

Identificación de compuestos con acción antifúngica en extractos de hojas de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng

Antifungal compounds identification in *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng leaf extracts

Dr. C. Yoannia Gretel Pupo Blanco*¹, <http://orcid.org/0000-0003-0050-9934>

Dr. C. Eleuterio Burgueño Tapia², <http://orcid.org/0000-0003-1108-7001>

Dr. C. Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonca³, <http://orcid.org/0000-0001-9511-2942>

Dr. C. Belyani Vargas Batis⁴, <http://orcid.org/0000-0002-6698-1281>

1. Centro de Estudios de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Técnicas. Universidad de Granma, Cuba.
 2. Departamento Química Orgánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
 3. Universidade da Beira Interior. Portugal.
 4. Departamento de Agronomía, Campus Julio Antonio Mella, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
- * **Autor para correspondencia:** correo electrónico: yoagret75@gmail.com

Recibido: 5 de diciembre de 2023

Aprobado: 20 de enero de 2024

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo identificar compuestos con actividad antifúngica frente a *Alternaria porri* presentes en extractos de hojas del orégano francés (*Plectranthus amboinicus*). El extracto crudo fue particionado consecutivamente en hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua destilada estéril. La bioactividad de las fracciones se evaluó mediante las técnicas de dilución en agar y gota colgante para micelio y esporas, respectivamente. De las fracciones más activas, se separaron compuestos con el empleo de cromatografía en columna y cromatografía de capa delgada. Los compuestos aislados fueron analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C. La fracción clorofórmica y la hexánica fueron las más activas, logrando disminuir alrededor del 50 % el crecimiento micelial e inhibir más del 90 % la germinación de los conidios. De estas fracciones se identificaron siete compuestos (flavonoides y terpenoides), de los cuales seis mostraron actividad antifúngica, al igual que el aceite obtenido de la fracción hexánica.

Palabras Claves: *Plectranthus amboinicus*; *Alternaria porri*; flavonoides; terpenoides; antifúngico

ABSTRACT

This work aimed to identify compounds with antifungal activity against *Alternaria porri* present in leaf extracts of French oregano (*Plectranthus amboinicus*). The crude extract was partitioned consecutively into hexane, chloroform, ethyl acetate, and sterile distilled water. The bioactivity of the fractions was evaluated using agar dilution and hanging drop techniques for mycelium and spores, respectively. Compounds were separated from the most active fractions using column chromatography and thin layer chromatography. The isolated compounds were analyzed by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. The chloroformic and hexanic fractions were the most active, managing to reduce mycelial growth by about 50 % and inhibit conidial germination by more than 90 %. From these fractions, seven compounds (flavonoids and terpenoids) were identified, of which six showed antifungal activity, as did the oil obtained from the hexanic fraction.

Keywords: *Plectranthus amboinicus*; *Alternaria porri*; flavonoids; terpenoids antifungal

INTRODUCCIÓN

El orégano francés (*Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng), sinónimos: *Coleus amboinicus* Lour., *Coleus aromaticus* Benth, *Plectranthus aromaticus* (Benth.) Roxb., es ampliamente reconocido por sus propiedades medicinales: antimicrobiano, antiinflamatorio, antidiabético, ansiolítico, antineoplásico, analgésico, útil para el cuidado de la piel, entre otras. Todo ello relacionado con la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, glicósidos, fenoles, taninos y esteroides; resultando muy seguro su uso, ya que apenas se han descrito efectos colaterales.⁽¹⁾

Esta especie es muy apreciada en Cuba como condimento, fitofármaco y suplemento nutricional, expendiéndose en el sistema nacional de farmacias seis productos a base de la misma. También se han evaluado nuevas formulaciones, con probados efectos en el tratamiento de enfermedades respiratorias.⁽²⁾ En el marco de la agricultura urbana, se fomenta su cultivo como planta repelente, por su aporte al incremento de la biodiversidad del agroecosistema y además porque constituye un rubro para la venta en estado fresco.

En la provincia Granma se desarrolla un proyecto para potenciar la cadena de producción del orégano, y uno de sus enfoques es identificar metabolitos de interés para las condiciones del territorio, de manera que se contribuya a promover el cultivo, el procesamiento y agregación de valor. En ese sentido, las aplicaciones en el contexto agrícola de extractos de esta especie, basado en su potencial fitoquímico, han sido menos exploradas. En estudios previos realizados por los autores, se demostró que el extracto etanólico de hojas de orégano reducía de forma significativa el crecimiento micelial y la germinación de las esporas de *Alternaria porri* Ell. y Cif.

Este hongo es el agente causal de la mancha púrpura de la cebolla (*Allium cepa* L), enfermedad que constituye una de las mayores preocupaciones para los productores de esta hortaliza y otras especies del género *Allium* en el mundo, dado por los severos daños que ocasiona al cultivo. Afecta las hojas y los bulbos y puede reducir el rendimiento hasta un 97 %. Los síntomas aparecen entre uno y cuatro días de iniciarse la infección en forma de lesiones que se tornan rojo púrpura. Varios factores como la estación del año, la humedad, temperatura, edad del cultivo y la arquitectura de la planta influyen en la progresión de la enfermedad. Resulta muy severa a alta humedad (80-90 %) y temperaturas en el rango de 25-30 °C.⁽³⁾

Para el control de la mancha púrpura se informa el empleo de diversos fungicidas.⁽⁴⁾ Sin embargo, es

recurrente la alerta acerca de que el uso irracional de compuestos químicos sintéticos no resulta la mejor opción, por lo costoso de los reiterados tratamientos, el negativo impacto ambiental, asociado a diferentes niveles de toxicidad de los mismos, y la ineffectividad a largo plazo, debido a la producción de resistencia en el patógeno. La búsqueda de productos naturales alternativos reviste gran importancia, ya que por su origen son biodegradables y generalmente contienen una mezcla de compuestos bioactivos que operan con diferentes modos de acción.

Este trabajo tuvo como objetivo identificar compuestos relacionados con la actividad antifúngica mostrada por el extracto de hojas del orégano.

MATERIALES Y MÉTODOS

La caracterización química de los extractos se realizó en el Centro de Estudios de Química Aplicada de la Universidad de Granma (UDG) y en el Laboratorio 1 de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), del Instituto Politécnico Nacional de la ciudad de México. Los bioensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la UDG.

Material vegetal

El material se colectó en áreas de la UDG, la identificación fue realizada por el Dr. C. Luis Catasús, depositándose tres muestras en la colección del Laboratorio de Botánica de la misma universidad. Se separaron las hojas, se lavaron con agua corriente y luego con agua destilada estéril a la que se le añadió cuatro gotas de hipoclorito de sodio al 1% por cada litro. Posteriormente fueron colocadas sobre papel absorbente y secadas en estufa (Labolen, SL) a 35 °C.

Al verificarse masa constante, se cuantificó el material deshidratado obtenido a partir de tres muestras de 100 g de material fresco (tomado en balanza analítica Sartorius, China). Luego se fragmentó en molino (IKA MF10 Basic, Alemania) a 5 000 rpm con cribas de 2 mm. El material se conservó en frascos ámbar a temperatura de 28 ± 2 °C, resguardados de la luz hasta su posterior empleo.

Con el propósito de definir caracteres que puedan ser empleados para el control de la calidad del material se realizaron cortes de forma manual en hojas de la planta en estado fresco, las que fueron observadas, al igual que muestras secas y molidas, al microscopio óptico Novel con cámara digital acoplada (Cannon de ocho mega píxel de resolución).

Obtención de los extractos crudos y fracciones

El proceso de extracción se realizó con etanol (Merck) al 70 % (1/10 m/v) por el método de percolación para obtener el extracto crudo (EC) al 10 % en masa. El solvente se eliminó en evaporador rotatorio (HB10 Basic, PC 3001 VARIO PRO, Alemania) a 175 mbar de presión y 40 °C. Los sólidos totales obtenidos se pesaron en balanza analítica (Sartorius, China) por diferencia de masa con el balón vacío que sirvió para la separación de los sólidos.

Con el empleo de un embudo separador de 4 L de capacidad, el EC fue particionado consecutivamente en hexano, cloroformo, acetato de etilo (todos Uni-Chem) y agua destilada estéril. Al igual que para el EC, el solvente de las fracciones fue eliminado por rotoevaporación. Se cuantificaron los sólidos totales obtenidos de 10 g de material seco y en las cuatro fracciones a partir de 10 g de los extractos crudos según describe.⁽⁵⁾

Caracterización de los extractos, aislamiento de los compuestos e identificación espectroscópica

Los extractos crudos fueron caracterizados mediante tamizaje fitoquímico por método descrito⁽⁶⁾ y el pH medido en potenciómetro modelo Hanna pH – 211.

Los compuestos fueron aislados de las fracciones usando las técnicas de cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa delgada (CCD). Para la primera se empleó como soporte sílica gel (100-200 Mesh, Aldrich-Sigma) y para la segunda placa semi-preparativas de sílica gel GF (20 x 20 cm., 1 500 µm de tamaño de partícula, 2 mm de espesor del adsorbente, Analtech). El seguimiento de la separación de los compuestos se llevó a cabo mediante CCD, con la utilización de placas analíticas de sílica gel 60 F 254 (20 x 20 cm; 1 500 µm de tamaño de partícula; 0,2 mm de espesor del adsorbente, Merck) a través de la observación de los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta ($\lambda = 254$ y 365 nm), y luego reveladas con sulfato de cerio amoniacal y calor.

Separación de la fracción clorofórmica

Una muestra de 0,59 g de esta fracción fue sometida a separación en CC; se eluyeron los compuestos utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo (Hx: AcOEt) en proporción 19:1, 9:1, 4:1, 7:3 y AcOEt 100 %, dando lugar a las subfracciones C1-C5 con 21,0; 28,0; 30,0; 37,5 y 180,0 mg, respectivamente. De la C1; 3,1 mg correspondieron al **Compuesto 1**, y 4,2 mg al

Compuesto 2. La C4 fue separada en CCD con una mezcla 6:4 de Hx: AcOEt y se obtuvieron 2,3 mg del **Compuesto 3**, y 4,7 mg de una mezcla de los **Compuestos 4 y 5**. La C5 mediante CC y con el uso de las mezclas 7:3; 6:4 y 1:1 de Hx: AcOEt se logró la separación de otros 15,0 mg del **Compuesto 3**.

Separación de la fracción hexánica

Se procedió de forma similar a lo anteriormente expresado para la separación de 2,0 g de esta fracción obteniéndose 191,0 mg de la H1 (19:1); 212,0 mg de la H2 (9:1); 34,9 mg de la H3 (17:3); 37,3 mg de la H4 (4:1); 82,8 mg de la H5 (7:3) y 36,4 mg de la H6 (AcOEt). La H2 fue sometida a CC para rendir 121,0 mg de una mezcla de los **Compuestos 6 y 7**, los cuales fueron precipitados con acetona (CH_3COCH_3).

De la fracción H1 (19:1) se obtuvo una porción voluminosa de subfracciones de apariencia aceitosa y olor penetrante, considerándose que una parte importante de esta lo conformaron compuestos de sus aceites esenciales. Aunque no fue posible caracterizar sus componentes si fue evaluada su actividad biológica junto a los otros compuestos aislados.

Identificación espectroscópica

Los compuestos separados fueron analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y comparados con los datos de la literatura. Los espectros RMN de ^1H y ^{13}C fueron medidos en un espectrómetro Varian, que operó a 500 y 125 MHz, respectivamente, con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Según la solubilidad de las muestras, se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3) o dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$).

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm alejados del TMS. Los experimentos de RMN en dos dimensiones: Espectroscopía de Coherencia de Quantum Múltiple (HMQC) y Espectroscopía de Coherencia de Quantum Múltiple Heteronuclear (HMBC) fueron llevados a cabo en el mismo espectrómetro, con la utilización de su secuencia de pulsos estándar.

En los datos espectrales de los compuestos aislados se emplea la siguiente leyenda: s, sa, d, dd, ddd, da, t, sept, m para las señales singlete, singlete ancho, doblete, doblete ancho, triplete, septeto y multiplete; *J*: constante de acoplamiento, Q (carbono cuaternario); OMe (OCH_3); Me (CH_3).

Determinación de la contribución a la actividad antifúngica

En los bioensayos, se utilizó un aislamiento de *A. porri* obtenido de condiciones de campo, cuya identificación fue confirmada en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal del Ministerio de la Agricultura. Se comprobó el cumplimiento de los Postulados de Koch, inoculando el aislamiento en hojas sanas de cebolla.

El método empleado para evaluar el efecto de los extractos en el crecimiento micelial fue el de dilución en agar,⁽⁷⁾ montado a través de un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos: tres dosis del extracto (1, 2 y 3 mg mL⁻¹), un control de actividad antifúngica Zineb (etilen-bis-ditiocarbamato de zinc a 0,2 mg mL⁻¹) y un control de ausencia de actividad (medio basal, agar papa dextrosa con N, N-dimetilformamida (DMF) (BDH) al 0,2 % (v/v). Se empleó DMF para lograr la disolución de las sustancias en el medio y por eso fue agregado a los controles en la misma proporción. Se montaron cinco repeticiones (placas Petri). El pH de los extractos y del medio basal sin esterilizar se ajustó a 5,8.

En cada placa fueron colocados discos de 5 mm de diámetro obtenidos del cultivo del aislamiento de ocho días de edad. Las placas se mantuvieron en incubadora a 26 ± 1 °C durante siete días, con un fotoperíodo de 12 h y humedad relativa del 85 %. Al séptimo día se midió el diámetro de las colonias y se calculó el porcentaje de inhibición micelial con respecto al control crecido en el medio basal (1):

$$\text{Inhibición micelial (\%)} = \left(\frac{d_c - d_t}{d_c} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

donde: d_c = diámetro del micelio del control, d_t = diámetro del micelio del tratamiento.

Mediante el método de gota colgante,⁽⁸⁾ con una concentración de 5×10^4 esporas mL⁻¹, se evaluó el efecto de los tratamientos citados anteriormente, y luego el de los compuestos aislados y el aceite obtenido a las dosis (25, 50, 100, 200, 400 µg mL⁻¹) en la germinación de las esporas. En este caso, el control de ausencia de actividad consistió en agua destilada estéril con DMF al 0,2 %.

Los portaobjetos excavados portadores de las muestras

sometidas a los diferentes tratamientos, se colocaron en placas Petri de 90 mm de diámetro, en cuya base se colocó doble papel de filtro (Whatman No. 1), humedecido con agua destilada estéril, a modo de cámara húmeda y se incubaron en condiciones similares a las referidas para el ensayo con micelio. A las 24 h, se evaluó al microscopio óptico Novel (200 X) un total de 100 conidios seleccionados al azar, por cada gota, determinándose el número de ellos que habían germinado (cuando el tubo germinativo fue igual o superior en longitud al conidio). Se calculó el valor de inhibición de la germinación según (2)

$$\text{Inhibición de la germinación (\%)} = \left(\frac{g_c - g_t}{g_c} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

donde: g_c = germinación en el control, g_t = germinación en el tratamiento.

Se estimó la concentración inhibitoria mínima (CIM) como la mínima concentración, a la que no se observó crecimiento (en este caso, germinación) del hongo entre las muestras evaluadas.

Las variables medidas fueron analizadas mediante análisis de varianza de clasificación simple, y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significación de 0,01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas frescas son suculentas, tienen olor penetrante, al tacto se percibe una suave pilosidad por el haz (Fig. 1A) y rugosidad por el envés dado lo saliente de las nervaduras (Fig. 1B). En corte epidérmico (Fig. 1B) se visualiza la presencia de abundantes tricomas pluricelulares y glandulares. Después de molinar el material seco, se conservan como elementos relevantes el olor característico y tricomas completos o fragmentados (Fig. 1C y 1D).

En la Tabla 1 se muestran los resultados del proceso de secado, de extracción y fraccionamiento de los sólidos totales. Debido a la succulencia de las hojas, el orégano presentó una baja producción de masa seca que representó el 5 % de cada 100 g de masa fresca sometida a secado, mientras que se obtuvo un rendimiento alto en sólidos totales, alrededor del 27 %, por cada 10 g de masa sometida a extracción.

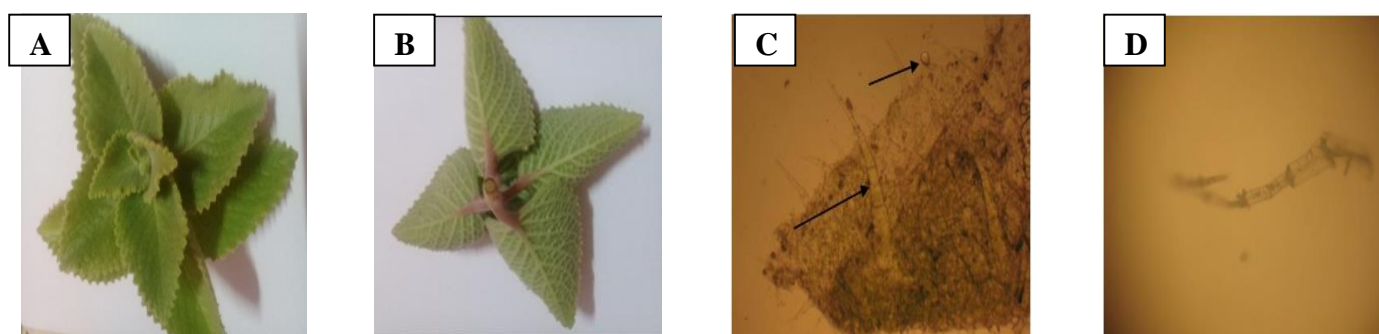


Fig. 1. Caracteres morfológicos de la hoja de orégano. A. Hojas frescas (haz), B. Hojas frescas (envés), C. Pelos pluricelulares y glandulares en corte de tejido epidérmico (200 X), D. Tricoma pluricelular en material seco y molido (250 X).

El extracto crudo presentó un pH ligeramente ácido (6,3) y con el tamizaje fitoquímico (tabla 2) no se encontraron saponinas, resinas, cumarinas y quinonas, mientras que resultaron positivos los ensayos para la detección de flavonoides, alcaloides y terpenos. La inhibición del crecimiento del micelio fue inferior a

la inhibición de la germinación de las esporas (tabla 3), hecho observado también con el fungicida comercial empleado como control positivo. Se presentó actividad antifúngica en todas las fracciones, evidenciando que existen metabolitos activos de diversa polaridad, y como tendencia, cada incremento de la dosis no se correspondió con un incremento en la bioactividad.

Tabla 1. Rendimiento del proceso de secado, extracción y fraccionamiento de los sólidos totales.

Rendimiento en masa seca Media ± desviación estándar	Rendimiento en sólidos totales Media ± desviación estándar	Reparto de los sólidos totales por fracciones	
		Fracciones	Sólidos totales (g) Media ± desviación estándar
5,2 ± 0,2	2,69 ± 0,11	Hexano	0,91 ± 0,02
		Cloroformo	0,50 ± 0,01
		Acetato de etilo	0,49 ± 0,02
		Agua	6,58 ± 0,03

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto crudo de las hojas de orégano.

Ensayos	Metabolitos	Resultados
Precipitado	Resinas	-
Espuma	Saponinas	-
Shinoda	Flavonoides	++
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	++
Baljet	Cumarinas	-
Dragendorff	Alcaloides	+
Borntrager	Quinonas	-

Leyenda: + presencia, ++ moderada, +++abundante, - no encontrado

Otro elemento importante, fue que todas las fracciones a una dosis de 3 mg mL⁻¹ superaron el 90 % de inhibición de la germinación del hongo, lo que denota una acción, principalmente preventiva. De manera integral, se seleccionaron para continuar el fraccionamiento bioguiado, las fracciones obtenidas en hexano y cloroformo, donde a la dosis de 3 mg mL⁻¹ se obtuvieron resultados similares al Zineb para las dos variables evaluadas, dada una reducción de alrededor del 50 % del crecimiento del micelio, y superior al 92 % la inhibición de la germinación de los conidios.

Tabla 3. Efecto de las fracciones del extracto de hojas de *P. amboinicus* en el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *A. porri*.

Tratamientos	Inhibición del micelio (%) Media ± DS
T1. F. hexano 1mg L ⁻¹	39,8 ± 0,7 b
T2. F. hexano 2 mg L ⁻¹	43,2 ± 0,3 b
T3. F. hexano 3 mg L ⁻¹	51,8 ± 0,9 a
T4. F. cloroformo 1mg L ⁻¹	40,5 ± 2,3 b
T5. F. cloroformo 2mg L ⁻¹	41,9 ± 1,1 b
T6. F. cloroformo 3mg L ⁻¹	48,8 ± 0,8 a
T7. F. acetato de etilo 1mg L ⁻¹	23,5 ± 0,9 d
T8. F. acetato de etilo 2mg L ⁻¹	31,2 ± 2,5 c
T9. F. acetato de etilo 3mg L ⁻¹	32,3 ± 1,7 c
T10. F. Acuosa 1mg L ⁻¹	14,1 ± 1,1 e
T11. F. Acuosa 1mg L ⁻¹	21,1 ± 2,5 d
T12. F. Acuosa 1mg L ⁻¹	22,8 ± 2,7 d
T13. Fungicida 0,2 mg mL ⁻¹	48,6 ± 1,1 a
Error estándar 0,8	

En las columnas medias con letras iguales no difieren significativamente para la prueba de Tukey (p<0,01). DS; desviación estándar; F. Fracción.

Los compuestos 1, 3, 4 y 5 aislados de la fracción clorofórmica mostraron datos espectroscópicos de

RMN ^1H que se correspondieron con una estructura flavonoide, dada por la presencia de las señales de protones de dos anillos aromáticos y un singlete de un protón de la estructura propanoide que une a ambos anillos, típico del esqueleto C6-C3-C6 (figura 2). Se observaron dos características comunes de la estructura de los flavonoides y la primera es que ninguno de ellos se presentó como estructura glicosilada. La segunda fue la presencia en el espectro RMN ^1H de señales hacia campo bajo (11-13 ppm), lo que indica despantallamiento de los protones, atribuido para el caso de los flavonoides a la presencia del protón de un grupo hidroxilo unido al carbono 5 (C-5), que participa en fuertes asociaciones por puente de hidrógeno intramolecular.

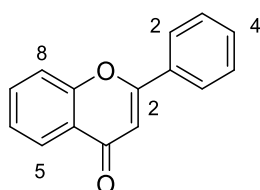


Fig. 2. Estructura flavonoide y esquema de numeración.

Compuesto 1. Sólido amarillo. RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,80 (s, 3H, OMe); 3,99 (s, 3H, OMe); 6,68 (s, 1H, H-8); 6,85 (s, 1H, H-3); 7,02 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7,96 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-2' y H-6'); 12,96 (sa, 1H, OH-5).

La presencia de dos singletes a 3,80 y 3,99 ppm que integran para tres protones cada uno, indica la existencia de dos grupos metoxilo. El singlete a 6,85 ppm establece la presencia del anillo B de la flavona y la no existencia de sustitución en el C-3. Los dos dobletes ubicados a 6,96 y 7,96 ppm con una constante de acoplamiento de 9,0 Hz (J *orto*) apuntan a que el segundo anillo aromático (anillo C) está *para*-sustituido (sistema AA'BB'); en este caso con un hidroxilo no observado en el espectro, debido a su intercambiabilidad.

Se identificó por comparación con la literatura⁽⁹⁾ el compuesto 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina), como se muestra en la figura 3. El aislamiento de este compuesto del extracto de hojas de *P. amboinicus* ha sido informado por otros autores.⁽¹⁰⁾

Compuesto 3. Sólido amarillo. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 3,92 (s, 3H, OMe); 3,97 (s, 3H, OMe); 5,82 (s, 1H, OH-7); 6,54 (s, 1H, H-3); 6,58 (s, 1H, H-8); 6,95 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-3' y H-5'); 7,80 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-2' y H-6'); 12,70 (s, 1H, OH-5).

Este compuesto mostró el mismo patrón de señales que el Compuesto 1, lo que evidencia una similitud en la estructura, pero la diferencia en los desplazamientos sugiere que los sustituyentes están intercambiados de

lugar. Los desplazamientos de los dos dobletes del anillo C para campos más altos pueden deberse, en este caso, a un grupo metoxilo. En el anillo A, además del otro metoxilo y del OH en la posición 5, puede estar presente otro hidroxilo, para que se observen dos singletes debidos a los protones del anillo aromático A y de la estructura propanoide (anillo B). Los datos espectrales y la estructura propuesta coincidieron con los descritos para el 5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (pectolinaringenina), según la figura 4.⁽¹¹⁾

Compuesto 4. Sólido cristalino amarillo. Este mostró similitud con los compuestos 1 y 3 en el patrón del espectro RMN ^1H ; pero aquí se observan tres singletes entre 3,90 y 3,97 ppm con integral de tres protones cada uno y en el espectro RMN ^{13}C , de las 18 señales, tres pertenecen a carbonos sp^3 conectados a oxígeno (55,4; 56,2; 60,8 ppm), lo que confirmó la existencia de tres grupos metoxilo, dos de ellos ubicados sobre el anillo A, comprobado a través de las correlaciones observadas en el experimento HMBC (tabla 4), con el que se logró la asignación inequívoca de todas las señales.

Tabla 4. Datos espectroscópicos del Compuesto 4. RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC (CDCl_3)

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	Tipo	HSQC	HMBC
2	163,9	Q		
3	103,9	CH	6,59 (s)	2, 4, 10, 1'
4	182,6	Q		
5	153,0	Q		
6	132,6	Q		
7	158,7	Q		
8	90,5	CH	6,55 (s)	6, 7, 9, 10
9	153,1	Q		
10	106,1	Q		
1'	123,6	Q		
2'	127,9	CH	7,85 (dd, $J = 9,0$ y 2,1 Hz)	4', 6'
3'	114,5	CH	7,02 (dd, $J = 9,0$ y 2,1 Hz)	1', 4', 5'
4'	162,6	Q		
5'	114,5	CH	7,02 (dd, $J = 9,0$ y 2,1 Hz)	1', 3', 4'
6'	127,9	CH	7,85 (dd, $J = 9,0$ y 2,1 Hz)	4', 6'
6-OMe	60,8	CH ₃	3,93 (s)	6
7-OMe	56,2	CH ₃	3,97 (s)	7
4'-OMe	55,4	CH ₃	3,90 (s)	4'
5-OH			12,76 (sa)	5, 6, 10

El anillo aromático C, al igual que los compuestos anteriores, presentó un sistema AA'BB' de acoplamiento que corresponde a un sistema *para*-sustituido. Los otros singletes corresponden a un protón del anillo A y al protón de C-3. Los datos anteriormente citados se corresponden con la estructura de la 5-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (salvigenina), descrito en la figura 5, según autor.⁽¹²⁾ Este compuesto fue aislado de *P. amboinicus* por.⁽¹⁰⁾

Compuesto 5. Sólido amarillo. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 3,89 (s, 3H, OMe); 3,93 (s, 3H, OMe); 4,09 (s, 3H, OMe); 6,63 (s, 1H, H-3); 6,98 (d, *J* = 8,5, 2H, H-3' y H-5'); 7,89 (d, *J* = 8,5, 2H, H-2' y H-6'); 12,88 (sa, 1H, OH-5).

La presencia de señales de bases de oxígeno, con integración para tres protones cada una, correspondientes a tres grupos metoxilo, dos dobles con *J* = 9,0 Hz indica la presencia de un grupo *p*-hidroxifenil, sumado a la señal del hidroxilo puenteado y la presencia de otro singlete a 6,63 ppm apunta a la estructura de una dihidroxi-trimetoxiflavona. La comparación con los datos referidos en la literatura para compuestos que comparten estas características se llegó a la conclusión de que el Compuesto 5 era 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona (xanthomicrol), como se muestra en la figura 6,⁽¹³⁾ aislado por estos autores de otras especies de la familia *Lamiaceae*.

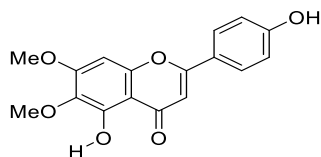


Fig. 3. Estructura del Compuesto 1. (cirsimaritina)

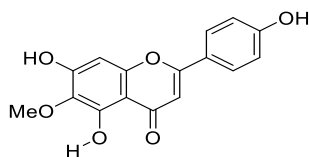


Fig. 4. Estructura del Compuesto 3 (pectolinaringenina)

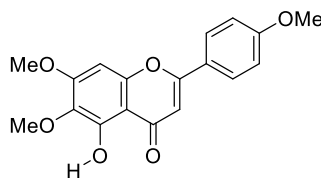


Fig. 5. Estructura del Compuesto 4 (salvigenina)

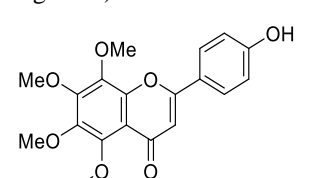


Fig. 6. Estructura del Compuesto 6 (xanthomicrol)

Los compuestos 2, 6 y 7 se correspondieron con estructuras de tipo terpenoide, para los cuales se empleó el esquema de numeración que se presenta en las figuras 7 y 8.

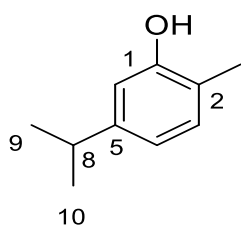


Fig. 7. Estructura del monoterpene

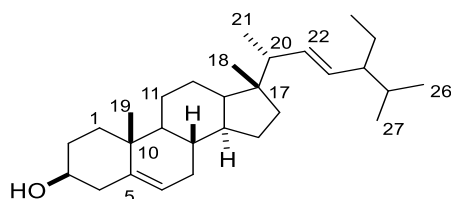


Fig. 8. Estructura de fitoesteroles

Compuesto 2. Semisólido amarillo. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,20 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H, Me-9 y Me-10); 2,18 (s, 3H,

Me-7); 2,80 (sept, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-8); 4,61 (sa, 1H, OH-1); 6,66 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H-6); 6,72 (dd, *J* = 7,5 y 1,5 Hz, 1H, H-4); 7,03 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-3).

Se observó un singlete ancho a 4,60 ppm de un protón de hidroxilo, unido a un anillo bencénico y tres señales de protones aromáticos (6,66 (d); 6,72 (dd) y 7,03 ppm (d). Por las características de estas señales, la sustitución debe tener un carácter 1,2,5, que permite el acoplamiento 3-4 y 4-6. Los sustituyentes corresponden a un grupo metilo, cuyos protones se expresan como un singlete a 2,18 ppm y un grupo isopropilo. Este último se determina por la existencia de un multiplete a 2,80 ppm, con integración para un protón, acoplado con un doblete a 1,20 ppm con integración para seis protones. Con estos datos y la consulta de la literatura,⁽¹⁰⁾ se identificó al carvacrol (figura 9). Diversos autores refieren la existencia de este compuesto en *P.amboinicus*.^(14,15)

Compuesto 6. Sólido cristalino sin color. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,68 (s, 3H, Me-18); 0,81 (s, 3H, Me-26); 0,82 (s, 3H, Me-27); 0,84 (s, 3H, Me-29); 0,92 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H, Me-21); 1,01 (s, 3H, Me-19); 3,52 (m, 1H, H-3); 5,35 (m, 1H, H-6).

RMN ¹³C (CDCl₃)δ: 37,3 (C-1); 31,7 (C-2); 71,8 (C-3); 42,2 (C-4); 140,5 (C-5); 121,7 (C-6); 31,9 (C-7); 31,9 (C-8); 50,2 (C-9); 36,5 (C-10); 21,1(C-11); 39,8 (C-12); 42,3 (C-13); 56,8 (C-14); 24,3 (C-15); 28,3 (C-16); 56,1 (C-17); 11,8 (C-18); 19,8 (C-19); 36,0(C-20); 18,8(C-21); 34,0 (C-22); 26,1 (C-23); 45,8 (C-24); 29,2 (C-25); 19,0 (C-26); 19,4 (C-27); 23,1 (C-28); 12,0 (C-29).

Las seis señales entre 0,6 y 1,0 ppm, cada una con integración para tres protones, indican la presencia de seis grupos metilo. El multiplete a 5,35 ppm con integración para 1 H denotó la presencia de un protón vinílico. El quintuplete a 3,52 ppm, por su acoplamiento, evidenció la existencia de una base de oxígeno con cuatro vecinos. El espectro de carbono confirmó estos datos, al aparecer señales de carbono con hibridación *sp*² y de bases de oxígeno. De ahí que, en la estructura, aparecen un grupo hidroxilo, un doble enlace y seis grupos metilos. Por la cantidad de protones unidos a carbono *sp*³, además de las características del extracto sometido a separación (hexánico), donde se encuentran compuestos de naturaleza lipofílica, se pensó en una sustancia de naturaleza esteroideal y por comparación con datos de la literatura,⁽¹⁴⁾ se llegó a la estructura del Estigmasta-5-en-3-ol, (3β) β-sitosterol (figura 10).

Compuesto 7. Sólido cristalino sin color. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,68 (s, 3H, Me-18); 0,81 (sa, 3H, Me-26); 0,82 (s, 3H, Me-27); 0,84 (s, 3H, Me-29); 0,92 (d, *J* =

6,7 Hz, 3H, Me-21); 1,01 (s, 3H, Me-19); 3,52 (m, 1H, H-3); 5,35 (m, 1H, H-6); 5,01 (dd, $J = 15,0$ y $8,4$ Hz, 1H, H-23); 5,12 (dd, $J = 15,0$ y $8,4$ Hz, 1H, H-22).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 37,1 (C-1); 31,5 (C-2); 71,7 (C-3); 42,1 (C-4); 140,6 (C-5); 121,6 (C-6); 31,5 (C-7); 31,7 (C-8); 50,0 (C-9); 36,4 (C-10); 21,1 (C-11); 39,5 (C-12); 42,1 (C-13); 56,7 (C-14); 24,2 (C-15); 28,8 (C-16); 55,8 (C-17); 12,1 (C-18); 18,8 (C-19); 19,8 (C-20); 40,4 (C-20); 20,9 (C-21); 138,2 (C-22); 129,1 (C-23); 51,1 (C-24); 31,7 (C-25); 20,9 (C-26); 19,3 (C-27); 25,3 (C-28); 11,9 (C-29).

Este se obtuvo en una mezcla 1:1 con el β -sitosterol en el extracto hexánico. A diferencia del espectro del

compuesto anterior, se observaron dos señales a 5,01 y 5,12 ppm que indican la existencia de otros dos protones vinílicos, aspecto confirmado con la existencia de señales de carbono con hibridación sp^2 en el espectro RMN ^{13}C . Sin embargo, las señales que debían integrar para un protón lo hacían para dos, y las que debían integrar para tres protones lo hacían al doble, lo que evidencia la existencia de dos compuestos con estructura similar en igual proporción. Los datos anteriores permitieron, junto a la consulta de la literatura ⁽¹⁶⁾ confirmar el aislamiento del Estigmasta-5,22-dien-3-ol, (3 β , 22 E) estigmasterol (figura 11).

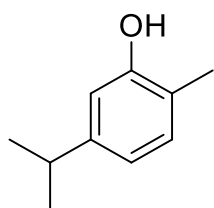


Fig. 9. Estructura del Compuesto 2 (carvacrol)

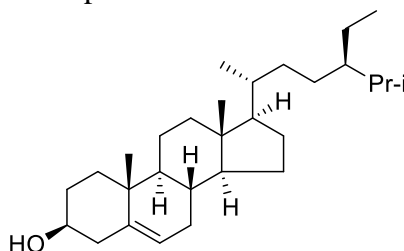


Fig.10. Estructura del Compuesto 6 (β -sitosterol)

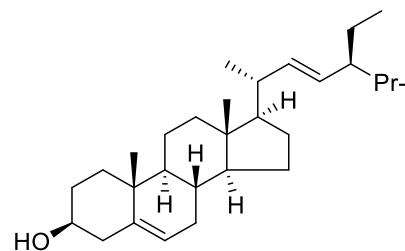


Fig.11. Estructura del Compuesto 7 (estigmasterol)

El DMSO a 0,2 % (v/v) no provocó cambios significativos en el porcentaje de germinación de los conidios comparado con lo sucedido en agua destilada estéril, por lo que se asume que los resultados observados se deben fundamentalmente a los

compuestos evaluados. La relación concentración de los metabolitos bioactivos vs. inhibición de la germinación, mostrados en la figura 12, aportó datos interesantes.

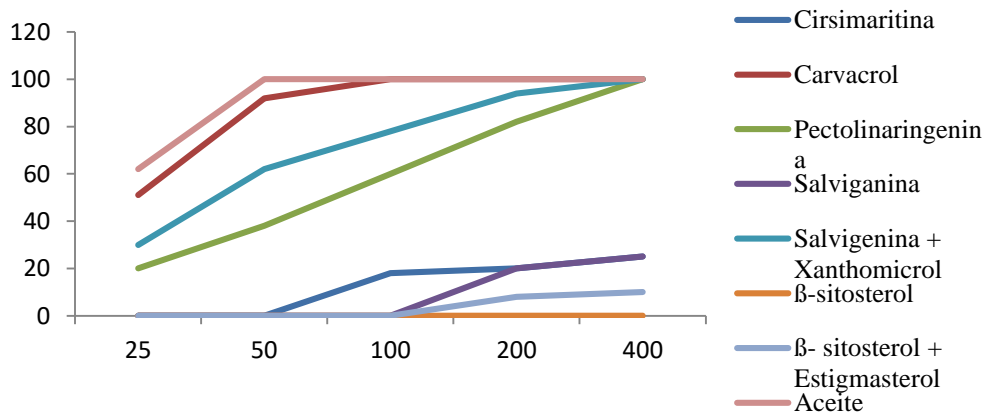


Fig. 12. Efecto de los metabolitos aislados en la germinación de los conidios de *A. porri*.

Salvigenina fue el flavonoide menos activo, pues solo mostró actividad a partir de los $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que cirsimaritina lo hizo con la mitad de esta concentración. No obstante, a 200 y $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, fue semejante la inhibición de la germinación provocada por estos compuestos, 20 y 25 %, respectivamente. Este hecho concuerda, con la observación de que un incremento de la concentración, no siempre se correspondió con un aumento de la bioactividad.

La mezcla de salvigenina con xanthomicrol mejoró, sustancialmente, la actividad mostrada por la primera, ya que se observó bioactividad desde la dosis más baja evaluada, con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ se superó el 50 % de inhibición de la germinación y a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ se alcanzó la CIM de *A. porri*. Lo anterior permite suponer, que el xanthomicrol es más activo que la salvigenina; y que estos flavonoides poseen una acción conjunta de tipo sinérgico.

β -sitosterol no mostró actividad antifúngica a ninguna de las dosis evaluadas. Sin embargo, la mezcla con estigmasterol a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ alcanzó un 10 % de inhibición de las esporas. Esto sugiere que el estigmasterol presenta actividad o que existe, al igual que en la mezcla de xanthomicrol y salvigenina, un efecto sinérgico entre los componentes.

Los compuestos más activos fueron el carvacrol y el aceite obtenido de la fracción hexánica. El carvacrol redujo completamente la capacidad de germinación de las esporas a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el aceite mostró un valor de CIM de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Teniendo en cuenta que el Zineb a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) inhibió el 94,8 % de la germinación de los conidios de *A. porri*, entonces se puede plantear que el carvacrol y el aceite fueron superiores al fungicida comercial. Dada la posibilidad de contar con patrones de carvacrol, el hecho de que se confirma su aislamiento por diversos autores, este pudiera ser utilizado como compuesto de referencia en la elaboración y control de un producto fungicida a base del extracto de hojas de *P. amboinicus*.

Los resultados demuestran que, en la fracción clorofórmica se presentaron varios compuestos con actividad antifúngica (flavonoides y carvacrol), y en la hexánica se concentró una parte del aceite esencial de elevado efecto inhibitorio del hongo. A estas observaciones se añade que dichas fracciones comparten metabolitos comunes, ya que por su naturaleza no se logra su separación independiente en una sola fracción. El análisis de los espectros de algunas mezclas durante la separación permitió discernir, por ejemplo, la presencia de señales de flavonoides que se mantuvieron en la fracción hexánica, y como se refirió anteriormente, el carvacrol ha sido identificado como parte del aceite esencial de esta planta.

Los flavonoides identificados son considerados externos, no vacuolares.^(9,10,17) Se plantea que los flavonoides superficiales tienden a ser lipofílicos, mientras que los vacuolares tienen una mayor polaridad. Los terpenoides también tienen naturaleza lipofílica y a menudo todos estos compuestos forman parte de los aceites que se concentran en los pelos glandulares que cubren la superficie vegetal.⁽¹⁸⁾ Esta característica de los flavonoides superficiales y de los terpenoides explica que se hayan concentrado, en mayor proporción, durante el fraccionamiento de los extractos, en los disolventes hexano y cloroformo y confirma la importancia de los tricomas observados en el material fresco y procesado.

Los flavonoides aquí citados como componentes del extracto de orégano han sido evaluados,

fundamentalmente, por su potencial terapéutico.^(18,19,20) Se ha informado la actividad de las flavonas trifolina y 4',7-dimetoxiflavona contra varias especies de *Alternaria* como *A. alternata*, *A. melongena*, *A. brassicicola* y *A. brassicae*.⁽²¹⁾ El carvacrol ha sido relacionado con las propiedades antisépticas que posee el aceite esencial del orégano.⁽¹⁶⁾ Una mezcla de fitoesteroles y flavonoides de las flores de *Tridax procumbens* inhibieron el 100 % de la germinación de las esporas de *Fusarium oxysporum*;⁽²²⁾ por lo que los resultados de este trabajo concuerdan con lo informado anteriormente, y reafirman la importancia de flavonoides y terpenoides en la actividad antifúngica mostrada por el extracto de hojas de *P. amboinicus*.

CONCLUSIONES

La fracción clorofórmica y la hexánica fueron las más activas, denotando que los compuestos con actividad antifúngica presentan de media a baja polaridad. Se logró disminuir cerca del 50 % el crecimiento micelial e inhibir más del 90 % la germinación de los conidios. De las fracciones promisorias se identificaron compuestos de estructura flavonoide y terpenoide, de los cuales seis mostraron actividad contra *A. porri*, al igual que el aceite obtenido de la fracción hexánica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUMAR, P.; SANGAM y KUMAR, N. "Plectranthus amboinicus: A review on its pharmacological and pharmacognostical studies". *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2020, **10** (2), 55–62. DOI: <http://doi.org/10.5455/ajpbp.20190928091007>
2. RODRÍGUEZ, Y.; JIMÉNEZ, D.; RODRÍGUEZ, J.; GRACIAL, M., FESTARY, T.; LUACES, M., GÓMEZ, J.; TUERO, A. y GARCÍA, I. "Efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (French oregano) tablets in patients with common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled study". *Bionatura*. 2016, **1** (4), 177-196. <http://www.revistabionatura.com>
3. DAR, A.; SHARMA, S.; MAHAJAN, R.; MUSHTAQ, M.; SALATHIA, A.; AHAMAD, S. y SHARMA, J. "Overview of purple blotch disease and understanding its management through chemical, biological and genetic approaches". *Journal of Integrative Agriculture*. 2020, **19** (12), 3013–3024. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63285-3
4. Gore, P.; Ingle, R. y Rakhorde, P- "Management of Purple blotch of Onion caused by *Alternaria porri*"

- Journal of Plant Disease Sciences*. 2021, **16** (1), 47-51. ISSN: 10976-2388
5. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (ONN). Norma cubana 26-94. Determinación de residuo de evaporación. Método de ensayo. La Habana, Cuba.1994.
6. ARONÉS, M.; CÁRDENAS, E.; LUNA, H.; BARBARÁN, S. y GÓMEZ, M. “Tamizaje fitoquímico, contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de trece plantas medicinales de los afloramientos rocosos del bosque de piedras de huaraca en Perú”. *Rev Soc Quím Perú*. 2022, **88** (1), 165-179. DOI: <https://doi.org/10.37761/rsqp.v88i2.388>
7. RAHMAN, A.; IQBAL - CHOUDARY, M. y THOMSON, W. *Bioassay techniques for drug development*. First Edition, USA, Harwood Academic Publisher, 2001. ISBN 90-5823-051-1. <http://www.gbhap.com>
8. KUMARESAN, K.; SUBRAMANIAN, M.; VAITHIYANATAN, S.; SEVAGAPERUMAL, N.; GOPAL, C. y DILANTHA, G. “Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode”. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2005, **38** (1), 69–76. DOI: <https://doi.org/10.1080/0323540040008408>
9. MESQUITA, A.; CORRÊA, D.; PÁDUA, A.; GUEDES, M. y GOTTIEB, O. (1986). “Flavonoid from four Compositae species”. *Phytochemistry*. 1986, **25** (5), 1255-1256. DOI: [https://doi.org/10.1016/50031-9422\(00\)81599-X](https://doi.org/10.1016/50031-9422(00)81599-X)
10. RGASA, C.; PENDON, Z.; SANGALANG, V. y RIDEOUT, J. “Antimicrobial flavones from *Coleus amboinicus*”. *Philippine Journal of Science*. 1999, **128** (4), 347-351. ISSN 0031-7683
11. LIU, S.; ZHANG, J.; LI, D.; LIU, W.; LUO, X.; ZHANG, R.; LI, L. y ZHAO, J. “Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* D.C.” *Natural Product Research*. 2007, **21** (10), 915 -922. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410701494686>
12. SAEIDNIA, S.; MORADI - AFRAPOLO, F.; GOHARI, A. y MALMIR, M. “Cytotoxic flavonoids from *Achillea talagonica* Bioss. “*Journal of Medicinal Plants*. 2009, **8** (5), 52-56. DOI: <https://doi.org/20.1001.1.2717204.2009.8.29.28.9>
13. SAHÍN, P.; EZER, N. y ÇALIS, J. “Terpene and phenolic compounds from *Sideritis stricta*”. *Turkish Journal of Chemistry*. 2006, **30**, 495-504. DOI: <https://journals.tubitak.gov.tr/chem/vol30/iss4/10>
14. HASSANI, MS.; ZAINATI, I.; ZRIRA, S.; MAHDI, S. y OUKESSOU, M. “Chemical composition and antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng essential oil from Archipelago of Comoros”. *J Essent Oil Bear Plants*. 2012, **15** (4), 637–44. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644098>
15. ARUMUGAM, G.; SWAMY, M. y SINNIHAH, U. “*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance.” *Molecules*. 2016, **21**, 369. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
16. XIE, D.; WANG, L.; YE, H. y LI, G. “Isolation and production of artemisin and stigmaterol in hairy root cultures of *Artemisia annua*”. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 2000, **63**, 161-166. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006438919841>
17. SHARP, H.; BARTHOLOMEU, B.; BRIGTH, C.; LATIF, Z.; SACKER, S. y NASH, R. “6-oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae)”. *Biochemical Systematic and Ecology*. 2001, **29** (1), 105-107. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00019-3)
18. SEN, A.; TURAN, S.; BITIS, L. “Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from endemic *Centurea kilaea*”. *Pharmaceutical Biology*. 2016, **55** (1), 541-546. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1255980>
19. ZAMANI, S.; HOSSIENI, M.; ETEBARI, M.; SALEHIAN, P.; EBRAHIMI, S. “Pharmacokinetics of calycopterin and xanthmicrol, two polymethoxylated hydroxyflavones with anti-angiogenic activities from *Dracocephalum kotschy* Bioss”. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **24** (22). DOI <https://doi.org/10.1186/s40199-016-0161-x>
20. LEE, D.; KIM, K.; LEE, J., HWANG, G.; LEE, H.; HAHM, D.; HUH, C.; LEE, S.; KANG, K. “Protective effect of cirsimaritin against streptozotocin-induced apoptosis in pancreatic beta cells”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017, **69** (7), 875-883. DOI: <https://doi.org/10.1111/jphp.12719>
21. LI, S.; ZHIZHEN, Z.; CAIN, A.; WANG, B.; LONG, M. y TAYLOR, J. “Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53** (1), 32-37. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0484780>
22. SHARMA, B. y KUMAR, P. “In vitro antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*”. *Internacional Journal of Green Pharmacy*. 2009, (January – March), 63-65. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-8258.49377>

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

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

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Dr. C. Yoannia Gretel Pupo Blanco: Participó en el diseño general, la colecta y procesamiento del material vegetal, el aislamiento de compuestos, la realización de bioensayos, la redacción y aprobación del manuscrito final.

Dr. C. Eleuterio Burgueño Tapia: Contribuyó con el diseño general, el esquema de separación de las fracciones, la identificación de los compuestos, la revisión y aprobación del manuscrito final.

Dr. C. Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonca: Contribuyó con el diseño general, la selección del método de obtención y caracterización del extracto crudo y su fraccionamiento, la identificación de los compuestos, redacción y aprobación del manuscrito final.

Dr. C. Belyani Vargas Batis: Participó en la realización de los bioensayos y aprobación del manuscrito final.