

Flavonoides en hojas de *Gliricidia sepium* y su efecto *in vitro* sobre *Colletotrichum acutatum*

Lilia Urdaneta¹, María E. Sanabria², Dorian Rodríguez²,
Gretty Ettiene³ y María Pérez De Camacaro⁴

¹Departamento Fitosanitario, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, CP 4002, Venezuela.

²Postgrado de Fitopatología, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara, CP 400, Venezuela.

³Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, CP 4002, Venezuela.

⁴Postgrado de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara, CP 400, Venezuela. lurdaneta@fa.luz.edu.ve

Resumen

Los extractos de las hojas de la planta conocida localmente como ‘mata ratón’ (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.), tienen potencial como biofungicidas, debido a la presencia de flavonoides con propiedades alelopáticas, destacándose su efecto sobre hongos fitopatógenos. El objetivo de esta investigación fue determinar los flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *G. sepium* empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Adicionalmente, se evaluó el efecto *in vitro* de los estándares comerciales de los flavonoides identificados sobre dos cepas de *Colletotrichum acutatum*, aisladas de frutos de fresa con antracnosis. Se identificaron y cuantificaron los flavonoides ácido ortocumárico (28,26%), cumarina (3,71%), quercetina (2,42%), luteolina (1,07%), kaenferol (0,36%) y miricetina (0,1%). Se evaluaron *in vitro* tres estándares de los compuestos encontrados en mayor proporción en el extracto. Las concentraciones ensayadas fueron 0,125; 0,250 y 0,50%, de los cuales sólo la cumarina y el ácido orto-cumárico ejercieron un efecto sobre la inhibición del crecimiento micelial

y de la esporulación de *C. acutatum*. El efecto de la cumarina al 0,25 y 0,5 % fue fungicida, mientras que el ácido orto cumárico al 0,5% tuvo un efecto fungistático. Estos resultados evidencian el potencial de los extractos vegetales de *G. sepium* como biofungicida para el manejo ecológico de la antracnosis de la fresa.

Palabras clave: *Gliricidia sepium*, *Colletotrichum acutatum*, flavonoides, biofungicida, antracnosis.

Flavonoids in Leaves of *Gliricidia Sepium* and Their Effect *In Vitro* on *Colletotrichum Acutatum*

Abstract

Extracts from leaves of the plant known locally as “mouse killer” (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) have potential as biofungicides, due to the presence of flavonoids with allelopathic properties, highlighting their effect on plant pathogenic fungi. The objective of this research was to determine the flavonoids present in ethanol extract from *G. sepium* leaves using high performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, the *in vitro* effect of commercial standards of the identified flavonoids was tested on two strains of *Colletotrichum acutatum* isolated from strawberry fruit with anthracnose symptoms. The flavonoids, ortho-coumaric acid (28.26%), coumarin (3.71%), quercetin (2.42%), luteolin (1.07%), kaenferol (0.36%) and myricetin (0.1%) were identified and quantified. Three standards of the compounds found in greater proportion in the extract were tested *in vitro*. The concentrations tested were 0.125, 0.250 and 0.5%, of which only coumarin and ortocumaric acid had an inhibitory effect on the mycelial growth and sporulation of *C. acutatum*. Coumarin at 0.25 and 0.5 % had a fungicidal effect, while ortho coumaric acid at 0.5% showed a fungistatic effect. These results demonstrate the potential effect of *G. sepium* extracts as biofungicides for the ecological management of strawberry anthracnose.

Keywords: *Gliricidia sepium*, *Colletotrichum acutatum*, flavonoids, biofungicides, anthracnose.

Introducción

La planta conocida localmente con el nombre común de ‘mata ratón’ (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.), perteneciente a la familia Fabaceae, es originaria de Centroamérica y en Venezuela es ampliamente conocida en las regiones cálidas (Hoyos 1992). Los extractos de hojas, semillas y cortezas de *G. sepium* tienen un gran potencial como biocida, ya que de éstos se han aislado e identificado un gran número de flavonoides, incluyendo la cumarina (C) con propiedades fungicidas, rodenticidas e insecticidas (Hochman 1966, Herath et al. 1998). Se ha sugerido que este grupo de metabolitos secundarios (MS) debería utilizarse para crear una nueva generación de fungicidas que sean más compatibles con el ambiente (Razavi 2011). Otros flavonoides identificados y cuantificados, a partir de las hojas de esta planta, son el ácido-ortocumárico (AC) y la miricetina (Ramamoorthy y Paliwal 1993).

Las propiedades antifúngicas de *G. sepium* han sido comprobadas con diversos hongos fitopatógenos. En tal sentido Martin et al. (2003) evaluaron el efecto *in vitro* del extracto acuoso (EA) de las hojas, obtenido por irradiación con microondas sobre el crecimiento micelial del hongo *Corynespora cassicola*, causante de manchas foliares en lechosa (*Carica papaya*), reportando que una concentración al 10% logra inhibir en un 91,4% el crecimiento del hongo. Así mismo, Ortiz (2010) evaluó el efecto del extracto etanólico (EE) de hojas *G. sepium* sobre la germinación *in vitro* de los conidios de *Septoria apiicola* encontrando un efecto fungicida, con el 1,25% de concentración y sobre la enfermedad en las plantas de apio (*Apium graveolens* var. dulce) con el 19% del EE. De igual manera, Urdaneta et al. (2012) encontraron que el EE de *G. sepium* al 2% logró inhibir el crecimiento micelial y la esporulación del hongo *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis en fresa pero la reducción significativa de la severidad de esta misma enfermedad, en frutos de fresa, fue alcanzada con la concentración del 20%.

El objetivo de la presente investigación fue determinar los flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *Gliricidia sepium* y su efecto *in vitro* sobre *Colletotrichum acutatum*.

Materiales y métodos

Determinación de los flavonoides

La investigación se realizó con el extracto etanólico de hojas de *G. sepium* obtenido previamente por Urduaneta et al. (2012), el cual fue almacenado en frascos de vidrio estériles, color ámbar, en condiciones de refrigeración a 4° C hasta el momento en el cual que se realizaron los ensayos. La identificación y cuantificación de los flavonoides ácido orto-cumárico, cumarina, kaenferol, luteolina, miricetina y quercetina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La preparación de la muestra del EE para el análisis de los flavonoides kaenferol (K), luteolina (L), miricetina (M) y quercetina (Q) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de dilución propuesto por Vargas et al. (2006). Se tomó 1 mL del extracto y se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL. Posteriormente, esta primera dilución se filtró tres veces por gravedad con filtros de nylon Millipore de 0,45 µm, se tomaron 150 µL y se mezclaron con 600 µL de agua destilada acidificada (pH 2,5) con ácido clorhídrico (1,2 M).

Las soluciones estándares del kaenferol (K), quercetina (Q), miricetina (M) y luteolina (L) se prepararon en metanol (MERCK®), grado HPLC, a una concentración de 1000 ppm (mg.L⁻¹) empleando los estándares comerciales de estos flavonoides. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución a partir de las soluciones madre a las concentraciones de 30 mg.L⁻¹ para L, M y Q; y de 20 mg.L⁻¹ para K.

La separación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo Shimadzu modelo SCL-10, equipado con detector UV a una longitud de onda de 280 nm y una columna Zorbax SB-C₁₈ (4,6 mm ID x 250 mm) (5µm) de fase reversa a temperatura ambiente. La fase móvil estuvo conformada por fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) 0,025 M:acetonitrilo (66,7:33,3%v/v), y a un flujo de 1,0 mL. min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 µL. Los solventes empleados en la fase móvil se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se sometieron a ultrasonido durante 10 min. El procesamiento de los datos y la obtención de los resultados se realizaron por medio del software Cromat 1,1®.

En el caso de los flavonoides ácido orto cumárico (AC) y la cumarina (C), se tomaron 0,5 mL del EE, se llevó a un volumen final de 10 mL con agua desioni-

zada y se filtró con papel filtro Millipore® de 0,45 µm. De esta dilución se tomaron 0,5 mL y se llevó a un nuevo volumen final de 10 mL con agua desionizada acidificada (pH 2,5) con ácido clorhídrico (0,1 N). Con esta dilución se cuantificó el AC. Posteriormente, de la segunda dilución se tomaron 150 µL y se mezclaron en 600 µL de agua desionizada acidificada (tercera dilución); de aquí se tomaron 100 µL y se mezclaron con 100 µL de agua destilada acidificada (cuarta dilución), la cual se utilizó para cuantificar la C.

Para la preparación de los flavonoides AC y C se utilizaron estándares puros disueltos en metanol (Merck®), grado HPLC, a una concentración de 22 y 11,05 mg·L⁻¹, respectivamente. La determinación se realizó en un cromatógrafo Waters 600 pump, equipado con un detector Waters 486 UV operado a una sensibilidad de 0,1 y una longitud de onda de 254 nm, con una columna Bondapak-C₁₈ (3,9 mm x 300 mm) de fase reversa a temperatura ambiente. La fase móvil estuvo conformada por metanol:agua (50:50%v/v), el flujo fue de 1,0 mL·min⁻¹ y el volumen de inyección de 20 µL. Los solventes empleados en la fase móvil se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y después se sometieron a ultrasonido durante 5 min. El procesamiento de los datos y la obtención de los resultados se realizó por medio del software Empower 2,0®.

En ambos casos, las muestras diluidas del EE y las soluciones de trabajo de los flavonoides se inyectaron por triplicado obteniéndose los cromatogramas respectivos. Se determinó el tiempo de retención (Tr) en min. y el área bajo la curva del pico en función de las obtenidas con cada uno de los estándares.

La identificación de los flavonoides presentes en el EE de *G. sepium* se realizó comparando los tiempos de retención (Tr) obtenidos con los de los estándares. Para su cuantificación, se calcularon los factores de respuesta (RF) para cada uno de los estándares, utilizando la fórmula:

$$RF = ppm/A$$

donde:

ppm, concentración (mg·mL⁻¹) de la solución de trabajo del estándar respectivo.

A, área del pico obtenida en el cromatograma

Una vez calculados los RF de los estándares y su coeficiente de variación, se calculó el contenido de los flavonoides ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) presentes en la muestra del extracto etanólico utilizando la fórmula anterior.

Finalmente, se calculó la concentración del flavonoides ($\text{g}/100$ g de hojas secas), considerando el volumen (en mL) del EE obtenido por reducción en un rotavapor (15 mL), número de diluciones realizadas a la muestra (factor de dilución), factor de concentración (volumen del macerado sometido a la reducción de 350 mL) y los gramos de hojas secas (434,58 g) maceradas en etanol al 96%.

Efecto *in vitro* de los patrones de flavonoides sobre *Colletotrichum acutatum*

Los metabolitos secundarios evaluados fueron los flavonoides AC, C y Q en sus presentaciones comerciales. Se utilizaron dos cepas de *C. acutatum*, aisladas de frutos de fresa con antracnosis en los estados Lara y Trujillo (L1F5 y Tr3F4), las cuales fueron reactivadas en medio papa dextrosa agar acidificado (PDAA) y cultivadas durante una semana antes de las pruebas. Las cantidades correspondientes de cada flavonoide fueron mezcladas en medio papa dextrosa agar (PDA), inmediatamente después de la esterilización a las concentraciones de 0,125, 0,25 y 0,5% (m/v).

El medio de cultivo PDA con la correspondiente concentración del MS se dispensó en platos Petri de 5 cm de diámetro (5 mL/plato) y una vez solidificado, en el centro de cada plato, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio del hongo. Luego se incubó a $27\pm 2^\circ\text{C}$.

Se realizaron tres repeticiones por concentración y por cepa del hongo. El diámetro de la colonia se marcó y midió diariamente por el reverso del plato Petri hasta que la colonia en el tratamiento testigo (sin extracto) lo cubrió totalmente (Rodríguez y Sanabria 2005). Con los datos del último día de evaluación del crecimiento micelial, se calculó el porcentaje de inhibición micelial (ICM) y el porcentaje de inhibición de la esporulación (IE) para cada tratamiento. La prueba se realizó dos veces.

Para determinar el efecto fungicida o fungistático de los MS, los discos del hongo que no presentaron crecimiento micelial en los tratamientos evaluados se transfirieron a platos Petri con el medio PDA libre de los MS, los cuales se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 12 h

durante siete días se evaluó el desarrollo de las colonias. Se consideró un efecto fungicida en aquellos que no presentaron crecimiento del hongo y fungistático para los que sí lo presentaron.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 3 \times 3$, siendo los factores y niveles de cada uno: cepas de *Colletotrichum acutatum* (L1F5 y Tr3F4), metabolito secundario (AC, C, Q) y concentración de éstos (0,125, 0,25 y 0,5 %). Los datos se sometieron al análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey (5 %) utilizando el programa estadístico Statistix versión 8.0 (Analytical Software 2003).

Resultados y discusión

Flavonoides presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Gliricidia sepium*

El análisis por HPLC permitió identificar seis flavonoides en el EE de *G. sepium*: ácido orto cumárico, cumarina, kaenferol, luteolina, miricetina y quercetina (Figuras 1 y 2). La presencia de estos flavonoides en hojas y otros órganos de *G. sepium* ha sido señalada por Griffiths (1962), Ramamoorthy y Paliwal (1993), Rastrelli *et al.* (1999) y Kaniampady (2007). La Tabla 1 muestra que el ácido orto cumárico es el flavonoide que se encuentra en mayor proporción en las hojas de *G. sepium* (28,26%), seguido de cumarina (3,71%), quercetina (2,42%), luteolina (1,07%), kaenferol (0,36%) y miricetina (0,1%). Kaniampady *et al.* (2007) analizaron el aceite esencial de hojas de *G. sepium*, por cromatografía de gases, y reportaron un contenido superior de cumarina, 18,2%, en comparación al obtenido en la presente investigación. Esta diferencia podría ser explicada porque la síntesis de estos compuestos depende de la fase específica del desarrollo y de las condiciones a las cuales estaban sometidas las plantas en el momento de recolectar el material vegetal (Sepúlveda *et al.* 2003, Cseke *et al.* 2006, Wink 2010).

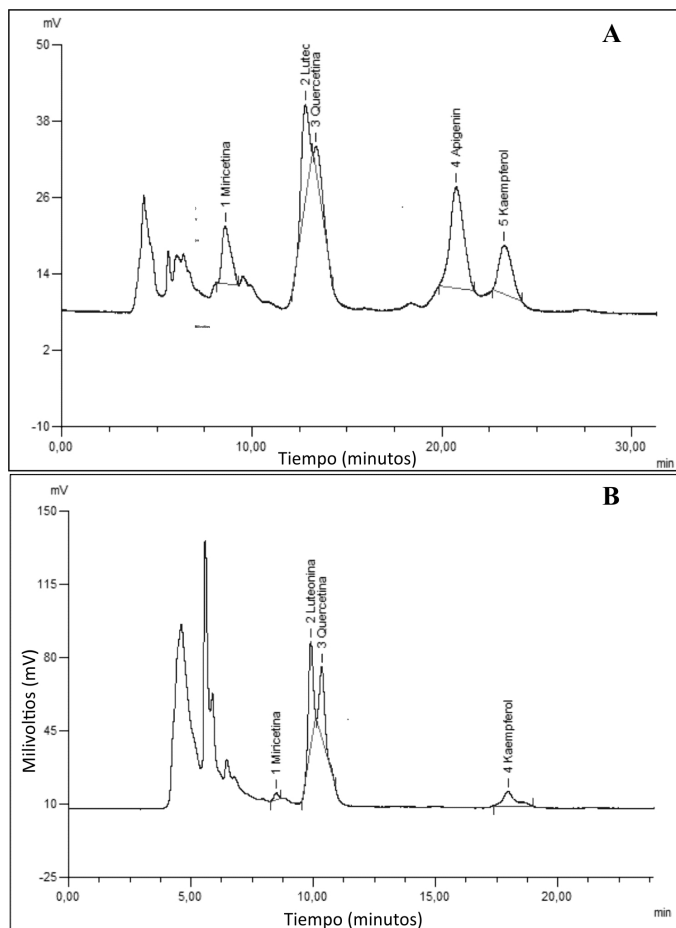


Figura 1. A. Cromatogramas de una mezcla de patrones o estándares de kaempferol (20 mg.L⁻¹), luteolina, miricetina y quercetina (30 mg.L⁻¹). B. Cromatograma del extracto etanólico de hojas de *Gliricidia sepium*, a una longitud de onda de 280 nm y fase móvil isocrática de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0,025 M/acetonitrilo (66,7:33,3% v/v)

Efecto *in vitro* de los patrones de flavonoides (estándares) sobre de *Colletotrichum acutatum*

Se evidenció un comportamiento diferencial de las dos cepas (L1F5 y Tr3F4) ante algunos de los flavonoides y sus concentraciones evaluadas ($p < 0,01$). La cumarina a las concentraciones de 0,25 y 0,50% logró inhibir completamente el crecimiento micelial de las dos cepas de *C. acutatum* (ICM=100%), pero a 0,125% se observó un comportamien-

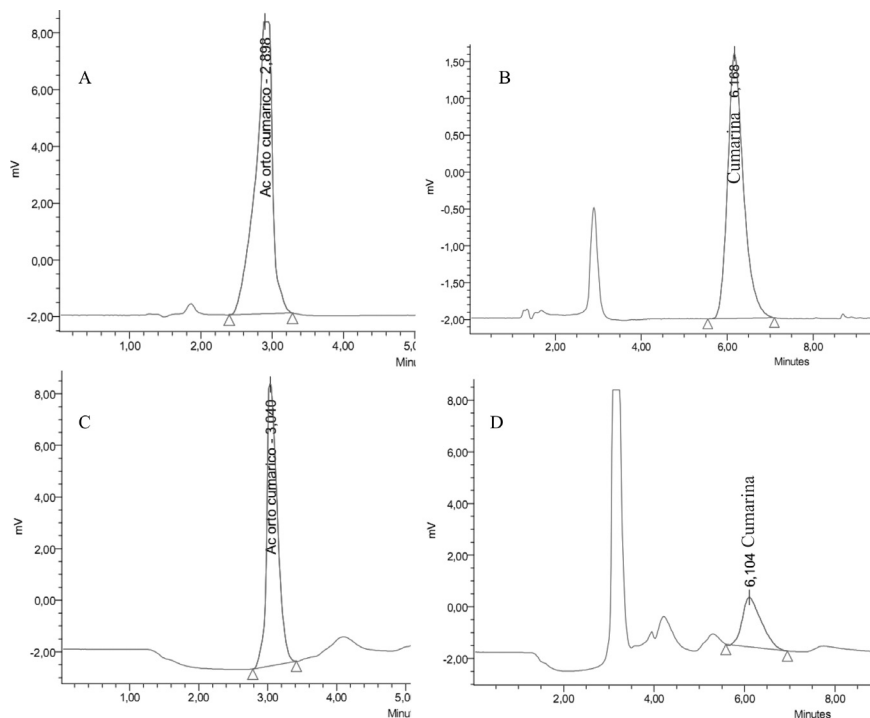


Figura 2. Cromatogramas correspondientes a la determinación de (A) Estándar de ácido orto coumarico (22 mg L⁻¹), (B) Estándar de cumarina (11,05 mg L⁻¹), (C) y (D). Cromatogramas del extracto etanólico de hojas de *Gliricidia sepium*, a una longitud de onda de 254 nm y fase móvil isocrática de metanol/agua (50:50% v/v).

to contrastante entre las dos cepas; para L1F5 y Tr3F4 los valores de ICM fueron de 100% y 76,33%, respectivamente (Tabla 2). El efecto del ácido orto cumárico (AOC) al 0,5%, para las dos cepas, fue similar con ICM de 97,67% para L1F5 y 94,67% para Tr3F4. La cepa L1F5 fue más susceptible a las concentraciones de este ácido al 0,125% y 0,25% con ICM de 36,67% y 89,33% respectivamente, mientras que la cepa Tr3F4 presentó ICM de 44,0% (AOC 0,25%) y 12,33% (AOC 0,125%). La cepa Tr3F4 resultó menos susceptible a las concentraciones de AOC (0,125 y 0,25%) y de C (0,125%), probablemente debido a la variabilidad genética entre ellas, lo cual resulta en la reducción de su sensibilidad al compuesto químico (Damicone 2004). Por otra parte, la quercetina (Q) ejerció un menor efecto sobre el ICM en comparación con la C y el AOC, apreciándose un comportamiento similar a

Tabla 1. Tiempo de retención (Tr), área, factor de respuesta (RF) y concentraciones de ácido orto cumárico, cumarina, kaenferol, luteolina, miricetina y quercetina presentes en el extracto etanólico y hojas de *Gliciridia sepium*

Metabolito secundario	Tr (min)	Área (mV*sec)	RF	mg MS/ L EE	mg MS/ 15 mL EE	Factor de dilución (mg)	Factor de concentración (mg)	Mg EE/ macerado	g MS/ 100 g hojas (%)
Ácido orto cumárico	3,01	117.522,67	0,000130577	15,35	0,23	920,75	21.481,05	122.748,88	28,26
Cumarina	6,10	56.081,00	0,000359000	20,13	0,30	120,80	2.818,19	16.103,97	3,71
Quercetina	10,33	330.644,53	0,000317440	104,96	1,57	78,72	1.836,53	10.494,48	2,42
Luteolina	9,89	399.794,50	0,000116194	46,45	0,70	34,84	812,82	4.644,71	1,07
Kaenferol	17,92	181.145,25	0,000087122	15,78	0,24	11,84	276,14	1.577,95	0,36
Miricetina	8,48	26.066,58	0,000164656	4,29	0,06	3,22	75,10	429,14	0,10

Tabla 2. Inhibición de crecimiento micelial (ICM) de las cepas de *Colletotrichum acutatum* (L1F5 Y TR3F4) por efecto de tres concentraciones de los flavonoides cumarina (C), ácido ortocumárico (AOC) y quercetina (Q). Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey ($p \leq 0,05$)

Cepa	Metab	Conc (%)	ICM (%)	Grupo
L1F5	C	0,125	100	A
L1F5	C	0,25	100	A
L1F5	C	0,5	100	A
Tr3F4	C	0,25	100	A
Tr3F4	C	0,5	100	A
L1F5	AOC	0,5	97,67	A
Tr3F4	AOC	0,5	94,67	A B
L1F5	AOC	0,25	89,33	B
Tr3F4	C	0,125	76,33	C
Tr3F4	AOC	0,25	44,00	D
L1F5	AOC	0,125	36,67	E
Tr3F4	Q	0,5	24,33	F
L1F5	Q	0,5	22,00	FG
Tr3F4	Q	0,125	20,67	FG
Tr3F4	Q	0,25	19,33	FGH
L1F5	Q	0,25	17,00	GH
Tr3F4	AOC	0,125	12,33	HI
L1F5	Q	0,125	8,33	I

las concentraciones de 0,25 y 0,5%, para las dos cepas; la mayor concentración (0,5%) sólo logró un ICM de 22,0%, para L1F5, y de 24,33%, para Tr3F4.

La cumarina (C) en todas las concentraciones evaluadas y el ácido orto cumárico (AOC) al 0,5% lograron inhibir la esporulación de *C. acutatum* con valores de IE muy cercanos al 100% (Figura 3); el AOC al 0,25% y 0,125 produjo% de IE de 84,5% y 63,67%, respectivamente. En relación al efecto de la quercetina (Q) sobre el IE, se aprecia que a medida que se incrementa la concentración disminuye la esporulación del hongo, pero sin diferencias significativas entre 0,25% y 0,5%, con valores de inhibición de 61,17% y 78,5% respectivamente.

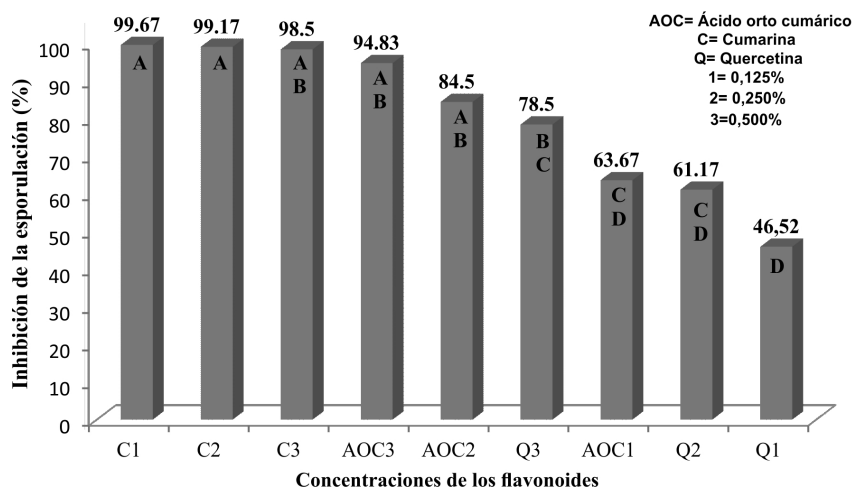


Figura 3. Inhibición de la esporulación (promedio) para las dos cepas de *Colletotrichum acutatum* (L1F5 y Tr3F4) ante el efecto de tres concentraciones de flavonoides: cumarina (C), ácido ortocumárico (AOC) y quercetina (Q). Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey ($p \leq 0,05$).

En relación al acentuado efecto de la cumarina sobre *C. acutatum*, Razavi (2011) sugiere que este grupo de MS debería utilizarse para crear una nueva generación de fungicidas que sean más compatibles con el ambiente, basado en los resultados de Razavi et al. (2010), quienes reportaron el efecto inhibitorio de tres cumarinas, aisladas de semillas de *Zosima absinthifolia*, sobre el crecimiento micelial y esporulación del *Sclerotinia sclerotiorum* hasta a la dosis de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$.

La quercetina ejerció un menor efecto sobre el crecimiento micelial del hongo *C. acutatum*; resultado que coincidió con los señalados por Bravo et al. (2003), quienes evaluaron el efecto de un estándar de este mismo compuesto en las dosis de 250, 500 y 750 mg.mL^{-1} , sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *C. gloeosporioides* sin encontrar diferencias significativas con el control.

Se determinó además que el efecto inhibitorio del AOC (0,5%) y la C (0,125%) fue de tipo fungistático, porque inhibieron el crecimiento micelial de las dos cepas del hongo, sólo al estar en contacto con el MS mezclado en

el medio PDA. La cumarina, por su parte, resultó ser tóxica a las dos cepas de *C. acutatum* a 0,25 y 0,5%, y no hubo crecimiento después de siete días que los discos fueron transferidos a PDA, de allí que este MS, a dichas concentraciones, tuvo propiedades fungicidas (Tabla 3).

Estos resultados demostraron que la cumarina presentó una mayor actividad antifúngica sobre el desarrollo *in vitro* de *C. acutatum*, comparado con el ácido orto cumárico. En tal sentido, Bhumika *et al.* (2007), determinaron el mecanismo de acción de algunas cumarinas sobre la levadura *Candida albicans*, en las cuales redujeron la respiración y el contenido de ergosterol de las células e incrementaron la pérdida de los aminoácidos a través de la membrana induciendo la muerte de las células; probablemente éstos sean los mismos mecanismos de acción por los cuales la cumarina comercial evaluada ocasionó la muerte de las dos cepas de *C. acutatum*.

Tabla 3. Crecimiento de las cepas de *Colletotrichum acutatum* (L1F5 Y TR3F4) en platos con PDA y determinación del efecto fungicida o fungistático de la cumarina (C) y el ácido ortocumárico (AOC)

Metab. Sec.	Primer ensayo		Segundo ensayo	
	L1F5	TR3F4	L1F5	TR3F4
C 0,125% R1	SC	X	X	NE
C 0,125% R2	X	X	X	NE
C 0,125% R3	X	SC	X	NE
C 0,25% R1	SC	SC	SC	SC
C 0,25% R2	SC	SC	SC	SC
C 0,25% R3	SC	SC	SC	SC
C 0,5% R1	SC	SC	SC	SC
C 0,5% R2	SC	SC	SC	SC
C 0,5% R3	SC	SC	SC	SC
AOC 0,25% R1	X	NE	NE	NE
AOC 0,25% R2	X	NE	NE	NE
AOC 0,25% R3	X	NE	NE	NE
AOC 0,5% R1	X	X	X	NE
AOC 0,5% R2	X	X	X	NE
AOC 0,5% R3	X	X	X	NE

R (1, 2, 3)= repeticiones, X= crecimiento en PDA, SC= sin crecimiento y NE= no evaluado.

Según Kawase et al. (2001), la presencia de fenoles y los grupos hidroxilados carboxílicos en el núcleo de la cumarina son necesarios para la actividad antimicrobiana de éstas. Sardari et al. (1999) hicieron referencia a que el grupo hidroxilo libre en la posición seis del núcleo cumarínico, es una consideración estructural muy relacionada con la actividad antifúngica de este MS.

Conclusiones

En el extracto etanólico de hojas de *Gliricidia sepium* se cuantificaron los flavonoides ácido orto cumárico, cumarina, quercetina, luteolina, kaenferol y miricetina.

La cumarina comercial ejerció un efecto fungicida sobre las dos cepas de *C. acutatum* evaluadas a las concentraciones de 0,25 y 0,5%, mientras que el ácido ortocumárico sólo tuvo una acción fungistática al 0,5%. La quercetina no inhibió significativamente el crecimiento micelial de *C. acutatum*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA) por el aporte económico para la realización de ésta investigación, a través del proyecto CDCHT 020-AG-2007, titulado “Efecto del control biológico y cultural sobre hongos y nemátodos”.

Literatura citada

Analytical software. 2003. Statistix for Windows. Versión 8.0.

Bravo, I., M. Corona, P. Villa, R. Hernández, I. Barrera, S. Bautista y K. Bermúdez. 2003. Efectos de extractos vegetales crudos y un compuesto sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Disponible en http://somech.com.mx/ponencias/ponencias_2003/ornamentales/MEMORIA%20ORNAMENTALES%2020.pdf. Consultado: 27 de noviembre de 2012.

Bhumika, T., A. Noble, R. Rowan, B. Creaven, M. Walsh, M. McCann, D. Egan y K. Kavanagh. 2007. Mechanism of action of coumarin and silver (I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol. in Vitro* 21:801-808. Mechanism of action of coumarin and silver (I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol. in Vitro* 21:801-808.

- CSEKE, L., A. KIRAKOSYAN, P. KAUFMAN, S. WARBER, J. DUKE Y H. BRIELMANN. 2006. Natural products from plants. Second Edition. CRC Press. 551 p.
- DAMICONE, J. 2004. Fungicide resistance management. Oklahoma State University, f-7663. 7 p. Disponible en <http://pearl.agcomm.okstate.edu/plantdiseases/f-7663.html>. Consultado: 18 de octubre de 2012.
- GRIFFITHS, L. 1962. On the co-occurrence of coumarin acid, and melilotic acid in *Gliricidia sepium* and *Diptery odorata*. J. Exp. Bot. 13:169-175.
- HERATH, H., R. DASSANAYAKE, A. PRIYADARSHANI, S. DE SILVA, G. WANNIGAMA Y J. JAIME. 1998. Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. Phytochemistry 47: 117-119.
- HOCHMAN, H. 1966. Mechanism of rodenticidal activity of *Gliricidia sepium*. Abstract. Defense Technical Information Center (DTIC). National Technical Information Service. AD0631002.
- HOYOS, J. 1992. Árboles tropicales ornamentales cultivados en Venezuela. Monografía N° 38. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas. 272 p.
- KANIAMPADY, M., M. MUHAMMED, L. JIROVETZ Y P. MOHAMED. 2007. Essential composition of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and flowers. Indian J. Chem. 46B: 1359-1360.
- KAWASE, M., N. MOTOHASHI, H. SAKAGAMI, T. KANAMOTO, H. NAKASHIMA, L. FERENCZY, K. WOLFARD, C. MISKOLCI Y J. MOLNÁR. 2001. Antimicrobial activity of trifluoromethyl ketones and their synergism with promethazine. Int. J. Antimicrob. Agents 18(2):161-165.
- MARTIN, A., T. GONZÁLEZ, A. MARRERO, V. MILIÁN, H. CAMPAÑÁ Y G. IGLESIAS. 2003. Obtención de un extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud bajo irradiación con microondas. Revista Cubana de Plantas Medicinales 8(3):1-2.
- ORTÍZ, F. 2010. Etiología del tizón tardío del céleri (*Apium graveolens* L. var dulce (Miller) Pers.) y evaluación de su control con extractos vegetales bajo condiciones controladas. Trabajo grado para optar al título de Magister Scientiarum en Fitopatología. Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado. 59 p.
- RAMAMOORTHY, M. Y K. PALIWAL. 1993. Allelopathic compounds in leaves de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex. Walp. and its effect on *Sorghum vulgare* L. J. Chem. Ecol. 19: 1961-1701.
- RASTRELLI, L., A. CÁCERES, F. DE SIMONE Y R. AQUINO. 1999. Studies on the constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and roots: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds. J. Agric. Food Chem. 47:1537-1540.
- RAZAVI, S. 2011. Plant coumarins as allelopathics agents. Int. J. Biol. Chem. 5: 86-90.

- RAZAVI, S., G. IMANZADEH Y M. DAVARI. 2010. Coumarins from *Zosima absinthifolia* seeds, with allelopathic effects. *Eur. Asia J. Biosci.* 4:17-22.
- RODRÍGUEZ, D. Y M. E. SANABRIA. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que la causan. *Interciencia* 30: 739-744.
- SARDARI, S., Y. MORI, K. HORITA, R. MICETICH, S. NISHIBE Y M. DANESHTALAB. 1999. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* 7:1933-1940.
- SEPÚLVEDA, G., H. PORTA Y M. ROCHA. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363.
- URDANETA, L., M. SANABRIA, D. RODRÍGUEZ Y M. PÉREZ DE CAMACARO. 2012. Grupos de metabolitos secundarios y potencial antifúngico del extracto etanólico de *Gliricidia sepium* sobre *Colletotrichum acutatum*. *Interciencia* 38(6):449-454.
- VARGAS, D., M. SOTO, V. GONZÁLEZ, E. ENGLEMAN Y A. MARTÍNEZ. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia* 40:109-115.
- WINK, M. 2010. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Serie: Annual Plant Reviews 39. Second Edition. Editorial Rommer's. Inglaterra. 408 p.