

Evaluación del balance Redox en *Cercospora kikuchii* y en plantas de soja, tratadas con alcaloides de *Prosopis nigra*

Sequin, Christian J.^{1,4}; Appelhans Stefania C.^{1,2}; Trossero, Julia A.¹; Sampietro, Diego A.³; Aceñolaza, Pablo G.^{1,4}.

Autoras/es: ¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos, Ruta 11 Km 10.5, Entre Ríos, Argentina. ²INTA EEA Paraná, Ruta 11 Km 12.5, Entre Ríos, Argentina ³LABIFITO, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, 4000, San Miguel de Tucumán, Argentina ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 CP C1425FQB, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: christian.sequin@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/fkkoc211k>

Resumen

El interés por la evaluación de fungicidas botánicos útiles para el control de enfermedades fitopatógenas ha crecido en los últimos años. En este marco los compuestos bioactivos presentes en las hojas de *Neltuma nigra* podrían ser utilizados en un fungicida botánico de gran relevancia para el control de enfermedades de fin de ciclo en el cultivo de soja, entre ellas la mancha púrpura causada por *Cercospora kikuchii*. Este proyecto tuvo como objetivo, en primer lugar, evaluar la actividad antifúngica y la composición química de la fracción de alcaloides presentes en las hojas de *N. nigra* (FAP). En segundo lugar, evaluar el estrés oxidativo en plantas de soja y en *C. kikuchii* cuando son tratados con la FAP. Para esto se evaluó la actividad antifúngica a través del ensayo de difusión en disco y se identificaron los alcaloides a través de GC-MS. Además, se determinaron parámetros como la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión radical superóxido (O₂⁻), la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y APX, la determinación de lípidos peroxidados, la actividad antioxidante total y el consumo de oxígeno. Los resultados muestran que la FAP tiene una fuerte actividad antifúngica y la triptamina es el alcaloide mayoritario en esta fracción. Respecto del estrés oxidativo la FAP no alteró el balance redox en plantas de soja ni en *C. kikuchii*. La FAP no afectó la actividad de enzimas antioxidantes *in vivo*, pero redujo la capacidad antioxidante total. Su actividad antifúngica parecería actuar por un mecanismo distinto al estrés oxidativo.

Objetivos propuestos y cumplidos

1. Evaluar la actividad antifúngica de la fracción de alcaloides de hojas de *Neltuma nigra* frente a *C. kikuchii*.
2. Purificar e identificar los alcaloides presentes en la fracción de alcaloides de hojas de *Neltuma nigra*.
3. Determinar la concentración de las ROS en cultivos de *Cercospora kikuchii* tratados con la fracción de alcaloides de *Neltuma nigra*.
4. Determinar *in vitro* el efecto conjunto de la fracción de alcaloides de hojas de *N. nigra* y fungicidas comerciales.
5. Aplicar *in vivo* en plantas de soja la combinación de la fracción de alcaloides de hojas de *N. nigra* y fungicidas comerciales.
6. Determinar la concentración de las ROS en plantas tratadas con la fracción de alcaloides de *N. nigra*.

Marco teórico y metodológico (síntesis)

El aumento de enfermedades fúngicas en el cultivo de soja en nuestro país se debe a factores como el monocultivo, la siembra directa y el uso de germoplasma con poca variabilidad. La aplicación constante de fungicidas ha generado resistencia, lo que obliga a incrementar las dosis para su control. En este contexto, la búsqueda de agentes naturales para el manejo de enfermedades cobra relevancia, ya que permitiría reducir el uso de fungicidas sintéticos y prevenir la pérdida de su eficacia.

El extracto de alcaloides de hojas de *Neltuma nigra* contiene compuestos con actividad antifúngica, como triptamina, N-acetilriptamina, eleagnina, tiramina y feniletilamina. Estos alcaloides han demostrado eficacia contra diversos hongos fitopatógenos, incluyendo *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus sp.*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria sp.*, *Moniliophthora roreri* y *Candida sp.* Se ha informado que aproximadamente el 2% del peso seco de las hojas de *P. nigra* corresponde a estos alcaloides. Aunque el mecanismo de acción de la mayoría de estos compuestos aún se desconoce, en el caso de la triptamina, se ha observado que induce estrés oxidativo en cianobacterias, lo que podría estar relacionado con su actividad antifúngica.

Este proyecto evaluó el efecto de la fracción de alcaloides obtenidos de hojas de *N. nigra* en *Cercospora kikuchii*, hongo que causa el tizón de la hoja y la mancha púrpura de la semilla y en plantas de sojas.

La extracción de alcaloides presentes en hojas de *N. nigra* se realizó siguiendo las técnicas descritas por Moro et al. (1975) y Samoylenko et. al. (2009). La identificación de los alcaloides presentes se realizó a través de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La actividad antifúngica de alcaloides de hojas de *N. nigra* se evaluó de acuerdo a las técnicas descritas por Quiroga et al. (2009) y Aristimuño et al. (2014). Respecto de las técnicas utilizadas en el estrés oxidativo, se midió el consumo de oxígeno de acuerdo a la técnica seguida por Sterren et al. (2016). Entre las especies reactivas del oxígeno se midió H_2O_2 utilizando las técnicas propuestas por Bellincampi et al., (2000) y Cheeseman (2009) que se basan en la formación de un cromóforo entre el xilenol y el Fe^{+3} . Para el caso del $O_2^{\cdot-}$ se utilizó una técnica propuesta por Wu y Tiedemann (2002), Jiang y Zhang (2001) y Zhang et al. (2015) basada en la reacción de la hidroxilamina con este radical. Se midieron dos enzimas antioxidantes, la CAT (catalasa) y APX (ascorbato peroxidasa) siguiendo las técnicas descritas por

Kausar et al., (2012), Aebi (1984), Daub, (1987) e Imran et al., (2021). Los hidroperóxidos de lípidos de plántulas de soja fueron determinados a través de la técnica informada por Delong et al. (2002) y Dermiş y Dođru (2012). Además, se determinó la capacidad antioxidante total siguiendo la técnica descrita por Aouam et al. (2019).

Además de los análisis relacionados con el estrés oxidativo se realizó la evaluación de la toxicidad de alcaloides de hojas de *N. nigra* a través del test de toxicidad con *Caenorhabditis elegans* (Spagnoletti et. al. 2021; Clavijo et. al. 2017).

Finalmente, para evaluar la sostenibilidad del procedimiento de extracción de alcaloides, se aplicó la metodología de métricas verdes propuesta por Kowtharapu et al. (2023), utilizando sus tablas de referencia.

Síntesis de resultados y conclusiones

En el presente proyecto se logró evaluar la actividad antifúngica de la fracción de alcaloides de hojas de *Neltuma nigra* frente a *C. kikuchii* y purificar e identificar los alcaloides presentes en la fracción. Fueron identificados un total de 5 alcaloides de hojas de *N. nigra*. De éstos, fenetilamina, triptamina y harman habían sido reportados por Moro et. al (1975). El alcaloide en mayor porcentaje fue la triptamina. La fracción de alcaloides exhibió actividad antifúngica en todas las dosis ensayadas y se observaron halos entre 9 y 12mm. No se observan diferencias significativas entre una dosis de 25 µg/disco de la fracción y 1 µg/disco de difenoconazol.

Sumado a esto se logró determinar la concentración de las ROS en cultivos de *Cercospora kikuchii* y en plantas de soja tratados con la fracción de alcaloides de *Neltuma nigra*. Respecto del balance redox la fracción de alcaloides no estimuló la producción de las especies reactivas del oxígeno y tampoco afectó las enzimas antioxidantes. Además, los resultados indican que fracción de alcaloides no genera cambios observables en las concentraciones de ROS en cultivos de *C. kikuchii*, lo que coincide con observaciones previas en las que se reportó que su aplicación estimulaba el consumo de oxígeno. Estos resultados están en línea con estudios previos que evidenciaron la baja toxicidad en comparación con fungicidas sintéticos.

Como se mencionó previamente la fracción de alcaloides no afecta significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes *in vivo*. Sin embargo, *in vitro*, el aumento de su concentración reduce la actividad sugiriendo un impacto en la V_{max} de las enzimas. En este contexto sería relevante evaluar otras enzimas como la PAL y parámetros adicionales del estrés oxidativo. En términos de su efecto sobre la lesión de las plántulas de soja, la fracción es capaz de reducirla cuando es aplicada en forma exógena.

Durante el desarrollo de este proyecto también se pudo lograr determinar *in vitro* el efecto conjunto de la fracción de alcaloides de hojas de *N. nigra* y fungicidas comerciales, como así también se logró aplicar *in vivo* en plantas de soja la combinación de estos productos. En este sentido, al comparar el efecto de un producto comercial con fungicidas sintéticos y una mezcla que combina un fungicida sintético con otro botánico derivado de la fracción estudiada, observamos diferencias en el comportamiento redox de las plantas de soja entre ambos tratamientos.

Finalmente, fue identificada una fracción obtenida con un método más verde que conserva la actividad antifúngica y cuya obtención es menos tóxica para el ambiente. Sin embargo, esta fracción es menos bioactiva y contiene una menor proporción del principal constituyente antifúngico.

Indicadores de producción

Artículos

- 1-Sequin, C. J., Appelhans, S. C., Heis, M. S., Torrent, W. A., Trossero, J. A., Catalán, C. A., ... & Aceñolaza, P. G. (2023). **Antifungal and toxicological evaluation of the alkaloids fraction from *Neltuma nigra* leaves**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102914. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102914>
- 2- Sequin CJ, Perusset SA, Trossero JA, Aceñolaza PG. 2024. New co-products from an endangered tree species: *Araucaria angustifolia* (bertol.) kuntze. *Technology in Agronomy 4*: e009 [doi: 10.48130/tia-0024-0006](https://doi.org/10.48130/tia-0024-0006).
- 3- Fernández EN, Sequin CJ, Gonzalez A, Herrera JM. Ethanollic Botanical Extracts: A Bioinsecticide Approach to Controlling *Epicauta atomaria* (Coleoptera: Meloidae). *Neotrop Entomol.* 2025 Apr 15;54(1):57. doi: [10.1007/s13744-025-01271-9](https://doi.org/10.1007/s13744-025-01271-9). PMID: [40234332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40234332/).

Presentaciones a congresos

- Heis Magali s, Torrent Walter A., Sequin Christian J., Appelhans Stefania C. Trossero Julia A., Bianchi Mariana, Aceñolaza Pablo G. **Evaluación de la lesión causada por *Cercospora kikuchii* en hojas de plantas de soja tratadas con ácido ascórbico y una fracción de alcaloides enriquecida en triptamina**. Presentado en Reunión de investigación, extensión y docencia (RIED), organizada por la Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER el 27 de septiembre de 2023 en la ciudad de Oro Verde.
- Magalí S. HEIS, Walter A. TORRENT, Stefania C. APPELHANS, Pablo G. ACEÑOLAZA, Christian J. SEQUIN (2022) **“Extracción de alcaloides a partir de hojas de *Prosopis nigra*”** XXXVI Jornadas Forestales de Entre Ríos, realizadas en la ciudad de Concordia, Entre Ríos, los días 13 y 14 de octubre.
- Sequin C. J., Appelhans S. C., Trossero J. A., Torrent W., Heis M., Sampietro D. A. y Aceñolaza P. G (2022) **“Alteración en el consumo de oxígeno de *Cercospora kikuchii* causado por la aplicación exógena de alcaloides”** XXVII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, realizadas en la ciudad de Pergamino, los días 19, 20 y 21 de octubre. Organizada por la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires.
- Sequin Christian J., Appelhans, Stefania C., Trossero Julia A., Sampietro Diego A., Aceñolaza Pablo G. (2022). **Evaluación del balance redox en plantas de soja, tratadas con alcaloides de *Prosopis nigra***. Jornadas INEXA 2022, realizadas en Paraná los días 2 y 3 de noviembre. Organizado por la Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Christian J. Sequin, Stefania C. Appelhans , Magalí S. Heis , Walter A. Torrent , Julia A. Trossero , Cesar A. N. Catalan, Diego A. Sampietro, Pablo G. Aceñolaza. **Evaluación antifúngica y toxicológica de la fracción de alcaloides de hojas de *Neltuma nigra***, en el marco del IX Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC), realizado del 21 al 23 de octubre de 2024, en la ciudad de Santa Fe (Argentina). Ciudad de Santa Fe – Argentina, noviembre de 2024.
- Torrent Walter, Aceñolaza Pablo, Appelhans Stefania, Heis Magalí, Trossero Julia y Sequin Christian (2022) **Actividad antifúngica de la fracción de alcaloides obtenida de hojas de *Prosopis nigra***. XXIX Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM, realizadas en Bolivia los días 7,8 y 9 de septiembre. Organizadas por la Universidad San Francisco Xavier.

Bibliografía

- MORO, G. A., GRAZIANO, M. N., y COUSSIO, J. D. (1975). Alkaloids of *Prosopis nigra*, en: *Phytochemistry*, 14:827
- SAMOYLENKO, V., ASHFAQ, M. K., JACOB, M. R., TEKWANI, B. L., KHAN, S. I., MANLY, S. P., ... & MUHAMMAD, I. (2009). Indolizidine, antiinfective and antiparasitic compounds from *Prosopis glandulosa* Torr. Var. *glandulosa*. *Planta Medica*, 75(04), P-48.
- QUIROGA, E. N., SAMPIETRO, D. A., SGARIGLIA, M. A., SOBERÓN, J. R., Y VATTUONE, M. A. (2009). Antimycotic activity of 50-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species, en: *International Journal of Food Microbiology*, 132(1):42–46.
- ARISTIMUÑO FICOSECO, M. E., VATTUONE, M. A., AUDENAERT, K., CATALAN, C. A. N., & SAMPIETRO, D. A. (2014). Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in *A nocardia-ceae* species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *F usarium* species. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1262-1273.
- STERREN, M. A., UHRICH, W., & BENINTENDE, S. (2016). Residualidad de glifosato en suelos de Entre Ríos y su efecto sobre los microorganismos del suelo. *Ecología austral*, 26(3), 246-255.
- BELLINCAMPI, D., DIPIERRO, N., SALVI, G., CERVONE, F., & DE LORENZO, G. (2000). Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant physiology*, 122(4), 1379-1386.
- CHEESEMAN, J. M. (2009). Seasonal patterns of leaf H₂O₂ content: reflections of leaf phenology, or environmental stress? *Functional Plant Biology*, 36(8), 721-731.
- WU, Y. X., & VON TIEDEMANN, A. (2002). Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution*, 116(1), 37-47.
- JIANG, M., & ZHANG, J. (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42(11), 1265-1273.
- ZHANG, Y., XU, S., YANG, S., & CHEN, Y. (2015). Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma*, 252, 911-924.
- KAUSAR, R., HOSSAIN, Z., MAKINO, T., & KOMATSU, S. (2012). Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Molecular Biology Reports*, 39, 10573-10579.
- AEBI H. 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 105:121–127. 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- DAUB, M. E. (1987). Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. *Phytopathology*, 77(11), 1515-1520.
- IMRAN, M., ATIF KHAN, A., SHAHZAD, R., AAQIL KHAN, M., BILAL, S., KHAN, A., & LEE, I.J. (2021). Exogenous melatonin induces drought stress tolerance by promoting plant growth and antioxidant defence system of soybean plants. *AoB Plants*, 13(4), lab026.
- DELONG, J. M., PRANGE, R. K., HODGES, D. M., FORNEY, C. F., BISHOP, M. C., & QUILLIAM, M. (2002). Using a modified ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 248-254.

- DERMIŞ, S., CAN, S., & DOĞRU, B. (2012). Determination of peroxide values of some fixed oils by using the mFOX method. *Spectroscopy Letters*, 45(5), 359-363.
- AOUAM, I., ATKI, Y. E., TALEB, M., TAROQ, A., KAMARI, F. E., LYOUSSEI, B., & ABDELLAOUI, A. (2019). Antioxidant capacities and total phenolic contents of *Thymus riatarum*. *Materials Today: Proceedings*, 13, 579-586.
- SPAGNOLETTI, F. N., KRONBERG, F., SPEDALIERI, C., MUNARRIZ, E., & GIACOMETTI, R. (2021). Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 297, 113434.
- KOWTHARAPU, L. P., KATARI, N. K., MUCHAKAYALA, S. K., & MARISSETTI, V. M. (2023). Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 166, 117196.

PID2237

Denominación del Proyecto

Evaluación del balance redox en *cercospora kikuchi* y en plantas de soja, tratadas con Alcaloides de *prosopis nigra*

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Cátedra/s, área o disciplina científica

Química Orgánica y Biológica y Dasonomía

Contacto

christian.sequin@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director/a

Sequin Christian Javier

Codirector/a

Aceñolaza Pablo G.

Integrantes internos/Docentes UNER

Appelhans, Stefania C.; Trossero, Julia Adriana. Externos: Sampietro, Diego A. (Laboratorio de Biología de Agentes Bioactivos y Fitopatógenos, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (LABIFITO) y CONICET.

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

26/04/2021 y 25/04/2024

Aprobación del Informe Final mediante resolución CS N° 264/25 (29-09-2025)