

Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina

[Antifungal activities of the essential oil of five species of *Juniperus* from Argentina]

José S. DAMBOLENA*^{1,2}, José M. MERILES^{1,2}, Abel G. LÓPEZ², Mauro N. GALLUCCI^{1,2}, Silvia B. GONZÁLEZ³, Pedro E. GUERRA⁴, Antonella BRUNO² y María P. ZUNINO^{1,2}.

¹IMBIV (CONICET) Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba., ³Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Química y ⁴Facultad de Ingeniería, Departamento Forestal, Universidad Nacional de la Patagonia.

Contactos / Contacts: José S. DAMBOLENA E-mail address. dambolena@fcq.unc.edu.ar

Abstract

The chemical composition of the leaf oils of five *Juniperus* species (*Juniperus sabina* L., *Juniperus communis* Lam., *Juniperus scopulorum* Sarg., *Juniperus virginiana* L., *Juniperus chinensis* L., Cupressaceae) was determined by co-chromatography with authentic samples, GC-MS and Kováts retention indices. Sabinene was the most abundant component in the oils of *Juniperus* from western Patagonia Argentina. However, limonene and germacrene B constituted 25.1% and 11.5% of the oil of *J. sabina*. *J. virginiana* showed high concentration of alpha-humulene and limonene (31.4 and 15.9% respectively), while isobornyl acetate and germacrene B were also the main compounds of *J. chinensis*. Essential oils extracted of *Juniperus* were evaluated in vitro for their efficacy against *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans* and *Rhodotorula* infection. *Candida albicans* was not inhibited for the essential oils of *Juniperus*. However, *F. verticillioides*, *A. flavus*, *A. parasiticus* and *Rhodotorula* were inhibited for these oils.

Keywords: *Juniperus sabina* L., *Juniperus communis* Lam., *Juniperus scopulorum* Sarg., *Juniperus virginiana* L., *Juniperus chinensis* L., antifungal action, essential oils.

Resumen

La composición de los aceites esenciales de la hoja de cinco especies de *Juniperus* (*Juniperus sabina* L., *Juniperus communis* Lam., *Juniperus scopulorum* Sarg., *Juniperus virginiana* L., *Juniperus chinensis* L., Cupressaceae), se determinó mediante una co-cromatografía con muestras auténticas de dos columnas de diferente polaridad, CG-EM y los índices de retención de Kováts. El sabineno fue el componente más abundante en los aceites de *Juniperus* del oeste de la Patagonia Argentina. Sin embargo, el limoneno y el germacreno B son otros componentes importantes del aceite esencial de *J. sabina* con el 25,1% y 11,5% respectivamente. En *J. virginiana* el alfa-humuleno y el limoneno (con el 31,4% y 15,9% respectivamente) mostraron ser también importantes, mientras que el acetato de isobornilo y el germacreno B fueron también los principales componentes de la *J. chinensis*. Los aceites esenciales extraídos de *Juniperus* se evaluaron in vitro para determinar su eficacia contra *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans* y *Rhodotorula*. *Candida albicans* no se inhibió por la acción de los aceites esenciales de *Juniperus*. Sin embargo, *F. verticillioides*, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *Rhodotorula* fueron inhibidos.

Palabras Clave: *Juniperus sabina* L., *Juniperus communis* Lam., *Juniperus scopulorum* Sarg., *Juniperus virginiana* L., *Juniperus chinensis* L., acción antifúngica; aceites esenciales.

Recibido | Received: 11 de Diciembre de 2010.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 8 de Febrero de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2011.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT-UNC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de esta investigación.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: José S. DAMBOLENA, José M. MERILES, Abel G. LÓPEZ, Mauro N. GALLUCCI, Silvia B. GONZÁLEZ, Pedro E. GUERRA, Antonella BRUNO y María P. ZUNINO 2011. Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(2): 104 - 115.

INTRODUCCIÓN

Los hongos representan un problema de consideración creciente en la industria de los alimentos ya que generan graves pérdidas económicas, incluso en países desarrollados, debido a su capacidad de causar descomposición y deterioro de materias primas y alimentos procesados y provocar riesgos potenciales para la salud (Brul & Klis, 1999). En la actualidad, el uso de conservantes químicos para prevenir el crecimiento de hongos en los alimentos es una necesidad para la industria alimentaria. Sin embargo, el desarrollo de la resistencia contra hongos de la mayoría de las drogas utilizadas ha sido informado (Cuenca-Estrella *et al.*, 2000). Debido al impacto económico de los alimentos en mal estado y a las preocupaciones de los consumidores sobre la seguridad de los alimentos que contienen productos químicos de síntesis, un considerable interés de la industria ha centrado su atención en los productos naturales (Dillon & Board, 1994).

Los aceites esenciales (AEs) de las plantas aromáticas son la principal fuente natural de monoterpenos, encontrándose también en menor cantidad otros terpenos como sesquiterpenos, iridanos, diterpenos y compuestos fenólicos como fenilpropenoides. Los AEs de varias plantas aromáticas poseen acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica (Hammer *et al.*, 1999; Chao & Young, 2000). Su efecto es atribuido a la presencia de monoterpenos y compuestos fenólicos que los componen o a su mezcla sinérgica con componentes presentes en menores proporciones (Burt, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha, no han demostrado claramente si existe una relación directa entre la actividad antifúngica y su estructura química (Dorman & Deans, 2000).

El género *Juniperus* pertenece a la Familia de las Cupressaceae, Subfamilia Juniperoideae. Esta Subfamilia es endémica del Hemisferio Norte (Correa, 1998). El género está dividido en tres secciones: *Caryocedrus*, *Juniperus* (enebros) y *Sabina*. Las dos últimas son las que contienen el mayor número de especies (Adams, 1999).

En Argentina se cultivan los enebros, sólo desde el punto de vista ornamental, en grupos, macizos, setos vivos, ejemplares aislados. En el Noroeste del Chubut, están distribuidos en cortinas de protección, cortavientos en zonas rurales, y formando setos vivos de reparo. Es *Juniperus communis*, la especie que más se ha naturalizado en el sotobosque de esta provincia (Guerra *et al.*, 2008).

Algunas especies cultivadas en Argentina, han demostrado poseer actividad antimicrobiana (Oliva *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004; Demo *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2007). En el género *Juniperus*, las especies *J. communis*, *J. phoenicea*, *J. oxycedrus*, *J. turbinata* y *J. aetheroleum* ya fueron estudiadas como antimicrobianas (Hammer *et al.*, 1999; Angioni *et al.*, 2003; Cavaleiro *et al.*, 2006; Cosentino *et al.*, 2003; Pepeljnjak *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no se conoce la actividad antifúngica de especies implantadas en Argentina.

El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química y el efecto antifúngico de cinco especies del género *Juniperus* provenientes de Esquel, provincia de Chubut, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se ubica al género *Juniperus*, de acuerdo a la secuencia de Jerarquías Taxonómicas:

Subdivisión: Gimnospermas

Clase: Coniferópsidas

Orden: Coniferales

Familia: Cupresáceas

Subfamilia: Juniperoideas

Género: *Juniperus*

Especie: *J. communis*, *J. chinensis*, *J. sabina*, *J. scopulorum* y *J. virginiana*.

El material vegetal fue recolectado, durante tres años consecutivos 2000, 2001 y 2002, en primavera y otoño, de los siguientes sitios: Estación Forestal INTA de Trevelin (Ex -IFONA), *J. communis* y *J. virginiana*; Vivero Las Araucarias-Hoyo de Epuyén: *J. chinensis* y *J. scopulorum*; Esquel: *J. sabina*. El material de herbario fue identificado por el Ing. Pedro E. Guerra y se halla depositado en el laboratorio de la Cátedra de Botánica Forestal-UNPSJB, registrado con la siguiente identificación: BF. N°342-346.

Características botánicas de las especies:

***J. communis*:** arbusto o árbol de baja talla; hojas jóvenes y adultas aciculares dispuestas en verticilos de 3, glaucas con ápices agudos y punzantes; flores femeninas y masculinas en ejemplares dioicos; frutos gábulos de forma ovoide a circular de diámetro 4 a 6 mm, color azul oscuro cuando maduros.

***J. virginiana*:** especie de porte arbustivo o arbóreo; hojas jóvenes espinescentes, dispuestas en verticilos trímeros; adultas escamiformes de 1,5 mm de largo; flores en ejemplares dioicos; frutos pruinosos antes y después de madurar, de color azul.

J. chinensis: especie de porte arbóreo, con altura variable; hojas jóvenes aciculares de color verde glauco, y adultas escamiformes, de olor resinoso al ser frotadas; flores masculinas y femeninas en ejemplares separados; frutos pruinosos color azul oscuro cuando maduros.

J. sabina: de porte arbustivo y forma irregular; hojas aciculares y escamosas opuestas y de color verde grisáceo a verde glauco; flores en ejemplares monoicos o dioicos; frutos gálbulos pruinosos cuando verdes y de color azul oscuro al madurar.

J. scopulorum: de porte arbustivo y arbóreo; hojas escamiformes, de color verde grisáceo a glauco; flores masculinas en ramas herbáceas y femeninas en ramas semileñosas, monoicos; frutos gálbulos pruinosos verde-grisáceos, y al madurar azul oscuro.

Ubicación de los sitios de recolección

***J. communis* y *J. virginiana*:**

Estación Forestal INTA-Trevelin: Alt.: 450 m.s.n.m; Lat.: 43° 05' Sur; Long.: 71° 31' Oeste.

Características climáticas: Temperatura máxima media anual: 15,7°C; Temperatura mínima media anual: 3,4°C; Temperatura máxima absoluta: 34°C; Temperatura mínima absoluta: -12°C; Precipitación media anual 942 mm; distribución: 80,6% Abril-Septiembre; 19,4% Octubre-Marzo.

Características edáficas: El material originario, está compuesto por cenizas volcánicas y mezclado con material coluvial. El suelo era de textura franco-arenosa, granular, media a fina y drenaje moderado en algunos sectores. La roca madre estaba constituida por aluviones y coluviones con aportes de cenizas volcánicas mezcladas.

***J. chinensis* y *J. scopulorum*:**

Vivero las Araucarias: Altura.: 250 m.s.n.m; Lat.: 42° 05' Sur; Long.: 71° 29' Oeste.

Características climáticas: Temperatura máxima absoluta 37°C; Temperatura mínima absoluta -9°C; Temperatura media anual: 16,7°C; Precipitación media anual: 950 mm; distribución de la precipitación: Abril-Septiembre: 76%, Octubre-Marzo: 24%.

Características edáficas: Suelos pardos forestales ácidos, débilmente lixiviados del área de transición subhúmedo-seca. Asociados: suelos aluviales, semiturbosos de mallín (Etchevehere, 1972).

***J. sabina*:**

Esquel: Alt.: 568 m.s.n.m; Lat.: 42° 57'; Long.: 71° 08' Oeste.

Características climáticas: Temperatura máxima absoluta 34° C; Temperatura mínima absoluta -14° C; Temperatura media anual: 9,1°C; precipitación media

anual: 520 mm; distribución: Abril-Septiembre: 72,7 %, Octubre-Marzo: 27,3 %.

Características edáficas: suelos pardo-forestales, menos ácidos que los pardo-forestales ácidos nopodsólicos y con características trasicionales hacia los regosoles del ecotono estepa-bosque. En las depresiones y valles, predominan los suelos aluvionales e hidromórficos de mallines (Etchevehere, 1972).

Obtención de los aceites esenciales (AE)

Los AE se aislaron a partir del material vegetal oreado, mediante destilación por arrastre con vapor de agua, en un aparato tipo Clevenger durante 3h (Biurrun *et al.*, 2005). Posteriormente, los aceites obtenidos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y almacenados en oscuridad a 4° C. Los mismos se analizaron por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.

Identificación y cuantificación de los componentes de los Aceites Esenciales.

La identificación de los componentes de los AEs fue realizado por Cromatografía gas-líquido-Espectrometría de masas (CG-EM), utilizado un equipo Perkin Elmer Q600, con columna capilar SE-30 (30m x 0.25 mm). La temperatura de la columna se programó desde 60° a 240° C a 4° C/min. La temperatura del inyector fue de 280° C y el flujo de helio de 1 ml/min. La interpretación de los espectros de masas se realizó utilizando una biblioteca NIST y por comparación con espectros similares tomados de bibliografía (Adams, 1995). También se utilizaron estándares auténticos para la identificación de algunos terpenos y se determinaron los índices de retención usando los tiempos de retención de una serie de n-alcanos inyectados bajo las mismas condiciones. La cuantificación de los componentes de los AE fue realizada por Cromatografía gas-líquido con detector de llama (CG-FID), utilizando un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado con detector de ionización de llama y con una columna capilar CBP1 (30m x 0.25 mm). La temperatura de la columna se programó desde 60° a 240° C a 4° C/min. La temperatura del inyector fue de 280° C. El flujo de nitrógeno fue de 1 ml/min.

La cuantificación de los componentes (composición porcentual) se realizó teniendo en cuenta las áreas de los picos del cromatograma correspondiente.

Microorganismos

Los microorganismos ensayados en este estudio fueron: *Fusarium verticillioides* MRC 4316 (obtenido

del Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis, Tygerberg, República de Sudáfrica, PROMEC), *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (obtenida del Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, IL), *Aspergillus flavus* (aislado a partir de semillas de maní crecidas en Córdoba-Argentina. Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), *Candida albicans* N° 387 (obtenida de la Colección de la División de Micología del Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba, Argentina), *Rhodotorula ssp* (aislada en el Laboratorio de Micología y Parasitología del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)

Preparación y estandarización de los inóculos

La concentración de los inóculos de las cepas fúngicas se ajustó para alcanzar 10^6 células o conidios /mL utilizando el método de recuento en cámara de Neubauer.

Los inóculos de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se elaboraron cultivando dichas cepas en placas de Petri de 90 mm de diámetro con 15 mL de medio Czapek-dox agar con el 0,1% de agar y agar papa dextrosa (PDA) respectivamente. Ambos medios fueron disueltos en agua destilada, fraccionados en frascos de vidrio de 50 mL y esterilizados a 121° C durante 15 minutos. Las placas fueron incubadas a 27° C durante siete días. Las placas con la cepas fúngicas desarrolladas, fueron inundadas con 10 mL de caldo tripteína de soja y su superficie fue frotada con una espátula de Drygalsky con el objeto de remover el desarrollo fúngico. La suspensión resultante fue extraída con una pipeta Pasteur estéril y transferida a un tubo cónico, el cual fue vigorosamente agitado en un vortex durante 15 segundos.

Para las levaduras *Rhodotorula* y *Candida albicans* se utilizó el medio Sabouraud – Agar, fueron diseminadas en placas de Petri y se incubaron a 30° C durante 72 horas. Posteriormente fue re-suspendida en caldo tripteína para el posterior ajuste de la concentración. La concentración final se ajustó con cámara de Neubauer para obtener una densidad de trabajo de 10^6 UFC/mL.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La determinación de las CIM se realizó por el método de susceptibilidad a los antifúngicos en medio

semisólido (SAAS) semi-cuantitativo (Provine & Hadley, 2000). Brevemente para este ensayo se utilizó como medio de cultivo el caldo de infusión de corazón (Anexo I) con el agregado de 0,5% de agar (medio semisólido). El medio fue disuelto en agua Milli Q fraccionado en alícuotas de 5 mL en tubos de vidrio de 16 x 125 mm y esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos, con un pH final aproximado de 7,4. Posteriormente, los tubos con el medio se enfriaron en baño termostático entre 45 – 50° C e inmediatamente, se agregaron los AEs disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), para obtener una concentración final de 30, 60, 125, 250, 500 y 1000 µL/L en los medios de cultivo. Posteriormente los tubos fueron almacenados a 4° C hasta su utilización. Un total de 5 tubos fueron adicionados con DMSO (puro sin monoterpenos) en la concentración más alta utilizada para disolver los monoterpenos, y utilizados como control positivo. Por otra parte, 5 tubos con el medio de cultivo puro, sin ningún agregado, fueron utilizados para evaluar el efecto de vehículo (DMSO) sobre el desarrollo fúngico y 3 tubos análogos sin inoculación fúngica, fueron utilizados como controles de esterilidad (control negativo). La inoculación de los medios fue realizada con un anillo de 10 µL, insertando el inóculo de levaduras (elaborado según lo detallado en el apartado anterior) hasta el fondo del tubo de 50 mL, que contiene el medio con el aceite a evaluar, para de esta forma obtener un desarrollo bidimensional. Finalmente sobre el medio de cultivo inoculado, se agregaron 0,5 mL de aceite mineral (vaselina), con el objeto de evitar la esporulación y el desarrollo fúngico sobre la superficie. Los tubos inoculados se incubaron durante 48 horas o hasta un buen desarrollo aparente en el medio control. Para determinar el nivel de inhibición se compararon todos los tratamientos con el control (control positivo) y el desarrollo fue calificado de la siguiente manera: 4+ desarrollo comparable con el control, 3+ aproximadamente en 75% del control, 2+ el 50%, 1+ 25% de desarrollo o menos, con respecto al control y “0” sin desarrollo visible. La inhibición del desarrollo de los hongos filamentosos de un 75% o más (1+) determina la CIM.

Dilución en agar en placa de Petri

Para este ensayo se utilizó como medio de cultivo Czapek-dox para el crecimiento de *F. verticillioides* y PDA para el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Los medios fueron disueltos en agua destilada, fraccionados en Erlenmeyers de vidrio de 100 mL, esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos,

y posteriormente se enfriaron en baño termostático a 45 – 50° C. Soluciones de los 5 AEs de *Juniperus* spp en DMSO fueron agregados en los medios hasta alcanzar una concentración final de 5, 125, 250, 500, y 1000 µL/L. Posteriormente, los medios de cultivo adicionados con los diferentes AEs fueron fraccionados en placas de Petri hasta su posterior solidificación. Una suspensión de conidios fúngicos (10 µL), preparada como se explicó previamente, fue insertada en el centro de las placas de Petri. Las placas fueron incubadas a 28°C en oscuridad hasta que el crecimiento fúngico en las placas control (medio adicionado con DMSO) cubrió completamente la superficie del medio. Los experimentos fueron realizados por quintuplicado y los resultados fueron expresados como área de crecimiento radial (cm²). El crecimiento radial de los respectivos microorganismos fue cuantificado tomando como eje el centro de la placa hasta el perímetro interno de la misma, a través del área del círculo (Meriles *et al.*, 2006).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa INFOSTAT/ Profesional 2005p.1 (F.C.A.-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los datos de estos estudios fueron analizados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). La normalidad de los datos fue determinada con el test Shapiro–Wilk. Diferencias significativas entre los tratamientos fueron determinadas con el test de comparaciones múltiples DGC test (Di Rienzo *et al.*, 2002). En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas para valores de P < 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y cuantificación de los componentes de los AEs de las plantas aromáticas estudiadas.

Los análisis por CG-EM revelaron la presencia de 39 compuestos que representan más del 90% del total de los aceites analizados (Tabla 1). Estos aceites se caracterizaron por presentar los siguientes compuestos mayoritarios: sabineno, limoneno, acetato de isobornilo, α-humuleno y germacreno B. El sabineno

predominó en el AE de *J. scopulorum* y *J. communis*, 86,5 % y 92 % respectivamente. El α-humuleno se encontró en *J. virginiana* en un 31.4 %, mientras que en las otras especies se presentó con valores traza o no estuvo presente. En esta especie, también fue importante la presencia de limoneno (15.9%). Este compuesto también se presentó como uno de los mayoritarios (25.1%) junto al sabineno (52.3%) y al germacreno B (11.5%) en la especie *J. sabina*. A su vez, el germacreno B fue uno de los terpenos con alto porcentaje (12%) en la especie *J. chinensis* junto al acetato de isobornilo (25.5%) y al sabineno (43%) (Tabla 1).

Mientras que muchas especies del género *Juniperus* se caracterizan por presentar alto contenido de α-pineno en su AE (Adams, 1999; Cavaleiro *et al.*, 2006; Cosentino *et al.*, 2003; Cavaleiro *et al.*, 2003; Salido *et al.*, 2002; Cavaleiro *et al.*, 2001; Angioni *et al.*, 2003; Mazari *et al.*, 2010), las especies aquí estudiadas presentaron muy poca proporción de este monoterpeno (<1.5%). Entre estas especies se encuentra *J. communis*, cuya composición estudiada en otras poblaciones muestra al α-pineno, como uno de sus principales componentes con concentraciones > 10% (Pepeljnjak *et al.*, 2005; Cavaleiro *et al.*, 2006; Cosentino *et al.*, 2003; Shahmir *et al.*, 2003; Ochocka *et al.*, 1997). Angioni *et al.* (2003) describió a la especie *J. communis*, originaria de Sardinia, con un 61.09% de sabineno y un porcentaje de 6.41 % de alfa pineno en su aceite esencial, mientras que éste estudio mostró al sabineno como el componente principal mayoritario (Tabla 1).

La especie *J. scopulorum* estudiada por (Adams *et al.*, 2006) presentó como principales componentes de su AE al sabineno (32%), limoneno y terpinen-4-ol. El presente estudio es coincidente con estos valores, aunque el sabineno se presentó con un porcentaje superior (86.5%) (Tabla 1). Las especies *J. chinensis* y *J. sabina*, también presentaron mayores valores de sabineno con respecto a las mismas especies estudiadas por otros autores (Raina *et al.*, 2005; Adams, 1999).

Tabla1. Composición porcentual (%) del aceite esencial de las especies de *Juniperus* estudiadas.

IR ^a	Componentes	<i>J. sabina</i>	<i>J. virginiana</i>	<i>J. chinensis</i>	<i>J. scopulorum</i>	<i>J. communis</i>
939	alfa pineno	0,2	1,2	0,2	tr	1,2
953	alfa fencheno			0,3	tr	2
953	Canfeno	0,2	0,2	0,4	tr	0,3
976	Sabineno	52,3	36,6	43	86,5	92

980	beta pineno	0,6	tr	0,1	0,1	0,5
991	Mirceno	4,3	0,2	1,6	0,1	0,6
1001	delta-2-careno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1011	delta-3- careno	tr			0,2	0,2
1018	alfa terpineno		tr	0,1		0,3
1026	p-cymeno	0,2	0,1	0,1		0,1
1031	limoneno	25,1	15,9	9,2	4,1	tr
1032	1,8-cineol		0,2			
1050	beta- (E) –ocimeno	tr		tr	0,1	0,1
1062	gama terpineno	0,1	0,2	0,1	tr	0,1
1088	terpinoleno		0,2	0,2	0,1	tr
1114	beta – tujona				tr	tr
1143	alcanfor			0,1	0,2	tr
1177	terpin-4-ol	1,4	1	4,4	4	tr
1191	mirtenol		0,3			tr
1286	acetato de isobornilo		0,4	25,5		
1338	delta elemeno		tr	tr		0,1
1388	beta cubebeno	0,6	tr	tr		0,2
1401	metil eugenol		0,2	0,1	tr	0,1
1418	cariofileno (E)			tr	0,2	0,1
1455	alfa humuleno		31,4	tr	tr	tr
1477	gama muuroloeno		0,1		tr	tr
1480	germacreno D	tr	tr			
1489	beta (E) ionona	0,2				
1513	gama cadineno			tr	0,1	
1515	cubebol	0,1	0,4	tr		tr
1524	delta cadineno		0,4	tr	0,3	tr
1529	trans-calameneno		tr			
1538	alfa cadineno	tr	0,2			
1549	elemol				1,2	0,1
1554	elemicin		0,8			
1561	germacreno B	11,5		12	0,3	tr
1649	beta eudesmol			tr	0,5	0,1
1652	alfa eudesmol				0,5	0,2
1653	alfa cadinol			tr	0,6	0,3
TOTAL		96,9	90,1	97,5	99,2	98,7

^a Índice de Retención en base a una columna CBP1 relativo a una serie de n-alcanos C₈ a C₂₄; tr=valores traza < 0.05%

Actividad antifúngica en el desarrollo de *Rhodotorula spp.* y *Candida albicans*.

El efecto de los AEs sobre el crecimiento de *Rhodotorula spp.* es resumido en la Tabla 2. Todos los

AEs evaluados mostraron efectos inhibitorios en la concentración más alta utilizada, 1000 ppm, mientras

que a menores concentraciones (30 ppm) ninguno de los AEs evaluados produjo efectos significativos sobre el crecimiento fúngico. El AE de *J. virginiana* mostró

el mayor poder inhibitorio sobre el crecimiento de *Rhodotorula spp*, en las condiciones empleadas, con una actividad inhibitoria mínima (CIM) de 500 ppm. El resto de los AEs evaluados también demostraron inhibir completamente el crecimiento fúngico cuando fueron aplicados a una concentración más elevada (CIM: 1000 ppm). Los AEs de *J. communis* y *J. scopulorum* inhibieron el 50% del crecimiento *Rhodotorula spp*, cuando fueron aplicados a una concentración de 60 ppm.

En *Candida albicans* no se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) ya que en las concentraciones evaluadas, ninguno de los AEs mostró una inhibición del 75% del crecimiento, (Tabla 3). *J. chinensis* mostró a 125 ppm una disminución del 50% del crecimiento, siendo el AE con mayor actividad antifúngica sobre el desarrollo de esta levadura.

Tabla 3. Actividad antifúngica de *Juniperus* spp sobre el desarrollo de *Candida albicans*.

Aceites Esenciales	Concentraciones de AE ppm					
	1000	500	250	125	60	30
<i>J. communis</i>	3	4	3	4	4	4
<i>J. chinensis</i>	2	2	2	2	4	4
<i>J. scopulorum</i>	3	3	3	4	4	4
<i>J. Sabina</i>	2	2	3	3	4	4
<i>J. virginiana</i>	2	2	3	4	4	4

Tabla 2. Actividad antifúngica de *Juniperus* spp sobre el desarrollo de *Rhodotorula*

Aceites Esenciales	Concentraciones de AE ppm					
	1000	500	250	125	60	30
<i>J. communis</i>	1	2	3	3	2	4
<i>J. chinensis</i>	1	2	2	3	4	4
<i>J. scopulorum</i>	1	2	2	2	2	3
<i>J. Sabina</i>	1	2	2	3	3	4
<i>J. virginiana</i>	1	1	2	3	4	4

0: Sin crecimiento visible. 1: Crecimiento de 25 % o menos que el control. 2: Crecimiento de aproximadamente 50 % del control. 3: Crecimiento aproximado 75 % de control, 4: Crecimiento 100 % de control.

Actividad antifúngica en el desarrollo de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides*.

Todos los AEs de *Juniperus* evaluados demostraron algún efecto sobre el crecimiento de las cepas fúngicas seleccionadas (Fig.1-3). Los AEs más activos en esta inhibición fueron: *J. scopulorum* > *J. virginiana* > *J. chinensis* > *J. Sabina* > *J. communis*.

El efecto de los AEs sobre el crecimiento de *A. flavus* es resumido en la Figura 1. Los AEs de *J. scopulorum*, *J. virginiana*, *J. chinensis* y *J. sabina* mostraron efectos inhibitorios dosis-dependientes; *J. scopulorum* y *J. virginiana* inhibieron alrededor del 70 % el desarrollo de *A. flavus*; *J. chinensis* y *J. sabina* tuvieron un efecto levemente menor, manteniendo el paralelismo con los AEs más activos. Por el contrario *J. communis* tuvo un efecto variable, mostrando en algunas concentraciones (125 y 1000 ppm), inducción sobre el desarrollo fúngico.

Los resultados de los AEs sobre *A. parasiticus* fueron similares a los observados en *A. flavus* (Figura 2). Por motivos experimentales el aceite esencial de *J. scopulorum* no fue incluido en este ensayo. El AE de *J. virginiana* presentó la mayor actividad inhibitoria a concentraciones bajas (62,5, 125 y 250 ppm). A 500 ppm el AE mencionado inhibió casi el 60% del desarrollo fúngico. Un efecto ligeramente inferior se observó en *J. sabina*. Estos dos AEs inhibieron casi el 100% del desarrollo cuando se aplicaron en la concentración más alta. Por otra parte, la especie *J. communis* indujo significativamente el crecimiento cuando fue aplicado en la concentración más baja. En concentraciones superiores se observó un efecto inhibitor constante de alrededor del 25%.

Fusarium verticillioides fue el más sensible en cuanto a los efectos de los AEs (Figura 3). En esta cepa fúngica se observó, que los AEs con mayor actividad fueron *J. scopulorum* y *J. virginiana*. Sin embargo *J. virginiana* tuvo un efecto menor con respecto a *J. scopulorum*. El AE de *J. chinensis* mostró un comportamiento variable, cuando fue aplicado en bajas concentraciones. En las concentraciones más altas presentó efectos inhibitorios, sin embargo estos efectos fueron significativamente menores a los producidos sobre las cepas de *Aspergillus*. *J. sabina* y *J. communis* mostraron también un efecto variable, observándose inducción sobre el desarrollo cuando fueron aplicados a concentraciones bajas (62,5, 125 y 250 ppm). En concentraciones mayores, *J. communis* mostró un efecto inhibitorio similar a *J. chinensis*. Por el contrario, en el caso de *J. sabina* la capacidad

inhibitoria se incrementó casi al 50 % cuando fue aplicado en una concentración de 500 ppm, para disminuir marcadamente en la concentración más alta utilizada.

El efecto de la actividad antifúngica de los AEs de *Juniperus* demostró diferentes resultados, según el tipo de microorganismo utilizado y el procedimiento de evaluación. Las levaduras fueron levemente afectadas por la presencia de los AEs. *Rhodotorula spp.* fue ligeramente más sensible que *Candida albicans* a la acción de los AEs, siendo los AEs de *J. virginiana* y *J. scopulorum* los más activos en este ensayo.

Por lo general, los AEs de las especies del género *Juniperus* han demostrado escasa actividad antifúngica, especialmente sobre *Candida albicans* (Angioni *et al.*, 2003). La actividad antifúngica informada en bibliografía, corresponde a AEs de especies *Juniperus* con elevado contenido de α -pineno y presencia del terpeno δ -3-careno, siendo éstos los posibles responsables de esta actividad (Pepeljnjak *et al.*, 2005; Cavaleiro *et al.*, 2006; Mazari *et al.*, 2010). Las especies aquí estudiadas no presentaron δ -3-careno en su aceite o lo tienen en concentraciones muy bajas, igual que α -pineno (Tabla 1). Generalmente el efecto inhibitor de los AEs es atribuido al componente o mezcla de componentes que lo forman. Kurita & Koike (1983) informaron que la actividad antifúngica de los aceites estaría relacionada a la naturaleza química de los diferentes componentes de los AEs y que seguirían la siguiente regla en orden decreciente de importancia: fenoles > alcoholes > aldehídos > cetonas > éter > hidrocarburos. Esta hipótesis estaría en concordancia con los resultados expuestos en este trabajo, ya que la escasa actividad antifúngica de los AEs de *Juniperus* podría atribuirse a la gran cantidad de hidrocarburos presentes en la composición química de estos AEs. La escasa actividad antimicrobiana de los hidrocarburos estaría estrechamente relacionada con la incapacidad de donar protones y su escasa solubilidad en agua (Griffin *et al.*, 2000).

Los AEs evaluados en este trabajo presentaron limoneno en su composición química. Algunos autores han informado que *A. parasiticus* es insensible a terpenos no oxigenados como limoneno y terpineno. Esto podría explicar, que en la concentración más alta de los AEs utilizados, no se observó una inhibición total del desarrollo fúngico.

Figura 1. Efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial de *A. flavus*. Arriba: Porcentaje de crecimiento radial en relación a concentraciones crecientes de AEs aplicadas al medio de cultivo. Abajo: Fotografía del efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial: a) Control. b) *J. sabina* 500ppm. c) *J. communis* 500ppm. d) *J. chinensis* 500ppm. e) *J. virginiana* 500ppm. f) *J. scopolorum* 500ppm.

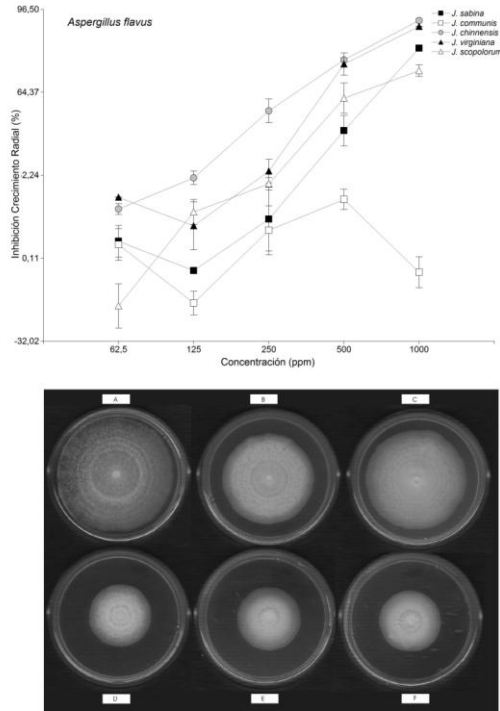


Figura 2. Efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus*. Arriba: Porcentaje de crecimiento radial en relación a concentraciones crecientes de AEs aplicadas al medio de cultivo. Abajo: Fotografía del efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial: a) Control. b) *J. sabina* 500ppm. c) *J. communis* 500ppm. d) *J. chinensis* 500ppm. e) *J. virginiana* 500ppm.

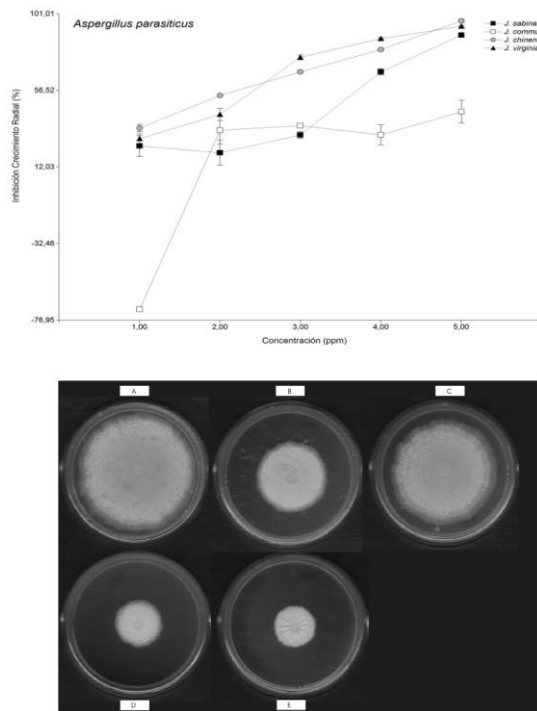
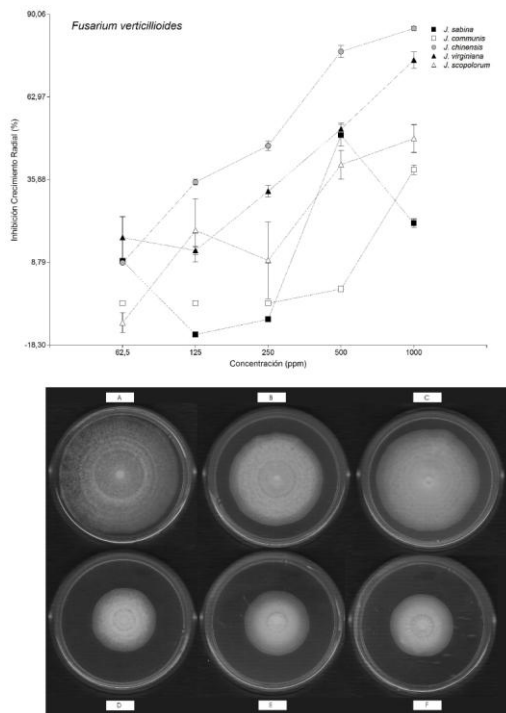


Figura 3. Efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides*. Arriba: Porcentaje de crecimiento radial en relación a concentraciones crecientes de AEs aplicadas al medio de cultivo. Abajo: Fotografía del efecto de los AEs de *Juniperus* spp sobre el crecimiento radial: a) Control. b) *J. sabina* 500ppm. c) *J. communis* 500ppm. d) *J. chinensis* 500ppm. e) *J. virginiana* 500ppm. f) *J. scopolorum* 500ppm



CONCLUSIONES

Los AEs de las especies de *Juniperus* estudiadas en este trabajo, no presentaron α -pineno como principal componente, predominando en cambio el sabineno.

El AE de *J. virginiana* se destacó por el elevado contenido de α -humuleno (31.4%), respecto del resto de los AEs evaluados.

La actividad antifúngica de estos AEs, es dosis-dependiente y varía de acuerdo al tipo de microorganismo y tratamiento. El AE con mayor actividad antifúngica para todos los tratamientos realizados, fue el de *J. virginiana*. En este caso, no es claro el motivo por el cual este AE fue el más bioactivo.

Una vez más, se destaca la importancia del efecto del conjunto de terpenos que componen un AE en la actividad antifúngica de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) y al

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de esta investigación. Al personal de Estación Forestal INTA de Trevelin- Al Sr. Artero y Flia. Vivero Las Araucarias. El Hoyo-Epuyén.

REFERENCIAS

- Adams RP. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL. USA
- Adams RP. 1999. Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* Adam son leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochem Syst Ecol* 27: 709 - 725.
- Adams RP, González Elizondo MS, González Elizondo M, Slinkman E. 2006. DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from

- Durango, Mexico. *Biochem Syst Ecol* 34: 205 - 211.
- Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessiä S, Cabras P. 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 51: 3073 - 3078.
- Biurrun F, Juliani (Jr) RH, Lopez ML, Zygadlo JA. 2005. Essential oil composition of *Baccharis tenella* Hook & Arn. *J Essent Oil Res* 17: 122 - 123.
- Brul S, Klis FM. 1999. Mechanistic and mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genet Biol* 27: 199 - 208.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223 - 253.
- Cavaleiro C, Pinto E, Goncalves MJ, Salgueiro L. 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbiol* 100: 1333 - 1338.
- Cavaleiro C, Rezzi S, Salgueiro L, Bighelli A, Casanova J, Proenca da Cunha A. 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem Syst Ecol* 29: 1175 - 1183.
- Cavaleiro C, Salgueiro LR, da Cunha AP, Figueiredo AC, Barroso JG, Bighelli A, Casanova J. 2003. Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochem Syst Ecol* 31: 193 - 201.
- Chao SC, Young DG. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res* 12: 630 - 649.
- Correa MN. 1998. Flora Patagónica, Gymnospermae. Colec. Científica del INTA. Tomo VIII, Parte I. Buenos Aires. 391.
- Cosentino S, Barra A, Pisano B, Cabizza M, Pirisi FM, Palmas F. 2003. Composition and antimicrobial properties of Sardinian *Juniperus* essential oils against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *J Food Prot* 66: 1288 - 1291.
- Cuenca-Estrella M, Mellado E, Díaz-Guerra TM, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. 2000. Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. *J Antimicrob Chemoth* 46: 475 - 477.
- Di Rienzo J, Guzmán A, Casanoves F. 2002. A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J Agr Biol Envir St* 7: 1 - 14.
- Demo MS, Oliva MM, López ML, Zunino MP, Zygadlo JA. 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatics plants of Argentina. *Pharm Biol* 43: 129 - 134.
- Dillon VM, Board RG. 1994. Future prospects for natural antimicrobial food preservation systems. In *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation* (V. M. Dillon, ed.). 297 - 305, CAB, Wallingford.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308 - 316.
- Etchevehere, P. H. 1972. Los suelos de la Región Andino-Patagónica. (en Dimitri, M. J). La Región de los Bosques Andino-Patagónicos. Tomo X. Colección Científica del INTA. Buenos Aires 388 p.
- González S, Guerra P. E, Bottaro H, Molares S, Demo MS, Oliva MM, Zunino MP, Zygadlo JA. 2004. Aromatic plants from Patagonia. Part I. Antimicrobial and composition of *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera essential oil. *Flavour Frag J* 19: 36 - 39.
- Griffin GS, Markham LJ, Leach ND. 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Essent Oil Res* 12: 149 - 255.
- Guerra, PE, González SB, Elbaum JH. 2008. Características Botánicas y Determinación de Aceites Esenciales en Especies del Género *Juniperus* (Cupressaceae), Cultivadas en el Oeste del Chubut. CIEFAP-UNPSJB. Publicación Técnica N° 33. ISSN 1514-2264. Esquel-Chubut. 31 p.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 86: 985 - 990.
- Kurita N, Koike S. 1983. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oils components. *Agric Biol Chem* 47: 67 - 75.
- Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian

- Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. J Med Plants Res 4: 959 - 964.
- Meriles JM, Vargas SG, Haro RJ, March GJ, Guzman CA. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut- corn- soybean rotations. J Phytopathology 154: 309 - 316.
- Ochocka JR, Asztemborska M, Zook DR, Sybilska D, Perez G, Ossicini L. 1997. Enantiomers of monoterpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis*. Phytochem 44: 86 - 873.
- Oliva MM, Demo MS, Zunino MP, Lopez ML, Zygadlo JA. 2002. Aromatic plants from Yungas. Part IV. Composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes pseudomato* (Legr.) Mc. Vaugh essential oil. Pharmaceut Biol 40: 481 - 484.
- Oliva MM, Zunino MP, López ML, Soria YA, Ybarra FN, Sabini L, Biurrun F, Demo MS, Zygadlo JA. 2007. Variation in the essential oil composition and antimicrobial activity of *Baccharis spartioides* (H. et A.) J. Remy from three regions of Argentina. J Essent Oil Res 19: 509 - 513.
- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Blazevic N. 2005. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). Acta Pharm 55: 417 - 422.
- Provine H, Hadley SJ. 2000. Preliminary evaluation of a semisolid agar antifungal susceptibility test for yeasts and molds. Clin Microbiol 38: 537 - 541.
- Raina VK, Srivastava SK, Syamsundar KV. 2005. Essential oil composition of *Juniperus chinensis* from the plains of northern India. Flavour Frag J 20: 57 - 59.
- Salido S, Altarejos J, Nogueras M, Sánchez A, Pannecouque C, Witvrouw M, De Clercq E. 2002. Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Badia*. J Ethnopharmacol 81: 129 - 134.
- Shahmir F, Ahmadi L, Mirza M, Korori SAA. 2003. Secretory elements of needles and berries of *Juniperus communis* L. ssp. *communis* and its volatile constituents. Flavour Frag J 18: 425 - 428.