

Estudio fitoquímico y de actividad biológica de los extractos de las plantas *Melia azedarach* L. y *Juniperus lucayana* B.

YARELIS ORTIZ*, I. SPENGLER, R. AVILÉS, Y. RODRÍGUEZ, P. SÁNCHEZ y Y. LORENZO.

****Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt"(INIFAT). Calle: 2, Esq.1, Stgo. de Las Vegas. Boyeros. Cuba
e-mail: fmc Janet@inifat.esihabana.cu***

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo ha sido una práctica eficiente del campesinado cubano el uso de los extractos y polvos vegetales elaborados a partir de diferentes partes de las plantas como plaguicidas botánicos en el control de plagas y enfermedades. Como parte de esa tradición en Cuba y teniendo en cuenta el nivel de desarrollo alcanzado a escala mundial durante los últimos 30 años en la producción y uso de estos productos, se intensifica en nuestro país los estudios para la obtención, validación y aplicación de este nuevo tipo de plaguicida. Con este fin, se hace necesario conocer los principios activos presentes en estos extractos que motivan a tal efecto biológico y de esta manera poder enriquecer los diferentes formulados que se preparan a partir de las plantas, brindando esto también la posibilidad de sintetizar análogos de estos compuestos. Teniendo en cuenta que las plantas *Melia azedarach* L.(paraíso) y *Juniperus lucayana* B. (sabina) resultan de un considerable interés por la variedad de estructuras que presentan y por sus propiedades como plaguicidas en la Agricultura, nos propusimos en este trabajo el aislamiento y caracterización de los metabolitos responsables de la actividad insecticida del paraíso y fungicida de la sabina, a través del uso de la Cromatografía de Columna, la Cromatografía de Capa Delgada, la Cromatografía de Placa Preparativa y la técnica HPLC, así como, a partir del estudio de actividad biológica de los diferentes extractos y fracciones obtenidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Las plantas *Melia azedarach* L.(paraíso) y *Juniperus lucayana* B. (sabina) fueron recolectadas en el INIFAT en los años 2000 y 2003 respectivamente e identificadas por el botánico Pedro Sánchez. Los frutos de paraíso y el follaje y tronco de la sabina fueron secados en estufa a 60 °C y molidos hasta polvo fino.

Extracción y Aislamiento

***Melia azedarach* L.(paraíso):** Los frutos secos y molidos fueron extraídos utilizando el método de Schröder (**Figura 1**). El crudo de AcOEt obtenido fue sometido a un fraccionamiento previo con benceno tibio, el extracto bencénico resultante fue posteriormente concentrado. El crudo bencénico fue fraccionado mediante cromatografía de sílica gel empleando como eluyente la mezcla de solventes CHCl₃/AcOEt(4:1), obteniéndose los compuestos **T-1** y **T-2**.

Al resto de los compuestos no solubles en benceno se les nombró crudo no bencénico.

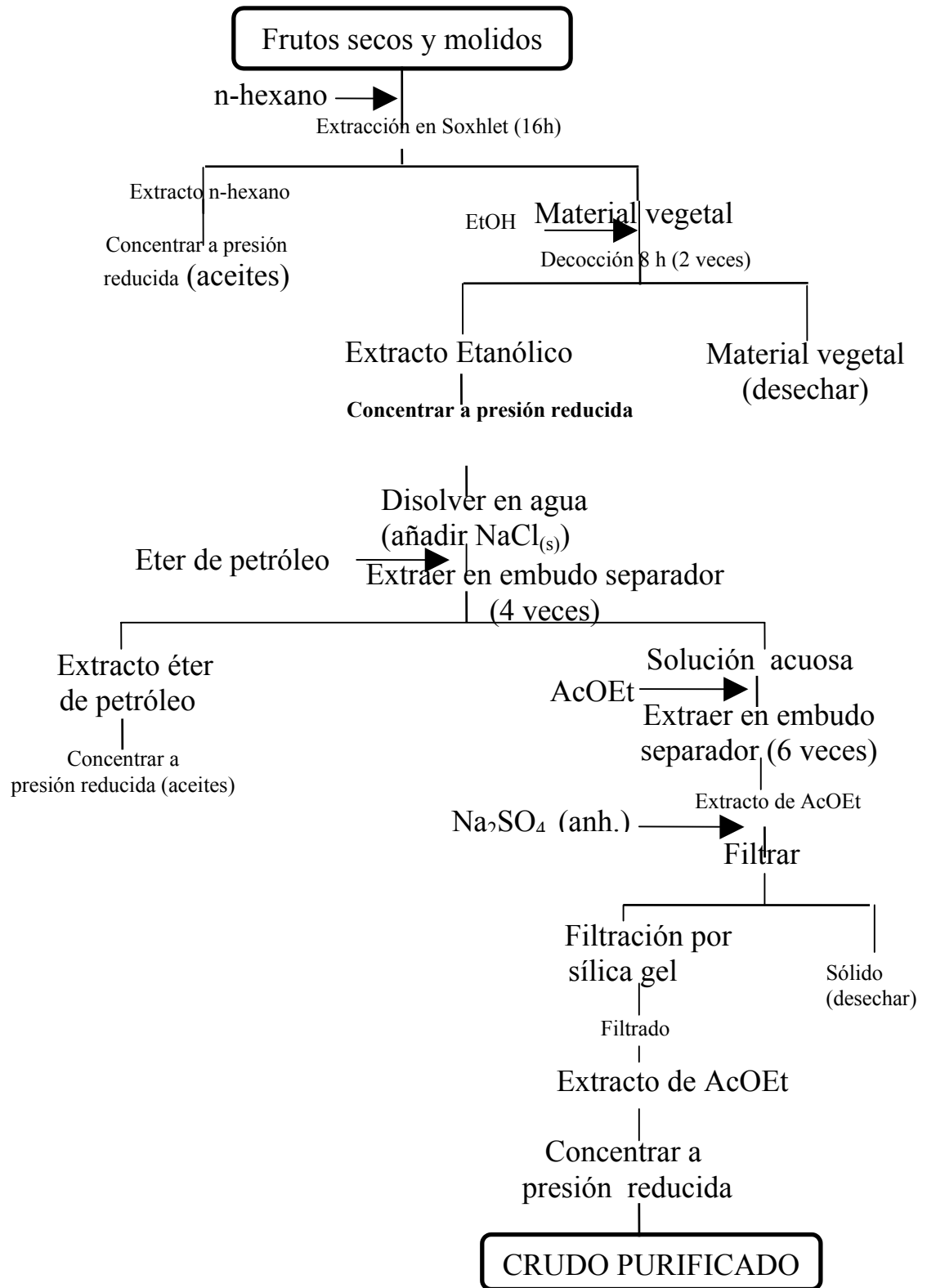


Figura 1. Diagrama de flujo seguido para la obtención del crudo de metabolitos .

Compuesto T-1:

El compuesto T-1 se obtuvo de las últimas fracciones eluidas con $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (4:1) a partir de la columna utilizada para el fraccionamiento del sólido I aislado de la columna primaria.

Este compuesto se recristalizó en AcOEt, presentó una temperatura de fusión de $196.8\text{-}197.5\text{ }^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = -62^\circ$ [CHCl_3 , $c=2.1$] y R_f 0.59 en el sistema de solvente $\text{CHCl}_3 / \text{AcOEt}$ (3:2).

El espectro IR en pastilla de KBr presentó las siguientes bandas en cm^{-1} : 3471.2, 2972.6, 2961.1, 2881.8, 1696.4, 1647.5, 1456.5, 1379.3, 1236.7, 1105.9, 1059.8, 973.1.

El espectro de RMN- ^1H en CDCl_3 mostró las siguientes señales (δ , ppm): 0.84, 0.99, 1.02, 1.09, 1.17, 1.24, 1.26, 1.43, 1.45, 1.50, 1.55, 1.70, 1.73, 1.74, 1.92, 1.97, 2.10, 2.17, 2.23, 2.33, 2.56, 2.73, 2.85, 3.22, 3.41, 3.68, 4.22, 4.86, 5.29.

El espectro de RMN- ^{13}C mostró las señales que a continuación se presentan (δ , ppm): 216.7, 145.5, 118.1, 107.7, 76.5, 75.4, 73.0, 63.9, 52.4, 51.0, 50.4, 48.3, 47.8, 43.7, 38.5, 35.1, 34.9, 34.4, 33.8, 31.6, 27.5, 27.3, 26.4, 24.5, 24.4, 22.7, 21.5, 17.8, 15.4, 12.7.

El espectro de masas mostró los siguientes picos (m/e): M^+ 516, 470, 455, 442, 440, 427 que corresponde al pico base, 397, 313, 271, 245.

Se realizaron los espectros bidimensionales ^1H - ^1H COSY, HETCOR y HETCOR-LR.

Compuesto T-2:

El compuesto T-2 se obtuvo de las fracciones 8-11 con el sistema de solventes $\text{CHCl}_3/ \text{AcOEt}$ (3:2) en el fraccionamiento del sólido III aislado de la columna primaria y a partir del sólido II mediante repetidas cromatografías de columna.

Este compuesto se recristalizó en acetona, presentó una temperatura de fusión de $206.8\text{-}207.1\text{ }^\circ\text{C}$ y R_f 0.44 en el sistema de solventes $\text{CHCl}_3/ \text{AcOEt}$ (3:2).

El espectro RMN- ^1H en CDCl_3 mostró cuatro señales (δ , ppm): 3.86, 6.81 y 7.57.

El espectro RMN-¹³C mostró las señales siguientes (δ , ppm): 54.9, 112.4, 114.3, 121.7, 123.8, 147.2, 151.1 y 168.6.

Se realizaron las técnicas DEPT-135⁰ y 90⁰, así como, la técnica bidimensional HMBC.

El espectro de masas mostró como picos más intensos (m/e): M⁺ 169 que también se corresponde con el pico base, es de aclarar que la muestra del compuesto T-2 que se utilizó para realizar el espectro de masas había sido anteriormente utilizada para realizar los espectros de RMN-¹H y ¹³C disolviendo la misma en MeOH deuterado, por este motivo, este pico aparece con una unidad de masa más, los otros picos son: 154, 126, 98, 69 y 51.

***Juniperus lucayana* B(sabina):** El follaje y tronco de la sabina fueron extraídos con acetona por maceración durante 24 h y con etanol por extracción continua(Soxhlet). Los extractos fueron concentrados a sequedad. El crudo etanólico del tronco fue sometido a repetidas cromatografías de columnas, utilizando los sistemas de solventes: AcOEt/n-hexano y CHCl₃/MeOH de variada polaridad. Las fracciones más puras fueron recromatografiadas utilizando la técnica de HPLC, así como, la Cromatografía de Capa Preparativa, obteniéndose finalmente 5 compuestos: Y-1, Y-2, Y-3, Y-4 y Y-5.

Ensayos de actividad biológica:

***Melia azedarach* L.(paraíso)**

Bioensayos antiapetitivos:

Los crudos de acetato de etilo, bencénico y no bencénico fueron estudiados para conocer su posible acción fagodepresiva en larvas de dos especies de lepidópteros fitófagos: *Mocis latipes* Guerin y *Spodoptera frugiperda* A.S, se montaron dos ensayos para cada especie utilizando el método de disco de hoja. Los crudos fueron evaluados a la concentración de 12%v/v. Transcurridas 24 h se evaluó visualmente el porcentaje de área foliar consumida y se calculó el % de fagodepresión utilizando la fórmula:

$$\text{InF} = \frac{\% \text{CC} - \% \text{CT}}{\% \text{CC}}$$

CC: consumo de alimento en el control.

CT: consumo de alimento en el tratamiento.

El efecto antiapetitivo de los compuestos **T-1** y **T-2** en larvas de *Mocis latipes* se evaluó siguiendo el método anterior, a la concentración de 2%v/v.

***Juniperus lucayana* B.(sabina)**

Bioensayos antifúngicos:

Los crudos obtenidos con acetona y etanol fueron evaluados a la concentración de 500ppm sobre el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers.(cepa 2100), utilizando el método de envenenamiento del medio y tres réplicas por cada tratamiento. Se evaluó el crecimiento micelial radial a partir de las 24 h, expresando los resultados en % de inhibición del crecimiento micelial radial con respecto al testigo.

Los compuestos **Y-1** y **Y-2** fueron evaluados de la misma manera pero a la concentración de 150ppm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

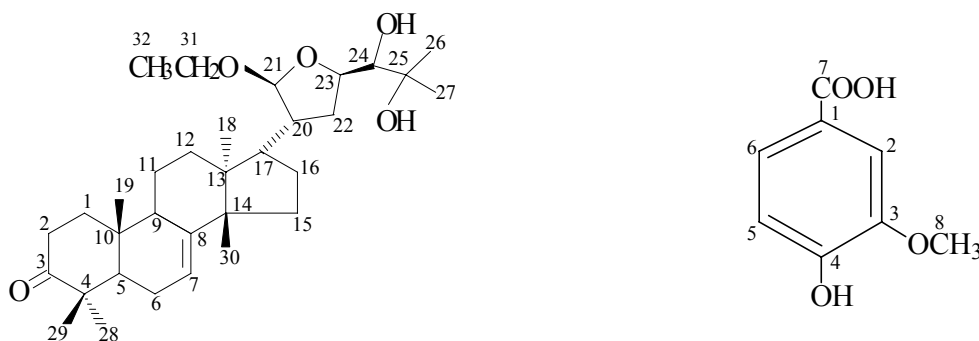
***Melia azedarach* L (paraíso)**

Como se muestra en la **Tabla 1** los tres crudos mostraron muy buen efecto antiapetitivo sobre las dos especies de lepidópteros, destacándose el crudo bencénico al alcanzarse hasta un 97.2% de antiapetitividad, por otra parte, esta disminución de la tendencia a consumir el alimento tratado se produjo con mayor intensidad en las larvas de *Spodoptera frugiperda*, resultando más sensibles a los extractos. Debido a estos resultados junto a los de la Cromatografía de Capa Delgada se decidió el fraccionamiento del crudo bencénico obteniéndose los compuestos **T-1** y **T-2**.

Tabla 1. Resultados de actividad biológica para los crudos de paraíso.

Indicadores biológicos	% DE FAGO DEPRESION					
	Crudo AcOEt		Crudo bencénico		Crudo no bencénico	
	Exp. 1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
<i>Mocis latipes</i>	77.6	64.6	89.3*	71.8	50.9	66.0
<i>Spodoptera frugiperda</i>	91.9*	80.3	88.2	97.2*	89.1	88.1

La interpretación de los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, EM y bidimensionales, así como, su comparación con la literatura permitió inferir las siguientes estructuras para los compuestos **T-1** y **T-2** :



Comp. **T-1**: 21β-etoximelianodiol Comp. **T-2**: ácido 3-metoxi, 4-hidroxibenzoico

➤ El compuesto **T-1** se aisló por primera vez de esta planta.

En la **Tabla 2** se reporta la actividad antiapetitiva de los compuestos aislados T-1 y T-2 en larvas de *Mocis latipes*, donde se observa que el compuesto T-1 no presentó actividad significativa, es de destacar este comportamiento pues la literatura reporta el efecto antiapetitivo de los compuestos aislados con este tipo de esqueleto pero con un grupo hidroxilo en el C-21 por lo que al parecer la presencia del grupo etoxilo en esta posición disminuye considerablemente la actividad antiapetitiva del mismo. El compuesto T-2, sin embargo, mostró muy buena actividad, reportándose por primera vez, su actividad antiapetitiva en la planta.

Tabla 2. Actividad antiapetitiva de los compuestos aislados en *Mocis latipes*.

% de fagodepresión						
Tratamientos/réplicas	1	2	3	4	5	Media
Testigo(agua)	9	6.7	1.6	16.4	17.3	10.2
T-1	1.6	13	10.2	5.3	4.5	6.9
T-2	47.4	80.3	50.1	64.3	57	59.8*

Juniperus lucayana B.(sabina)

Los resultados de actividad antifúngica de la **Tabla 3** muestran que los crudos obtenidos a partir de la sabina fueron activos sobre el hongo *Botrytis cinerea* al alcanzarse más del 50% de inhibición de su crecimiento en todos los casos, destacándose los extractos obtenidos del tronco de la planta para ambos solventes.

Tabla 3. Resultados de actividad biológica para los crudos de sabina.

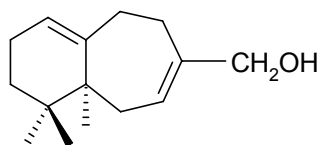
t(h)	% DE INHIBICIÓN (500ppm)			
	Extracto acetona		Extracto etanólico	
	Follaje	Tronco	Follaje	Tronco
24	63.4	83.6*	70.4	89.6*
48	59.7	77.0	75.2	78.8
72	57.2	78.8	67.7	76.7
96	60.6	81.5	63.8	75.8
120	60.0	83.7	63.6	79.6
144	61.0	85.5	60.2	79.4
168	59.9	85.3	58.1	79.1

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, así como la Cromatografía de Capa Delgada y los rendimientos, se fraccionó el crudo etanólico obtenido del tronco.

El análisis espectroscópico de los compuestos Y-1 al Y-5 permitieron inferir las siguientes estructuras:

Compuesto Y-1:

El compuesto Y-1 se obtuvo de las fracciones 20-24 con el sistema de solventes CH_2Cl_2 /n-hexano(7.3) (Columna VI) en el fraccionamiento del 3er pico obtenido de la Columna IV. Al mismo se le realizó el espectro de RMN^{-1}H coincidiendo con la estructura del 15-hidroxi- α -pseudowidreno:

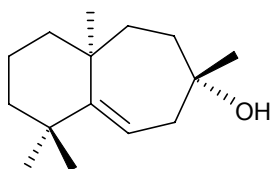


Para corroborar la estructura propuesta, se acetiló el mismo, realizando los correspondientes espectros de RMN^{-1}H y ^{13}C , los cuales coincidieron con los reportados por la literatura para el 15-acetoxi- α -pseudowidreno.

Compuesto Y-2:

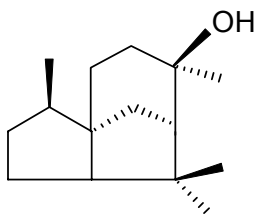
El compuesto Y-2 se obtuvo de las fracciones 42-58 con el sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexano}(7.3)$ (Columna VI) en el fraccionamiento del 3er pico obtenido de la Columna IV. También se obtuvo a partir de las fracciones 30-44 con este mismo sistema de solventes, en el fraccionamiento de las F 26-41 obtenidas de la columna VI y por CCP con CHCl_2 . El espectro RMN- ^1H de la fracción 14-15 de la columna IV también coincidió con este compuesto.

Al mismo se le realizaron los espectros de RMN- ^1H , ^{13}C y bidimensionales coincidiendo los mismos con el Widdrol:



Compuesto Y-3

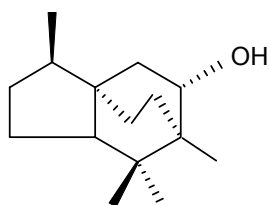
El compuesto Y-3 se obtuvo a partir de la fracción 58-81 después de purificar la misma por HPLC con el sistema de solventes $\text{AcOEt}/\text{n-hexano}(7\%)$. Se realizaron los espectros de RMN- ^1H , ^{13}C y bidimensionales, coincidiendo los mismos con la estructura del Cedrol, aislado de varias especies del género *Juniperus*.



Cedrol

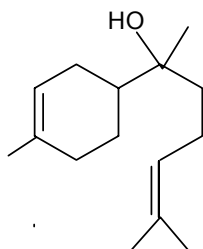
Compuesto Y-4.

El compuesto Y-4 se obtuvo a partir de la fracción 58-81 después de purificar la misma por HPLC con el sistema de solventes AcOEt/n-hexano(7%). Se le realizaron los espectros de RMN-¹H y ¹³C, correspondiendo los mismos con la estructura del alcohol tricíclico llamado **allo-cedrol**:



Compuesto Y-5.

Este compuesto se obtuvo de la F40-44 después de purificar la misma por HPLC con el sistema de solventes AcOEt/ n-hexano(5%), al mismo se le realizó los espectros de RMN-¹H y ¹³C y bidimensionales, los cuales mostraron un compuesto con esqueleto de bisabolano, resultando ser el **bisabolol**:



En las **Tabla 4** se muestran los resultados de actividad antifúngica de los **compuestos Y-1 y Y-2**, sobre *B. cinerea.*, como se observa, ambos compuestos mostraron un alta inhibición sobre el crecimiento micelial del hongo al alcanzarse más de un 80 % de inhibición a partir de las 24 horas, por lo que ambos compuestos influyen en la actividad fungicida que presenta dicha planta. Del resto de los compuestos se conoce que también presentan este tipo de actividad por lo que todos resultan de un considerable interés en posteriores estudios de sus estructuras químicas para el diseño de análogos más activos.

Tabla 4. Actividad antifúngica de los compuestos Y-1 y Y-2 sobre *B. cinerea*.

t(h)	% de inhibición (150ppm)	
	Y-1	Y-2
24	96.2	83.8
48	91.4	82.3
72	90.5	79.2
96	89.6	80.5
120	89.2	81.5
144	89.7	83.4
168	88.5	83.0

CONCLUSIONES

- Los crudos de AcOEt, bencénico y no bencénico mostraron muy buen efecto antiapetitivo sobre larvas de *Mocis latipes* y *Spodoptera frugiperda*, alcanzándose en esta última los mejores resultados.
- Se aislaron e identificaron los compuestos: 21 β -etoximelianodiol y el ácido 3-metoxi,4-hidroxibenzoico, el primero se aísla por primera vez en la planta *Melia azedarach* L.
- El ácido 3-metoxi,4-hidroxibenzoico presentó muy buena actividad sobre *Mocis latipes* mientras que el 21 β -etoximelianodiol no presentó actividad.
- Los mayores porcentos de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* se obtuvieron con los crudos etanólico y de acetona del tronco de *Juniperus lucayana* B.
- Del fraccionamiento del crudo etanólico del tronco de la sabina se obtuvieron 5 compuestos activos: widdrol, 15-hidroxi- α -pseudowidreno, cedrol, allo-cedrol y el bisabolol
- El widdrol y el 15-hidroxi- α -pseudowidreno inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* en más de un 80%.