

20.Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Plantas nativas del Norte Argentino: aplicación en el control de bacterias fitopatógenas

Zareath P. Terán Baptista^{a,c}, Analía de los Angeles Gómez^{a,c}, Marina Kritsanida, Raphael Grougnet^b, Tsvetelina Mandova^b, Diego A. Sampietro^{a,c,*}

^aLaboratorio de Biología de Agentes Bioactivos y Fitopatógenos (LABIFITO)- Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-^bLaboratoire de Pharmacognosie, Université de Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR-CNRS 8638 COMETE, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Resumen

Las enfermedades bacterianas generan pérdidas económicas importantes en los cultivos. En la actualidad se aplican en forma preventiva compuestos cúpricos para disminuir a incidencia de las mismas. El noroeste argentino posee una enorme biodiversidad en sus plantas medicinales que constituyen una potencial fuente de nuevos metabolitos bioactivos. En este contexto, el objetivo del trabajo fue identificar y cuantificar la actividad antibacteriana de extractos de plantas nativas del noroeste argentino sobre bacterias fitopatógenas de importancia agrícola. Para ello se recolectaron partes aéreas de plantas nativas del noroeste argentino. Hojas y tallos de *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Schinus fasciculatus*, *S. gracilipes*, *Amphilophium cynanchoides* y *Tecoma stans* fueron separados y extraídos con solventes de polaridad creciente para obtener extractos de diclorometano (fCH₂Cl₂), acetato de etilo (fAcEt) y metanol (fMeOH), respectivamente. Entre los treinta extractos analizados solo los fAcEt a partir de hojas y tallos de *S. fasciculatus* inhibieron a las cinco cepas bacterianas ensayadas, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* var *carotovora* y *Agrobacterium tumefaciens* (CI₅₀ = 0.9 mg/ml). Se identificaron y cuantificó la actividad antibacteriana de tres componentes de estos extractos: kaempferol (CIM= 250 µg/ml, CECT 124 y 472; CIM=500 µg/ml, CECT 126 y 792), quercetina (CIM = 1000 µg/ml, CECT 124, 126 y 792; CIM= 2000 ppm, CECT 472) y agathisflavona (CIM = 2000 µg/ml; CECT 126 y 792). El extracto fAcEt de *S. fasciculatus* y los flavonoides mostraron efectos sinérgicos y aditivos en las cepas bacterianas en combinación con kocide.

Palabras clave: *Schinus*, actividad antibacteriana, flavonoides, kocide

Introducción

Las enfermedades bacterianas producen significativas pérdidas económicas en los principales cultivos agrícolas del mundo disminuyendo el rendimiento y la calidad del producto cosechado, ocasionando pérdidas en el almacenamiento y favoreciendo la incidencia de otras enfermedades en los cultivos (Agríos, 2009; Wraber y col, 1997). Se conocen más de 30 géneros de bacterias fitopatógenas, la mayoría bacilos Gram (-), responsables de daños como marchitamientos vasculares (*Pseudomonas syringae*), necrosis (*Xanthomonas campestris*), podredumbres blandas (*Erwinia carotovora*) y tumores (*Agrobacterium tumefaciens*) (Schad y col., 2001). El control de bacterias fitopatógenas se basa actualmente en la aplicación preventiva de compuestos cúpricos. La baja eficacia y la aparición de resistencia de estos productos hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana (McLeod y col, 2017). El conocimiento etnobotánico existente sobre algunas especies vegetales nativas del Noroeste Argentino sugiere que poseen actividad antimicrobiana, por lo cual extractos de las mismas o sus constituyentes pueden utilizarse para reemplazar o reducir la dosis de los productos comerciales utilizados en la actualidad.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue identificar, a partir de partes aéreas de plantas nativas del Noroeste Argentino (NOA), extractos y sus constituyentes con actividad antibacteriana.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron bacterias Gram negativas obtenidas de la Colección Española De Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, Valencia, España): CECT 126 (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*), CECT 124 (*Pseudomonas corrugada*), CECT 792 (*Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*), CECT 225 (*Erwinia carotovora* var *carotovora*) y CECT 472 (*Agrobacterium tumefaciens*).

Material vegetal

Se recolectaron hojas y tallos de partes aéreas de las especies *Amphilophium cynanchoides*, *Schinus fasciculatus*, *Schinus gracilipes*, *Tecoma stans* y *Aspidosperma quebracho-blanco* recolectadas en la provincia de Tucumán, en las localidades de Tapia, Ampimpa, La Quebradita, El Cadillal y en las adyacencias de la ruta nacional N°9, respectivamente, durante febrero-marzo de 2014. Las especies fueron identificadas por la Dra Nora Muruaga en la Fundación

Miguel Lillo. Las hojas y tallos fueron separadas y secadas a temperatura ambiente en una habitación bien ventilada. Posteriormente el material vegetal se almacenó a resguardo de la luz en bolsas de papel hasta su utilización.

Preparación de los extractos

Las hojas o tallos secos de cada especie vegetal se molieron por separado y 45 g de este material se extrajo secuencialmente con solventes de polaridad creciente (diclorometano, acetato de etilo y metanol). El material molido se puso en contacto durante 24 hs con cada solvente, se filtró y evaporó hasta obtener un residuo seco antes de ser inmerso en el siguiente solvente. Cada extracto orgánico filtrado fue evaporado y pesado para calcular los rendimientos:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{gr de material seco extraído}}{\text{gr de material vegetal seco}} \right) \times 100$$

Los extractos obtenidos, referidos como fCH₂Cl₂, fAcEt y fMeOH, fueron almacenados a -20°C.

Ensayos de Microdilución

La actividad antibacteriana se evaluó mediante ensayos de microdilución en policubetas de 96 pocillos (6). El inóculo se preparó resuspendiendo en agua destilada estéril colonias de un cultivo bacteriano de 24 hs hasta obtener una absorbancia a 630 nm de 0,09 ± 0.01

equivalente al 0.5 de la escala de McFarland (10⁸ UFC/ml). A partir de esta suspensión se realizaron diluciones en medio Mueller-Hinton (MH) hasta obtener un inóculo de trabajo de 10⁵ UFC/ml. Los extractos fueron solubilizados en acetona, etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizaron diluciones seriadas de los mismos (4-4000 ug/mL). El ensayo de microdilución se llevó a cabo colocando en cada pocillo 75 µL de la dilución del extracto y 75 µL del inóculo bacteriano (volumen final= 150 µL). Se realizaron controles de crecimiento con y sin la adición del solvente, controles de esterilidad del extracto y del medio. Se utilizó ciprofloxacina (0,001-0,1 µg/mL) como control positivo. Las policubetas se incubaron a 37°C durante 24 hs, realizándose lecturas de absorbancia a 630 nm al inicio y al término del tiempo de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado. La concentración de materia seca requerida por cada fracción para inhibir el 50% del crecimiento bacteriano (CI₅₀) se calculó por análisis Probit (9), utilizando el paquete estadístico XLSTAT versión de software. 7.5.2 (Addinsoft, Nueva York, NY, EE.UU.). Las medias de datos que se presentan en figuras se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía, y la diferencia entre medias se determinó mediante el test de la mínima diferencia significativa (LSD test).

Cromatografía de capa fina (CCF) y bioautografía

Los extractos que mostraron actividad antibacteriana en microdilución fueron ensayados por CCF. Cada extracto orgánico fue sembrado puntualmente en la placa en una dosis de 50 ug de materia seca/punto de carga, junto con controles negativos (solventes orgánicos) y positivos (ciprofloxacina 0,01 ug). Las placas sembradas fueron desarrolladas en un sistema con cloroformo:acetato de etilo (1:3 v/v) como fase móvil. Se revelaron las placas con natural product/polietilenglicol (NP/PEG) y vainillin/ácido sulfúrico y se observaron a 254 nm y 365 nm antes y después del agregado de los reactivos reveladores. Se calcularon los Rf de las bandas observadas. Para la bioautografía se realizó una CCF en condiciones de esterilidad y se cubrieron las placas con 3 mL de medio MH con 0,15% de agar conteniendo 10^5 UFC/mL de las cepas bacterianas en estudio. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 hs y se observó la aparición de halos de inhibición asociados a las bandas reveladas en CCF. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Aislamiento e identificación de los componentes antibacterianos del extracto de acetato de etilo de hojas de *Schinus fasciculatus*

El extracto acetato de etilo de *S. fasciculatus* se sembró en una columna (60x2,6 cm) de sílica gel (270-400 mesh). La elusión se llevó a cabo con un

gradiente de cloroformo:acetato de etilo (50:50%, 50:55%, 35:65%, 10:90%, 0:100%). Se obtuvieron 12 fracciones (F1 a F12). Las fracciones que contenían componentes puros (F1, F4 y F6) fueron analizadas mediante espectrometría UV-Vis entre 200 a 700 nm (Beckman DU 650) y $^1\text{H-RMN}$ a 300 y 400 mhz (Bruker Avance III). Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en ppm y los valores de las constantes de acoplamiento (J) son expresados en Hertz (Hz) (Mabry y col, 1970)

Microdilución y efecto conjunto de los compuestos aislados y de compuestos antibacterianos comerciales

Se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos aislados a partir del extracto fAcEt de *S. fasciculatus* y del antibacteriano comercial Kocide 3000 (DuPont) (46% hidróxido cúprico) mediante el método de microdilución en concentraciones de 2-2000 $\mu\text{g/ml}$. Se calcularon las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM)

La acción conjunta de los compuestos aislados y Kocide 3000 fue evaluado por el método del tablero de ajedrez descrito por Vitale y col. 2005. También se ensayaron mezclas del extracto fAcEt de *S. fasciculatus* con Kocide 3000. Se calcularon las concentraciones fraccionarias inhibitorias (FICI) como:

$$\text{FICI} = (\text{concentración de A en CIM}_{A+B} / \text{concentración de A en CIM}_A) +$$

(concentración de B en CIM_{A+B}
/concentración de B en CIM_B)

La interacción entre los compuestos ensayados se interpretó de la siguiente manera:

$FICI \leq 0.5$ = sinergismo; $FICI$ entre 0.5-4.0 = no hay interacción; $FICI > 4.0$ antagonismo (Vitale y col., 2005)

Resultados y Discusión

Rendimiento de los extractos

Los rendimientos obtenidos a partir de la extracción secuencial con solventes orgánicos de partes aéreas de las plantas estudiadas se encuentran en los rangos de 1.02-3.03% (hojas) y 0.38-1.89% (tallos) para los extractos fCH_2Cl_2 , 0.87-2.51% (hojas) y 0.32-1.72% (tallos) para los extractos $fAcEt$ y 1.97-11.37% (hojas) y 1.74-5.25% (tallos) para los extractos $fMeOH$. (Tabla 1). Los rendimientos obtenidos para cada especie muestran que los constituyentes polares fueron extraídos en mayor proporción en comparación con los componentes de mediana y baja polaridad. Los solventes orgánicos, indistintamente de cual se trate, extraen mayor cantidad de materia seca a partir de las hojas que de los tallos. Las hojas de las especies de *Schinus* mostraron mayores rendimientos después de la extracción con diclorometano ($3.03 \pm 0.05\%$, *S. fasciculatus*; $2.89 \pm 0.03\%$, *S. gracilipes*), acetato de etilo ($2.08 \pm 0.02\%$, *S. fasciculatus*; $2.51 \pm 0.05\%$,

S. gracilipes) y metanol ($11.37 \pm 0.01\%$, *S. fasciculatus*; $11.25 \pm 0.01\%$, *S. gracilipes*). Este perfil de extracción ha sido reportado en otras especies de *Schinus*, en las cuales la extracción con solventes polares obtuvo rendimientos de cuatro y cinco veces mayores que la extracción con solventes no polares (Salem y col, 2018; da Silva y col, 2017; Velazquez y col, 2003). El rendimiento obtenido para *S. fasciculatus* y *S. gracilipes* con un solvente polar (metanol) en este trabajo fue de 11,375 y 11,25%, en concordancia con la literatura que muestra que los niveles de rendimiento obtenidos para extractos con solventes polares de hojas de especies de *Schinus* se encuentran en el rango de 4-13,4%.

Actividad antibacteriana de los extractos e identificación de los constituyentes bioactivos

La presencia de componentes antibacterianos en los extractos de fCH_2Cl_2 , $fAcEt$ y $fMeOH$ de las cinco especies de plantas nativas del NOA fue evaluada en primer término por microdilución (Tabla 2). De los treinta extractos ensayados solo los $fAcEt$ de hojas y tallos de *S. fasciculatus* fueron activos frente a las cinco cepas bacterianas ensayadas, con valores de IC_{50} de 0.8-1.0 mg/ml y 3.1-4.0 mg/ml, respectivamente. Los $fAcEt$ de hojas y tallos de *S. gracilipes* y $fMeOH$ de hojas y tallos de ambas especies de *Schinus* fueron activos frente a tres y cuatro cepas

bacterianas. Los extractos restantes inhiben solamente una o dos cepas bacterianas. Los extractos de *T. stans* fueron inactivos para las bacterias fitopatógenas ensayadas y no se presenta en las tablas.

De los 46 IC₅₀ obtenidos, 23 pertenecen a extractos fAcEt, 16 a fMeOH y 7 a fCH₂Cl₂. La actividad antibacteriana de fAcEt de *Schinus* fue estudiada mediante CCF y bioautografía frente a las cinco cepas bacterianas en dosis de 50 µg. Se encontraron bandas con Rf de 0.21 (B1), 0.37 (B2) y 0.55 (B3) (Fig. 1) tanto en extractos de hojas como de tallos, que inhibieron el crecimiento de todas las cepas bacterianas. Estas bandas fueron separadas por cromatografía de sílica gel a partir del fAcEt de hojas de *S. fasciculatus*. Sus espectros UV-Vis y H1-RMN permitieron identificar a B1, B2 y B3 como agathisflavona (dímero de apigenina), quercetina y kaempferol, respectivamente (Tabla 3).

Microdilución y efecto conjunto de los compuestos aislados y de compuestos antibacterianos comerciales

Kaempferol mostró ser el flavonoide con mayor actividad antibacteriana en ensayos de microdilución (CIM= 250 µg/ml, CECT 124 y 472; MIC=500 µg/ml, CECT 126 y 792), seguido por quercetina (CIM = 1000 µg/ml, CECT 124, 126 y 792; CIM= 2000 µg/ml, CECT 472) y agathisflavona (CIM = 2000 µg/ml; CECT 126 y 792) (Tabla 4).

Los flavonoides aislados exhiben una actividad antibacteriana elevada (CIM < 500 µg/mL) y moderada (CIM= 600-1500 µg/mL) (Sartoratto y col., 2004).

La actividad conjunta de los flavonoides con kocide mostró sinergismo en algunas cepas (CECT 124 126 y 792) y aditivismo en otras (CECT 472 y 225) (Tabla 5). Este tipo de respuesta indicaría que las primeras y las últimas actúan mediante diferentes mecanismos de acción. Los resultados obtenidos sugieren que la fracción flavonoide es un importante contribuidor a la bioactividad mostrada por el extracto de hojas de *S. fasciculatus*. Sin embargo, todavía no es posible una clara comprensión de los mecanismos involucrados en estas interacciones. Los mecanismos de acción descritos para quercetina, kaempferol y kocide involucran múltiples blancos de acción en las células. Kocide, como otros agentes cúpricos, libera iones cobre que catalizan la producción de especies reactivas del oxígeno y forman complejos estables que producen daños a importantes componentes celulares (Stevenson y col, 2013). Si bien los mecanismos de acción antibacterial de quercetina y kaempferol no están completamente dilucidados, se ha demostrado que en bacterias patógenas humanas estos flavonoides producen daños a nivel de membrana modificando su fluidez y potencial eléctrico, todo esto resultando en una disminución de la síntesis de ATP, del transporte a través de la membrana y la

motilidad bacteriana (Tsuchiya 2010; Cusnie y col 2005; Mirzoeva y col, 1997; Wu y col, 2008). Estos flavonoides también inducen la liberación de radicales libres que pueden dañar macromoléculas vitales para la célula (Calderón-Montaña y col, 2011; Subramanian y col, 2014) o actuar como inhibidores enzimáticos a nivel de la síntesis de ADN (Plaper y col, 2003; Ohemeng y col; Liu y col, 2009). Agathisflavona ha sido reportada como agente neuroprotector y antioxidante, pero no como agente antibacteriano (dos Santos Souza y col, 2018; Ajilay y col, 2015).

Conclusiones

Los extractos fAcOEt de hojas y tallos de *S. fasciculatus* contienen flavonoides con actividad antibacteriana sobre cepas fitopatógenas, habiendo sido posible aislar e identificar a tres de ellos: quercetina, kaempferol y agathisflavona. Kaempferol es el compuesto con mayor actividad, seguido por quercetina y agathisflavona. Debido a la baja toxicidad de estos compuestos y al sinergismo que presentan al ensayarse con compuestos comerciales la combinación de flavonoides con agentes cúpricos pueden constituir una nueva estrategia para el control de las bacterias fitopatógenas investigadas.

Bibliografía

Agrios, G. N. Fitopatología, 2ª Ed. Limusa, **2009**, 273 – 530.

Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, y Bollinger WH. *Science* **1985**, 228, 1154-1160.

Bieto JA, y Cubillo MT. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana, España. **2008**

Campbell, B.C., Chan, K.L., Kim, J.H. 2012. *Frontiers in microbiology* 3:79-82.

CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*, M07-A9, **2012** M07-A9 37: 45-50
Cushnie, T.P. and Lamb, A.J.

Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2005**, 26, 343-56.

Dos Santos Souza, M.S. Grangeiro, E.P. Lima Pereira, C.C. Dos Santos, A.B. da Silva, G.P. Sampaio, D.D. Ribeiro Figueiredo, J.M. David, J.P. David, V.D.A. da Silva, A.M. Butt, S. Lima Costa. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology*, 2018, 65, 85-97,

Ellis, S.D., Boehm, M.J., Coplin, D. *Agriculture and Natural Resources Series in Plant Pathology*. **2008**. 1-4.

Ellis, S.D., Boehm, M.J., Coplin, D. *Plant Pathology*, **2008**, 1-4.

Finney. D.J.. *Cambridge Univ. Press*, **1971**, 333 pp

Gehrke, I. T. S., Neto, A. T., Pedroso, M., Mostardeiro, C. P., Da Cruz, I. B. M., Silva, U. F., Morel, A. F. *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, 148(2), 486–491.

J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, M. Lopez-Lazaro. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol

Jiménez, C. M., Sampietro, D. A., González, V., Soberón, J. R., Sgariglia, M.

A., Vattuone, M. A., **2010**, *Molecular and Medicinal Chemistry* 21: 41-43.

Kumar K., Gupta S.C., Chander Y., Singh A.K. *Advances in Agronomy*, **2005**, 87, 2-54.

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, **2011**, 11, 298-344

Mirzoeva OK1, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997 Sep;152(3):239-46.

Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., Vattuone, M.A. *Int. J. of Food Microbiology*, **2009**, 132, 42-46.

Rhouma, A., Ben Daoud, H., Ghanmi, S., ben Salah, H., Romdhane, M., & Demak, M. *Journal of Plant Pathology*, **2009**, 91(2), 339–345.

Sampietro, D. A.; Belizan, M.M.E.; Terán Baptista, P.Z.; Vattuone, M.A.; Catalan, C.A.N. *Natural Product Communications* **2014**, 9, 1019 - 1022

Sgariglia, M., Soberón, J.R., Sampietro, D.A., Vattuone, M.A. *Food Chemistry*, **2011**, 126 (2), 395-404.

Soberón, J. R., Sgariglia, M. A., Sampietro, D. A., Quiroga, E. N., Vattuone, M. A. *Journal of Applied Microbiology* **2009a** 108: 1757-1768.

Velázquez, E., Tournier, H. A., Mordujovich De Buschiazso, P., Saavedra, G., & Schinella, G. R. *Fitoterapia*, **2003** 74(1-2), 91–97.

Wrather, J. A., J. Kuc, Williams E. B. *Phytopathology* **1997**, 63, 1075-1076.

Wu, B.; Takahashi, T.; Kashiwagi, T.; Tebayashi, S.; Kim, C.S. New flavonoid glycosides from the leaves of *Solidago altissima*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2007**, 55, 815-6.

Tabla N°1. Rendimientos de los extractos recuperados a partir de hojas y tallos de especies nativas del Noroeste Argentino.

Especies vegetales		Rendimiento de extractos (%p/p)		
		Diclorometano	Acetato de Etilo	Metanol
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>	Hojas	2.22±0.06	1.56±0.02	8.67±0.01
	Tallos	1.18±0.02	0.45±0.07	4.74±0.01
<i>Schinus fasciculatus</i>	Hojas	3.03±0.05	2.08±0.02	11.37±0.01
	Tallos	1.89±0.01	1.39±0.02	3.47±0.06
<i>Schinus gracilipes</i>	Hojas	2.89±0.03	2.51±0.05	11.25±0.01
	Tallos	1.22±0.07	0.50±0.03	5.25±0.03
<i>Tecoma stans</i>	Hojas	1.81±0.01	1.72±0.01	5.09±0.01
	Tallos	0.71±0.02	0.41±0.02	3.97±0.05
<i>Amphilophium cynanchoides</i>	Hojas	1.02±0.01	0.87±0.05	1.97±0.02
	Tallos	0.38±0.03	0.32±0.01	1.74±0.04

Tabla N°2. Concentraciones inhibitorias del 50% del crecimiento bacteriano (CI₅₀) obtenidas para los extractos de diclorometano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de plantas nativas del Noroeste Argentino.

	CI ₅₀ (mg/ml) de extractos de hojas					CI ₅₀ (mg/ml) de extractos de tallos				
	CECT 124	CECT 126	CECT 225	CECT 792	CECT 472	CECT 124	CECT 126	CECT 225	CECT 792	CECT 472
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>										
Diclorometano	3.0 (2.8-3.3)	2.6 (2.3-2.9)	>4.0	>4.0	>4.0	3.9 (3.4-4.9)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
Acetato de Etilo	2.7 (2.3-3.1)	3.9 (3.4-4.8)	2.9 (2.6-3.4)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
Metanol	3.1 (2.8-3.6)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
<i>Schinus fasciculatus</i>										
Diclorometano	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	1.3 (1.2-1.5)	>4.0	3.5 (3.2-3.8)	>4.0	0.9 (0.8-1.0)	>4.0
Acetato de Etilo	2.4 (2.2-2.6)	2.3 (2.1-2.5)	1.3 (1.2-1.5)	3.7 (3.1-4.0)	1.4 (1.3-1.6)	1.2 (1.1-1.3)	0.9 (0.8-1.0)	3.1 (2.7-3.8)	1.4 (1.2-1.5)	1.3 (1.1-1.4)
Metanol	3.0 (2.7-3.3)	>4.0	1.9 (1.7-2.1)	2.8 (2.1-2.6)	1.2 (1.1-1.4)	>4.0	1.4 (1.9-2.4)	1.9 (1.7-2.2)	0.9 (0.8-1.1)	>4.0
<i>Schinus gracilipes</i>										
Diclorometano	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	0.9 (0.8-1.0)	>4.0
Acetato de Etilo	2.4 (2.2-2.6)	2.3 (2.1-2.5)	>4.0	>4.0	>4.0	1.8 (1.6-2.1)	>4.0	1.6 (1.4-1.9)	1.3 (1.2-1.5)	1.3 (1.1-1.4)
Metanol	3.0 (2.7-3.3)	>4.0	>4.0	2.3 (2.1-2.6)	2.0 (1.8-2.4)	>4.0	2.1 (1.9-2.4)	0.9 (0.6-1.1)	0.9 (0.8-1.1)	>4.0
<i>Amphilophium cynanchooides</i>										
Diclorometano	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0
Acetato de Etilo	1.6 (1.4-1.8)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	2.9 (2.6-3.1)	>4.0	3.8 (3.5-4.2)	>4.0	2.2 (2.0-2.4)
Metanol	3.9 (3.4-4.7)	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	>4.0	3.1 (2.8-3.4)

Tabla N°3 - Datos de los espectros RMN 1H- NMR de los compuestos de las fracciones (Agathisflavona), B₂ (Quercetina) y B₃ (Kaempferol) a 300 MHz, en acetona deuterada (CD₃)₂CO, los dos primeros compuestos y en metanol deuterado CD₃OD el último. Los desplazamientos químicos (δ) se muestran en ppm, y J en Hz.

B₁ Agathisflavona		B₂ Quercetina		B₃ Kaempferol	
H	δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	δ (ppm)
1	-	1	-	1	-
2	-	2	-	2	-
3	6,76 (s)	3	-	3	-
4	-	4	-	4	-
5	-	5	-	5	-
6	-	6	6,22 (d)	6	6,20 (s)
7	-	7	-	7	-
8	6,62 (s)	8	6,48 (d)	8	6,41 (s)
1'	-	1'	-	1'	-
2'	8,65 (d)	2'	7,78 (d)	2'	8,03 (d)
3'	7,07 (d)	3'	-	3'	6,91 (d)
4'	-	4'	-	4'	-
5'	7,07 (d)	5'	6,97 (d)	5'	6,91 (d)
6'	8,65 (d)	6'	7,66 (dd)	6'	8,03 (d)
1''	-				
2''	-				
3''	6,69 (s)				
4''	-				
5''	-				
6''	6,37 (s)				
7''	-				
8''	-				
1'''	-				
2'''	7,62 (d)				
3'''	6,86 (d)				
4'''	-				
5'''	6,86 (d)				
6'''	7,62 (d)				

Figura N°1. Cromatografía en capa fina del extracto fAcet de hojas de *S. fasciculatus* observado bajo UV_{254nm} (B) y después del revelado con NP-PEG (A). La figura 1 C muestra la bioautografía obtenida frente a la cepa CECT 124.

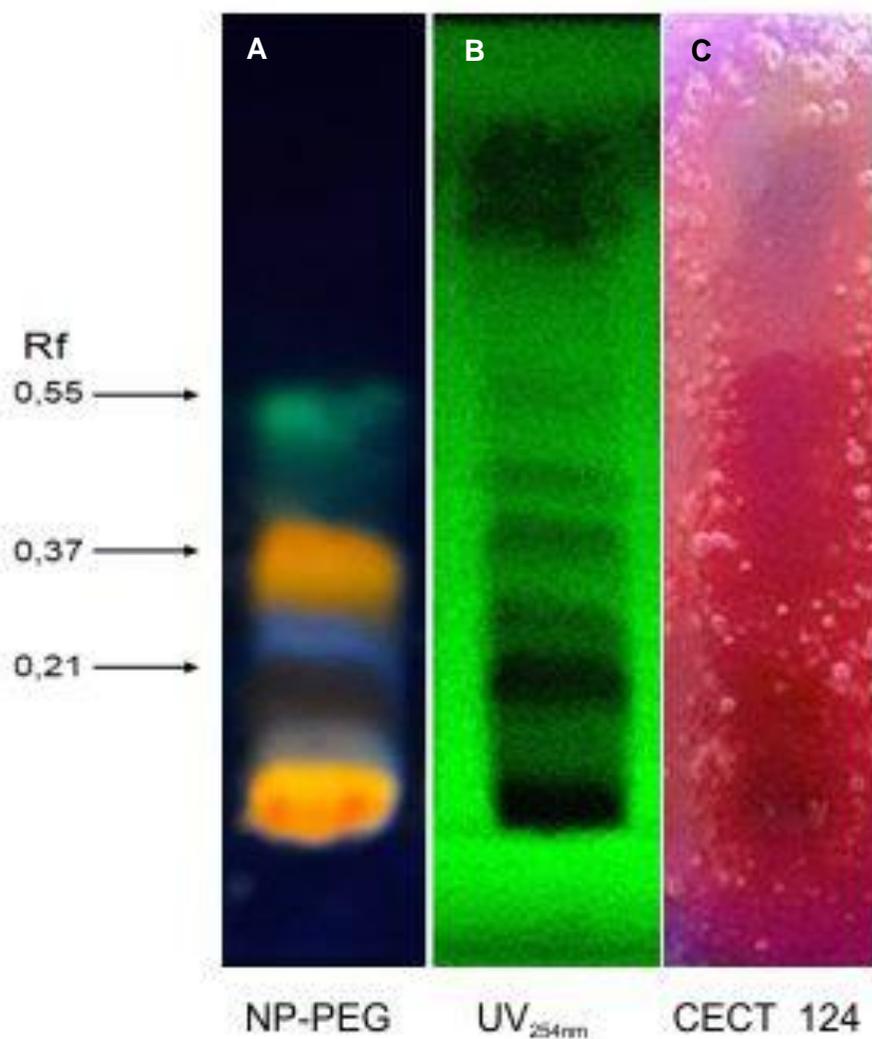


Tabla N° 4. Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de los falvonoides identificados del extracto fAcEt de hojas de *Schinus fasciculatus*, y de compuestos antibacterianos comerciales (kocide y carifix) sobre cepas de bacterias fitopatógenas.

	CIM (mg/ml)				
	CECT 124	CECT 126	CECT 225	CECT 472	CECT 792
Kaempferol	0.25 (0.23-0.27)	0.50 (0.47-0.53)	2.00 (1.80-2.12)	0.25 (0.23-0.27)	0.50 (0.46-0.54)
Quercetina	1.00 (0.91-1.10)	1.00 (0.91-1.10)	2.00 (1.75-2.15)	2.00 (1.81-2.19)	1.00 (0.91-1.10)
Agathisflavona	2.00 (1.85-2.10)	2.00 (1.81-2.19)	2.00 (1.75-2.15)	2.00 (1.81-2.20)	2.00 (1.81-2.19)
Kocide	0.13 (0.12-0.13)	0.13 (0.12-0.13)	0.13 (0.12-0.13)	0.13 (0.12-0.13)	0.13 (0.12-0.13)
Caurifix	0.25 (0.23-0.27)	0.25 (0.23-0.28)	0.25 (0.23-0.27)	0.25 (0.23-0.27)	0.25 (0.23-0.27)