

## ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD FUNGICIDA DE CORTEZA DE *MAYTENUS URQUIOLAE* MORY (*CELASTRACEAE*)

Alexander Fernández de la Torre,<sup>1</sup> Clara Nogueiras Lima,<sup>2</sup> Carlos Romeu Carballo,<sup>3</sup> Jorge Roberto Palacios<sup>3</sup> Enoc Naranjo Chamizo,<sup>4</sup> Rolando Marbot Ramada<sup>3</sup> y Armando Urquiola Cruz<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Empresa Comercializadora de Pinar del Río. Carretera al central José Martí Km 1, San Cristóbal, Pinar del Río, Cuba, alexander@azugrup.pr.minaz.cu

<sup>2</sup> Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana. Calle Zapata s/n, e/ Mazón y G, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, C. P. 10400, clara@fq.uh.cu

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, C. P. 11600, cromeu@inisav.cu

<sup>4</sup> IPQI Mártires de Girón. Calle 17 esq. a 5.<sup>a</sup> ave., Playa, Ciudad de La Habana

<sup>5</sup> Jardín Botánico de Pinar del Río. Carretera Hoyo de Guamá Km 1½, Pinar del Río, Cuba

### RESUMEN

Se realizó el tamizaje fitoquímico de la corteza del tallo de *Maytenus urquiolae* Mory, el cual mostró triterpenos y compuestos fenólicos como las familias de metabolitos más abundantes en el material vegetal. Se aisló y caracterizó el polímero 1,4 trans poliisopreno, marcador quimiotaxonomico de la familia *Celastraceae*, y finalmente se realizó un estudio de la composición química de la fracción de más baja polaridad, la cual se caracterizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, en la que se identificaron 11 compuestos, seis pertenecientes a la familia de los sesquiterpenos. El extracto en *n*-hexano:éter etílico (1:1) de la corteza del tallo mostró efecto fungicida in vitro contra el patógeno *Curvularia clavata* B. L. Jain.

Palabras claves: *Celastraceae*, *Maytenus urquiolae*, tamizaje fitoquímico

### ABSTRACT

A phytochemical screening of *Maytenus urquiolae* Mory steam barks was done. This study showed that triterpenes and phenolic compounds were the main metabolites families present in plant material. Polymer 1,4 trans polyisoprene was isolated and characterized as chemiotaxonomic significance of *Celastraceae* family. Finally a chemical composition study of the lower polarity fraction was carried out by CG-MS, where 11 compounds were identified and six of them belong to sesquiterpene family. The steam barks *n*-hexane: ethyl ether (1:1) extract showed in vitro fungicide activity against the pathogen *Curvularia clavata* B. L. Jain.

Keywords: *Celastraceae*, *Maytenus urquiolae*, phytochemistry screening

### INTRODUCCIÓN

La familia *Celastraceae* es conocida comúnmente como familia agridulce (*bittersweet*) debido al sabor de sus frutos. Incluye 98 géneros con aproximadamente 1264 especies [Dias *et al.*, 2005].

Dentro de la familia *Celastraceae*, el género *Maytenus* tiene una larga historia de empleo en la medicina popular de varios pueblos [González *et al.*, 1996]. Se conoce que presentan una serie de familias de metabolitos secundarios con amplia variedad de actividades biológi-

cas [Santos-Oliveira *et al.*, 2009]. Ejemplo de esto son los alcaloides sesquiterpénicos piridínicos con actividad antialimentaria e inmunosupresora [Alvarenga *et al.*, 2001], triterpenoquinonas y dímeros triterpénicos con actividad antimicrobiana [González *et al.*, 1996] y nortriterpen metilénquinonas con actividad antimicrobiana e insecticida [Ávilla *et al.*, 2000; Spivey *et al.*, 2002]. Se conoce además que estas plantas contienen metabolitos considerados marcadores taxonómicos

como la gutapercha, agarofuranos, sesquiterpénicos piridínicos, entre otros [Menezes de Olivera *et al.*, 2006].

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio fitoquímico preliminar de la corteza del tallo de la especie *Maytenus urquiolae*, así como evaluar de manera preliminar su actividad fungicida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La especie *Maytenus urquiolae* Mory, árbol endémico de Cuba, fue descrita por vez primera en 1993 [Mory, 1993]. Se recolectó en el municipio de Mantua, provincia de Pinar del Río, en noviembre del 2007.

La corteza de tallo se secó a la sombra por espacio de 48 h y luego se completó el proceso en estufa a 35°C durante 2 h. Posteriormente se procedió a su trituración por medio de un molino de cuchillas, con un tamiz de 5 mm. Se maceraron 690 g del material vegetal en 2 L de una mezcla de n-hexano:éter etílico 1:1 durante 24 h; seguidamente se calentó a reflujo en la misma mezcla por espacio de 4 h. Se filtró por gravedad, y al dejar enfriar el filtrado precipitó 5,9 g de un sólido amorfo de color blanco ( $A_1$ ), el cual se lavó con pequeños volúmenes de metanol y gotas de acetona. El líquido sobrenadante se concentró a presión reducida y se obtuvieron 11 g de un sólido color naranja ( $A_2$ ).

Para detectar las principales familias de metabolitos presentes en la corteza del tallo se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico según el Minsap (1994).

El compuesto  $A_1$  fue caracterizado por su punto de fusión y por espectroscopia IR-FT,  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ .

Se preparó una columna cromatográfica por vía seca en la que se utilizó como adsorbente gel de sílice 60 de tamaño 0,063-0,200 mm de alta pureza, y se le añadieron 5 g de  $A_2$  disueltos en 10 mL de n-hexano, la columna se eluyó con n-hexano, n-hexano-cloroformo 1:1, cloroformo, acetato de etilo y metanol. La fracción de n-hexano se concentró al vacío hasta total sequedad, y el residuo ( $R_1$ ) se analizó por CG-MS.

Con el objetivo de evaluar la actividad fungicida se seleccionó como hongo diana una cepa de *Curvularia clavata* B. L. Jain, patógeno en pastos, donado por el cepario del Inisav, que se sembró en placas Petri de 9 cm de diámetro con PDA, las que se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante siete días. Para la producción de conidios se transfirieron de dos a tres porciones del micelio a hojas

de yerba Don Carlos (*Sorghum halepense* L. Pers.) en agar agua. Después de 72 h y observados los conidios al estereoscopio, se tomaron las hojas que se transfirieron a medio líquido papa dextrosa y se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 72 h. El ensayo se llevó a cabo según el método descrito por Philip *et al.* (1984), modificado con papa dextrosa como medio de cultivo. En placa delgada cromatográfica de 25 x 25 cm, cubierta de gel de sílice (0,5 mm de espesor) se aplicaron 5, 10, 20, 40 y 100  $\mu\text{L}$  de una solución de  $A_2$  de concentración 5 mg/mL en acetato de etilo. Después de evaporado el solvente se asperjaron 10 mL de suspensión de esporas del hongo fitopatógeno *C. clavata*. La placa cromatográfica se incubó por espacio de cuatro días a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  en cámara húmeda (humedad > 95%) en la oscuridad. Como control positivo se utilizó tebuconazol a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Se evaluó cualitativamente la inhibición de la germinación de conidios.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el tamizaje fitoquímico realizado el ensayo de Liebermann-Buchard para la identificación de triterpenos dio positivo; se observó la formación de una coloración roja con gran intensidad, hecho que indica abundancia de este metabolito en la corteza de tallo. En el ensayo de Baljet, para la identificación de las cumarinas, se notó su presencia en buenas cantidades. Se identificó la presencia de fenoles o taninos en el ensayo del cloruro férrico. Por último, el ensayo de Molisch confirmó la presencia de glicósidos (*Tabla 1*).

El sólido esponjoso de color blanco  $A_1$  resultó soluble en tetracloruro de carbono y diclorometano, e insoluble en metanol y acetato de etilo. Su apariencia física y solubilidad sugieren la posibilidad de estar en presencia de 1,4 trans poliisopreno, polímero natural conocido como gutapercha. El intervalo de la temperatura de fusión fue de 68-70°C, valor superior al reportado para el mismo polímero aislado de *Maytenus acanthophylla* (52,5-56°C) [Menezes de Oliveira *et al.*, 2006]. La diferencia en las temperaturas de fusión puede deberse a diferencias en el grado de polimerización.

El espectro IR de  $A_1$  muestra señales de carbonos con hibridación  $sp_2$  ( $> 3000\text{ cm}^{-1}$ ). El grupo  $\text{CH}_3$  también se detecta por sus bandas características de 2915, 2890 y 1446  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 1664  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza la frecuencia de vibración estiramiento de doble enlace carbono-carbono ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), y a 796  $\text{cm}^{-1}$  aparece la banda de doblaje fuera del plano de alquenos  $\gamma_{\text{CH}}$ .

Tabla 1 Tamizaje fitoquímico de la corteza de tallo de *Maytenus urquiolae*

Metabolitos	Ensayo	Éter/n-hex
Alcaloides	Wagner	-
Triterpenos	Liebermann-Buchard	++
Quinonas	Bornträger	-
Cumarinas	Baljet	++
Saponinas	Espuma	-
Fenoles o taninos	Cloruro férrico	+
Aminas y aminoácidos	Ninhidrina	-
Flavonoides	Shinoda	-
Glicósidos	Molisch	-

-: No detectable. +: Positivo. ++: Abundante.

La ausencia de señales correspondientes a grupos carbonilo, amino, alcoholes u otros compuestos oxigenados, son también elementos que confirman la presencia de la gutapercha (Fig. 1).

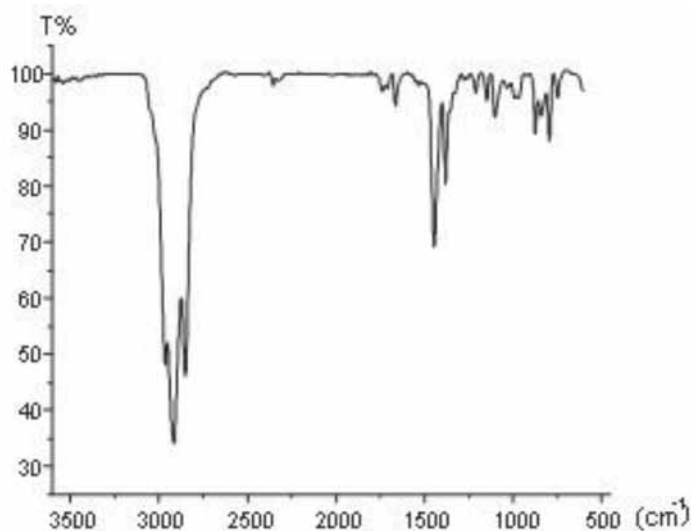


Figura 1. Espectro de IR de la gutapercha aislada de *M. urquiolae*.

Se verificó la estructura del polímero con los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Fig. 2) aparecen dos señales características del compuesto, una perteneciente al protón olefínico ( $\delta$ 5,12 p.p.m. (1H,s)) y otra del grupo  $\text{CH}_3$  ( $\delta$ 1,60 ppm (3H,s)); aparece además la señal de los grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) ( $\delta$ 2,01 p.p.m. (4H,d)).

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN muestra cinco señales pertenecientes a la unidad estructural (Fig. 3). Las señales a 135 p.p.m. (=CH-) y 125 p.p.m. pertenecen a los carbonos  $\text{sp}_2$  del doble enlace; la señal a 16 p.p.m. al grupo  $\text{CH}_3$ ; y las señales a 40 p.p.m. y 27 p.p.m. a los grupos  $\text{CH}_2$ .

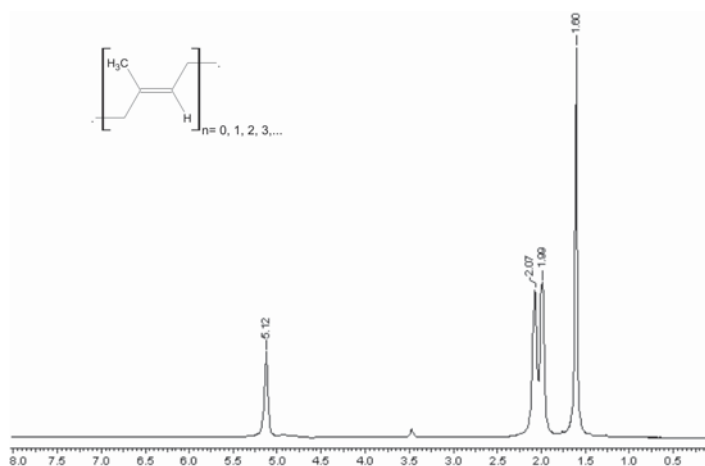


Figura 2. Estructura y espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la gutapercha aislada de *M. urquiolae*.

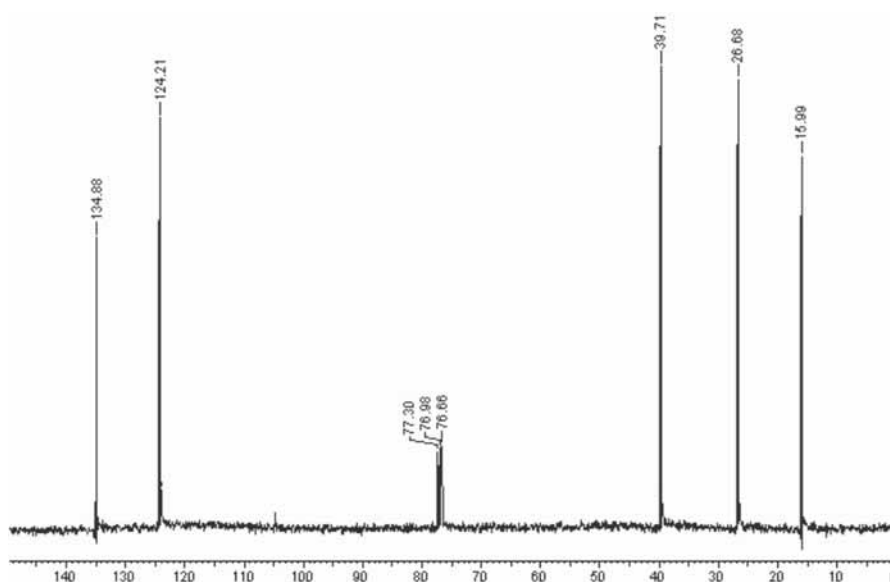


Figura 3. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la gutapercha aislada de *M. urquiolae*.

$R_1$  se logró del fraccionamiento de  $A_2$  y se hizo un CG-MS. La *Tabla 2* resume los resultados del cromatograma de  $R_1$  (*Fig 4*). Se utilizó una columna SPB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) con una programación de temperatura para el horno de 60°C (2 min), 4°C/min hasta 250°C (20 min).

El detector empleado fue de impacto electrónico (70eV) a 230°C. La detección se realizó en el modo *scan* entre 35 y 400 uma. Los componentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los compilados en la base de datos NIST98.

Fueron detectados 11 compuestos. Seis identificados son sesquiterpenos, los cuales significan más del 50% de la composición de  $R_1$ . Se destaca  $\delta$ -muuroleno con el 21,2%. Es de notar que, según la literatura, los sesquiterpenos son sustancias comunes en las *Celastraceas*, y se relacionan con la biosíntesis de los agarofuranos, metabolitos con marcada actividad insecticida [Céspedes *et al.*, 2001]. Fueron detectados además tres hidrocarburos saturados de 12, 14 y 18 átomos de carbono.

Tabla 2. Resultados obtenidos del cromatograma de R<sub>1</sub>

No.	Tr (min)	Compuesto	Fórmula global	Área (%)
1	2,5	4 hidroxí, 4 metil 2-pentanona	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	7
2	7,5	Dodecano	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	4,8
3	11,1	α-copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,5
4	11,32	Tetradecano	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	2,4
5	11,40	β-elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	7
6	12,55	α-himachaleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	4,7
7	12,64	α-cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2,4
8	12,97	γ-muuroleño	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	21,2
9	13,44	cis-β-guaieno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	7
10	14,95	Octadecano	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	4,7
11	31,58	Escualeno	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	17,7

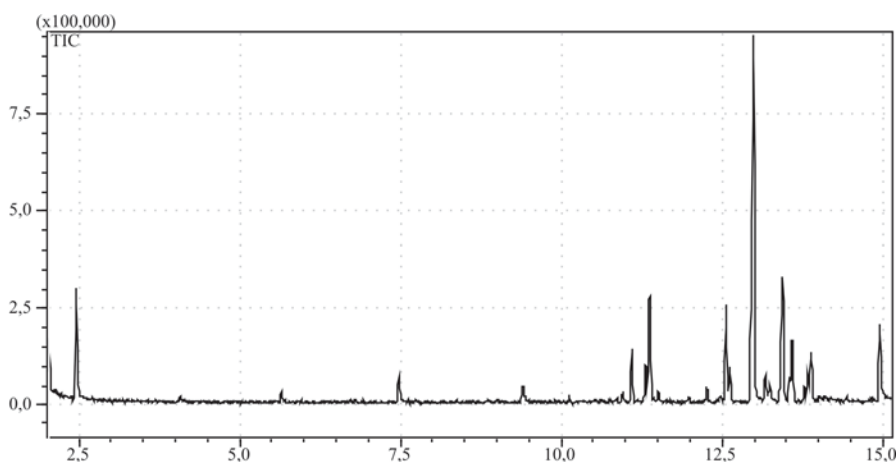


Figura 4. Cromatograma de R<sub>1</sub>

Los resultados –primeros de carácter fitoquímico que se le realizan a esta planta– dan elementos que confirman su clasificación taxonómica, puesto que la guta-percha es considerada un marcador quimiotaxonómico de la familia Celastraceae. Las familias de metabolitos encontradas en el tamizaje fotoquímico como triterpenos, cumarinas y compuestos fenólicos están ampliamente descritas por sus actividades biológicas en el control de plagas. Los triterpenos se caracterizan por ser muy efectivos como insecticidas y fungicidas [Chen *et al.*, 2005; Connolly y Hill, 2002], de los compuestos fenólicos en general, y las cumarinas en particular se conoce su efecto insecticida, fungicida y rodenticida [Duke, 1990; Baskar *et al.*, 2010].

Finalmente, los sesquiterpenos identificados por cromatografía gaseosa se caracterizan por provocar efecto antialimentario en insectos y alelopático [Fraga, 2003; Silva *et al.*, 2009]. Todos estos elementos indican

a esta planta como promisorio fuente de metabolitos activos en el control de plagas.

En la *Tabla 3* se listan los valores de la inhibición del crecimiento micelial de *C. clavata* respecto a la cantidad de extracto de A<sub>2</sub> aplicado.

El extracto obtenido a partir de *M. urquiolae* (A<sub>2</sub>) comenzó a evidenciar efecto antifúngico a partir de los 20 μL, equivalente a 100 μg del crudo. Los valores obtenidos son interesantes, ya que se está evaluando un extracto que contiene una mezcla de metabolitos y no a un compuesto puro. El o los metabolitos responsables de la actividad biológica pueden estar en diferentes proporciones en el extracto, desde ser mayoritario a solo encontrarse a nivel de trazas. Este estudio merece una profundización en el análisis de los metabolitos involucrados en la actividad antifúngica por la posible utilización en el control de patógenos en la agricultura.

**Tabla 3. Inhibición de la germinación de conidios de *C. clavata* por el extracto de A<sub>2</sub>**

Volumen aplicado (µL)	A <sub>2</sub> (5 mg/mL)	Tebuconazol (0,050 mg/mL)	Acetato de etilo
5	-	+	-
10	-	+	-
20	+	+	-
40	+	+	-
100	+	+	-

+: Inhibió. -: No inhibió.

## CONCLUSIONES

- El extracto en n-hexano/éter etílico (1:1) de la corteza del tallo de *Maytenus urquiolae* Mory inhibió la germinación conidial de *C. clavata*.
- El tamizaje fitoquímico realizado a la corteza del tallo mostró la presencia de triterpenos, cumarinas, compuestos fenólicos y glicósidos.
- Se aisló y caracterizó un polímero natural (1,4 trans poliisopreno) conocido como gutapercha, el cual es un marcador quimiotaxonómico de la familia *Celastraceae*.
- Para la fracción R<sub>1</sub> se identificaron 11 compuestos, seis de ellos sesquiterpenos.

## REFERENCIAS

- Alvarenga, N.; C. A. Velásquez; N. Canela de Alvarenga: «Actividad biológica de compuestos aislados de corteza de raíz», *Revista de Ciencia y Tecnología*, Dirección de Investigaciones, UNA 1 (3): 51, México, 2001.
- Avilla, J.; A. Teixido; C. Velázquez; N. Alvarenga; E. A. Ferro; R. Canela: «Insecticidal Activity of *Maytenus* species (*Celastraceae*) Nortriterpene Quinone Methides Against Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)», *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (1): 88-92, EE. UU., 2000.
- Baskar, K.; R. Maheswaran; S. Kingsley; S. Ignacimuthu: «Bioefficacy of *Couropita guianensis* (Aubl) Against *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae, Spanish», *Journal of Agricultural Research* 8 (1): 135-141, España, 2010.
- Céspedes, C. L.; E. J. Aranda; A. J. Becerra; O. M. Silva; L. Achnine: «Insect Growth Regulator and Insecticidal Activity of  $\delta$ -Dihydroagarofurans from *Maytenus* spp. (*Celastraceae*)», *Zeitschrift für Naturforschung* 56: 603-613, Alemania, 2001.
- Chen, J. C.; M. H. Chiu; R. L. Nie; G. A. Cordell; S. X. Qiuc: «Cucurbitacins and Cucurbitane Glycosides: Structures and Biological Activities», *Natural Products Reports* 22: 386-399, EE. UU., 2005.
- Connolly, J. D.; R. A. Hill: «Triterpenoids», *Natural Products Reports*, 19: 494-513, EE. UU., 2002.
- Dias, J. F.; G. M. Cirio; M. D. Miguel; O. G. Miguel: «Contribution to the Allelopathic Study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., *Celastraceae*», *Revista Brasileira Farmacognosia*. 15 (3): 220-223, Brasil, 2005.
- Duke, S. O.: *Natural Pesticides From Plants*, Advances in New Crops, Timber Press, Portland, EE. UU., 1990.
- Fraga, B. M.: «Natural Sesquiterpenoids», *Natural Products Reports* 20: 392-413, EE. UU., 2003.
- González, A. G.; N. Alvarenga; A. Ravelo; I. Bazzocchi; E. Ferro; A. Navarro; L. Moujir: «Scutione. A New Bioactive Norquinonemethide Triterpene from *Maytenus Scutioides* (*Celastraceae*). *Biorganic*», *Medicinal Chemistry* 4: 815-820, EE. UU., 1996.
- Menezes de Oliveira, D.; G. D. De Fátima Silva; L. Pains Duarte; S. A. Vieira Filho: «Chemical Constituents Isolated from Roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (*Celastraceae*)», *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 661-665, EE. UU., 2006.
- Minsap: *Guía para el tamizaje fotoquímico*, Minsap, La Habana, 1994.
- Mory, B.: «*Maytenus urquiolae* Mory sp. nov. eine neue *Celastraceae* für die flora von kuba mit 3 tafeln und 2 tabellen», *Feddes Repertorium* 104 (7-8): 431-438, Alemania, 1993.
- Philip, H. E.; W. S. Bowers; E. J. Funk: «Identification on Fungicidal and Namaticidal Omponents in the Leaves of *Piper bettle* (*Piperaceae*)», *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 1254-1256, EE. UU., 1984.
- Santos-Oliveira, R.; S. Coulaud-Cunha; C. Waldeciro: «Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, *Celastraceae*. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas», *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19 (2b): 650-659, Brasil, 2009.
- Silva, A. P. da; M. A. Marçal; M. G. Bichara; R. L. Cunha: «Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas», *Acta Amazonica* 39 (2), Brasil, 2009.
- Spivey, A. C.; M. Weston; S. Woodhead: «*Celastraceae* Sesquiterpenoids: Biological Activity and Synthesis», *Chemical Society Review* 31 (1): 43-59, EE. UU., 2002.