

ACTIVIDAD FUNGICIDA DE CUATRO ESPECIES CUBANAS DE PLANTAS SOBRE *BOTRYTIS CINEREA* PERS. ESTUDIO FITOQUÍMICO.

Y. Ortiz Núñez¹, I. González Collado², R. Hernández-Galán², I. Spengler Salabarría³,
Y. Rodríguez¹, M.A. Álvarez¹ y Y. Lorenzo¹.

1. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Calle 2, Esq. 1, Santiago de Las Vegas. Ciudad de La Habana.

Cuba. yareliso2002@yahoo.com

2. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.
Apdo. 40, 11510. Puerto Real. España

3. Centro de Estudios de Productos Naturales (CEPN). Universidad de La Habana.
Zapata y G. Vedado. Ciudad de La Habana. Cuba

INTRODUCCIÓN.

Botrytis cinerea Pers. es un hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad conocida como “podredumbre gris” y afecta a más de 235 especies de plantas cultivadas y silvestres; especialmente a las hojas, flores y frutos (Casatejada, 1996). Actualmente el uso de fungicidas comerciales significa un grave problema por los efectos colaterales que producen, relacionados con la contaminación ambiental, la falta de especificidad, su incorporación a la cadena alimentaria, así como, la aparición de resistencia en dichos patógenos. Por tal motivo, se han venido desarrollando investigaciones en el campo de los productos naturales para la obtención de fungicidas racionales y altamente biodegradables, en el cual las plantas han jugado un papel primordial, resultando ser un instrumento importante en el desarrollo de una agricultura sostenible.

En este sentido, y conociendo que Cuba posee una gran variedad florística aún sin explotar nos propusimos como objetivos en este trabajo evaluar la actividad fungicida de los extractos de cuatro especies cubanas de plantas sobre el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers., así como, aislar y caracterizar los compuestos responsables de tal actividad a partir del extracto más activo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Recolección de las plantas y procesamiento del material vegetal.

Las plantas estudiadas (**Tabla 1**), fueron recolectadas en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), entre los meses de Noviembre/2002 y Marzo/2003 e identificadas por su clasificación botánica. Los diferentes órganos fueron secados en estufa a 60°C y molidos hasta polvo fino.

2. Obtención y fraccionamientos de los crudos.

Se obtuvieron los extractos etanólico y con acetona de las 4 especies de plantas (50g), utilizando los métodos de extracción continua (Soxhlet, 8 horas) y maceración (24horas) respectivamente. Los extractos resultantes fueron concentrados en un rotoevaporador hasta sequedad. Los diferentes crudos obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Plantas estudiadas y crudos resultantes.

N. científico	N. común	Órgano de la planta	Clave de los crudos	Peso de los crudos(g)
<i>Pinus caribaea</i> M.	Pino macho	Follaje(agujas)	Pac, Petc	1.84, 10.39
<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud	Piñón florido	Hojas	Gac, Getc	0.81, 13.79
<i>Juniperus lucayana</i> Britton	Sabina	Follaje Tronco	JFac, JFetc JTac, JTetc	5.34, 15.08 1.55, 2.11
<i>Thuja orientalis</i> L.	Tuya	Follaje Tronco	TFac, TFetc TTac, TTetc	3.97, 21.66 2.76, 4.01

F: follaje T: tronco ac: acetona etc: etanol

Según los resultados de actividad biológica, la CCD y los rendimientos, se decidió comenzar a trabajar con el crudo etanólico del tronco de *Juniperus lucayana* (JTetc), en cuanto al aislamiento y purificación de los diferentes metabolitos activos. El mismo fue fraccionado en una columna primaria sobre sílica gel 60(70-230 mesh) con un tamaño de partícula de 0.063-0.200mm, la elución fue iniciada con n-hexano, seguida de mezclas de AcOEt/n-hexano con incremento de polaridad y finalizada con mezcla de CHCl₃/MeOH (3:1, 1:1), un total de 11 fracciones fueron obtenidas (F₁₋₁₁); las fracciones F₅ y F₆ fueron recromatografiadas en columna de sílica gel 60 con el sistema de solventes AcOEt/n-hexano(1:9, 1:3 y 1:1). De las últimas fracciones obtenidas a partir de la F₅ se obtuvo un sólido blanco que fue posteriormente purificado por HPLC utilizando una columna semi-preparativa, de fase normal y el sistema de solventes AcOEt/n-hexano(7%), resultando los compuestos **1** (66.1mg), **2** (73.1mg) y **3** (4.3 mg).

Del fraccionamiento de F₆ se obtuvieron 13 fracciones (F₁₋₁₃), la fracción 5 fue separada por HPLC en columna semi-preparativa de fase normal en n-hexano/AcOEt(9:1), el pico mayoritario fue entonces purificado por HPLC en esta misma columna con el sistema de solvente CH₂Cl₂/n-hexano(7:3) obteniéndose el compuesto **4** (654.1 mg).

Compuesto 1

Aceite incoloro

$$[\alpha]_D^{20} = -54^{\circ} \text{ (c 0.1, CHCl}_3\text{)}$$

RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz): δ 5.36 (1H, brs, H-2), 5.12 (1H, m, H-10), 1.68 (3H, s, H-13), 1.64 (3H, s, H-14), 1.62 (3H, s, H-12), 1.14 (3H, s, H-15).

RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz): δ (APT) 134.1 (C, C-1), 131.5 (C, C-11), 124.6 (CH, C-10), 120.5 (CH, C-2), 74.2 (C, C-7), 42.9 (CH, C-4), 40.1 (CH₂, C-8), 31.0 (CH₂, C-6), 26.9 (CH₂, C-3), 25.7 (CH₃, C-13), 23.3 (CH₃, C-14), 23.3 (CH₂, C-9), 23.2 (CH₃, C-15), 22.0 (CH₂, C-5), 17.6 (CH₃, C-12).

Compuesto 2

Sólido blanco

$$[\alpha]_D^{20} = +28.4^{\circ} \text{ (c 0.116, CHCl}_3\text{)}$$

P. Fusión: 76-78 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz): δ 1.30(3H, s, H-15), 1.24(3H, d, J=0.9Hz, H-13), 0.98(3H, s, H-14), 0.82(3H, d, J= 7.1 Hz, H-12)

RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz): δ (APT) 75.13(C, C-8), 61.05(CH, C-7), 56.54(CH, C-5), 54.10(C, C-1), 43.40(C, C-6), 41.98(CH₂, C-11), 41.48(CH, C-2), 37.01(CH₃, C-3), 35.38(CH₂, C-9), 31.61(CH₂, C-10), 30.18(CH₃, C-15), 28.92(CH₃, C-14), 27.64(CH₃, C-13), 25.37(CH₂, C-4), 15.58(CH₃, C-12).

Se realizó el espectro bidimensional gCOSY

Compuesto 3

Aceite incoloro

$$[\alpha]_D^{20} = +89^0 \text{ (c 1.20, CHCl}_3\text{)}$$

RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz): δ 3.90(1H, ddd, H-9), 2.06(1H, m, H-8), 1.92(1H, m, H-2), 1.57(1H, m, H-6), 1.45(1H, m, H-7), 1.43(1H, m, H-7), 1.42(1H, m, H-1), 1.39(1H, m, H-3), 1.24(1H, m, H-3), 1.21(1H, m, H-6), 1.10(1H, m, H-7), 1.04(1H, m, H-8), 0.96(1H, m, H-2), 0.86(3H, s, H-11), 0.82(3H, s, H-12), 0.78(3H, d, H-13), 0.73(3H, s, H-10).

RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz): δ 71.04(C-9), 53.12(C-3_a), 41.35(C-7_a), 40.73(C-8), 40.01(C-1), 39.77(C-5), 35.03(C-2), 34.48(C-4), 30.99(C-7), 26.28(C-12), 24.26(C-3), 24.21(C-6), 21.02(C-11), 17.67(C-13), 16.15(C-10).

Compuesto 4

Sólido blanco

$$[\alpha]_D^{20} = +98.2^0 \text{ (c 0.675, CHCl}_3\text{)}$$

P.Fusión: 89.7-90.9 °C

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3309, 2964, 2924, 2873, 1454, 1371, 1134, 1116, 1097, 908, 840.

RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz): δ 5.49(1H, dd, J₁=9, J₂=5.8 Hz, H-3), 2.48(1H, dd, J₁=13.6 Hz, J₂= 6 Hz), 1.98(1H, dd, J₁= 13.8 Hz, J₂= 9 Hz), 1.20(3H, s, H-14), 1.18(3H, s, H-12), 1.07(3H, s, H-13), 1.06(3H, s, H-15).

RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz): δ 154.28(C, C-4), 117.68(CH, C-3), 72.98(C, C-1), 41.63(CH₂), 39.99(CH₂), 39.81(CH₂), 39.40(CH₂), 37.95(CH₂), 36.79(C), 32.87(CH₃), 31.94(CH₃), 29.68(CH₂), 28.44(CH₃), 26.66(CH₃), 18.54(CH₂).

Se realizaron los espectros bidimensionales gCOSY, gHMBC y gHSQC.

2. Ensayos de actividad biológica

Microorganismo: El cultivo de *Botrytis cinerea* empleado en este trabajo, *B.cinerea* 2100, se obtuvo del Centro Español de Cultivos Tipos(CECT), Facultad de Biología, Universidad de Valencia, España, donde un cultivo de esta cepa se encuentra depositado.

Ensayos antifúngicos.

El efecto antifúngico de los extractos etanólicos y de acetona de las cuatro especies de plantas fue evaluado como porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* utilizando el método de envenenamiento del medio (Chattannavar, et al., 1985, Patil, et al., 1986).

Los ensayos se realizaron sobre placas petri de un diámetro de 90mm, conteniendo 20 ml de medio de cultivo agar-malta (pH 6.5-7.0) y sobre el cual se añadió 20 µl de las soluciones etanólicas que contenían los diferentes extractos a la concentración de 500mg.litro⁻¹. Simultáneamente se colocaron los testigos absolutos conteniendo solamente medio de cultivo y los testigos de referencia conteniendo idéntica concentración de etanol que los tratamientos. La inoculación se realizó abriendo un orificio circular de 6mm de diámetro en la parte central del medio de cultivo con un tubo de vidrio estéril y posteriormente el orificio se rellenó con un trozo igual de un precultivo del hongo obtenido previamente en placas de agar-malta que habían sido incubadas durante un tiempo de 24 horas. La inhibición del crecimiento radial del hongo fue medida durante 7 días, determinándose los porcentajes de inhibición del crecimiento por comparación con el control. Los ensayos se realizaron por triplicados.

Las fracciones F₁₋₁₁ fueron evaluadas de la manera anteriormente descrita en un rango de concentraciones de 50 a 500mg.litro⁻¹. La actividad fungicida del compuesto 4 fue evaluada siguiendo el procedimiento anterior a la concentración de 150mg.litro⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados del efecto antifúngico de los extractos etanólicos y de acetona de las cuatro especies de plantas se muestran en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos sobre *B. cinerea*

% DE INHIBICION (500ppm)						
t(h)	Petc	Getc	JFetc	JTetc	TFetc	TTetc
48	56.7	55.6	70.4	89.6	52.6	71.1
72	55.0	51.0	75.2	78.8	58.0	56.9
96	47.1	39.4	67.7	76.7	53.8	57.2
120	31.1	41.1	63.8	75.8	53.3	52.9
144	44.3	36.5	63.6	79.6	58.5	61.1
168	37.4	26.8	60.2	79.4	50.4	57.8
192	27.7	19.4	58.1	79.1	43.6	58.7

Tabla 3. Actividad antifúngica de los extractos de acetona sobre *B. cinerea*

% DE INHIBICION (500ppm)						
t(h)	Pac	Gac	JFac	JTac	TFac	TTac
24	29.3	22.2	63.4	83.6	55.5	62.9
48	34.3	11.1	59.7	77.0	55.6	56.4
72	35.1	3.35	57.2	78.8	57.1	57.1
96	35.9	5.45	60.6	81.5	60.1	60.9
120	33.4	4.5	60.0	83.7	60.8	62.1
144	31.2	7.7	61.0	85.5	62.9	64.4
168	26.8	1.9	59.9	85.3	62.3	63.0

Los resultados de actividad biológica de las **Tablas 2 y 3** muestran que los crudos obtenidos a partir de *Juniperus lucayana* fueron los más activos sobre *Botrytis cinerea* al alcanzarse los mayores porcentajes de inhibición de su crecimiento, destacándose los extractos obtenidos del tronco (JTetc y JTac). Teniendo en cuenta estos resultados, así como, la cromatografía de capa delgada realizada a los crudos y los rendimientos, los cuales fueron mucho mayores con el método de extracción continua en Soxhlet, se decidió comenzar a trabajar con el crudo de JTetc en el aislamiento de los metabolitos activos. Por otra parte, no se debe descartar los resultados alcanzados con la planta *Thuja orientalis* pues con los mismos se logró de un 50-70 % de inhibición del hongo.

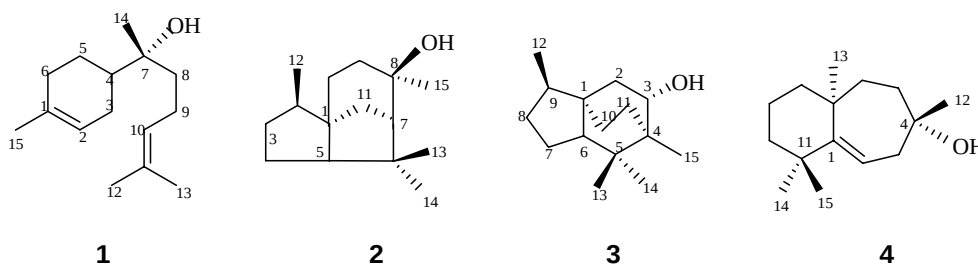
El fraccionamiento inicial del crudo de JTetc se realizó por cromatografía de columna sobre sílica gel obteniéndose 11 fracciones, las cuales fueron evaluadas sobre *B. cinerea*, los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

De las 11 fracciones evaluadas sobre *B. cinerea*, 6 de ellas redujeron el crecimiento del hongo en comparación con el control, las fracciones 5, 6 y 9 mostraron los más altos porcentajes de inhibición del crecimiento a partir de las 24 horas, mientras que la fracción 3 mostró una ligera actividad y las fracciones 2, 4, 10 y 11 no mostraron actividad. No obstante, las fracciones 2, 3 y 4 deberán probarse a concentraciones más altas, lo que no fue posible realizar en este experimento por las pequeñas cantidades obtenidas.

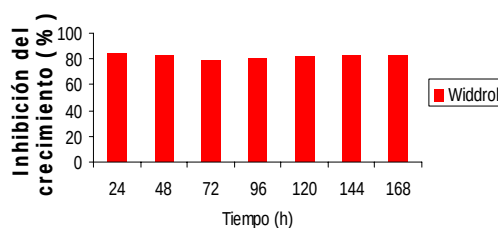
Tabla 4. Actividad antifúngica de las fracciones de la columna primaria sobre *B. cinerea*

% DE INHIB.											
t(h) (ppm)	F-1 (500)	F-2 (100)	F-3 (100)	F-4 (50)	F-5 (500)	F-6 (500)	F-7 (500)	F-8 (500)	F-9 (500)	F-10 (500)	F-11 (500)
24	89.5	20.9	45.7	19.4	100	100	100	98.1	100	37.2	57.9
48	64.7	15.4	37.6	10.7	99.1	100	87.6	83.4	92.6	24.5	30.2
72	62.6	21.9	37.9	2.7	95.0	94.5	80.2	80.2	90.1	23.6	23.0
96	64.6	26.5	40.5	9.4	90.0	92.0	79.7	80.0	90.0	26.7	21.4
120	66.9	30.8	44.9	19.5	88.6	91.3	78.6	78.9	88.8	27.8	20.2
144	71.0	37.9	47.2	34.0	87.3	91.3	80.8	80.5	88.9	36.2	33.9

Estos resultados junto a la cromatografía de capa delgada sirvieron de base para continuar el trabajo en la búsqueda de los principios activos presentes en el extracto, por lo que se comenzó el fraccionamiento de las fracciones 5 y 6. Las mismas fueron purificadas a través de la cromatografía de columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando siempre como solventes: AcOEt/n-hexano de variada polaridad y CH₂Cl₂/n-hexano(7:3). El fraccionamiento y purificación de las mismas arrojó cuatro compuestos, cuyas estructuras fueron elucidadas por métodos cromatográficos (RMN-¹H, RMN-¹³C y bidimensionales) y comparación con la literatura, resultando ser α-bisabolol (**1**), cedrol (**2**), allo-cedrol (**3**) y widdrol (**4**). Estos compuestos han sido aislados de algunas especies del género *Juniperus* (Tunalier, 2002 ; Uçar, 2002) pero se reportan por primera vez en esta planta.



Los resultados de la evaluación fungicida del compuesto **4** sobre *B. cinerea* se muestran en la **figura 1**. Como se observa el compuesto inhibe el crecimiento del hongo. También el cedrol ha sido evaluado sobre este hongo con resultados satisfactorios (Shidhar, 2003) por lo que al menos estos dos compuestos parecen ser responsables de la actividad que muestra la planta.

**Figura 1.** Actividad antifúngica del widdrol sobre *B. cinerea*

Hasta donde conocemos muy pocos estudios fitoquímicos han sido llevados cabo a partir de *Juniperus lucayana* B. Más aún, este trabajo es el primer reporte de la actividad fungicida de la planta sobre *Botrytis cinerea*, así como, de algunos de sus compuestos. Además pocos

estudios de actividad microbiana han sido encontrados en especies de este género (Diğrak, et al., 1999; Karaman, et al., 2003).

Este trabajo sugiere el aprovechamiento de esta planta en el campo de los fungicidas naturales como alternativa viable a la persistencia, multiresistencia y poco cuidado del ambiente que presentan los fungicidas de síntesis química en el mercado actual.

CONCLUSIONES.

1. Los extractos de *Juniperus lucayana* B. y *Thuja orientalis* L. resultaron los más efectivos sobre *B. cinerea*.
2. Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron con los crudos JTetc y JTac.
3. Las fracciones F-5, F-6 y F-9 obtenidas en el fraccionamiento del crudo JTetc fueron las más activas sobre *B. cinerea*.
4. Del fraccionamiento de F-5 se obtuvieron los compuestos: α -bisabolol, cedrol y allo-cedrol .
5. Del fraccionamiento de F-6 se obtuvo el widdrol
6. El compuesto widdrol mostró inhibición del crecimiento del hongo *B. cinerea*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Casatejada, J. A. (1996). "Inhibición de la biosíntesis de Botrydial. Un nuevo método de control de la podredumbre gris". Tesis doctoral
- Chattannavar, S.N.; Kulkarni, S. and Hedge, R.K. (1985) "Bioassay of non/systemic fungicides against the wheat pathogen *Drechslera sativus* (Pam, King and Bakke)". Pesticides, 33-34.
- Patil, I.S; Kulkarni, S. and Hedge, R.K. (1986) "Bioassay of fungicides against *Drechslera sorokiniana* (Sacc)". Pesticides, 30-31.
- Tunalier, Z.; Kirimer, N., Baser, K. H. C. (2002). "The composition of essential oils from various parts of *Juniperus foetidissima*". Chemistry of Natural Compounds, 38(1).
- Uçar, G.; Balaban, M. (2002). "The composition of volatile extractives from the wood of *Juniperus excelsa*, *Juniperus foetidissima* and *Juniperus oxycedrus*". Holz als Roh-und Werkstoff 60, 356-362.
- Diğrak, M.; İlçim, A. and Alma M.H. (1999). "Antimicrobial Activities of Several Parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*". Phytotherapy Research, 13, 584-587.
- Karaman, İ; Şahin, F.; Güllüce, M.; Öğütçü, H.; Şengül, M. and Adıgüzel, A. (2003) "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L." Journal of Ethnopharmacology, 85, 231-235.
- Shidhar, S.R.; Rajagopal, R.V.; Rajavel, R.; Masilami, S. and Narasimhan, S. (2003). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(26).