

Estudio fitoquímico de la especie endémica cubana *Zanthoxylum pseudodumosum*, una planta con potencial actividad antifúngica

Phytochemical study of the cuban endemic species *Zanthoxylum pseudodumosum*, a plant with potential antifungal activity

Lic. Alexander Dueñas-Deyá^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0948-2291>

Lic. Rut Castañeda-Bauta² <https://orcid.org/0000-0001-7383-2893>

Lic. Lisbet Martín-Cruz¹ <https://orcid.org/0000-0002-7784-635X>

Dra C. Katia Ojito-Ramos² <https://orcid.org/0000-0001-8065-7106>

Dr C. José O. Guerra-de-León¹ <https://orcid.org/0000-0002-6885-5481>

¹Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba

*Autor para la correspondencia. correo electrónico: aduenas@nauta.cu

RESUMEN

Zanthoxylum pseudodumosum es una planta aromática endémica de Cuba que ha sido poco estudiada, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la composición química de diferentes productos preparados a partir de la misma, así como evaluar la actividad antifúngica "in vitro" frente a *A. solani*. De sus hojas se obtuvo el aceite esencial mediante hidrodestilación, así como los extractos hexánico e hidroalcohólico mediante maceración. Se realizó la caracterización fitoquímica de las fracciones aisladas mediante ensayos químicos y con ayuda de la cromatografía de capa delgada. Los productos obtenidos se ensayaron frente al hongo fitopatógeno *Alternaria solani*, obteniendo los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante el método de microdilución. Los principales metabolitos encontrados fueron terpenos, alcaloides, cumarinas, antraquinonas, esteroides y compuestos fenólicos. El extracto hexánico

mostró buena actividad antifúngica con un valor de CMI de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguido del aceite esencial con 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Palabras clave: *Zanthoxylum pseudodumosum*; aceite esencial; actividad antifúngica; *Alternaria solani*.

ABSTRACT

Zanthoxylum pseudodumosum is an endemic aromatic plant from Cuba that has been little studied, for this reason the aim of this work was to determinate the chemical composition of different products prepared from it, as well as to evaluate the antifungal activity *in vitro* against *A. solani*. The essential oil was obtained from its leaves by hydrodistillation, as well as the hexane and hydroalcoholic extracts by maceration. The phytochemical characterization of the isolated fractions was performed by chemical tests and with the help of thin layer chromatography. The products obtained were tested against the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values by the microdilution method. The main metabolites found were terpenes, alkaloids, coumarins, anthraquinones, steroids and phenolic compounds. Hexane extract showed good antifungal activity with a MIC value of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, followed by essential oil with 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: *Zanthoxylum pseudodumosum*; essential oil; antifungal activity; *Alternaria solani*.

Recibido: 22/7/2020

Aprobado: 12/9/2020

Introducción

El género *Zanthoxylum* L., perteneciente a la familia *Rutaceae*, cuenta con aproximadamente 250 especies distribuidas de forma pantrópica.⁽¹⁾ Varias especies de *Zanthoxylum* presentan usos etnobotánicos con fines antipirético, analgésico, antimicrobiano, antiinflamatorio, antiplasmódico y citotóxico, entre otros. Estudios fitoquímicos realizados a estas especies, han demostrado la presencia de alcaloides, lignanos, amidas, cumarinas, terpenos, flavonoides, esteroides, cromonas, entre otros, a los cuales se le han atribuido un amplio espectro de actividades biológicas.⁽²⁾

En Cuba, el género *Zanthoxylum* se encuentra representado por 25 especies de las cuales 15 son endémicas.⁽³⁾ *Zanthoxylum pseudodumosum* Beurton, conocida popularmente como Ayúa dumosa, es una planta aromática endémica de Cuba, la cual cuenta con ejemplares distribuidos en el occidente, centro y oriente del país. Debido a su endemismo, los compuestos bioactivos de esta planta han sido poco estudiados. La literatura consultada⁽⁴⁾ reporta la presencia de aminos,

taninos, cumarinas, fenoles, flavonoides y alcaloides en los tallos y las hojas. Sin embargo, en estos trabajos no se hace referencia a la actividad biológica de estos compuestos.

Alternaria solani es el agente causal del tizón temprano en la papa (*Solanum tuberosum* L.) y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), una de las enfermedades foliares en Solanáceas más conocida a nivel mundial, ya que puede llegar a disminuir los rendimientos de producción entre un 20 y 30%. Este hongo fitopatógeno puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados, en la maleza, en semillas y puede ser dispersado por el viento, el agua, insectos e incluso mediante los trabajadores y maquinarias agrícolas. *A. solani* penetra a la planta por contacto directo con las hojas, frutos, tubérculos o a través de heridas y/o aperturas naturales. Una vez establecido en la misma, se desarrolla y produce esporangios que pueden llegar a infectar otros tejidos de órganos sanos.⁽⁵⁾

Tradicionalmente, en el control del tizón temprano se implementan medidas agrotécnicas tales como: la realización de rotaciones de los cultivos de papa o tomate con otros cultivos no hospedantes de *A. solani*, la eliminación de los restos del cultivo infectado mediante un arado profundo, el uso de semillas y plántulas sanas, la introducción de variedades resistentes, entre otras. También con el propósito de eliminar la enfermedad o retardar su desarrollo se emplean numerosos fungicidas químicos como Clorotalonil, Mancozeb, Propineb, Zoxamida, Boscalid, Pyraclostrobin, Difenocoazole, entre otros.⁽⁶⁾ Sin embargo, a pesar de que el uso de los fungicidas contribuye al control efectivo de la enfermedad, el uso prolongado de los mismos provoca una elevada contaminación ambiental, daños severos a la salud humana y la aparición de resistencia por parte del hongo.⁽⁷⁾ Debido a esto, es creciente la tendencia mundial hacia el uso de “productos verdes”, con el interés de emplear cada vez menos aditivos sintéticos y productos que afecten al medio ambiente, por lo que el uso de extractos de origen vegetal se amplía en la actualidad. En este sentido, extractos de *Z. pseudodumosum*, pudieran constituir una alternativa para el manejo agroecológico del tizón temprano.

Según lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la composición química de diferentes extractos preparados a partir de hojas de *Z. pseudodumosum*, así como evaluar la actividad antifúngica “*in vitro*” frente a *A. solani*.

Materiales y métodos

Colecta del material vegetal y procesamiento

Las hojas de *Z. pseudodumosum* se colectaron en su hábitat natural en el poblado “El Hormiguero”, carretera a Camajuaní, Santa Clara, Cuba, en septiembre de 2018. La identificación taxonómica del material vegetal se realizó en el lugar de la colecta por especialistas pertenecientes al Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, donde se registró con el número 12414 ULV. Las hojas se secaron en una estufa (YLD-6000) con circulación de aire a 40 °C y luego se molieron en un molino (KMF 10 basic IKA WERKE, Alemania) para facilitar los procesos extractivos.

Obtención de los extractos y el aceite esencial

Los extractos se prepararon por el método de maceración en la oscuridad durante siete días, cambiando el disolvente cada 48 hs para facilitar el proceso de extracción y alcanzar buenos rendimientos.

Para obtener el extracto hexánico (EHex) se mezclaron 20 g de material vegetal con 200 mL de n-hexano (relación s/l 1:10). Posteriormente se filtró la fase hexánica obtenida, y se concentró a presión reducida en un rotovaporador (IKA WERKE RV10BS1, Alemania). Se obtuvo un extracto de color verde y consistencia gomosa con un rendimiento del 0.68 % m/m.

Para el extracto hidroalcohólico (EHA) se mezclaron 20 g de material vegetal con etanol 75% (relación s/l 1:10). Se filtró la fase hidroalcohólica resultante y se concentró a presión reducida, obteniéndose un extracto de color pardo con un rendimiento del 16,8 % m/m.

El aceite esencial se extrajo de las hojas mediante el método de hidrodestilación, empleando una trampa tipo Clevenger.⁽⁸⁾ Se pesaron 80 g del material vegetal y se mezclaron en un balón con 1200 mL de agua destilada, deteniéndose el calentamiento cuando el volumen de aceite permaneció constante en el tiempo (3 h).

El aceite se separó del hidrodestilado extrayéndolo con n-hexano, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se conservó en refrigeración para su posterior análisis. El producto así obtenido fue menos denso que el agua, presentó una coloración amarilla y un olor cítrico agradable. La extracción se realizó por triplicado con un rendimiento promedio de 0,46% ± 0,021 m/m.

Identificación de metabolitos secundarios en los extractos mediante tamizaje fitoquímico

Para la identificación de metabolitos en los extractos se empleó el método de tamizaje fitoquímico reportado por Selvaraj.⁽⁹⁾

Ensayo de Dragendorff: Se aplica para la detección de alcaloides. Se tomó 1 mL de cada extracto y se depositó en dos tubos de ensayos respectivamente. Estos se evaporaron en baño de agua para eliminar el solvente. Los residuos se redisolviéron en 1 mL de HCl (1%). Se calentó la mezcla ligeramente y luego se añadieron tres gotas del reactivo de Dragendorff. Se consideró positivo si apareció opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado (+++).

Ensayo de Wagner: Se utilizó para la detección de alcaloides. Se partió al igual que en el caso anterior de la disolución ácida, luego se añadieron 2-3 gotas de disolución alcohólica de I₂/KI. Se clasificó el ensayo de igual manera que el anterior.

Ensayo de Baljet: Se emplea para la detección de cumarinas. Una alícuota del extracto hexánico se sometió a calentamiento ligero para evaporar el solvente, el extracto etanólico se utilizó sin necesidad de evaporar el solvente. Paralelamente se prepararon dos soluciones, una de NaOH al 10 % y otra de ácido pícrico al 1% en etanol, se mezclaron volúmenes iguales de estas y se adicionó 1 mL de esta última a las muestras. Se consideró positivo la aparición de coloración (+) o un precipitado (++) .

Ensayo de Borntrager: Se emplea para la detección de quinonas. Se evaporó 1 mL de cada extracto y el residuo se redisolvió en cloroformo, se adicionó 1 mL de KOH al 5 % en agua. Se agitaron las fases y se dejó en reposo. Se consideró positivo si la fase acuosa alcalina se coloreó de rosado a rojo.

Ensayo de Liebermann-Burchard: Se utilizó para detectar triterpenos y/o esteroides. Al igual que en el ensayo anterior se empleó la mezcla clorofórmica. Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se agitó. Se dejaron caer lentamente 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado sin agitar. Se consideró positivo al ocurrir un cambio de coloración.

Ensayo de catequinas: Se aplicó una gota de cada extracto sobre el papel de filtro y sobre la mancha se aplicó una gota de disolución de Na₂CO₃. Se consideró positiva la aparición de una mancha verde-carmelita a la luz UV.

Ensayo de resinas: Se adicionaron 10 mL de agua a 2 mL de cada extracto. Se consideró positiva la aparición de un precipitado.

Ensayo de Fehling: Se usó para la detección de azúcares reductores. Se tomó 1 mL del extracto etanólico y se evaporó el solvente. El residuo se redisolvió en 1-2 mL de agua. Se adicionaron 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó en baño de agua. El ensayo se consideró positivo si la disolución se colorea de verde-naranja (+) o la aparición de un precipitado rojizo (+++).

Ensayo de espuma: Se utilizó para la detección de saponinas. Se tomó 1 mL del extracto etanólico y se diluyó en cinco veces su volumen de agua. La mezcla se agitó fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se consideró positivo al aparecer espuma de más de 2 mm de espesor o altura en la superficie del líquido.

Ensayo del cloruro de hierro (III): Permite reconocer compuestos fenólicos y/o taninos. Una alícuota de cada extracto se calentó para evaporar el solvente y se le adicionaron 3 gotas de una disolución de FeCl₃ al 5%. Se consideró positivo un cambio de coloración.

Ensayo de ninhidrina: Posibilita reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se tomó una alícuota de cada extracto, se calentó ligeramente para eliminar el disolvente y se mezcló con 2 mL de la disolución de ninhidrina al 2 %. La mezcla se calentó durante 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se consideró positivo si se desarrolla un color violáceo.

Ensayo de Shinoda: Contribuye a reconocer los flavonoides. Una alícuota de cada extracto se calentó para evaporar el solvente, se diluyó con 1 mL de HCl concentrado y se adicionó un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción, se añadió 1 mL de alcohol isoamílico, se agitó y se dejó reposar hasta que las fases se separaron. El ensayo se consideró positivo si el alcohol isoamílico se coloreó de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

Ensayo de Antocianidinas: Permite la identificación en los extractos de estas sustancias. Se calentaron 2 mL del extracto etanólico para eliminar el solvente y se adicionó 1 mL de HCl concentrado. Se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de agua y 2 mL de alcohol isoamílico. Se agitó y se

dejaron separar las dos fases. Se consideró positiva la aparición de un color rojo a marrón en la fase isoamílica.

Ensayo de Kedde: Posibilita la identificación de glicósidos cardiotónicos. Se mezclaron a volúmenes iguales disoluciones de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2% en metanol y de KOH al 5% en agua. Una alícuota del extracto etanólico se mezcló con 1 mL de la disolución reactiva y se dejó reposar durante 5-10 minutos. Se consideró un ensayo positivo en el que se desarrollara una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas.

Cromatografía de Capa Delgada (CCD)

Para determinar los posibles metabolitos presentes, el aceite y los extractos obtenidos se analizaron en placas cromatográficas con fase estacionaria sílica gel F₂₅₄. Se evaluaron como fase móvil diferentes disolventes y mezclas de ellos: cloroformo, acetato de etilo y tolueno. Se aplicaron en cada placa las tres muestras (1-aceite esencial, 2- extracto hexánico y 3-extracto etanólico) y se escogió el sistema que permitiera una mejor separación de los compuestos presentes.

Las cromatoplasmas se revelaron con luz UV a 254 nm y 365 nm (Lámpara UV, WD-9403E) y con los reveladores químicos que se especifican en la tabla 1 según aparecen referenciados en la literatura ⁽¹⁰⁾:

Tabla 1 - Reveladores cromatográficos utilizados

Revelador utilizado	Metabolitos que detecta
Vapores de yodo	Compuestos lipofílicos o con dobles enlaces conjugados
Permanganato de potasio	Compuestos oxidables
Vainillina-ácido sulfúrico	Terpenoides, fenilpropanoides y esteroides
Reactivo de Liebermann-Burchard	Esteroides, terpenoides, lignanos
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides y compuestos heterocíclicos nitrogenados
Ácido fosfomolibdico	Terpenos, alcoholes terpénicos y sus ésteres, vitaminas y esteroides

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos

El aislado de *A. solani* se cultivó en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), en oscuridad, a 27 °C, durante 7 días. Posteriormente, discos de micelio de 0,6 cm de diámetro fueron transferidos al medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) y se dejaron crecer en constante movimiento en una zaranda (Gerhardt, Alemania) a 120 rpm, 27 °C durante 72 h. Luego, 1 g de *A. solani*, crecido en estas condiciones, se trituró en un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Rose Scientific Ltd, Canadá) y se ajustó la concentración a 5×10^5 fragmentos de micelios/mL en cámara de Neubauer (Brand, Alemania).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Z. pseudodumosum* se determinó por el método de microdilución. Los extractos fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO) 5 % y se evaluaron a concentraciones de 4 000, 2 000, 1 000 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El ensayo se realizó en microplacas de ELISA de 96 pocillos (ThermoScientific, EE.UU.). Se añadió en cada pocillo 100 μL de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB), excepto el primer pocillo de cada fila a la cual se le colocaron 190 μL de PDB. Luego se le añadió al primer pocillo de cada fila 10 μL del extracto previamente resuspendido en DMSO, para obtener un volumen final de 200 μL y una concentración final del extracto de 8 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de esa concentración se realizaron tres diluciones seriadas de 100 μL y posteriormente se añadió a cada pocillo 100 μL de la suspensión de 5×10^5 fragmentos de micelios/mL de *A. solani* y el extracto quedó a la concentración final a evaluar.

Como control de crecimiento se utilizó *A. solani* en el medio de cultivo PDB. Como control de actividad antifúngica se empleó *A. solani* en medio de cultivo PDB con DMSO 40%. Como control de solvente se utilizó *A. solani* en medio de cultivo PDB con DMSO 5%. Como control de esterilidad se empleó el medio de cultivo PDB sin *A. solani*. Para cada extracto y controles se realizaron tres réplicas y el experimento se repitió una vez. Las placas se incubaron en oscuridad, a 27 °C, durante 7 días. El crecimiento micelial se observó a partir de 72 h de incubación, cada 24 h, durante 7 días. La CMI fue definida como la concentración mínima a la que el extracto fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo.

Análisis y discusión de resultados

Tamizaje fitoquímico de extractos de *Z. pseudodumosum*

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a extractos de hojas de *Z. pseudodumosum* se reflejan en la tabla 2.

La determinación cualitativa de metabolitos (Tamizaje fitoquímico) indica que son mayoritarios en el extracto n-hexánico los flavonoides y triterpenos, mientras que en el hidroalcohólico aparecen los compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides, así como alcaloides y flavonoides. En el aceite esencial sólo se detectaron triterpenos, metabolitos comunes en estos productos.

Varios de estos tipos de compuestos han sido detectados en otras especies del género *Zanthoxylum*. Diversos autores han realizado tamizajes fitoquímicos a otras especies endémicas cubanas pertenecientes a este género, así se estudiaron las especies *Z. pimpinelloides* (Lam.) D.C., *Z. dumosum* A. Rich., *Z. duplicipunctatum* Wright y *Z. rolandii* Beurton. En los extractos etanólicos y hexánicos de estas especies se detectan en abundancia triterpenos y esteroides; particularmente en *Z. dumosum*, *Z. duplicipunctatum* y *Z. pimpinelloides*. También es muy elevada la presencia de fenoles y/o taninos en todas estas especies, con excepción de *Z. rolandii*. La presencia de flavonoides y compuestos reductores fue detectada en mayor concentración en *Z. pimpinelloides*, mientras que en ninguna de ellas se encontraron saponinas.⁽¹¹⁾ La especie *Z. pseudodumosum* era considerada como *Z. dumosum* hasta que Beurton en 1987 la clasificó como tal.⁽⁴⁾

En la bibliografía consultada ⁽²⁾, aparece que en estas plantas se han identificado diversas estructuras alcaloidales, incluyendo mayormente compuestos que presentan el nitrógeno en forma terciaria y cuaternaria.

En extractos etanólicos de madera de *Z. caribaeum* se han identificado estructuras esteroidales como el colesterol, estigmasterol y sitoesterol.⁽¹²⁾ Por otra parte, compuestos polifenólicos como los flavonoides quercetina, afzelina, quercitrina y rutina también han sido aislados de extractos etanólicos de hojas de *Z. bungeanum*.⁽¹³⁾ Las cumarinas, que fueron detectadas en el extracto hexánico de nuestra planta, son metabolitos que poseen un agrupamiento lactónico en su estructura y se han encontrado en diversos órganos de las especies *Z. avicennae* y *Z. zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich donde se reportan variadas estructuras de este tipo en fracciones de distinta polaridad.^(14,15) Igualmente, antraquinonas han sido detectadas en estudios fitoquímicos de la especie *Z. zanthoxyloides*.⁽¹⁶⁾

Tabla 2 - Metabolitos detectados en el tamizaje fitoquímico de extractos de *Z. pseudodumosum*

Nombre de ensayo / metabolito	Extracto n-hexánico	Extracto etanólico	Aceite esencial
Ensayo de Dragendorff / alcaloides	-	++	-
Ensayo de Wagner / alcaloides	+	++	-
Ensayo de Na ₂ CO ₃ / catequinas	+	+	-
Ensayo de FeCl ₃ / fenoles-taninos	+	+++	-
Ensayo de Baljet / cumarinas	+	-	-
Ensayo de Borntrager/ quinonas	-	+	-
Ensayo de Liebermann-Burchard / triterpenos y/o esteroides	++	++	+
Ensayo de resinas	+	++	-
Ensayo de saponinas	-	-	-
Ensayo de azúcares reductores	-	++	-
Ensayo de ninhidrina / aminoácidos	-	-	-
Ensayo de Shinoda / flavonoides	+++	++	-
Ensayo de antocianidinas	-	+	-
Ensayo de Kedde / glicósidos cardiotónicos	-	-	-
(-) no presencia (+) poco abundante, (++) abundante, (+++) muy abundante			

Cromatografía de Capa Delgada (CCD)

Para profundizar en las características de los extractos obtenidos, incluido el aceite esencial, decidimos estudiar los perfiles de sus cromatogramas de capa delgada bajo diferentes condiciones.

De los sistemas de disolventes evaluados como fases móviles, el constituido por tolueno-acetato de etilo permitió una mejor resolución de las mezclas. Se observó durante el desarrollo de la cromatografía, que al aumentar la polaridad de la misma la separación de los componentes en el aceite esencial y extractos decrecía notablemente, por lo que finalmente se seleccionó el sistema tolueno-acetato de etilo 8:2 para continuar el trabajo. Estos resultados, que coinciden con lo

reportado por otros autores ⁽¹⁰⁾, nos proporcionan información para un posible fraccionamiento de los extractos mediante cromatografía de columna.

La apariencia general de los cromatogramas revelados con vapores de yodo y otros reveladores más específicos, se corresponde con lo esperado para los productos estudiados. En todos los casos se observa que se trata de mezclas complejas; las del aceite esencial y extracto n-hexánico presentan las principales manchas a valores de Rf superiores a 0,6 y se corresponden con la menor polaridad que presentan los componentes de estas fracciones. Por su parte en el extracto hidroalcohólico, que posee compuestos de mayor polaridad, hay una distribución a lo largo de todo el recorrido con las manchas más intensas en el rango de Rf entre 0,3 y 0,5. (figura 1A)

Como parte de este estudio las placas fueron visualizadas sin usar revelador químico, primero a la luz visible y luego expuestas a la luz UV con longitudes de onda de 254 y 365 nm. Para el aceite sólo se tuvo un resultado positivo al irradiar con luz a 254 nm, pues se observó una zona oscura bien definida a Rf de 0,8, que según la literatura consultada ⁽¹⁰⁾ corresponde a derivados del fenilpropano, constituyentes comunes en estos productos.

En el caso de los extractos n-hexánico e hidroalcohólico, el comportamiento fue similar. Al observar los cromatogramas bajo la luz visible, se apreciaron manchas de colores verde y amarillo a valores de Rf de 0,78, 0,85 y 1 para el extracto hexánico y valores de Rf de 0,10, 0,60, 0,65 y 0,85 para el extracto hidroalcohólico debidas a la presencia de pigmentos que también se aprecian al utilizar luz ultravioleta.

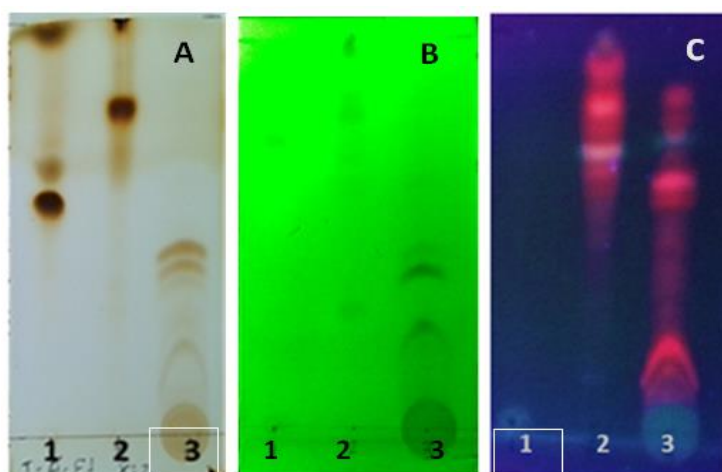


Fig. 1 - Cromatoplasmas reveladas con vapores de yodo (A), por exposición a luz UV 254 nm (B) y luz UV 365 nm (C)

En el extracto hexánico no se observaron nuevos compuestos al evaluar la cromatoplasma bajo luz UV 254 nm, por el contrario, el extracto hidroalcohólico reveló la presencia de nuevas manchas cuando se reveló mediante este método, las cuales aparecieron a valores de Rf entre 0,3 y 0,5.

Por último, al visualizar con luz UV-365 nm se detectaron en ambos extractos (figura 1B) manchas con fluorescencia roja características de derivados del antraceno, como las antraquinonas, las

cuales mostraron fluorescencia roja tras asperjarse con disolución de KOH al 5 %. Además, se visualizaron manchas azul celeste, propias de cumarinas ^(17,18), aunque este tipo de metabolito no fue detectado en el extracto hidroalcohólico por medio del tamizaje fitoquímico. Ambas clases de metabolitos fueron encontrados a valores de Rf superiores en el extracto hexánico mientras que en el extracto hidroalcohólico el recorrido de las manchas fue menor, lo cual está en concordancia con la naturaleza de los extractos.

Si bien las cumarinas no destacan entre los metabolitos más importantes en la fitoquímica del género, en estudios realizados a extractos de variada polaridad de *Z. avicennae* y *Z. zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernichse reportan diversas estructuras de este tipo. ^(14, 15) Antraquinonas también han sido detectadas mediante la técnica de HPTLC en extractos etanólicos de *Z. rhetsa* (Roxb.) DC. ⁽¹⁹⁾ La presencia de varios de estos compuestos en diferentes especies de *Zanthoxylum* pudiera indicar que los mismos son propios del género.

El empleo de reveladores químicos fue útil para ampliar la información sobre la composición de estos productos. El uso de una disolución de permanganato de potasio para la visualización permitió corroborar resultados anteriores al observarse cromatogramas muy parecidos a los obtenidos utilizando vapores de yodo (figura 2A), mientras que el revelado con vainillina-ácido sulfúrico (figura 2B), específico para terpenoides, fenilpropanoides y esteroides, mostró en el aceite esencial manchas violetas coincidentes con las más intensas para este producto que fueron observadas antes en el revelado con yodo a valores de Rf de 0,5 y 0,6, mientras una tercera mancha corre con el frente del solvente. En el extracto n-hexánico se evidenció algo similar pues con vainillina-ácido sulfúrico también se visualizan las dos manchas más intensas, mientras en el hidroalcohólico sólo la que aparece a Rf de 0,3.

Con la aparición de manchas de diversos colores, los resultados obtenidos con este último revelador fueron corroborados con el uso del reactivo de Liebermann Burchard (figura 2C) y del ácido fosfomolibdico, también específicos para esteroides y terpenoides. En estos casos es necesario destacar el hecho de que en el extracto hidroalcohólico aparecen un grupo de manchas cercanas a la aplicación con Rf cercanos a 0,3, que anteriormente no habían sido visualizadas.

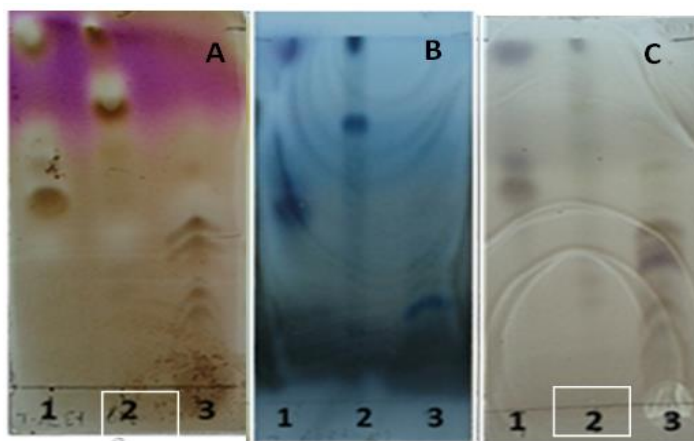


Fig. 2 - Cromatoplasmas reveladas con disolución de permanganato de potasio (A), vainillina en ácido sulfúrico (B) y reactivo de Liebermann-Burchard (C)

Para la visualización de alcaloides, al emplear el reactivo de Dragendorff se observaron solamente en el extracto hidroalcohólico algunas manchas de colores naranja y pardo a valores de Rf entre 0.3 y 0.5, lo cual es concordante con los resultados alcanzados en el tamizaje fitoquímico. Estas zonas se produjo un oscurecimiento en la fluorescencia a 254 nm, característico de alcaloides tipo indol, quinolina, isoquinolinas y purinas.⁽¹⁰⁾

Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones

De los extractos evaluados de hojas de *Z. pseudodumosum* el extracto hexánico fue el que presentó mayor actividad antifúngica ya que inhibió el crecimiento de *A. solani* a una concentración de 1000 µg/mL (tabla 3.).

Tabla 3 - Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de hojas de *Zanthoxylum pseudodumosum*

Extractos	CMI (µg/mL)
Aceite esencial	2000
Extracto hidroalcohólico	> 4000
Extracto hexánico	1000
DMSO 40%	< 500
DMSO 5%	> 4000

Debido a la importancia de *A. solani* para la economía a nivel mundial, se han realizado diversos estudios con extractos o aceites esenciales de plantas en los que se determina la CMI a la que presentan actividad antifúngica frente a este hongo. Por el método de microdilución en agar los extractos clorofórmicos de hojas de *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland), metanólicos de raíces de *Muntingia calabura* L. y metanólicos de hojas de *Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss. presentaron actividad antifúngica frente a *A. solani* a una CMI de 1 000 µg/mL^(20,21), igual CMI que la obtenida con el extracto hexánico de hojas de *Z. pseudodumosum* obtenido en esta investigación. Además, por ese mismo método, el extracto metanólico de frutos de *Vinca rosea* L. presentó actividad antifúngica frente a *A. solani* a una concentración mínima de 2 000 µg/mL⁽²²⁾, igual CMI que la obtenida por el aceite esencial de hojas de *Z. pseudodumosum*. Según estos autores, los extractos de *C. coronarium*, *M. calabura*, *H. tuberculatum* y *V. rosea* a estas concentraciones presentaron una buena actividad antifúngica frente a *A. solani*, por lo que este extracto y el aceite esencial de hojas de *Z. pseudodumosum* podría considerarse promisorio como alternativa antifúngica frente a este hongo.

La determinación cualitativa de metabolitos (Tamizaje fitoquímico) indicó que en el extracto hexánico fueron mayoritarios los flavonoides y triterpenos, compuestos con probada actividad antifúngica⁽²³⁻²⁶⁾, por lo que la actividad de este extracto pudiera deberse en gran medida a la presencia de estos compuestos. Estos resultados son de gran importancia ya que pudiera constituir una alternativa para ser incluida en un sistema de manejo integrado para el control del Tizón temprano en la papa y el tomate.

Conclusiones

Se obtiene el aceite esencial, así como los extractos hexánico e hidroalcohólico de las hojas de *Zanthoxylum pseudodumosum* y se determinan las condiciones para el estudio de los mismos mediante CCD. Esta técnica junto al tamizaje fitoquímico permite la detección de triterpenos y derivados del fenilpropano en el aceite esencial, así como de flavonoides y/o compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides en los extractos. También indistintamente han dado positivos ensayos que identifican alcaloides, cumarinas y antraquinonas en estos productos, lo que coincide con estudios fitoquímicos reportados en la literatura para este género. Desde el punto de vista de los resultados biológicos, el extracto hexánico y el aceite esencial presentan la mayor actividad antifúngica frente a *Alternaria solani*, por lo que resultan promisorios para el control agroecológico del tizón temprano.

Referencias bibliográficas

1. Diéguez, R., *et al.* Potencialidad del género *Zanthoxylum* como fuente de agentes con actividad biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2004, 23(2), 243-251. ISSN: 0326-2383.
2. Patiño, L.O.J.; Prieto, R.J.A.; Cuca, S.L.E. *Zanthoxylum* genus as potential source of bioactive compounds. En I. Rasooli ed. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. Edtion ed. Croatia: InTech, 2011, vol. 10, p. 185-187, 188. ISBN: 978-953-307-805-2.
3. Heredia Díaz, Y., *et al.* Influencia del medio de extracción en la composición de sustancias volátiles de las hojas de *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb. *Revista Cubana de Química*, 2016, 28(1), 490-506. ISSN: 2224-5421.
4. Beurton, C. Rutaceae. En W. Greuter and R. Rankin eds. *Flora de la República de Cuba. Serie A. Plantas Vasculares. Fascículo. 14.* . Edtion ed. Liechtenstein, Berlín A.R. Gantner Verlag KG, 2008, p. 134. ISBN: 3904144243.
5. Martínez Ruiz, F.E., *et al.* Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: La importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 2016, 12(18), 232-256. ISSN: 1857-7431.
6. Tandazo Falquez, N., *et al.* Efecto de *Hypocrea lixii* sobre el tizón temprano del tomate *Alternaria solani* en condiciones de invernadero, Guayas 2014-2015. *Espirales*, 2018, 2(14). ISSN: 2550-6862.
7. Li, P., *et al.* Biodiversity, phylogeny, and antifungal functions of endophytic fungi associated with *Zanthoxylum bungeanum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9), 1541. ISSN: 1422-0067.
8. Prajapati, N.; Ojha, P.; Karki, T.B. Antifungal property of essential oil extracted from *Zanthoxylum armatum* (Timur). *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 2015, 3(1), 1-5.
9. Selvaraj, P. Phytochemical Extraction and Screening. En S.a. Selvaraj ed. *Biopestides: Innovations and Practices*. Edtion ed. India, 2015, p. 76-86.

10. Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma, and T. Kowalska Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Edtion ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2008. ISBN: 978-1-4200-4677-9.
11. González García, K., *et al.* Evaluación Fitoquímica preliminar de cuatro especies endémicas cubanas de *Zanthoxylum* (Rutaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 2004, 23(1), 71-74. ISSN: 0326-2383.
12. Villamizar, V.M.; Cuca Suarez, L. Mezcla de esteroides aislada del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum*; y actividad anti-tuberculosis y anti-malaria del extracto etanólico. *Scientia Et Technica*, 2007, XIII(33), 189-190. ISSN: 0122-1701.
13. Zhang, Y., *et al.* Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. *PLoS ONE*, 2014, 9(8), 1-11. ISSN: 1932-6203.
14. Chen, J.J., *et al.* New coumarin derivatives and other constituents from the stem bark of *Zanthoxylum avicennae*: Effects on Neutrophil Pro-Inflammatory Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 9719-9731. ISSN: 1422-0067.
15. Tine, Y., *et al.* A method for LC-MS/MS profiling of coumarins in *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich and Timler extracts and essential oils. *Molecules*, 2017, 22(174), 13. ISSN: 1420-3049.
16. Ngane, A., *et al.* Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian *Rutaceae*: *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 70(2000), 335-342. ISSN: 0378-8741.
17. Carvajal Rojas, L., *et al.* Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Kkruckoff). *Revista Colombia Forestal*, 2009, 12, 161-170. ISSN: 0120-0739.
18. Navarro, E., *et al.* Identificación y aislamiento de compuestos de *Rumex lunaria* L. Endemismo canario con actividad farmacológica. *Canarias Médica y Quirúrgica*, 2012, 9(27), 53-59. ISSN: 1696-6864.
19. Alphonso, P.; Saraf, A. Chemical profile studies on the secondary metabolites of medicinally important plant *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC using HPTLC. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(3), S1293-S1298. ISSN: 2221-1691.
20. Ramasamy, R.; Nanjundan, J. Antifungal metabolite from *Muntingia calabura* root against early leaf blight of tomato. *Journal of Medicinal Plant Research*, 2014, 8(17), 646-656. ISSN: 1996-0875.
21. Abdelgaleil, S.A., *et al.* Antimicrobial and phytotoxic activities of secondary metabolites from *Haplophyllum tuberculatum* and *Chrysanthemum coronarium*. *South African Journal of Botany*, 2020, 128, 35-41. ISSN: 0254-6299.
22. Naz, S., *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of extracts of in vivo and in vitro grown *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus*) against pathogens. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2015, 28(3), 849-853. ISSN: 1011-601X.
23. Al-Huqail, A., *et al.* Antifungal, antibacterial, and antioxidant activities of *Acacia Saligna* (Labill.) H. L. Wendl. flower extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid compounds. *Molecules*, 2019, 24(4), 700. ISSN: 1420-3049.
24. Sollepura Boregowda, R., *et al.* Antifungal activity of *Eclipta alba* metabolites against *Sorghum* pathogens. *Plants*, 2019, 8(3), 72. ISSN: 2223-7747.

25. Siddiqui, S.A., *et al.* A novel triterpenoid 16-hydroxy betulinic acid isolated from *Mikania cordata* attributes multi-faced pharmacological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(3), 554-562. ISSN: 1319-562X.

26. El-Hefny, M., *et al.* The potential antibacterial and antifungal activities of wood treated with *Withania somnifera* fruit extract, and the phenolic, caffeine, and flavonoid composition of the extract according to HPLC. *Processes*, 2020, 8(1), 113. ISSN: 2227-9717

Conflicto de interés

Los autores expresan que no hay conflictos de intereses en el manuscrito presentado.

Contribución de los autores

Alexander Dueñas Deyá: Realizó el trabajo experimental correspondiente a la preparación de los extractos y aceites esenciales, identificación de los metabolitos y estudios mediante cromatografía de capa delgada. Participó en la evaluación de los resultados y escritura del manuscrito.

Rut Castañeda Bauta: Realizó el trabajo experimental correspondiente a la evaluación de la actividad antifúngica. Participó en la discusión de los resultados y escritura del manuscrito.

Lisbet Martín Cruz: Dirigió lo relacionado con los estudios fitoquímicos y participó en la discusión de los resultados. Realizó las correcciones del manuscrito.

Katia Ojito Ramos: Participó en el diseño y supervisión de la investigación, así como en la discusión de los resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.

José O. Guerra de León: Participó en el diseño y supervisión de la investigación, así como en la discusión de los resultados, revisión y aprobación final del manuscrito.