

AGROQUÍMICOS NATURALES A PARTIR DE PLANTAS CUBANAS

Yarelis Ortiz Núñez¹, Iraida Spengler Salabarría², Rubén Avilés Pacheco¹, Yamilet Rodríguez Díaz¹, María Elena Álvarez Váldez¹, Yannin Lorenzo Rodríguez¹, Daylín Gamiotea¹, Yolanda Martínez¹ y Yuliet Aguado Rodríguez¹.

¹ *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). c.e.: yareliso@inifat.co.cu*

² *Centro de Estudios de Productos Naturales. Facultad de Química. Universidad de La Habana. Cuba*

RESUMEN

Las plantas constituyen una alternativa natural para el control de las diferentes plagas que causan considerables daños a cultivos de gran importancia económica, ofreciendo seguridad para el medio ambiente. En este trabajo se evaluó la actividad insecticida y fungicida de extractos etanólicos de las plantas: *Pinus caribaea*; *Gliricidia sepium*; *Juniperus lucayana*; *Thuja orientalis* y *Melia azedarach* sobre *Mocis latipes*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, además, se realizó un fraccionamiento biodirigido a partir de *Juniperus lucayana*, utilizando la cromatografía de columna y la técnica de CLAE. Los extractos de las plantas *Melia azedarach* L. y *Juniperus lucayana* mostraron los mejores resultados de actividad insecticida y fungicida respectivamente. Del fraccionamiento del extracto etanólico de la madera de *Juniperus lucayana* se lograron aislar 12 compuestos: cedrol, allo-cedrol, α -bisabolol, widdrol, ácido β -chamigrenico, 10,11-dihidroxi- β -bisaboleno, naringenina, aromadendrina, 12-hidroxi- α -pseudowiddreno, 3-hidroxipseudowiddran-6(7)-en-4-ol, 15-hidroxi- α -cedrol y 12-hidroxiwiddrol, los cuatro últimos de estructuras novedosas. Por otra parte, se estudió el efecto de los compuestos aislados sobre el hongo *B. cinerea*.

Palabras claves: extractos de plantas, actividad biológica, estudio fitoquímico.

NATURAL AGROCHEMICALS FROM CUBAN PLANTS

ABSTRACT

Plants constitute a natural alternative for pest control that attacks economical important crops, decreasing environmental risk. In this paper, insecticidal and antifungal activity of ethanolic extracts of *Pinus caribaea*; *Gliricidia sepium*; *Juniperus lucayana*; *Thuja orientalis* and *Melia azedarach* were evaluated against *Mocis latipes*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*, besides, a bioassay-guided fractionation of *J. lucayana* by column chromatography and HPLC was **conducted**. The best results of insecticidal and antifungal activity were shown by *Melia azedarach* L. and *Juniperus lucayana* extracts, respectively. Fractionation of ethanolic extract from the wood of *Juniperus lucayana* afforded eight known compounds named: cedrol, allo-cedrol, α -bisabolol, widdrol, β -chamigrenic acid, 10,11-dihydroxy- β -bisabolene, naringenine, aromadendrine and four new compounds: 12-hydroxy- α -pseudowiddrene, 3-hydroxypseudowiddran-6(7)-en-4-ol, 15-hydroxyallo-cedrol and 12-hydroxywiddrol. The effect of isolated compounds on *B. cinerea* fungus was also studied.

Key words: plant extracts, biological activity, phytochemical study.

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra diferentes plagas, por tal motivo, el hombre ha desarrollado investigaciones en las mismas para la obtención de plaguicidas naturales^{1,2}. El empleo de estos plaguicidas botánicos dentro de los Programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) ha permitido mostrarlos como una alternativa de control eficaz, económica, y sana para el medio ambiente³. En este sentido, algunas especies de la flora cubana han sido utilizadas para la elaboración de diferentes bioplaguicidas. Tales son los casos del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), Paraíso (*Melia azedarach* L.), Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), Crisantemo (*Chrysanthemum cinense* Sabine), Flor de muerto (*Tagetes erecta* L.), Guirito espinoso (*Solanum globiferum* L.), Añil cimarrón (*Indigofera suffruticosa* Mill), entre otras⁴, algunas de reconocimiento internacional como son el Nim y el paraíso^{5,6}. Por otra parte, los plaguicidas naturales obtenidos de plantas, más conocidos y utilizados a nivel mundial, son aquellos para el control de insectos. En cambio la información referente a extractos vegetales para el control de las enfermedades fúngicas y bacterianas es mucho más escasa, debido principalmente a que los cambios son menos perceptibles y por lo tanto más difíciles de estudiar. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y que a pesar de las investigaciones realizadas, se han estudiado muy pocas plantas en relación a la diversidad natural que ofrece el planeta, nos propusimos en este trabajo evaluar la actividad insecticida y fungicida de extractos de especies de plantas cubanas sobre *Mocis latipes*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, así como realizar estudios biodirigidos a partir de una de las plantas más activas.

MATERIALES Y METODOS

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

Las plantas estudiadas (**Tabla 1**) fueron recolectadas en Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT, Cuba) entre los meses de Noviembre/03 y Agosto/04 e identificadas por el botánico Pedro Sánchez. Los diferentes órganos fueron secados en estufa a 40°C y molidos hasta polvo fino.

2. Obtención y fraccionamiento de los extractos

Para la obtención de los extractos se partió de 50 g del material vegetal seco y molido. El mismo fue extraído con etanol, utilizando el método de extracción continua en Soxhlet, durante 6 horas. Posteriormente, los extractos alcohólicos obtenidos se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador, resultando los crudos **Petc**, **Getc**, **JFetc**, **JTetc**, **TFetc**, **TTetc** y **Metc**, según se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Plantas y extractos estudiados

NOMBRE CIENTÍFICO	MES DE RECOLECCIÓN	ÓRGANO DE LA PLANTA	CLAVE DE LOS EXTRACTOS	PESO DE LOS CRUDOS (G)
<i>Pinus caribaea</i> M.	Febrero/04	Follaje	Petc	10.4
<i>Gliricidia sepium</i> J.S.	Noviembre/03	Hojas	Getc	13.4
<i>Juniperus lucayana</i> B.	Marzo/04	Follaje	JFetc	15.1
		Madera	JTetc	2.11
<i>Thuja orientalis</i> L.	Febrero/04	Follaje	TFetc	21.7
		Madera	TTetc	4.0
<i>Melia azedarach</i> L.	Agosto/04	Frutos	Metc	7.7

Según los resultados de actividad biológica y la Cromatografía en Capa Fina (CCD) realizada a los diferentes extractos, se decidió comenzar a trabajar con el crudo etanólico de la madera de *Juniperus lucayana* (JTetc) en cuanto al aislamiento y purificación de los diferentes metabolitos activos.

Fraccionamiento del extracto etanólico de *J. lucayana*

El crudo etanólico fue fraccionado en una columna primaria sobre gel de sílice 60 utilizando los sistemas de disolventes AcOEt/n-hexano y CHCl₃/MeOH de polaridad creciente, obteniéndose finalmente 11 fracciones (**F1-11**). Las nuevas fracciones obtenidas tras cromatografiada en columna las fracciones F-5, F-6, F-8 y F-9 fueron cromatografiadas sucesivamente en HPLC con AcOEt/n-hexano, CH₂Cl₂/n-hexano y Acetona/n-hexano de variada polaridad, resultando los compuestos 1 (863.7 mg), 2 (4.3 mg), 3 (66.1 mg), 4 (654.1 mg), 5 (14.9 mg), 6 (42.9 mg), 7 (5.6 mg), 8 (9.4 mg), 9 (2.7 mg), 10 (39.7 mg), 11 (520.5 mg) y 12 (29.3 mg).

3. Ensayos de actividad biológica

3.1. Ensayos de actividad insecticida

3.1.1. Bioensayos por contacto.

Los crudos etanólicos **Petc**, **Getc**, **JFetc**, **JTetc**, **TFetc**, **TTetc**, **Metc** fueron probados al 25 % en larvas de *Mocis latipes* del tercer estadio de desarrollo utilizando el método de aplicación por aspersión. Las evaluaciones se hicieron por conteos de los insectos vivos y muertos después de 24, 48 y 72 horas y posteriormente se calcularon los porcentajes de mortalidad.

3.2. Ensayos de actividad fungicida

3.2.1. Ensayos antifúngicos “*in vitro*” sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*

Los crudos etanólicos **Petc**, **Getc**, **JFetc**, **JTetc**, **TFetc**, **TTetc** y **Metc** se evaluaron a una concentración de 500 ppm sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* utilizando el método de envenenamiento del medio⁷. Las placas Petri se incubaron a 25 °C durante 6-7 días, anotando el diámetro de la colonia cada 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicados y se

determinaron los porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos por comparación con el control. Así mismo fueron evaluadas las fracciones **F1-11** y los compuestos **1, 3, 4, 5 y 11** sobre *B. cinerea* a diferentes concentraciones.

Los compuestos **1, 4, 6, 7, 10, 11, 12** fueron evaluados sobre *B. cinerea* en la empresa NBT (Newbiotechnic), para determinar su efecto de inhibición de la germinación de las esporas mediante una técnica estandarizada en este propio laboratorio. Los resultados se promediaron y se expresaron como porcentajes de germinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que solamente el extracto de *Melia azedarach* L. (**Metc**) mostró una actividad significativa sobre las larvas *M. latipes*, alcanzándose hasta un 100 % de mortalidad a las 72 horas del ensayo (**Figura 1**). El extracto **TTetc** obtenido de *Thuja orientalis* también sobrepasó el 50 % de mortalidad, no siendo así, para el resto de los extractos probados.

Los resultados de la **Figura 2** muestran que los extractos **JFetc** y **JTetc** obtenidos del follaje y la madera de la planta *Juniperus lucayana* respectivamente, fueron los más activos sobre *B. cinerea* inhibiendo el crecimiento micelial del hongo entre un 60-90 % durante los 6 primeros días de duración del ensayo, disminuyendo ligeramente el último día para el extracto **JFetc**. Por otra parte, no se deben descartar los resultados alcanzados con los extractos de la planta *Thuja orientalis* L. pues se logró hasta un 71.1 % de inhibición del hongo con el extracto **TTetc** en las primeras 24 horas del ensayo.

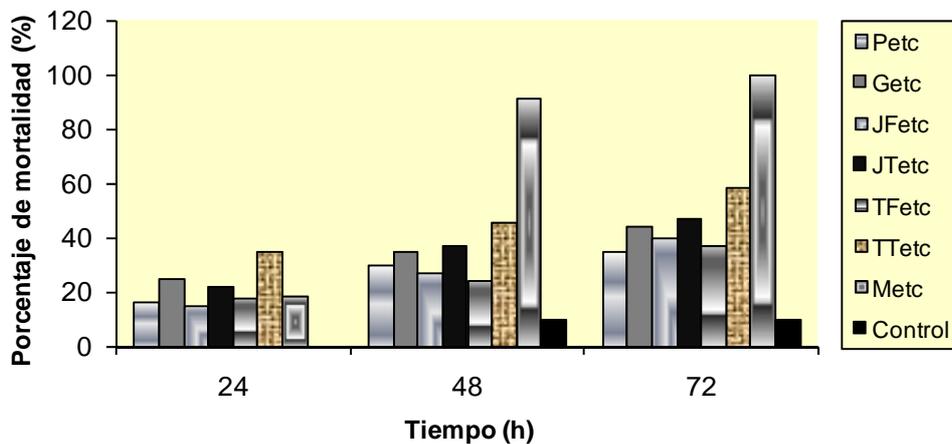


Figura 1. Actividad insecticida de los extractos etanólicos

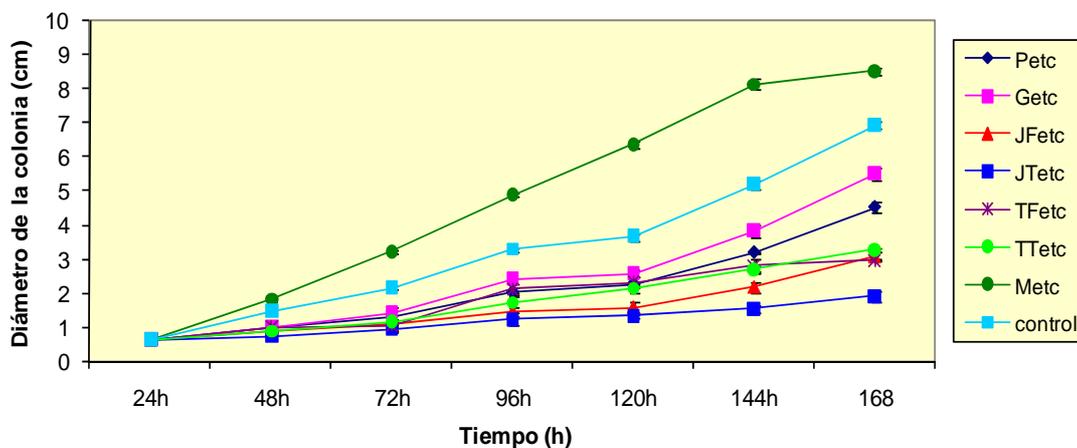


Figura 2. Ensayo de inhibición de los extractos etanólicos sobre *B. cinerea*

De los resultados anteriores y teniendo en cuenta los estudios fitoquímicos realizados y publicados sobre las plantas más activas se decidió comenzar el estudio biodirigido de actividad fungicida de la madera de *J. lucayana*.

El estudio de la actividad fungicida de las 11 fracciones (**F1-11**), obtenidas a partir del extracto etanólico, mostró resultados muy positivos, donde 6 de las fracciones: F-1, F-5, F-6, F-7, F-8 y F-9 redujeron significativamente el crecimiento del micelio durante los 6 días del ensayo en comparación con el control. La fracción F-3 mostró una moderada actividad y las fracciones F-2, 4, 10 y 11 no mostraron actividad.

El análisis espectroscópico de los compuestos obtenidos del fraccionamiento de F-5, F-6, F-8 y F-9 permitió determinar sus estructuras, correspondiendo a: cedrol(**1**), allo-cedrol(**2**), α -bisabolol(**3**), widdrol(**4**), ácido β -chamigrenico(**6**), 10,11-dihidroxi- β -bisabolenol(**8**), naringenina(**10**) y aromadendrina(**12**). Estos compuestos han sido aislados de varias especies del género *Juniperus*^{8,9} aunque solamente el cedrol (**1**) había sido encontrado previamente en *Juniperus lucayana*. Sin embargo, los compuestos 12-hidroxi- α -pseudowiddreno(**5**), 3-hidroxipseudowiddran-6(**7**)-en-4-ol(**7**), 15-hidroxi- α -cedrol(**9**) y 12-hidroxiwiddrol(**11**) resultaron ser estructuras novedosas¹⁰.

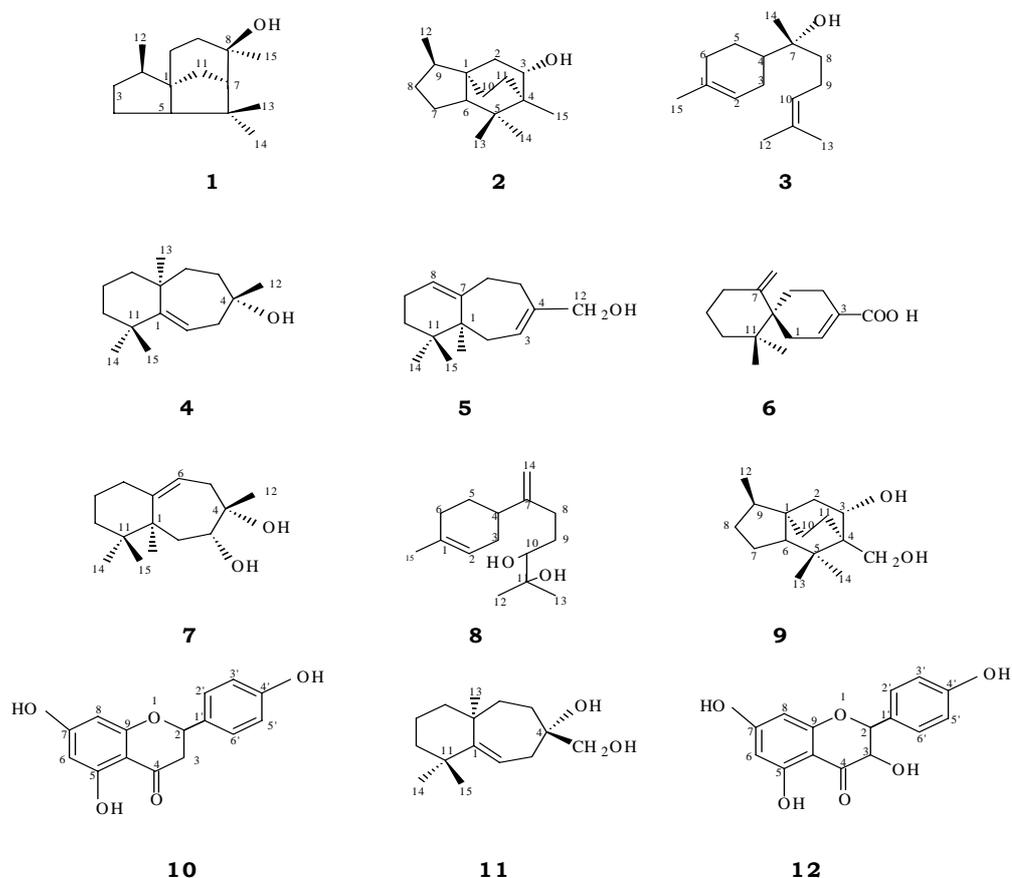


Figura 3. Compuestos aislados del extracto etanólico de la madera de *J. lucayana*

Los compuestos evaluados mostraron inhibición del crecimiento del hongo alrededor de los 200 ppm, destacándose los compuestos cedrol (**1**), widdrol (**4**) y 12-hidroxi- α -pseudowiddreno (**5**). Sin embargo, por debajo de los 50 ppm esta actividad disminuye llegando a ser inactivos a los 25 ppm. El compuesto 12-hidroxiwiddrol (**11**) mantiene una actividad moderada a la concentración más alta probada (**Figura 4**). Estos resultados demuestran que estos compuestos influyen en la actividad que muestra el extracto etanólico del tronco (**JTetc**) y que un futuro estudio de transformaciones químicas de sus estructuras pudiese mejorar su actividad. En el caso del 12-hidroxi- α -pseudowiddreno (**5**) se hace necesario estudiar su actividad a menores concentraciones, lo cual no fue posible en este trabajo debido a las pequeñas cantidades obtenidas del compuesto.

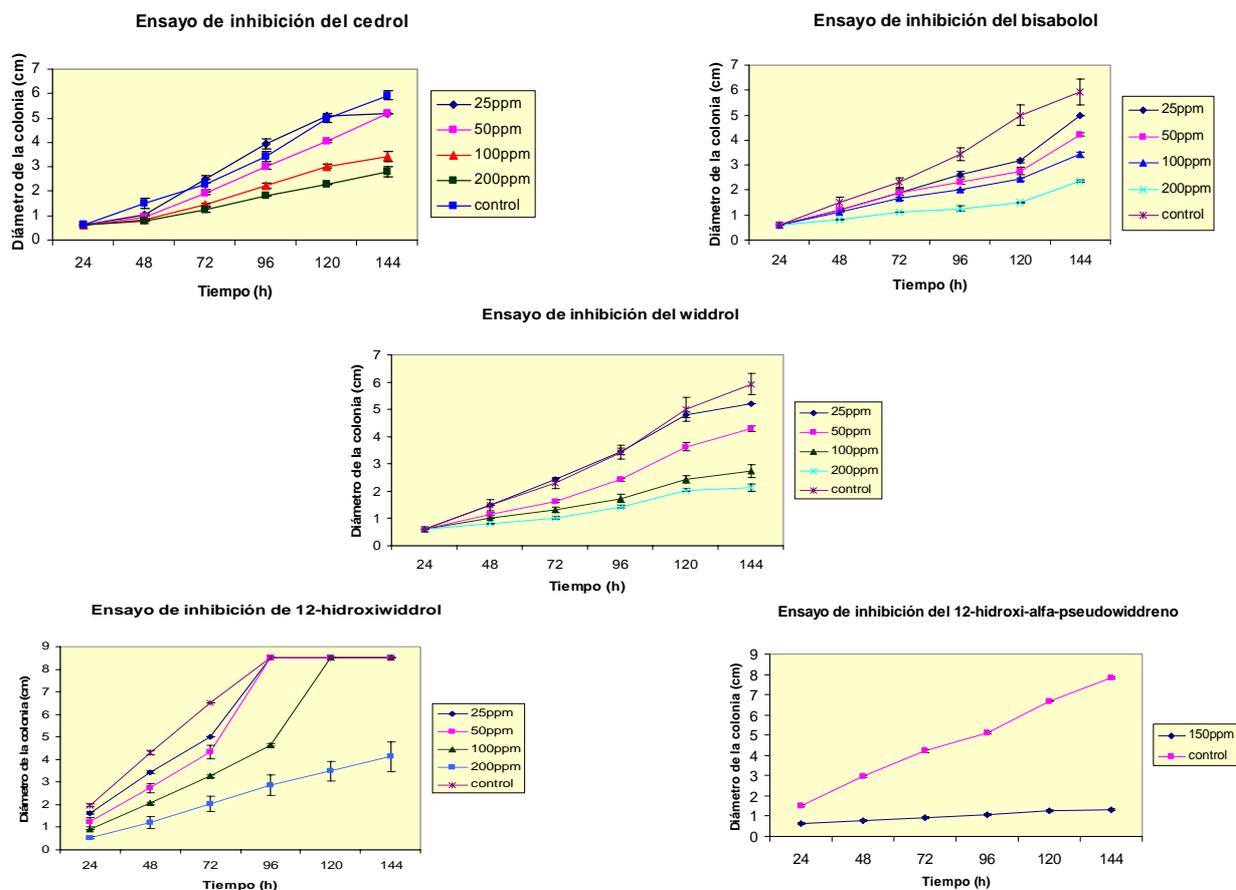


Figura 4. Actividad fungicida de los compuestos 1, 3, 4, 5 y 11 obtenidos de la madera de *J. lucayana*

De los resultados mostrados en la **Tabla 2**, se infiere que solamente los compuestos **7** y **11** presentaron un efecto inhibitorio de la germinación de las esporas del hongo *B. cinerea*. El compuesto **11** presentó los mejores resultados a diferencia del ensayo anterior (inhibición del crecimiento micelial), lográndose un 0 % de germinación para ambas concentraciones. El compuesto **7** fue más activo a 200 ppm con tan solo un 32.0 % de germinación pero además, se observó una disminución del tamaño de los tubos germinales. Sin embargo, el resto de los compuestos no mostraron ningún efecto, existiendo un sobrecrecimiento para los compuestos **10** y **12** a la concentración de 100 ppm.

Tabla 2. Porcentajes de germinación de los compuestos evaluados (%).

Tratamiento	100 ppm	200 ppm	Observaciones
Control agua	98.5	98.5	-
Control agua-etanol	96.5	96.5	-
1	96.5	93.0	Ningún efecto
4	91.1	90.9	Ningún efecto
6	96.0	-	A 200 ppm presenta cristales
7	70.9	32.0	Los tubos germinales son muy cortos
10	100	100	Sobrecrecimiento a 100 ppm
11	0	0	No existe germinación
12	100	90.9	Sobrecrecimiento a 100 ppm

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Céspedes, C. L.; Calderón, J. S.; Lina, L. and Aranda, E., **2001**. Growth effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela spp.* (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1903-1908.
- Marongiu, B.; S. Porcedda; A. Caredda and A. Piras., **2004**. Isolation of *Juniperus phoenicea* volatiles by supercritical carbon dioxide extraction and bioactivity assays, *J. Essent. Oil Res.*, 16, 256-261.
- Vázquez, L. L. La lucha contra las plagas agrícolas en Cuba, **2006**. De las aplicaciones de plaguicidas químicos por calendario al Manejo Agroecológico de Plagas. *Fitosanidad* 10(3), 221-242.
- Hernández, M.; Fuentes, F. V.; Alfonso, M. M.; Avilés, P.R y Perera, A. E., 2004. Plaguicidas naturales de origen botánico. Editorial Pueblo y Educación, 105 pp.
- Morgan, E. David, **2004**. The place of neem among modern natural pesticides. *Neem: Today and in the New Millennium*, 21-32.
- Nathan, S.S., **2006**. Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaf folder *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84, 98-108
- Soundharrajan, R.S., Velusamy, R.R., Ramasamy, R., Selladurai, M., Srinivasan, N., **2003**. Antifungal activity of some essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7596–7599.
- Uçar, G. and 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.
- Jong Pil; Song, Y. Ch.; Kim, J. W.; Ku, Ch. H.; Eun, J. S.; Leem, K. H. and Kim, Dae K., **2002**. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 25 (4), 449-452.
- Ortiz, Y.; Hernández-Galán, R.; Spengler, I.; Rodríguez, Y.; Collado, I.G., **2007**. Sesquiterpenes from the wood of *Juniperus lucayana*. *Phytochemistry* 68, 2409–2414.