

Desarrollo SEIPASA para la fabricación de biopesticidas.

Obtención de un biofungicida botánico

Francisco Espinosa, Javier Nacher, Jordi Espuny y Puig Mora (Departamento de I+D de SEIPASA).

INTRODUCCIÓN

El uso y aplicación de productos de origen botánico con propiedades antifúngicas representa una atractiva y eficiente alternativa para inhibir el crecimiento de enfermedades fúngicas. Estos compuestos naturales que se originan en las plantas, principalmente como resultado del metabolismo secundario, son sin duda los de mayor interés farmacológico y los que van a constituir los principios activos de la droga [1].

Los principios activos derivados del metabolismo secundario engloban una gran variedad de compuestos químicos distintos, cuya presencia a lo largo de los taxones botánicos varía enormemente, así, existen familias especialmente ricas en determinados compuestos como taninos (Rosaceae), otras con abundancia en lactonas sesquiterpénicas (Compositae) y otras muchas cuya singularidad química es manifiesta [2].

Los grupos principales con actividad antifúngica son terpenos, taninos, flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, lecitina, polipéptidos [1]. Estos grupos de compuestos son importantes para la fisiología de las plantas, confiriendo resistencia contra los microorganismos y ayudando a preservar la integridad de la planta frente a la exposición continua a factores de estrés biótico y abiótico, tales como la radiación ultravioleta, las altas temperaturas o la deshidratación.

En el mercado podemos encontrar compuestos fitoquímicos, tales como las piretrinas o la azadiractina, que se definen por su estructura química y son identificados mediante análisis químico. A diferencia de estos, los extractos botánicos con aplicación fitoprotectora tienen una composición química variable y por consiguiente, deben ser definidos por parámetros distintos. De este modo, dos factores son de importancia fundamental en la industrialización de este tipo de productos, la calidad de la materia prima utilizada y la elección del solvente de extracción.

En relación a la materia prima y siendo conscientes de que la presencia o ausencia de determinados principios activos varía dentro de las distintas familias botánicas (quimiotaxonomía), en SEIPASA sabemos que existen distintos factores extrínsecos que influyen en las variaciones de la composición química de la materia prima utilizada, ya que ésta cambia también con el lugar donde fue realizada la recolección, las condiciones climáticas, el suelo y la época del año, así como las diferentes técnicas de cultivo [3]. Por lo tanto, el material vegetal utilizado para la realización del extracto, debe ser sometido a una serie de ensayos botánicos y físico-químicos con el fin de normalizar la droga vegetal a utilizar.

Los ensayos botánicos realizados sobre el material vegetal a extraer podemos dividirlos en macroscópicos y microscópicos. Los primeros consisten en la observación directa por lupa, la comprobación morfológica del material extraño y su porcentaje, así como ensayos organolépticos; los ensayos microscópicos consisten en la observación microscópica de cortes histológicos y de droga pulverizada para analizar los elementos constitutivos. Los ensayos físico-químicos se clasifi-

can en cualitativos y cuantitativos. Los cualitativos consisten en ensayos de solubilidad en diferentes solventes, reacciones de coloración y precipitación características de determinados grupos de principios activos, así como valoraciones específicas para un determinado principio activo presente en la droga usando técnicas cromatográficas (CCF). Los ensayos cuantitativos consisten en evaluar la humedad de la droga, el contenido en cenizas, contaminación microbiológica, así como valoraciones de determinados principios activos por HPLC y CG.

El solvente utilizado en el proceso extractivo es, junto con la materia prima, capital en la composición y características físico-químicas del extracto obtenido. El primer paso consiste en definir la selectividad del solvente a utilizar y la polaridad de los compuestos químicos a extraer, la capacidad de asociación entre el solvente y el principio activo a extraer puede expresarse en términos de constante dieléctrica, cuanto más polar sea un solvente mayor será su constante dieléctrica. Los compuestos ionizables y altamente polares se extraen en solventes de elevada constante dieléctrica, al igual que los compuestos apolares se extraen con solventes de baja constante dieléctrica.

Otras variables que intervienen, independientemente del tipo de extracto, en la composición final son el estado de división de la droga, la temperatura, el pH y el tiempo de extracción.

Utilizando estas características de polaridad y ácido-base de los compuestos a extraer (extracción selectiva, L-L), junto a una posterior concentración en rotavapor, el departamento de I+D+i de SEIPASA ha obtenido un extracto de origen botánico, cuya composición se caracteriza por una elevada concentración de compuestos del metabolismo secundario, principalmente compuestos fenólicos y más concretamente fenoles simples, taninos y flavonoides. Estos compuestos presentan una elevada diversidad estructural, siendo el elemento fundamental que los caracteriza, la presencia de al menos un núcleo bencénico que contiene como mínimo un grupo hidroxílico, libre o formando parte de otra función: éter, éster, heterósido [4].

En el caso de los compuestos fenólicos simples los lugares y el número de grupos hidroxilo en el anillo parece que están directamente relacionados con la toxicidad frente a microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado

a una mayor toxicidad. El mecanismo de acción está relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas [5]. Los taninos constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se dividen en hidrolizables y condensados. Poseen una alta reactividad por intermedio de interacciones hidrófobas y de puentes de hidrógeno entre los agrupamientos fenólicos de los taninos y las proteínas [6]. Se han descrito más de 30 taninos distintos que pueden inhibir hongos y bacterias. Los **flavonoides** son un grupo amplio de moléculas cuyo núcleo básico es la fenilbenzopirona. En el caso de las flavonas su actividad antimicrobiana probablemente se debe a su capacidad de formación de complejos con las proteínas de la pared bacteriana [7].

Dentro de los ensayos a realizar del citado extracto frente a diversas problemáticas que afectan a los cultivos, el Departamento de I+D de SEIPASA decidió ensayar frente a *Botrytis Cinerea*. Se trata de un hongo fitopatógeno que ataca flores, frutos, hojas y tallos de más de 200 especies de plantas, causando enfermedades previas y posteriores a la cosecha [8]. El uso continuo de fungicidas comerciales tales como dicarboximidazoles ha provocado la aparición de cepas de *B. cinerea* altamente resistentes [9]. Sin embargo, algunos productos naturales aislados de plantas poseen actividad antifúngica y pueden ser una buena alternativa a los fungicidas comerciales [10].

A continuación se expone un ensayo válido para el registro fitosanitario realizado a través de una empresa oficial acreditada, dentro de la estrategia de SEIPASA para la obtención de una nueva generación de fitosanitarios.

Materiales y métodos

Objetivo

Estudiar la eficacia y selectividad del Producto S (extracto vegetal en desarrollo) en el control de la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) en cultivo de uva de vinificación y comparándolo con una referencia química (Cyprodinil 37,5% + Fluodioxynil 25% WG w/w).

Localización

El ensayo se realizó durante el verano de 2011 en una parcela comercial situada en Sanlúcar de Barrameda (Cádiz).

Condiciones de cultivo

La parcela escogida para el ensayo presentaba un histórico de contaminación por dicha enfermedad

Tratamiento		Formulación		Dosis	Ingrediente activo	Código Aplicación
Nº	Nombre	Conc.	Tipo			
1	No tratado	-	-	-	-	-
2	Producto S	15% de moléculas vegetales activas	SL	0,3 l/ha	45 g ia/ha	ABCDE (intervalo entre 7-10 días)
3	Ref. Química	37,5% Cyprodinil + 25% Fluodioxynil	WG	0,75 kg/ha	468 g ia/ha	AB (de acuerdo a etiqueta)

Tabla 1. Aplicaciones.

Tratamientos	% Incidencia		% Eficacia (Abbott)	
	7 DA-D	8 DA-E	7 DA-D	8 DA-E
1. No tratado	12,50 a	26,50 a	-	-
2. Producto S	2,00 b	5,50 b	84,0	79,2
3. Ref. Química	1,50 b	4,00 b	88,0	84,9

Tabla 2. Promedio de incidencia y eficacia por tratamiento.

Tratamientos	% Severidad		% Eficacia (Abbott)	
	7 DA-D	8 DA-E	7 DA-D	8 DA-E
1. No tratado	0,37 a	3,90 a	-	-
2. Producto S	0,04 b	0,31 b	89,0	92,2
3. Ref. Química	0,03 b	0,11 b	93,2	97,2

Tabla 3. Promedio de severidad y eficacia por tratamiento.

que afectaba considerablemente el desarrollo y rendimiento de los racimos de uva.

- Cultivo: Uva cv. Palomino. Cepas de 10 años de edad.
- Tipo de cultivo: al aire libre.
- Plantas/ha: 4.132 (2,2 m x 1,1 m).

Diseño del ensayo

Se realizó un diseño experimental en bloques al azar con cuatro repeticiones. Siguiendo las guías EPP0 que establecen aspectos tales como la distribución de los tratamientos, la evaluación de eficacia, la evaluación concreta del patógeno, los efectos de fitotoxicidad, etc.

Cada una de las 12 parcelas experimentales tenía una superficie de 14,52 m² (2,2 m x 6,6 m), y en ellas se distribuían aleatoriamente los productos a comparar.

Tratamientos y aplicación.

Los 3 tratamientos a comparar así como sus dosis se explicitan en la Tabla 1. Se realizaron con una

mochila a motor Maruyama, con las boquillas y la presión de trabajo adecuadas al cultivo y patógeno y con un volumen medio de caldo de 500 l/ha.

Evaluaciones

Las evaluaciones consistieron en cuantificar la incidencia y severidad del ataque provocado por *B. cinerea*. Se realizaron 2 evaluaciones midiendo la incidencia y severidad en 50 racimos de uva de cada parcela experimental y en cada evaluación.

Entendiendo por:

- **Incidencia:** Porcentaje de racimos afectados en cada tratamiento.
- **Severidad:** Porcentaje de racimo afectado en cada tratamiento.

La primera evaluación se hizo transcurridos 7 días de la 4ª pulverización con el **Producto S**. Y pasados 22 días de la última aplicación con el químico

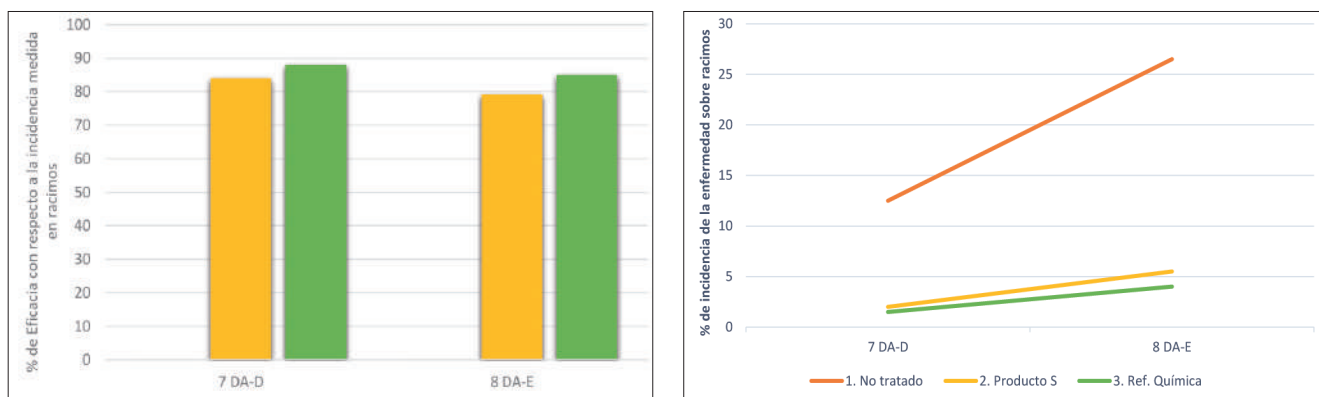


Figura 1. Gráficas de la evolución de la incidencia en los racimos de uva y de la eficacia obtenida respecto al no tratado.

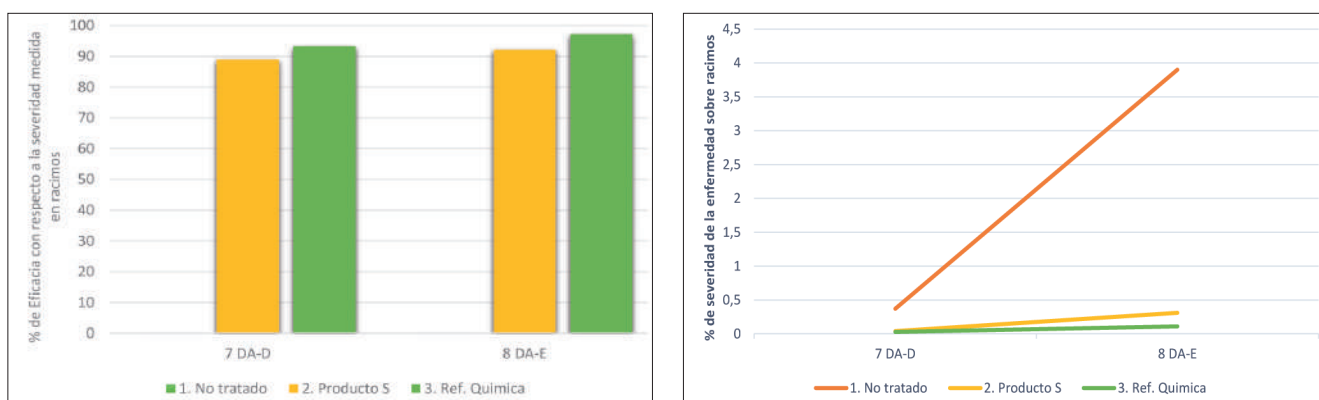


Figura 2. Gráficas de la evolución de la severidad en los racimos de uva y de la eficacia obtenida respecto al no tratado.

mico de referencia. La segunda evaluación se realizó 8 días después de la primera.

Resultados y discusión

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados numéricos y el análisis estadístico obtenido tras realizar el Análisis de la Varianza (ANOVA).

Las Figuras 1 y 2 muestran las gráficas de evolución de la enfermedad y la eficacia obtenida por los productos respecto al control no tratado. Se observa como los dos productos consiguen disminuir la agresividad del patógeno evitando valores de infección y propagación altos.

Como resultado del análisis estadístico de la **incidencia**, el Producto S no mostró diferencias significativas con la referencia química; y al mismo tiempo ambos mostraron diferencias con el no tratado.

A la luz de estos resultados podría deducirse que la aplicación temprana del Producto S consigue evitar la propagación de la enfermedad por toda la superficie de cultivo. Alcanzándose así un buen

control en la contaminación de racimos por inóculo de *B. cinerea*.

Respecto al análisis de la severidad, tampoco se obtienen diferencias significativas entre tratamientos y sí en comparación con el no tratado. Mientras en los racimos no tratados la enfermedad se desarrolla rápidamente, en aquellos tratados con el Producto S y el químico se inhibe el crecimiento del patógeno.

Conclusiones

- Las condiciones ambientales de temperatura y humedad fueron las propicias para el desarrollo de la enfermedad. Más por la proximidad de la finca al mar.
- Las aplicaciones tempranas del Producto S fueron capaces de mantener controlada la presión de patógeno sobre el cultivo; estadísticamente sin diferencias con el producto químico de referencia.
- Las eficacias mostradas por el producto S resultaron ser, en todos los casos, superiores al 84% en comparación con el control no tratado.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 CASTILLO F., HERNÁNDEZ D., GALLEGOS G., RODRÍGUEZ R. and AGUILAR C. N. (2012). *Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants, Fungicides for Plant and Animal Diseases*, Dr. Dharumadurai. Dhanasekaran (Ed.)
- 2 VILLAR DEL FRESNO AM. (Editor). (1999). *Farmacognosia general*. Edit. Síntesis SA.
- 3 SHARAPIN N. (CYTED 2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*.
- 4 BRUNETON J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales*. Editorial Acribia SA.
- 5 DOMINGO D., LÓPEZ-BREA M. (Dic. 2003). *Plantas con acción antimicrobiana*. Servicio de microbiología, Hospital Universitario de la Princesa. Rev. Esp. Quimioterap. Vol. 16 nº 4: 385-393.
- 6 SCALBERT A. (1991). *Antimicrobial properties of tannins*. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- 7 MURPHY COWAN M. (Oct. 1999). *Plant Products as Antimicrobial Agents*. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 564-582
- 8 ELAD Y., EVENSEN K. (1995) *Physiological aspects of resistance to Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
- 9 LATORRE BA., FLORES V., SARA AM., ROCO A. (1994) *Dicarboximide-resistant strains of Botrytis cinerea from table grapes in Chile: survey and characterization*. *Plant Dis* 78: 990-994.
- 10 GRAYER RJ., KOKUBUN T. (2001) *Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants*. *Phytochemistry* 56: 253-63.