de ácido ferúlico, la mejora fue estadísticamente significativa sólo en la dosis más baja; y para los compuestos basados en curcumina o silimarina, la adición de AgNPs llevó a un peor comportamiento (especialmente evidente para el compuesto con silimarina a la concentración más alta de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Los resultados del ANOVA factorial (Tabla 1) indicaron efectos de interacción unidireccionales, bidireccionales y triples estadísticamente significativos. En la Tabla 2 se muestra una clasificación de los tratamientos, con y sin AgNPs, según el test de Tukey.

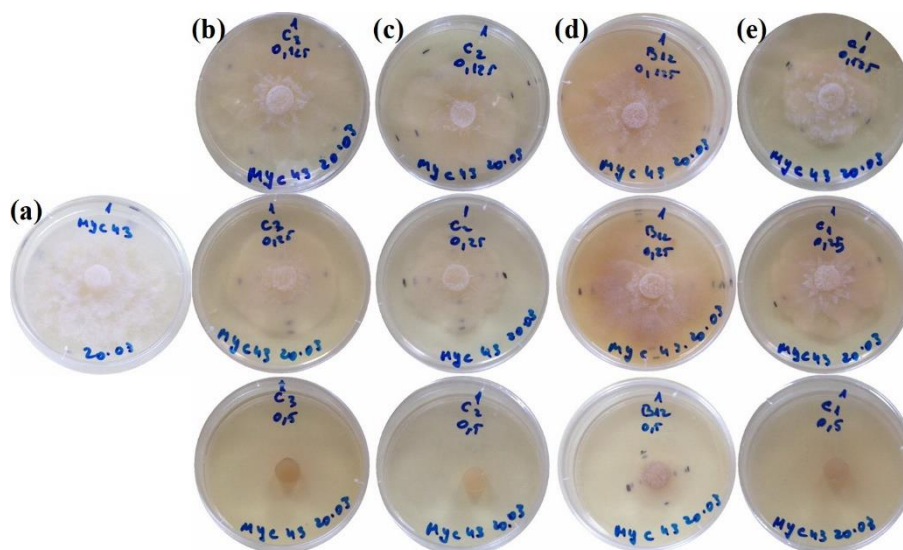


Figura 1. Ejemplo de test de sensibilidad. Crecimiento radial del micelio para (a) el control, y tratamientos con (b) curcumina, (c) ácido ferúlico, (d) ácido gálico y (e) silimarina. De arriba abajo: concentraciones de 125 µg·mL⁻¹, 250 µg·mL⁻¹ y 500 µg·mL⁻¹. Sólo se muestra una repetición por tratamiento.

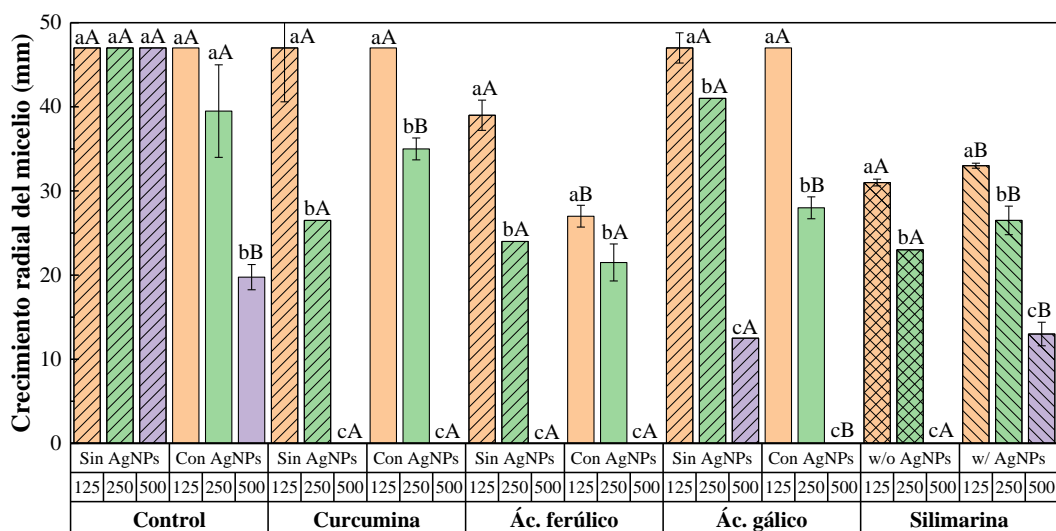


Figura 2. Valores de crecimiento radial de *P. cinnamomi* en presencia de los composites, consistentes en complejos de inclusión de polifenoles sin y con nanopartículas de plata (AgNPs), a diferentes concentraciones (expresadas en µg·mL⁻¹). Para cada tratamiento, las concentraciones etiquetadas con la misma letra minúscula no son estadísticamente diferentes según el test de Tukey ($p < 0,05$). Para los tratamientos con el mismo polifenol y la misma dosis, las letras mayúsculas diferentes indican que la ausencia/presencia de AgNPs dió lugar a diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$). Todos los valores presentados son valores medios de tres repeticiones. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones.

Tabla 1. Test de efectos entre sujetos.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Tratamiento	4	5647,375	1411,844	446,080	< 0,0001
Dosis	2	16053,013	8026,506	2536,021	< 0,0001
AgNPs	1	228,006	228,006	72,040	< 0,0001
Tratamiento*Dosis	8	2103,425	262,928	83,074	< 0,0001
Tratamiento*AgNPs	4	1013,275	253,319	80,038	< 0,0001
Dosis*AgNPs	2	52,962	26,481	8,367	0,001
Tratamiento*Dosis*AgNPs	8	1003,475	125,434	39,632	< 0,0001

GL: grados de libertad

Tabla 2. Categorías en función de los valores de crecimiento radial del micelio para cada combinación de polifenol*dosis*AgNPs, con un intervalo de confianza del 95%, según el test de Tukey.

Categoría	Grupos										
Ác. ferúlico*500*con AgNPs	A										
Curcumina*500*sin AgNPs	A										
Curcumina*500*con AgNPs	A										
Ác. ferúlico*500*sin AgNPs	A										
Ác. gálico*500*con AgNPs	A										
Silimarina*500*sin AgNPs	A										
Ác. gálico*500*sin AgNPs	B										
Silimarina*500*con AgNPs	B										
Control*500*con AgNPs		C									
Ác. ferúlico*250*con AgNPs		C	D								
Silimarina*250*sin AgNPs		C	D	E							
Ác. ferúlico*250*sin AgNPs		C	D	E							
Silimarina*250*con AgNPs			D	E	F						
Curcumina*250*sin AgNPs			D	E	F						
Ác. ferúlico*125*con AgNPs			D	E	F						
Ác. gálico*250*con AgNPs				E	F	G					
Silimarina*125*sin AgNPs					F	G	H				
Silimarina*125*con AgNPs						G	H				
Curcumina*250*con AgNPs							H	I			
Ác. ferúlico*125*sin AgNPs								I	J		
Control*250*con AgNPs									I	J	
Ác. gálico*250*sin AgNPs										J	
Control*250*sin AgNPs											K
Control*125*con AgNPs											K
Control*125*sin AgNPs											K
Curcumina*125*con AgNPs											K
Curcumina*125*sin AgNPs											K
Ác. gálico*125*con AgNPs											K
Ác. gálico*125*sin AgNPs											K
Control*500*sin AgNPs											K

Valor crítico *d* de Tukey: 5,566

Los resultados del test de sensibilidad también pueden expresarse en términos de indicadores de concentración efectiva CE₅₀ y CE₉₀. La sensibilidad de los aislados claramente varió en función de la ausencia/presencia de AgNPs en los composites y dependiendo del compuesto fenólico empleado. La adición de AgNPs apenas modificó los valores de CE₉₀ para curcumina y

ácido ferúlico (los dos polifenoles con mejor actividad antifúngica), pero mejoró notablemente los de los composites de ácido gálico (en un 34% y 112% para CE₅₀ y CE₉₀, respectivamente).

Tabla 3. Concentraciones efectivas que inhibieron el crecimiento micelial en un 50% y un 90% (CE₅₀ y CE₉₀, respectivamente).

Tratamiento	CE ₅₀ (µg·mL ⁻¹)		CE ₉₀ (µg·mL ⁻¹)	
	Sin AgNPs	Con AgNPs	Sin AgNPs	Con AgNPs
Control	--	458,4	--	1192,8
Curcumina	257,5	279,9	448,3	487,4
Ác. ferúlico	228,7	171,6	446,2	450,4
Ác. gálico	373,6	261,3	795,3	455,6
Silimarina	195,5	261,8	453,1	963,7

Con respecto al impacto de la elección del polifenol, para los tratamientos sin AgNPs, tanto en base a la Tabla 2 como a los valores de CE₅₀, la eficacia seguiría la secuencia: silimarina > ácido ferúlico > curcumina > ácido gálico. En base a los valores de CE₉₀, las sensibilidades de *P. cinnamomi* a la curcumina, el ácido ferúlico y la silimarina serían similares, y el ácido gálico sería la opción menos deseable.

De acuerdo con el método de Wadley [10] para la cuantificación del nivel de interacción, se obtuvo un factor de sinergia FS=1,7 para el ácido gálico, indicativo de una interacción sinérgica con las AgNPs; para el ácido ferúlico FS=1,0, indicativo de un comportamiento aditivo entre los dos productos antifúngicos; y para silimarina y curcumina se obtuvieron valores de FS de 0,5 y 0,9, respectivamente, indicativos de un comportamiento antagonístico con la nanoplatina.

Aunque poco frecuentes en la literatura, es preciso aclarar que, por ejemplo, se han referido casos de comportamiento antagonístico de las AgNPs con amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) [11]. Estos autores, en ensayos con 7 organismos y 19 antibióticos, completaron 96 tests, encontrando 5 combinaciones con comportamiento sinérgico, 89 con comportamiento aditivo y 2 con comportamiento antagonístico.

4. Conclusiones

Los ensayos realizados han conducido a diferencias notables en la inhibición del crecimiento del micelio de *P. cinnamomi*, observándose un rendimiento superior de los preparados a base de ácido ferúlico con AgNPs y de silimarina sin nAg (evidenciando, así, que la adición de AgNPs, pese a su actividad antimicrobiana, no siempre da lugar a sinergismos).

Los principales hallazgos han sido: un comportamiento antagonístico inesperado para dos de los polifenoles (curcumina y silimarina), un comportamiento aditivo para el ácido ferúlico y un comportamiento sinérgico para el ácido gálico.

La conclusión alcanzada es que los preparados referidos pueden ser prometedores para las aplicaciones de protección de cultivos y masas forestales contra *P. cinnamomi*.

5. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada a través del proyecto VA258P18 de la Junta de Castilla y León.

Referencias

1. Ramírez Gil, J.G. Incidencia, diagnóstico, comportamiento y alternativas de manejo de la marchitez del aguacate con énfasis en *Phytophthora cinnamomi* Rands. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 2013.
2. Bergot, M.; Cloppet, E.; Perarnaud, V.; Deque, M.; Marcais, B.; Desprez-Loustau, M.-L. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biol.* **2004**, *10*, 1539-1552.
3. Lowe, S.; Browne, M.; Boudjelas, S.; De Poorter, M. *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database*. Invasive Species Specialist Group Auckland: Auckland, NZ, 2004; p 12.
4. Sánchez, M.; Caetano, P.; Romero, M.; Navarro, R.; Trapero, A. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In *Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees*, Brasier, C.; Jung, T.; Oßwald, W., Eds. Forest Research: Farnham, Surrey, UK, 2004; pp 149-154.
5. Jackson, T.J.; Burgess, T.; Colquhoun, I.; Hardy, G.E.S. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.* **2000**, *49*, 147-154.
6. Sun, T.; Zhou, D.; Xie, J.; Mao, F. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *225*, 451-456.
7. Matei, P.; Martín-Gil, J.; Michaela Iacomi, B.; Pérez-Lebeña, E.; Barrio-Arredondo, M.; Martín-Ramos, P. Silver nanoparticles and polyphenol inclusion compounds composites for *Phytophthora cinnamomi* mycelial growth inhibition. *Antibiotics* **2018**, *7*.
8. Martín-Gil, J.; Matei Petruta, M.; Pérez Lebeña, E. P201731489, Complejo de inclusión para mejorar la biodisponibilidad de compuestos biológicamente activos no hidrosolubles. 28th December 2017, 2017.
9. Şesan, T.E.; Enache, E.; Iacomi, B.M.; Oprea, M.; Oancea, F.; Iacomi, C. *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum* **2017**, *16*, 167-176.
10. Wadley, F.M. *The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis*; U.S. Government Printing Office: Washington DC, USA, 1945.
11. De Souza, A.; Mehta, D.; Leavitt, R. Bactericidal activity of combinations of Silver-Water Dispersion with 19 antibiotics against seven microbial strains. *Curr. Sci.* **2006**, *91*, 1825–1851.