

Trabajo Fin de Grado

***Salvia canariensis*, una especie endémica de Canarias, fuente de biopesticidas**

Isaac Martín Lorenzo

Tutores: Dra. Isabel López Bazzocchi

Dra. Carolina Pérez Reyes

Curso 2021-2022

La Dra. Dña. ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI y la Dra. Dña. CAROLINA PÉREZ
REYES, como tutores de la presente Memoria:

AUTORIZAN: Al alumno Isaac Martín Lorenzo, a la presentación y defensa del Trabajo de Fin de Grado titulado “*Salvia canariensis*, una especie endémica de Canarias, fuente de biopesticidas”, para optar al Grado en Química por la Universidad de La Laguna.

Fdo. Dra. Dña. Isabel López Bazzocchi

Fdo. Dr. Dña. Carolina Perez Reyes

La Laguna, 17 de junio de 202

Índice

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Situación actual de la agricultura	5
1.2. Biopesticidas.....	7
1.3. Principales plagas que afectan a los cultivos de la Macaronésia	8
1.4. Flora Canaria como fuente de biopesticidas: <i>Salvia canariensis</i> como objeto de estudio	11
2. OBJETIVOS	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1. Preparación de extractos de <i>S. canariensis</i> silvestre y cultivada	14
3.2. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico	18
3.3. Fraccionamiento bioguiado de la fracción hexánica	20
4. PARTE EXPERIMENTAL	22
4.1. Recolección, secado y molienda de las hojas de <i>S. canariensis</i>	22
4.1.1. Material vegetal: <i>Salvia canariensis</i> silvestre.....	22
4.1.2. Material vegetal: <i>Salvia canariensis</i> cultivada.....	22
4.2. Preparación de extractos	24
4.3. Partición líquido-líquido.....	26
4.4. Fraccionamiento bioguiado.....	27
4.5. Datos espectroscópicos del diterpeno D1	29
4.6. Actividad fungicida frente a hongos fitopatógenos	30

5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES EMPLEADAS	30
5.1. Técnicas experimentales	30
5.1.1. Técnicas de extracción	30
5.2. Técnicas cromatográficas.....	31
5.3. Técnicas espectroscópicas.....	32
5.4. Programas informáticos.....	32
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

El aumento en la demanda de alimentos, como consecuencia del aumento de la población a nivel mundial, exige adoptar estrategias que aseguren la eficacia, productividad, sostenibilidad y seguridad alimentaria. Uno de los desafíos para lograr este objetivo es el control de las plagas, que en los últimos años ha aumentado debido a la globalización, cambio climático y a la pérdida de efectividad de los pesticidas convencionales, causando de esta manera, innumerables pérdidas en el sector agrícola.

Actualmente, la protección de los cultivos se centra casi exclusivamente en los pesticidas sintéticos, sin embargo, el uso excesivo de estos ha despertado la preocupación e interés social debido a los efectos tóxicos que pueden ocasionar en el medio ambiente y en el ser humano.

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo principal la búsqueda de alternativas a los pesticidas convencionales aprovechando recursos naturales, especies endémicas de Canarias para el desarrollo de biopesticidas.

Para ello, se lleva a cabo la preparación de extractos a partir de las hojas de *S. canariensis* mediante maceración y Soxhlet. Se seleccionó uno de los extractos en base a su rendimiento y se realizó partición líquido-líquido usando diferentes disolventes. A continuación, se evaluó la fracción hexánica frente a hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés y la fracción más activa se seleccionó para llevar a cabo un fraccionamiento bioguiado, que condujo a un diterpeno abietatriénico, como metabolito activo.

SUMMARY

The increase in demand for food, as a consequence of population growth, requires the adoption of strategies that ensure efficiency, productivity, sustainability and food security. One of the challenges to achieve this goal is pest control, which in recent years has increased due to globalisation, climate change and the loss of effectiveness of conventional pesticides, thus causing innumerable losses in the agricultural sector.

Currently, crop protection focuses almost exclusively on synthetic pesticides, however, the excessive use of these has aroused social concern and interest due to the toxic effects they can have on the environment and on human beings.

The main objective of this Final Degree Project is the search for alternatives to conventional pesticides by taking advantage of natural resources such as the endemic species of the Canary Islands in the development of biopesticides

To this end, extracts were prepared from the leaves of *S. canariensis* by means of maceration and Soxhlet. One of the extracts was selected on the basis of its yield and liquid-liquid partitioning was performed using different solvents. Then, the hexane fraction was evaluated against plant pathogenic fungi affecting crops of interest and the most active fraction was selected for bioguided fractionation, leading to an abietatriene diterpene as the active metabolite.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual de la agricultura

Estimaciones realizadas por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ponen de manifiesto la necesidad de aumentar la producción de alimentos un 70% para poder abastecer a la futura población mundial en 2050¹. Asimismo, si añadimos la escasez de alimentos, la pérdida de productividad, la baja fertilidad del suelo además de una gran preocupación por parte de los agricultores debido a los irreparables daños ocasionados por las plagas sobre los cultivos debido al cambio climático, obtenemos un sistema de producción agrícola incapaz de abastecer la demanda de la futura población mundial. Por ello, para poder cubrir la demanda, el sector agrícola tiene que adoptar estrategias modernas y avanzadas que puedan asegurar un aumento de la eficacia, productividad, sostenibilidad, así como la seguridad de los alimentos en la producción. Los biopesticidas constituyen una alternativa sostenible al uso de fitosanitarios convencionales en el control integrado de plagas^{2,3}.

Un pesticida es una sustancia o mezcla de sustancias usada para prevenir, destruir o controlar cualquier especie vegetal, animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales. Según Grumezescu en 2017⁴, estos pueden ser clasificados en función de su origen y estructura química (naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos), modo de acción (por contacto o sistémicos), espectro de actividad (de espectro amplio o selectivos) y organismo objetivo (insecticida, herbicida, bactericida, etc.). Actualmente, la sociedad tiene una mayor conciencia sobre los problemas que los pesticidas actuales pueden ocasionar. Uno de los grandes problemas de estos pesticidas sintéticos es que pueden poner en riesgo la calidad del agua en las zonas cercanas a los campos de cultivos, ya que estos compuestos se transportan a través del agua y la atmósfera y por tanto, contaminan tanto las aguas superficiales como subterráneas. Asimismo, la toxicidad que estos compuestos provocan en los seres humanos son muy importantes ya que pueden afectar directamente al sistema endocrino y nervioso, ser potencialmente cancerígenos y también son peligrosos por bioacumulación, provocando enfermedades a largo plazo.

Algunos de los pesticidas más utilizados hoy en día son el glifosato, el endosulfán y mancozeb (figura 1.1). En un experimento reciente, se evaluó el poder de estos pesticidas, entre otros, sobre 4 especies de lombrices de tierra (*Eisenia fétida*, *Lampito mauritii*, *Eudrilus eugeniae* y *Peronyx excavates*) como modelos biológicos para la investigación ecotoxicológica. Los resultados mostraron que endosulfán causó la muerte de las 4 especies; el glifosato, que se evaluó sobre la especie *E. fétida* produjo la muerte de esta especie después del séptimo día de exposición. Por último, mancozeb se evaluó sobre la lombriz *P. excavates* y resultó ser muy poco tóxico. Concluyendo de esta manera que endosulfán es el pesticida más tóxico de los tres⁵.

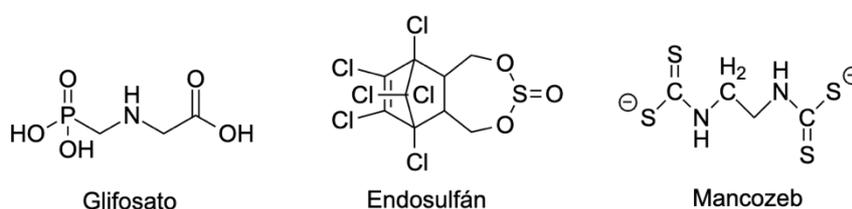


Figura 1.1. Ejemplos de pesticidas usados actualmente en el control de plagas

Afortunadamente, en la actualidad el uso de pesticidas químicos en la protección de cultivos está en declive. Esto se debe en gran medida, a la preocupación e interés social que cuestiona su aplicación debido a los efectos tóxicos que provoca en el medio ambiente y en el ser humano.

Entre las diversas enfermedades que afectan a los cultivos, las infecciones fúngicas por ascomicetos son de gran incidencia a nivel mundial, siendo los fungicidas sintéticos ampliamente utilizados para luchar contra estos hongos fitopatógenos. Sin embargo, algunos de estos fungicidas como clorotalonil, fenamidona, propineb, quinoxifeno, tiram o propiconazol han sido retirados en Europa durante los últimos años por su gran toxicidad (figura 1.2.)

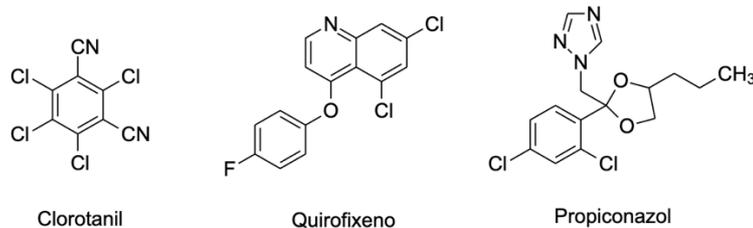


Figura 1.2. Ejemplos de fungicidas retirados en Europa

1.2. Biopesticidas

En la búsqueda de una solución que respete el medio ambiente y controle las plagas, el interés en pesticidas que se originan a partir de organismos vivos o de sus metabolitos (biopesticidas) se ha visto incrementado en los últimos años. Los biopesticidas se clasifican en tres categorías principales⁶:

- Pesticidas microbianos o derivados de microorganismos: Son aquellos compuestos que derivan de hongos, bacterias, algas, virus, nematodos o protozoos.
- Semioquímicos: Son compuestos químicos producidos por organismos que causan cambios en el modo de actuar de otro individuo de la misma o diferente especie. Los más utilizados son las feromonas sexuales de insectos, que pueden ser sintetizadas y utilizadas efectivamente para el control de plagas.
- Bioquímicos: Suelen ser productos naturales aislados de plantas, animales o microorganismos que controlan las poblaciones de plaga mediante diversas acciones, como puede ser interferir en el crecimiento o apareamiento y atraer o repeler diferentes plagas de insectos.

Entre los pesticidas bioquímicos, se encuentran los biopesticidas botánicos⁷, que han sido utilizados durante generaciones en la agricultura tradicional, tanto para el tratamiento de los cultivos como para el almacenaje de estos. Son generalmente, menos tóxicos que los plaguicidas convencionales, afectando sólo al organismo diana y en ocasiones a los organismos estrechamente relacionados.

Concretamente, se ha prestado más atención a los biopesticidas obtenidos a partir de plantas (botánicos) ya que ofrecen una amplia diversidad química y biológica muy variada. Las plantas son capaces de biosintetizar un gran número de metabolitos con actividad bacteriana, fungicida, insecticida o repelente para defenderse de enfermedades y depredadores. Estos fitoquímicos podrían explorarse como agentes de control biológico para la gestión integrada de plagas ya que, en comparación con los pesticidas convencionales, son menos tóxicos, menos persistentes, respetuosos con el medio ambiente y seguros para los seres humanos.

Entre los biopesticidas obtenidos de plantas más relevantes se encuentran: azadiractina, nicotina, piretrinas, rotenona, veratrum, anoninas, rocaglamidas e isobutilamidas ⁸ (figura 1.3).

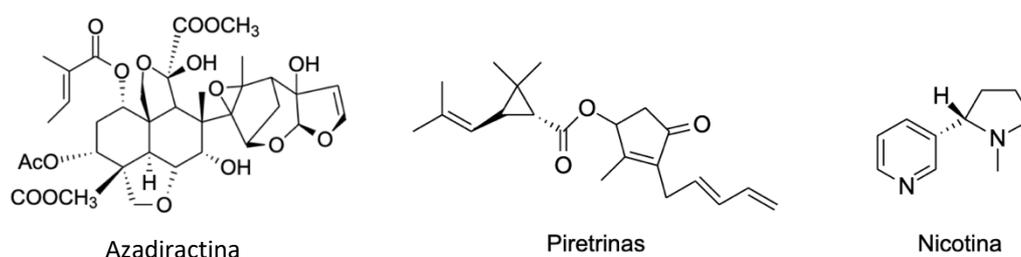


Figura 1.3 Ejemplos de biopesticidas botánicos

1.3. Principales plagas que afectan a los cultivos de la Macaronesia

La región Macaronésica la componen los archipiélagos: Azores, Madeira, Salvajes, Canarias y Cabo Verde (figura 1.4). Todas ellas son de origen volcánico, y poseen una gran riqueza botánica⁹. Esta región sólo representa el 0,2% del territorio de la Unión Europea (exceptuando Cabo Verde), sin embargo, muchas de las especies presentes en esta pequeña proporción de territorio son de gran importancia y por ello, han sido recogidas en el anexo II de la Directiva sobre hábitats¹⁰, siendo clasificadas como Zonas Especiales de Conservación¹¹.

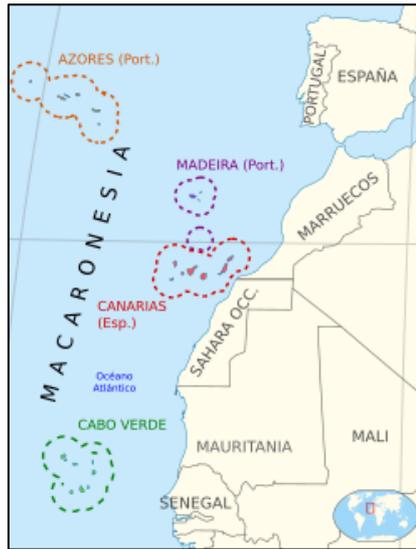


Figura 1.4. Localización de la Región Macaronésica¹²

Dentro de esta región, las Islas Canarias son las que mayor biodiversidad presentan¹⁰, con una flora rica en endemismos. Se entiende por endemismo “aquello que es propio o exclusivo de determinadas localidades o regiones”¹³. Canarias cuenta con más de 500 endemismos, siendo la región española con mayor número de especies endémicas^{9,14}. El Archipiélago posee una gran variedad de microclimas que dotan a las islas de riqueza biológica y paisajística, permitiendo el desarrollo de producciones tropicales y subtropicales. Entre las principales producciones de cultivos de las Islas destacan la vid con aproximadamente 18.932 hectáreas (Ha), la platanera con 9.113 Ha, la papa que a pesar de tener poca relevancia exportadora cuenta con 4.134 Ha y el tomate con 1.819 Ha¹⁵. Estos datos muestran que la agricultura canaria tiene que hacer frente a los problemas propios de los monocultivos. En el ámbito de las plagas, Canarias presenta un clima con temperaturas estables durante todo el año, lo que beneficia el desarrollo de las mismas.

Denominamos plaga a cualquier población de organismos vivos que ataca a los cultivos labrados por los seres humanos y cuyo nivel poblacional aumenta hasta generar una reducción o anulación total del rendimiento, ocasionando pérdidas económicas.

Según su importancia, las plagas se clasifican en¹⁶:

- Plagas clave, de alta importancia ya que implican una gran pérdida económica y suponen un manejo difícil.
- Plagas ocasionales, que también causan pérdidas pero su aparición es ocasional.
- Plagas secundarias, cuyas pérdidas no son tan significativas a pesar de que su presencia es constante.

En Canarias, las plagas más importantes son aquellas que afectan a los cultivos anteriormente mencionados como el cultivo de tomate, platanera y papa, aunque también son relevantes las de árboles frutales y cereales¹⁷. Algunas de las principales plagas que afectan a los cultivos canarios son: la cochinilla algodonosa (*Dysmicoccus grassii*)¹⁸ (figura 1.5), la bacteria *Streptomyces scabies*¹⁹ (figura 1.6.), el hongo *Alternaria solani*²⁰ (figura 1.7.) y el virus de la cuchara (*Tomate Yellow leaf curl virus*)²¹ (figura 1.8).



Figura 1.5. *Cochinilla algodonosa (Dysmicoccus grassii)*²²



Figura 1.6. *Streptomyces scabies*²³



Figura 1.7. *Alternaria solani*²⁴



Figura 1.8. *Virus de la cuchara*²⁵

1.4. Flora Canaria como fuente de biopesticidas: *Salvia canariensis* como objeto de estudio

Las Islas Canarias cuentan con una amplia variedad de fauna y flora a pesar de su escasa superficie. En lo referente a la flora, su riqueza se debe a diversos factores que hacen del Archipiélago una zona especialmente idónea para el crecimiento de muchas especies de plantas. La altitud, los vientos alisios, el tipo de suelo y el clima son algunos de esos factores.

El Archipiélago cuenta con numerosos endemismos, es por ello que al ser especies únicas, poseen sus propias características y componentes, por lo que es inevitable pensar en su posible aplicación en diversos ámbitos. En lo referente al control de plagas existen algunas especies botánicas como el incienso canario (*Artemisia thuscula/Artemisia canariensis* Cav.)^{26,27}, la salvia (*Salvia canariensis* L.)^{26,27}, la cola de caballo (*Equisetum arvense*)^{26,27}, la ortiga (*Urtica urens* L.)^{26,27} o el helecho (*Davallia canariensis* L.)²⁶⁻²⁸, que tradicionalmente tienen aplicación en la agricultura para el control de plagas²⁹. Sin embargo, a pesar del potencial de estos endemismos en el control integrado de plagas no existen investigaciones que avalen dichos usos populares.

El género *Salvia* se incluye en la extendida y diversificada familia de las Labiadas (Lamiceae) y consta de unas 900 especies presentes en zonas tan diversas como el Mediterráneo, Asia central, las islas del Pacífico, África tropical y América. Las especies de este género se han utilizado desde la antigüedad en la industria cosmética, en la medicina popular y como productos de aromatización y conservación de alimentos, por sus propiedades antioxidantes, aromáticas y antimicrobianas³⁰.

En particular, *Salvia. canariensis* L. (figura1.9.), conocida como "salvia canaria", "garitopa" o "salvia morisca", es un endemismo de las Islas Canarias ampliamente utilizado en la medicina popular del Archipiélago Canario por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes y antisépticas, siendo especialmente recomendada su infusión para las afecciones estomacales³¹.



Figura 1.9. *Salvia canariensis*³²

A diferencia de otras especies del género *Salvia*, la salvia canaria es un arbusto que puede llegar a alcanzar los 2 m de altura y cuyas largas ramas con largos lóbulos lanceolados presentan una disposición característica. Por ello, esta especie ha sido considerada como un probable vínculo entre las salvias del Viejo y del Nuevo Mundo.

Estudios preliminares en el grupo de investigación QUIMIOPLAN ponen de manifiesto el potencial que la especie *Salvia canariensis* tiene como fuente de biopesticidas, ya que resultó activo frente a varios hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de Canarias (datos sin publicar). Además, se ha descrito en la literatura química que esta especie³³⁻³⁶ presenta componentes tipo diterpeno o triterpeno (figura 1.10) con propiedades fungicidas. Es por ello que este Trabajo de Fin de Grado, en el marco de un proyecto de investigación titulado Biopesticidas botánicos de la Macaronesia: investigación y saber popular “(Macbiopest, Intemeg” MAC 2014-2020) se centra en el estudio de *Salvia canariensis* como potencial fuente de biopesticidas.

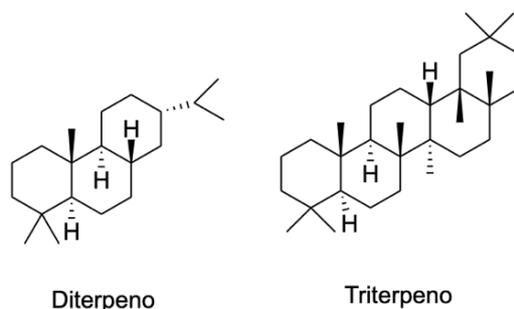


Figura 1.10 Ejemplo de diterpeno y triterpeno

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es la obtención de biopesticidas frente a hongos fitopatógenos a partir de una planta endémica de Canarias, *Salvia canariensis*. Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Revisión bibliográfica de los usos etnobotánicos de la flora canaria como plaguicidas.
- Revisión bibliográfica del perfil fitoquímico de *Salvia canariensis*.
- Optimización de la metodología de extracción de las hojas de *Salvia canariensis*.
- Evaluación de la actividad fungicida de extractos y fracciones de *Salvia canariensis* frente a hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.
- Estudio comparativo del perfil químico y fungicida de *S. canariensis* silvestre y cultivada.
- Fraccionamiento bioguiado de *S. canariensis* cultivada.

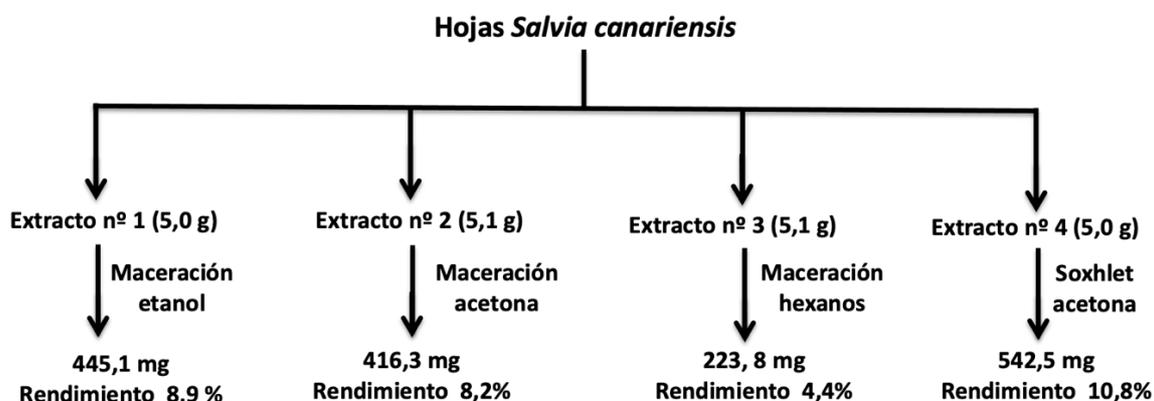
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los antecedentes mencionados, *Salvia canariensis* fue seleccionada para su estudio como especie prometedora en la búsqueda de biopesticidas, ya que existen referencias de su uso tradicional en la agricultura para combatir plagas^{26,27} y previos estudios fitoquímicos revelaron la presencia en esta especie de metabolitos con esqueleto de diterpeno y triterpeno con propiedades fungicidas³³⁻³⁶.

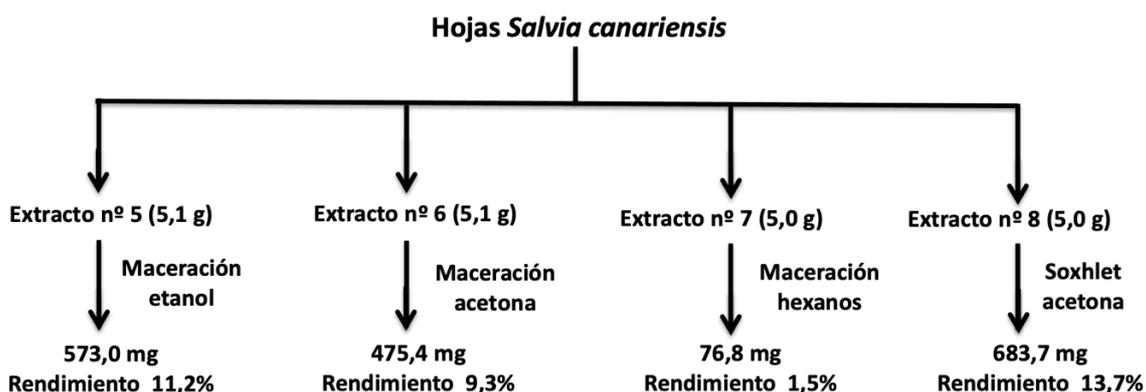
Por otra parte, con el objetivo de hacer un estudio comparativo del perfil químico y biológico, el material vegetal estudiado fue, por un lado, la especie recolectada en su hábitat natural (silvestre) y por otro la especie cultivada en el Centro Ambiental La Tahonilla (Cabildo de Tenerife). Resulta de gran interés que la especie cultivada presente potencial para el desarrollo de biopesticidas, ya que ello no sólo garantiza la disponibilidad de material vegetal, sino que además reduciría el impacto medioambiental de esta especie endémica al llevar a cabo ensayos de campo que requieren mayor cantidad de material vegetal.

3.1. Preparación de extractos de *S. canariensis* silvestre y cultivada

Se prepararon extractos a partir de las hojas de *S. canariensis* silvestre y cultivada (5 g en cada caso), usando diferentes métodos de extracción: maceración con disolventes de polaridad creciente (hexanos, acetona y etanol) y Soxhlet, usando acetona, dado que fue el disolvente más eficaz en el método de maceración (Esquemas 1 y 2). Se pretende así, determinar el procedimiento de extracción óptimo en base a los rendimientos obtenidos.



Esquema 1. Preparación de extractos de *S. canariensis* silvestre



Esquema 2. Preparación de extractos de *S. canariensis* cultivada

Los resultados obtenidos indican que tanto en el caso de la planta silvestre (tabla 1) como cultivada (tabla 2) el mejor método de extracción es la técnica de Soxhlet, usando como disolvente acetona, con unos rendimientos de 10.8 y 13.7%, respectivamente, presentando un aumento del 32% y 47% con respecto a la extracción con el mismo disolvente mediante maceración. Por tanto, podemos concluir que el tipo de técnica utilizado juega un papel importante en el rendimiento de la extracción. Por otra parte, este resultado fue el esperado ya que el aporte de calor usado en la extracción con Soxhlet aumenta el poder extractor de un disolvente.

En cuanto a los rendimientos obtenidos mediante maceración, en ambos casos, el mejor resultado se obtuvo con etanol (8,9 y 11,2%, respectivamente), seguido de la extracción con acetona (8,2 y 9,3%, respectivamente), mientras que el extracto hexánico fue el de menor rendimiento.

Tabla 1. Resultados del uso de diferentes técnicas en la extracción de las hojas de *Salvia canariensis* silvestre

Extracto	Peso hojas secas (g)	Técnica	Disolvente	Peso extracto (g)	Rendimiento del extracto (%)
Nº 1	5,0	Maceración	Etanol	0,45	8,9
Nº 2	5,1	Maceración	Acetona	0,42	8,2
Nº 3	5,1	Maceración	Hexanos	0,22	4,4
Nº 4	5,0	Soxhlet	Acetona	0,54	10,8

Los resultados obtenidos de la extracción de las hojas de *S. canariensis* silvestre que el mejor método de extracción es la técnica de Soxhlet con acetona (nº 8) seguido de maceración con etanol (nº 5) o con acetona (nº 6). Mientras que el extracto hexánico (nº 7) es el de peor rendimiento. El extracto acetónico en Soxhlet rinde aproximadamente un 47% más con respecto a la extracción con acetona mediante maceración (Tabla 2). En este caso la maceración con etanol y acetona muestran resultados diferentes mientras que en el caso anterior eran similares.

Tabla 2. Resultados del uso de diferentes técnicas en la extracción de las hojas de *Salvia canariensis* cultivada

Extracto	Peso hojas secas (g)	Técnica	Disolvente	Peso extracto (g)	Rendimiento del extracto (%)
Nº 5	5,1	Maceración	Etanol	0,58	11,2
Nº 6	5,1	Maceración	Acetona	0,47	9,3
Nº 7	5,0	Maceración	Hexanos	0,77	1,5
Nº 8	5,0	Soxhlet	Acetona	0,68	13,7
Nº 9	400,0	Maceración	Etanol	52,0	13,0

Los extractos obtenidos fueron evaluados por su actividad fungicida frente tres hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, fitopatógenos que afectan a los cultivos de mayor relevancia en Canarias, como la vid, el tomate y la papa. Estos ensayos se llevaron a cabo en el grupo de investigación CIPEV, unidad de Fitopatología del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Universidad de La Laguna. La actividad fungicida (tablas 3 y 4) se expresa en porcentaje de inhibición del crecimiento de los micelios (% inhibición), evaluándose la actividad a las concentraciones de 1, 0,5 y 0,1 mg/mL.

Tabla 3. Actividad fungicida (% de inhibición con STD) frente a *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum* de extractos de *S. canariensis* silvestre

Nº extracto y técnica	Actividad fungicida (% inhibición con STD)								
	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
1 Maceración (Etanol)	76,3 ±2,5	69,1 ±2,4	54,2 ±1,8	63,5 ±4,2	42,9 ±4,2	28,7 ±5,7	61,4 ±4,1	55,8 ±4,9	21,7 ±3,9
2 Maceración (Acetona)	66,1 ±0,7	62,2 ±1,3	58,6 ±1,6	80,5 ±2,1	76,8 ±2,2	73,6 ±2,7	64,8 ±2,4	63,3 ±2,1	44,6 ±1,7
3 Maceración (Hexanos)	61,9 ±2,0	61,8 ±1,4	51,5 ±2,4	74,8 ±1,6	75,5 ±4,8	65,1 ±5,7	62,7 ±2,6	62,0 ±1,6	33,0 ±2,9
4 Soxhlet (Acetona)	53,7 ±1,8	62,0 ±1,5	55,8 ±0,9	82,2 ±3,1	87,1 ±0,7	82,4 ±4,6	66,6 ±1,8	63,5 ±2,0	58,1 ±3,5

Tabla 4. Actividad fungicida (% de inhibición con STD) frente a *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum* de extractos de *Salvia canariensis* cultivada (Centro Ambiental La Tahonilla, Cabildo de Tenerife)

Nº extracto y técnica	Actividad fungicida (% inhibición con STD)								
	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
5 Maceración Etanol	68,6 ±3,6	62,1 ±1,6	45,0 ±3,2	44,1 ±3,3	38,3 ±6,8	29,4 ±6,6	53,6 ±0,8	45,9 ±2,8	21,3 ±2,3
6 Maceración Acetona	46,7 ±1,8	55,5 ±2,3	26,4 ±2,3	69,0 ±5,0	52,0 ±6,4	34,6 ±5,8	33,9 ±3,0	39,7 ±3,6	22,5 ±4,0
7 Maceración Hexano	40,4 ±2,9	42,32 ±1,2	19,5 ±2,0	54,8 ±4,9	48,1 ±6,6	23,6 ±4,7	37,1 ±2,0	34,9 ±2,4	18,4 ±3,5
8 Soxhlet (Acetona)	59,2 ±3,1	55,5 ±3,1	32,6 ±2,8	72,5 ±3,1	68,4 ±5,5	26,3 ±8,2	48,6 ±2,8	42,6 ±4,1	26,9 ±1,8

Los resultados indican que todos los extractos, tanto de la planta silvestre (tabla 3) como cultivada (tabla 4), presentaron algún grado de actividad frente a los tres hongos ensayados, resultando *A. alternata* la especie más sensible a los mismos, alcanzándose una inhibición del crecimiento del 76,3 y 68,6% a la concentración de 1 mg/mL con los extractos etanólicos (maceración) obtenidos de la planta silvestre y cultivada, respectivamente.

Un análisis comparativo de los resultados indican que, aunque los valores de actividad fungicida de los extractos correspondientes a la planta silvestre son ligeramente superiores a los de la planta cultivada, estos datos nos permiten validar que el cultivo de *Salvia canariensis* cumple con los objetivos de ser una alternativa sostenible para la obtención de biopesticidas.

3.2. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico

Una vez evaluada la actividad de los extractos frente a los fitopatógenos de interés, los extractos más prometedores, fueron seleccionados para llevar a cabo un fraccionamiento mediante partición líquido-líquido. Para ello, se suspendió el extracto etanólico en agua y se extrajo, sucesivamente, con disolventes de polaridad creciente (hexanos y acetato de etilo). Las fases orgánicas fueron concentradas en el rotavapor para eliminar los correspondientes disolventes, obteniéndose de esta forma las fracciones de hexanos y acetato de etilo. Por otro lado, la fase acuosa fue liofilizada, obteniéndose la correspondiente fracción acuosa.

Cabe mencionar que el fraccionamiento mediante partición líquido-líquido del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas de *S. canariensis* silvestre se había realizado previamente en el grupo de investigación, y los resultados de su evaluación antifúngica se incluyen en esta memoria de TFG con fines comparativos con los obtenidos de la planta cultivada.

La evaluación de la actividad antifúngica reveló que en ambos casos, tanto las fracciones obtenidas de la planta silvestre (tabla 5) como cultivada (tabla 6), la fracción de hexanos resultó la más activa con valores de inhibición entre 52-78%

frente a los tres especies de hongos evaluados, seguido de la fracción de acetato de etilo, mientras que la fracción acuosa presentó los peores resultados.

Tabla 5. Actividad fungicida (% de inhibición con STD) frente *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum* de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de *Salvia canariensis* silvestre

Fracción	Actividad fungicida (% inhibición con STD)								
	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
Hexano	78,7 ± 2,8	70,3 ± 1,5	66,7 ± 2,6	75,5 ± 4,1	56,7 ± 5,5	33,6 ± 5,4	59,6 ± 3,6	58,2 ± 2,8	37,5 ± 3,6
Acetato de etilo	53,6 ± 3,37	38,9 ± 3,5	36,7 ± 4,4	4,6 ± 6,8	19,8 ± 5,6	25,6 ± 9,4	26,3 ± 3,9	14,0 ± 5,3	-15,6 ± 8,2
Agua	22,0 ± 2,2	12,5 ± 3,9	12,3 ± 4,6	-3,2 ± 5,5	-0,5 ± 4,7	4,5 ± 3,3	0,8 ± 6,3	2,6 ± 2,0	-2,5 ± 4,7

Tabla 6. Actividad fungicida (% de inhibición con STD) frente *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum* de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de *Salvia canariensis* cultivada (Centro Ambiental La Tahonilla, Cabildo de Tenerife)

Fracción	Actividad fungicida (% inhibición con STD)								
	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
Hexano	73,5 ± 1,3	67,3 ± 1,5	44,3 ± 3,3	66,6 ± 2,9	55,7 ± 4,8	19,3 ± 4,0	52,4 ± 1,6	46,7 ± 2,2	26,6 ± 2,5
Acetato de etilo	59,3 ± 1,4	55,9 ± 1,9	46,1 ± 0,7	19,2 ± 5,5	13,9 ± 2,5	19,4 ± 5,9	54,0 ± 2,81	44,9 ± 2,2	32,4 ± 1,3
Agua	46,7 ± 2,8	39,2 ± 2,3	27,0 ± 3,2	-1,7 ± 4,8	0,9 ± 2,6	0,3 ± 6,6	35,4 ± 1,7	20,9 ± 3,1	13,2 ± 1,9

Cabe destacar que la especie cultivada presentó un perfil fungicida ligeramente mejor que la silvestre, lo que pone de manifiesto que el cultivo de esta especie es una alternativa al uso de la planta silvestre para el desarrollo de biopesticidas. Por otra parte, los resultados de la partición líquido-líquido muestran un enriquecimiento de la fracción de hexanos en los metabolitos bioactivos, ya que dicha fracción resultó más activa que el extracto etanólico.

3.3. Fraccionamiento bioguiado de la fracción hexánica

La fracción más activa, la fracción hexánica, procedente de *Salvia canariensis* cultivada fue seleccionada para realizar un fraccionamiento bioguiado (esquema 3), mediante cromatografía líquida a gravedad, usando como sistemas de elución: hexanos-acetato de etilo, en orden creciente de polaridad. Las fracciones obtenidos se reunieron según un análisis por cromatografía en capa fina, obteniendo así 13 fracciones.

El análisis de la actividad fungicida de las 13 fracciones (tabla 7) frente a *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*, reveló un aumento de la actividad fungicida frente a *B. cinerea* y *F. oxysporum*, indicando un enriquecimiento de los componentes activos frente a estos hongos. Sin embargo, la actividad frente a *A. alternata* se redujo ligeramente con respecto a la fracción de hexanos.

Tabla 7. Actividad fungicida (% de inhibición con STD) frente *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum* del fraccionamiento de la fracción de hexano de *Salvia canariensis* cultivada (Centro Ambiental La Tahonilla, Cabildo de Tenerife)

Fracción	Actividad fungicida (% inhibición con STD)		
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
1	6,1 ± 1,7	0,7 ± 15,6	19,0 ± 1,6
2	69,0 ± 2,8	84,0 ± 4,4	55,1 ± 2,6
3	19,7 ± 1,5	24,6 ± 5,5	27,9 ± 2,8
4	64,1 ± 1,4	77,9 ± 3,4	57,1 ± 1,5
5	60,6 ± 1,6	84,2 ± 4,5	41,2 ± 2,8
6	51,8 ± 3,0	79,4 ± 2,6	41,5 ± 3,2
7	45,7 ± 1,8	79,8 ± 4,1	45,5 ± 1,8
8	46,1 ± 2,0	68,6 ± 3,8	40,1 ± 2,0
9	49,9 ± 2,2	78,1 ± 4,0	36,6 ± 2,7
10	50,1 ± 2,8	62,5 ± 5,2	45,9 ± 1,7
11	61,9 ± 2,5	83,4 ± 2,7	85,9 ± 1,1
12	65,4 ± 1,5	83,8 ± 2,8	73,4 ± 2,1
13	53,4 ± 1,3	65,0 ± 3,5	44,8 ± 1,9

Teniendo en cuenta los resultados en su conjunto, la fracción A13-14 fue seleccionada para su posterior fraccionamiento, ya que fue la fracción que

El análisis mediante cromatografía en capa fina y estudios previos de RMN de ^1H de estas fracciones reveló que las subfracciones F11-4C y F11-4D correspondían a un producto mayoritario, cuyos datos de RMN de ^1H , sugieren que es un diterpeno abietatriénico. Este tipo de metabolitos se pueden considerar indicadores quimio-taxonómicos de las especies del género *Salvia*.

Este trabajo de investigación, abre una línea de trabajo dirigida al estudio de la especie *Salvia canariensis* como fuente potencial de nuevos biopesticidas, como alternativa a los pesticidas sintéticos, con la gran ventaja de ser más respetuosos con el medio ambiente y la salud humana.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Recolección, secado y molienda de las hojas de *S. canariensis*

4.1.1. Material vegetal: *Salvia canariensis* silvestre

El material vegetal que ha sido objeto de estudio, *S. canariensis silvestre*, fue recolectada en junio de 2021 en el municipio de Gáldar (Gran Canaria, Islas Canarias, España), en la zona conocida como los pinos de Gáldar, en el cruce que conduce hacia Artenara y el Juncalillo (28°02'10"N, 15°37'30"W, 1415 m.a.s.l.). Un ejemplar testigo con número de pliego TFC 53.528, identificado por la botánica Cristina Montelongo, técnico responsable del Herbario TFC (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, está depositado en dicha instalación.

4.1.2. Material vegetal: *Salvia canariensis* cultivada

Por otra parte, el material vegetal que ha sido objeto de estudio, *S. canariensis* cultivada, fue recolectada en junio de 2021 en el municipio de La Laguna (Tenerife, Islas Canarias, España), en la zona conocida como La Tahonilla, centro de recuperación de fauna silvestre. Un ejemplar identificado por la Dra. Cristina González Montelongo, técnico responsable del Herbario TFC (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, está depositado en dicha instalación.

El material vegetal usado para este Trabajo de Fin de Grado corresponde a plantas de *Salvia canariensis* cultivadas en el Centro Ambiental La Tahonilla. Para el cultivo de esta especie se siguió el siguiente procedimiento:

Para la producción de la planta es fundamental la recolección del material de reproducción, que puede ser sexual (semillas) o asexual (esquejes). Además, es muy importante recolectarlo cuando el embrión ya se haya desarrollado. Las flores se recogen cuando tiene un estado sequedad apropiado y se deben de tamizar, obteniéndose pequeñas semillas en el fondo del tamizador.

La siguiente etapa se desarrolla en el vivero y consiste en la preparación de la mezcla de sustratos, el relleno de las bandejas semilleros y el proceso de siembra (figura 4.1). En dicho proceso, se alisa la superficie, se riega con agua y se siembran las semillas. A continuación, se aplica una mezcla de sustrato, el cuál debe espolvorearse muy suave para no enterrar la semilla.

En la fase de endurecimiento, las plántulas son trasplantadas a macetas de 1 L llenas con mezcla de sustrato (figura 4.2). Asimismo, se deben hidratar con agua. El mantenimiento de las plantas en las macetas depende de si algunas especies necesitan más o menos aguas y más o menos luz.



Figura 4.1. Siembra de las semillas



Figura 4.2. Cultivo de la salvia

Finalmente, al sacar las plantas del umbráculo a los exteriores, se debe de tener en cuenta la especie y la época del año.

El cultivo de esta especie se llevó a cabo en marzo de 2021, mientras que la recolecta de 200 ejemplares transcurridos 8 meses de su cultivo fue en noviembre de 2021.

Una vez se recogieron las hojas, se secaron durante dos semanas en la oscuridad, a una temperatura de 20°C. Posteriormente, las hojas vegetales se molieron en una máquina de la marca Mateu & Sole, S.L. tipo B-2, hasta obtener el material finamente dividido.

4.2. Preparación de extractos

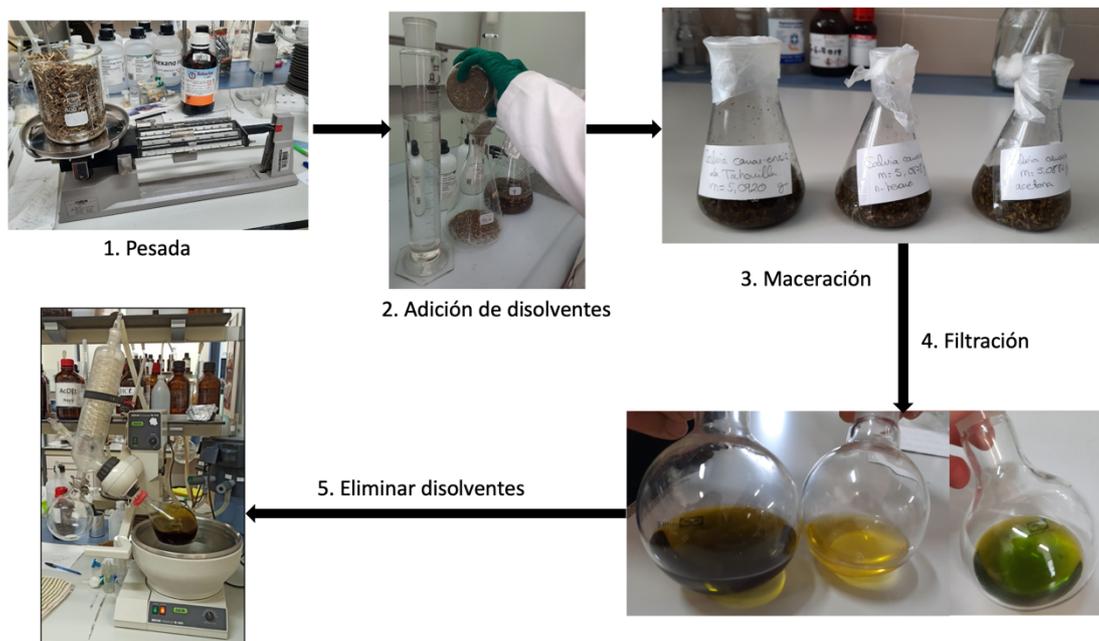
Antes de realizar procesos de separación y purificación es muy importante la correcta preparación de la muestra. Esto es debido a que un buen tratamiento previo de la muestra puede llegar a ahorrarnos tiempo y esfuerzo en los siguientes pasos, además de hacer que el aislamiento se realice de una manera más sencilla. Por todo ello, para preparar correctamente la muestra se debe elegir adecuadamente el disolvente o disolventes de extracción. La extracción con disolventes de baja polaridad rinde extractos con componentes lipofílicos.

Por otro lado, la extracción con acetona, extrae compuestos de media y baja polaridad. Finalmente, la extracción con etanol, disolventes de carácter universal, se obtienen extractos que presentan componentes polares y apolares. En la presente memoria se prepararon diferentes extractos de las hojas de *S. canariensis*:

- Preparación extracto nº 1: Las hojas de *Salvia canariensis* silvestre (5,0 g) se extrajeron tres veces mediante maceración con etanol (3 x 50 mL) a temperatura ambiente (figura 4.3). Se filtró el extracto etanólico y se eliminó el disolvente en el rotavapor a presión reducida a 40°C, obteniéndose 445,1 mg de dicho extracto (Rendimiento 8,9%).
- Preparación extracto nº 2: Las hojas de *S. canariensis* silvestre (5,1 g) se extrajeron tres veces mediante maceración con acetona (3 x 51 mL) a temperatura ambiente (figura 4.3). Se filtró el extracto y se eliminó el disolvente, obteniendo 416,3 mg de extracto (Rendimiento 8,2%).

- Preparación extracto nº 3: Las hojas de *S. canariensis* silvestre (5,1 g) se extrajeron tres veces mediante maceración con hexano (3 x 51 mL) a temperatura ambiente (figura 4.3). El extracto se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor, obteniendo 223,8 mg de extracto hexánico (Rendimiento 4,4%).
- Preparación extracto nº 4: 5,0 gramos de *S. canariensis* silvestre se extrajeron en Soxhlet usando acetona como disolvente. El extracto concentró. usando el rotavapor obteniéndose 542,5 mg de extracto acetónico (Rendimiento 10,8%).
- Preparación extracto nº 5: Las hojas de *Salvia canariensis* (5,1 g) cultivada se extrajeron tres veces aplicando la técnica de maceración con etanol (3 x 51 mL) como disolvente a temperatura ambiente (figura 4.3). El extracto se filtró y se eliminó el disolvente usando el rotavapor obteniendo 573,0 mg de extracto etanólico (Rendimiento 11,2 %).
- Preparación extracto nº 6: Las hojas de *S. canariensis* (5,1 g) cultivada fueron extraídas tres veces mediante maceración con acetona (3 x 51 mL) a temperatura ambiente (figura 4.3). El extracto se filtró y se eliminó el disolvente obteniendo 475,4 mg de extracto acetónico (Rendimiento 9,3%).
- Preparación extracto nº 7: Las hojas de *S. canariensis* (5,0 g) cultivada se extrajeron mediante maceración con hexanos (3 x 50 mL) a temperatura ambiente (figura 4.3). El extracto hexánico se filtró y luego se eliminó el disolvente en el rotavapor obteniendo 76,8 mg (Rendimiento 1,5%).
- Preparación extracto nº 8: 5,0 g de material vegetal de *S. canariensis* cultivada se extrajeron mediante Soxhlet usando acetona como disolvente. Seguidamente, se eliminó el disolvente en el rotavapor obteniéndose 683,7 mg de extracto acetónico (Rendimiento 13,7%).

- Preparación extracto nº 9: Las hojas de *Salvia Canariensis* (400,0 g) cultivada se extrajeron mediante maceración usando etanol como disolvente (3 x 4L) a temperatura ambiente (figura 4.3). El extracto etanólico se filtró y el disolvente se eliminó usando el rotavapor, obteniendo 52,0 gramos de dicho extracto (Rendimiento 13,0%).



Esquema 4. Preparación de extractos mediante maceración

4.3. Partición líquido-líquido

El extracto etanólico, 52 gramos (extracto nº 9) se suspendió en agua (300 mL) y se extrajo tres veces con hexanos (3 x 300 mL). El disolvente de la fracción hexánica se eliminó en el rotavapor obteniendo 8,7 g. Posteriormente, la fracción acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 mL). La fracción orgánica se lleva a sequedad obteniéndose 22,3 g de la fracción de acetato de etilo. Una alícuota de 50 mL de la fracción acuosa fue congelada y posteriormente liofilizada.



Figura 4.4
Partición líquido-líquido

4.4. Fraccionamiento bioguiado



Figura 4.5. Columna cromatográfica

Una vez realizados los ensayos antifúngicos, la fracción de hexano (8,7 mg) fue seleccionada para su posterior estudio mediante cromatografía en gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de hexanos-acetato de etilo en las siguientes proporciones: (100:0), (97,5:2,5), (95:5), (92,5:7,5), (90:10), (89:11); (87:13), (85:15), (82,5:17,5), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (0:100). Se obtuvieron un total de 16 fracciones, que tras el análisis mediante cromatografías en capa fina se reunieron en 13 fracciones.

Continuando con el fraccionamiento bioguiado, la fracción A13-14 (341,7 mg) fue fraccionada mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como fase móvil una mezcla de diclorometano-acetona de polaridad creciente (9:1 a 6:4). Se obtuvieron 100 fracciones (figura 4.6.), las cuales se reunieron en 4 fracciones tras hacer análisis mediante cromatografías en capa fina: F11-1, F11-2, F11-3, F11-4.

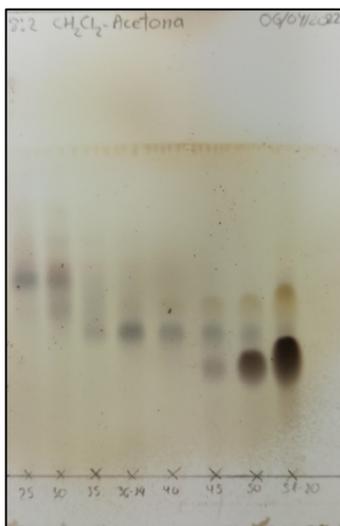


Figura 4.6. CCF de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción A13-14

La subfracción F11-2 (29,4 mg) fue recromatografiada utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 (cloroformo:metanol 1:1), obteniéndose 28 fracciones. Tras realizar análisis por cromatografía en capa fina, se reúnen en 2 fracciones: F-11-2A y F11-2B (figura 4.7).

Además, la subfracción F11-4 (341,7 mg) también fue recromatografiada utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 (cloroformo:metanol 1:1), obteniéndose 40 fracciones. Tras realizar análisis por cromatografía en capa fina, se reúnen en 3 fracciones: F11-4A, F11-4B y F11-4C (figura 4.7).

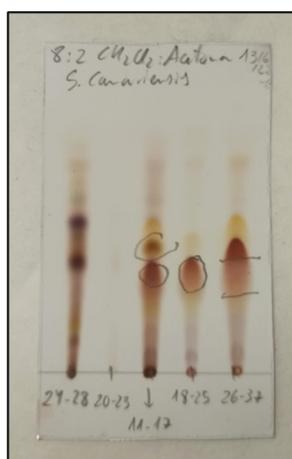


Figura 4.7. CCF de las subfracciones F11-2 y F11-4

Con el objetivo de aislar e identificar los metabolitos presentes en dichas fracciones, la fracción F-11-4B fue purificada mediante cromatografía preparativa en capa fina (PTLC), utilizando como fase móvil diclorometano, obteniéndose un metabolito que hemos denominado diterpeno D1. Dicho compuesto fue aislado como un sólido que revela de color gris en cromatografía en capa fina (diclorometano-acetona 8:2), cuando fue revelado con óleum ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 80:16:4) seguido de calentamiento en placa.

Un análisis preliminar de los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C (figura 4.8. y 4.9.) están de acuerdo con una estructura de diterpeno con esqueleto de abietatrieno para el producto que hemos denominado D1, que presenta un anillo aromático tetrasustituido, una cadena isopropílica y un alcohol secundario. Estos datos están de acuerdo con estudios previos de *Salvia canariensis*, los cuales

muestran que es una especie rica en diterpenos con esqueleto de abietatrieno^{34,35}.

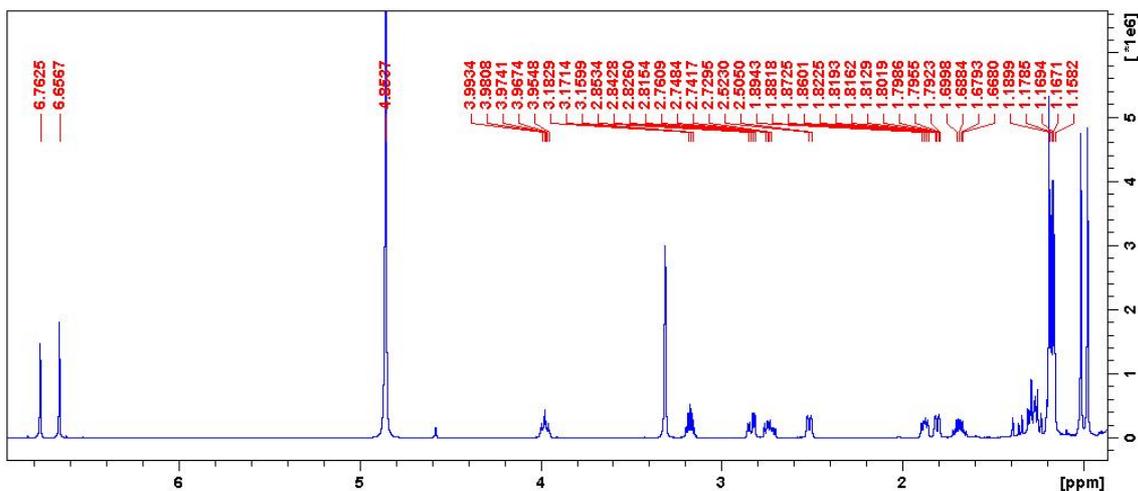


Figura 4.8. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 600 MHz) del diterpeno D1

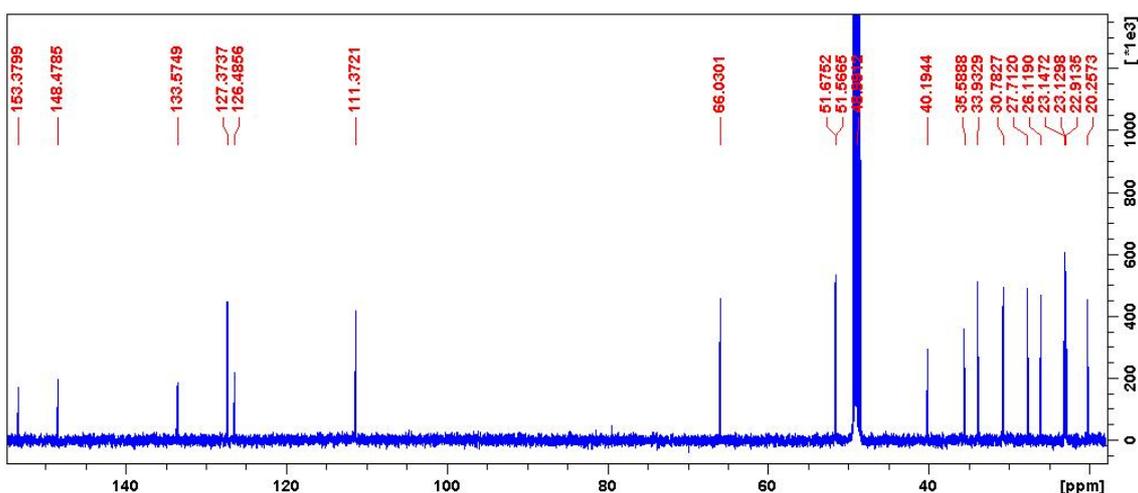


Figura 4.9. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) del diterpeno D1

4.5. Datos espectroscópicos del diterpeno D1

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.98 (3H, s); 1.01 (3H, s); 1.16 (3H, d, *J*= 6.8 Hz); 1.17 (3H, d, *J*= 6.8 Hz); 1.19 (3H, s); 1.68 (1H, ddd, *J*= 6.7, 12.4, 19.2 Hz); 1.81 (1H, ddd, *J*= 2.0, 3.8, 12.4 Hz); 1.88 (1H, dd, *J*= 7.6, 13.1 Hz); 2.51 (1H, dt, *J*= 11.9 Hz); 2.73 (1H, ddd, *J*= 7.6, 11.4, 18.9 Hz); 2.83 (1H, dd, *J*= 6.2, 16.3 Hz); 3.17 (1H, sext, *J*= 7.0 Hz); 3.97 (1H, tt, *J*= 11.6, 4.0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 20.3; 22.9; 23.1; 23.2; 26.1; 27.7; 30.8; 33.9; 35.6; 40.2; 51.6; 51.7; 66.0; 111.4; 126.5; 127.4; 133.6; 148.5; 153.4 .

4.6. Actividad fungicida frente a hongos fitopatógenos

Los ensayos para la evaluación de la actividad fungicida de los extractos y fracciones se llevaron a cabo por los miembros del equipo de investigación CIPEV (Control integrado de plagas y enfermedades de los vegetales) de la universidad de La Laguna. Estos ensayos se efectuaron frente a tres hongos fitopatógenos que afecta a los cultivos en Canarias: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología implementada por el CIPEV ³⁷.

Brevemente, la actividad antifúngica fue analizada como micelios por un método de agar-disolución. Una vez solidado el medio de cultivo, se colocaron 8 discos de 40 mm del hongo objetivo por placa, en placas de Petri de prueba y de control. Se preparó una solución madre de 40 mg/mL, utilizando etanol como disolvente, y se ensayó el extracto de la planta a la concentración de 1 mg/mL. Las colonias crecieron en placas de Petri incubadas durante 48 horas y se digitalizaron y midieron con la aplicación ImageJ (Image j, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). El porcentaje de inhibición (%) fue calculado como: $\%I = (C - T/C) \times 100$, donde C es el diámetro de las colonias de control y T es el diámetro de las colonias de prueba.

5. TÉCNICAS EXPERIMENTALES EMPLEADAS

5.1. Técnicas experimentales

5.1.1. Técnicas de extracción

Extracción por maceración

La extracción por maceración usualmente es una técnica que se utiliza en la elaboración de vinos, tónicas e incluso en la producción de aceites vegetales y compuestos bioactivos.

Esta técnica consiste en moler el material vegetal para obtener partículas más finas con el fin de mejorar la superficie de contacto con el disolvente. Luego, se debe dejar reposar el material vegetal en un recipiente con el disolvente, favoreciendo de esta manera la rotura de la pared celular para liberar

compuestos solubles. Hemos de comentar que el recipiente que contiene esta mezcla se debe agitar temporalmente, ha de estar a temperatura ambiente y se debe dejar macerar durante un día para después filtrar (esto se hace tres veces).

La maceración es la técnica de extracción más simple y sencilla, no obstante, tiene la desventaja de que la cantidad de disolvente usado es muy grande.

Extracción Soxhlet

El científico alemán Franz Ritter diseñó el primer extractor de Soxhlet en 1879. Se creó con el fin de eliminar lípidos y se ha usado para extraer compuestos bioactivos útiles de origen natural.

Esta técnica es de extracción continua y se fundamenta en colocar la muestra seca y molida en una bolsa porosa hecha de papel de filtro y se incluye en la cámara extractora. Si comparamos las dos extracciones, se concluye que la extracción Soxhlet necesita una menor cantidad de disolvente y se puede hacer en menos tiempo. Sin embargo, también presenta algunas desventajas, por ejemplo, la necesidad de que la muestra debe estar seca, finamente dividida, y además se requieren disolventes de alta pureza por lo que puede aumentar el coste del proceso.

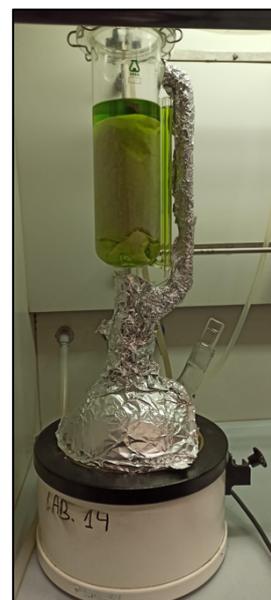


Figura 5.1. Extracción Soxhlet

5.2. Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina (CCF o TLC)

Para realizar esta cromatografía se usaron cromatofolios (20 x 20 cm) los cuáles fueron recortados a la medida de 5 x 7 cm y provienen de la empresa Merck. Por otra parte, la detección de los diferentes productos sobre las placas se realiza mediante un revelado oleum ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 80:16:4) y calentamiento en placa calefactora.

Cromatografía preparativa en capa fina (PTLC)

Las cromatografías preparativas en capa fina se realizaron en placas (20 x 20 cm) de gel de sílice de 1 nm de espesor, de la empresa Merck. La cantidad sembrada por placa fue cercana a 10 mg, usándose para la elución la mezcla de disolventes más adecuada en cada caso. La detección de los productos sobre las placas se realizó por fluorescencia con luz UV a 254 o 360 nm. Posteriormente se realizó el raspado de la zona que contenía el producto deseado y su elución con un disolvente.

Cromatografía en columna

Para hacer este tipo de cromatografía se utiliza gel de sílice fina de 0.063-0.200 nm de diámetro de la empresa Macherey-Nagel. Las mezclas que se quieren separar se colocaron disueltas o absorbidas en gel de sílice.

5.3. Técnicas espectroscópicas

Resonancia magnética nuclear

Se hicieron varios espectros de RMN de ^{13}C y RMN de ^1H . Con respecto a este último, los espectros se obtuvieron con el espectrómetro Bruker Avance (600 MHz). También, se ha de comentar que para realizar los espectros se disolvió el producto en cloroformo deuterado (CDCl_3). Además, los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm y la constante de acoplamiento (J) en Hz.

5.4. Programas informáticos

Para realizar las estructuras de esta memoria se ha utilizado el programa ChemDraw. Además, el procesado de los experimentos de RMN se llevó a cabo con el programa TopSpin 3.6.1. de Bruker.

6. CONCLUSIONES

Siguiendo los objetivos propuestos para el desarrollo del proyecto llevado a cabo en este TFG, se extraen las siguientes conclusiones:

- El método óptimo en el proceso de extracción de las hojas de *Salvia canariensis* fue el realizado mediante Soxhlet, usando acetona como disolvente.
- Todos los extractos presentaron una excelente actividad frente a los hongos fitopatógenos ensayados: *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.
- La partición líquido-líquido de los extractos etanólicos permitió obtener fracciones enriquecidas (hexanos y acetato de etilo) en compuestos fungicidas.
- La comparación del estudio de *Salvia canariensis* silvestre y cultivada reveló que ambas presentan un perfil químico y fungicida similar.
- El fraccionamiento bioguiado de la fracción hexánica de *S. canariensis* cultivada reveló que los metabolitos antifúngicos corresponden a diterpenos abietatriénicos.
- *Salvia canariensis* es una prometedora fuente de biopesticidas y una alternativa respetuosa con el medio ambiente y sostenible frente a pesticidas convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) *El Estado Mundial de La Agricultura y La Alimentación 2019*; FAO, **2019**. <https://doi.org/10.4060/CA6030ES>.
- (2) Jha, S.; Tripathi, S. K.; Singh, R.; Dikshit, A.; Pandey, A. Global Scenario of Natural Products for Sustainable Agriculture. In *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture*; Springer Singapore: Singapore, **2020**; pp 291–307. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_14.
- (3) Sachdev, S.; Singh, R. P. Current Challenges, Constraints and Future Strategies for Development of Successful Market for Biopesticides. *Climate*

- Change and Environmental Sustainability* **2016**, 4 (2), 129.
<https://doi.org/10.5958/2320-642X.2016.00014.4>.
- (4) *Content :: AlgaeBase*.
<https://www.algaebase.org/content/> (accessed 2022-06-08).
- (5) *Toxicidad de los pesticidas en humanos*.
<http://elherbolario.com/nutricion/item/755-toxicidad-de-los-pesticidas-en-humanos> (accessed 2022-06-08).
- (6) Chandler, D.; Bailey, A. S.; Tatchell, G. M.; Davidson, G.; Greaves, J.; Grant, W. P. The Development, Regulation and Use of Biopesticides for Integrated Pest Management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2011**, 366 (1573), 1987–1998.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>.
- (7) Suhaib A. Bandh. *Sustainable Agriculture. Technical Progressions and Transitions*; Springer, **2022**.
- (8) Regnault-Roger, C., Philogène, B., Vincent, C. Biopesticidas de Origen Natural. *Prensa Libros, S.A* **2004**, 3–6, 13, 33–35, 68.
- (9) *Situación, forma y extensión - GEOGRAFÍA FÍSICA - (GEVIC) Gran Enciclopedia Virtual Islas Canarias*.
https://www.gevic.net/info/contenidos/mostrar_contenidos.php?idcat=22&idcap=91&idcon=526 (accessed 2022-06-08).
- (10) Sundseth, K. *Natura 2000 En La Región Macaronésica*. Comisión Europea. **2010**.
- (11) *BOE.es - DOUE-L-1992-81200 Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres*.
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1992-81200> (accessed 2022-06-08).

- (12) *Macaronesia* - *Wikipedia, la enciclopedia libre*.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Macaronesia> (accessed 2022-06-11).
- (13) *endémico, endémica* | *Definición* | *Diccionario de la lengua española* | *RAE - ASALE*.
<https://dle.rae.es/end%C3%A9mico> (accessed 2022-06-08).
- (14) Bramwell, D. *Flora de Las Islas Canarias*; Editorial Rueda, 1997.
- (15) *Etnografía – Asociación para el Desarrollo Rural de La Palma*.
<https://www.aderlapalma.org/etnografia/> (accessed 2022-06-11).
- (16) *Métodos de control de plagas: estrategias y tácticas - Innovatione*.
<https://innovatione.eu/2020/01/13/metodos-control-plagas/> (accessed 2022-06-08).
- (17) *Agricultura en Canarias: conciliando tradición y ciencia. Actas de la VII Semana Científica Telesforo Bravo. 2012. | IEHCAN*.
<https://www.iehcan.com/2012/01/agricultura-en-canarias-conciliando-tradicion-y-ciencia-actas-de-la-vii-semana-cientifica-telesforo-bravo-2012/>
(accessed 2022-06-13).
- (18) Rodríguez, F.; Pego, A.; Perera González, S.; Viña, D. E. MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES EN CULTIVOS.
- (19) *AgroCabildo - Agricultura y desarrollo rural en Tenerife*.
https://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=686
(accessed 2022-06-13).
- (20) *Control Biológico del Tizón Temprano en Tomate*.
<https://www.fertilab.com.mx/blog/314-control-biologico-del-tizon-temprano-en-tomate/> (accessed 2022-06-13).
- (21) *RAIF: Virus de la Clorosis del Tomate (ToCV) en Tomate Bajo Abrigo*.
[http://chilorg.chil.me/post/raif-virus-de-la-clorosis-deltomate-\(%20%20to cv\)-en-tomate-bajo-abrigo-70774](http://chilorg.chil.me/post/raif-virus-de-la-clorosis-deltomate-(%20%20to cv)-en-tomate-bajo-abrigo-70774) (accessed 2022-06-13).

- (22) *Cómo eliminar la cochinilla algodonosa para siempre* - Succulent Avenue.
<https://succulentavenue.com/eliminar-cochinilla-algodonosa/> (accessed 2022-06-11).
- (23) *File:Aardappelschurft (Streptomyces scabies on potato).jpg* - Wikimedia Commons.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aardappelschurft_%28Streptomyces_scabies_on_potato%29.jpg (accessed 2022-06-11).
- (24) *Alternaria-solani* - NOVA Calidad en tus cultivos.
<https://laboratorios-nova.com/web/tipodeproblematika/tizon-temprano-la-papa/alternaria-solani/> (accessed 2022-06-13).
- (25) *Agricultura. Directorio de empresas, artículos, cultivos y negocios agrícolas.*
<https://www.infoagro.com/> (accessed 2022-06-13).
- (26) Bertrand B., C. J. P., & P. E. *Plantas Para Curar Plantas*, 2nd ed.; **2014**.
- (27) *Agaete Televisión* - YouTube.
https://www.youtube.com/channel/UC8cqo2kmiog_qHi-AjMI67w
(accessed 2022-06-11).
- (28) *Cabriña. Davallia canariensis.*
<https://www.asturnatura.com/especie/davallia-canariensis.html> (accessed 2022-06-11).
- (29) *Plantas medicinales: "Salvia canaria"* - Infonortedigital.com.
<https://www.infonortedigital.com/portada/salud-viva/item/82449-plantas-medicinales-salvia-canaria> (accessed 2022-06-12).
- (30) *Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica* | Farmacia Profesional.
<https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-salvia-fitoquimica-farmacologia-terapeutica-13034818> (accessed 2022-06-12).

- (31) *Flora de las Islas Canarias. Salvia canariensis.*
https://floracanaria.com/especies/lamiaceae/Salvia_canariensis.html
(accessed 2022-06-08).
- (32) *Flora de las Islas Canarias. Salvia canariensis.*
https://floracanaria.com/especies/lamiaceae/Salvia_canariensis.html
(accessed 2022-06-12).
- (33) Funes, J. L. B. ; D. A. I. J. R. Triterpenes from Lavandula Canariensis. *Journal of Natural Products* **1986**, 49, 937–949.
- (34) Luis J.G.; Gonzalez A.G.; Andres L.S.; Mederos S. Diterpenes from in Vitro-Grown Salvia Canariensis. **1992**, 31, 3272–3273.
- (35) Abreu, M. E.; Müller, M.; Alegre, L.; Munné-Bosch, S. Phenolic Diterpene and α -Tocopherol Contents in Leaf Extracts of 60 *Salvia* Species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2008**, 88 (15), 2648–2653.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3384>.
- (36) Rivero-Chan, B. E.; Marrero, J. G.; Hernández-Ortega, S.; Mena-Rejón, G. J.; Miranda, L. D. Rapid Access to Ketones Related to Oleanolic and Ursolic Acids. *Natural Product Research* **2012**, 26 (7), 675–679.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2010.543902>.
- (37) Cosoveanu, A. , C. R. , G. C. I. B. , G.-C. A. Antifungal Activity of Plant Extracts against Pre and Postharvet Pathogen. **2013**, 56, 206–211.

