

ESTRUCTURA DE UN METABOLITO DE STRESS DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*,
E. CITRIODORA Y *E. PULVERULENTUS*

Luis Fernando Echeverri L.(1)
Jairo Quijano T.(1)
Carmenza Uribe B.(1)
Raúl Montoya C.(2)

RESUMEN

De la resina de *Eucalyptus globulus*, *E. citriodora* y *E. pulverulentus* se aisló un flavonoide, que por métodos espectroscópicos demostró ser 7-metoxiaromadendrin. Se discuten varias alternativas para justificar su presencia en la resina de estas plantas, así como algunos efectos biológicos de los flavonoides.

La ausencia de una prueba concluyente acerca del origen microbiano de la enfermedad, implica que esta sustancia ha de clasificarse como un metabolito de stress, mejor que como una fitoalexina.

INTRODUCCION

En una pasada publicación (Echeverri et al., 1982) se reportó la presencia de una sustancia que se encontraba exclusivamente en la resina de un *Eucalyptus globulus*, el cual presentaba un cuadro morfológico caracterizado por el deteniimiento en el crecimiento (tanto en longitud como en grosor), descamación de la corteza y secreción constante de una resina de color café. En este trabajo se reporta la elucidación de la estructura de esta sustancia por métodos espectroscópicos, así como su detección en la resina de especies de *E. citriodora* y *E. pulverulentus* que presentan un cuadro patológico similar al anterior; estas últimas especies se encontraron en una plantación del INDERENA, del municipio de Ayapel.

Se discutirán las posibles implicaciones y causas de la presencia de este compuesto, en la enfermedad de tales plantas.

MATERIALES Y METODOS

Las plantas se recolectaron en los jardines de la Universidad de Antioquia y en el municipio de Ayapel, Colombia. Los testigos se encuentran en el herbario de la Universidad de Antioquia (HUA), Madrigal 021,022,023.

Parte Experimental:

El compuesto se obtuvo por el método descrito anteriormente (Echeverri et al., 1982), de la resina de las tres especies de *Eucalyptus* mencionadas. A partir de 100 g de resina, se obtuvo 1.1 g de compuesto.

Espectros de ^1H RMN tomados en un Varian 60A, desplazamientos en valores delta y s: singlete, d: doblete, m: multiplete, usando en este caso como solvente acetona d_6 : 11.65 (s), 1H, 8.40 (s), 1H, 7.45 (d, $J = 8$ Hz), 2H, 6.80 (d, $J = 8$ Hz), 2H, 6.10 (d, $J = 1.5$ Hz), 1H, 6.00 (d, $J = 1.5$ Hz), 1H, 5.00 (d, $J = 10$ Hz), 1H, 4.60 (compleja), 2H, 3.80 (s), 3H. (fig. 1).

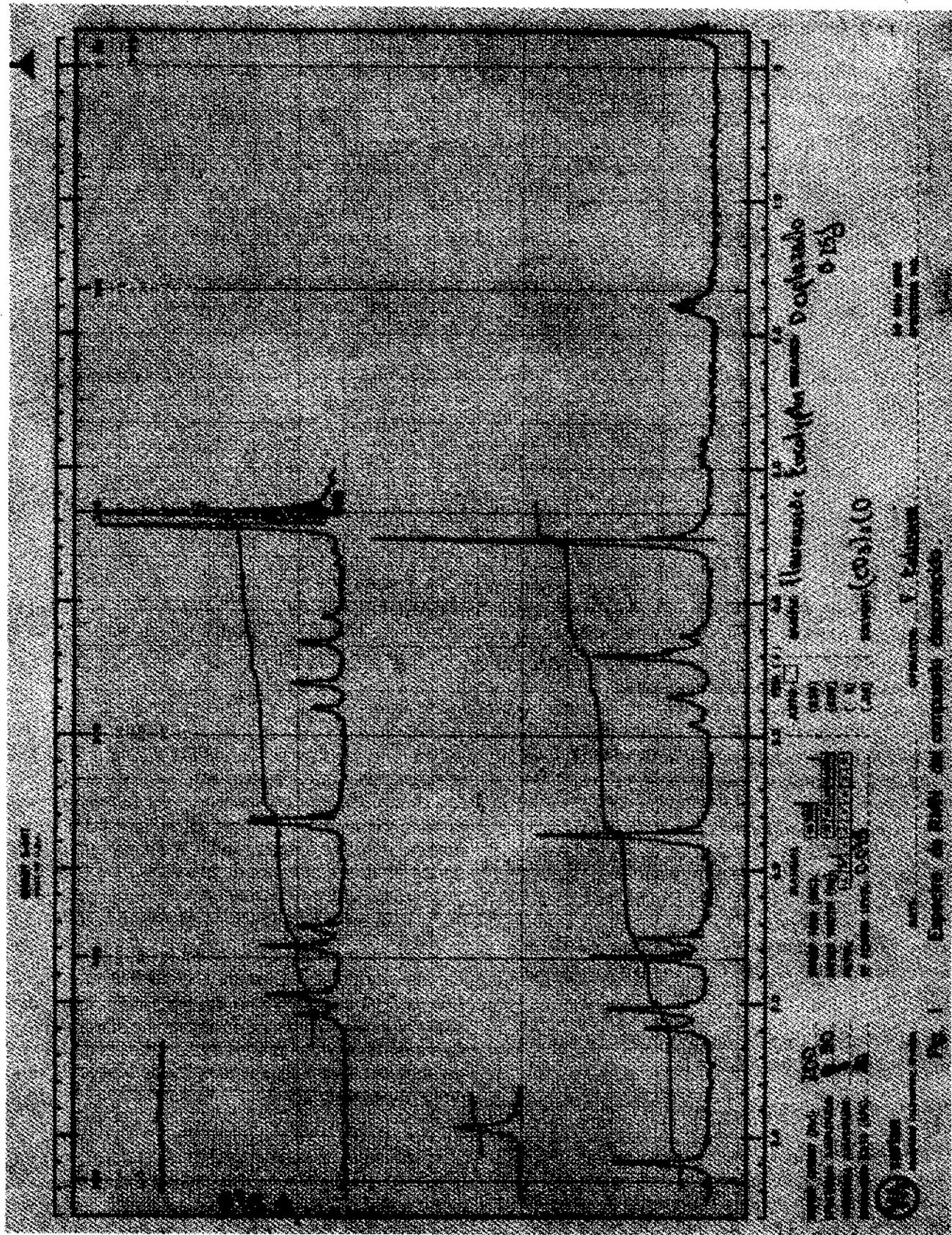
La adición de una gota de D_2O a la muestra, ocasiona la desaparición de las dos primeras señales, transformándose además la señal a 4.60 en un doblete con $J = 10$ Hz.

Espectros de Masas tomados en un Finnigan 4000 a 70 eV, Impacto Electrónico, m/e (intensidad relativa): 302 (36), 285 (4), 273 (50), 179 (19), 167 (100), 166 (4), 134 (50), 107 (25). (Fig. 2).

El compuesto se acetiló en frío con una mezcla de piridina-anhídrido acético durante 72 horas, cristalizándose en clo-

(1) Profesores, Depto de Química, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Estudiante de postgrado, Depto. de Química, Univ. del Valle, Cali, Colombia.



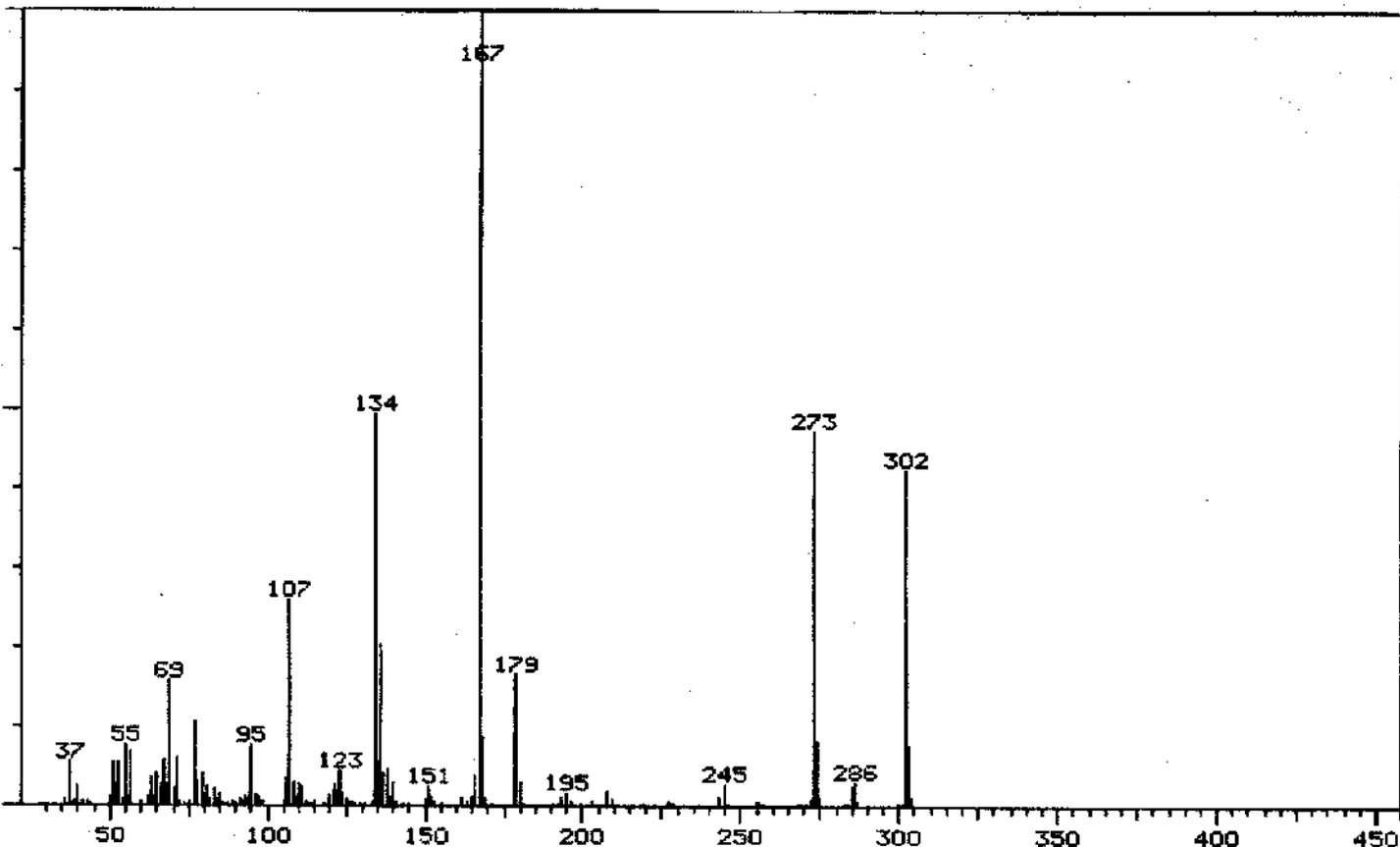


Fig. 2. Espectro de masas del compuesto desconocido.

roformo y teniendo un punto de fusión 105-107° C. Sus características espectroscópicas son:

¹H RMN, usando como solvente CCl₄: 11.60 (s), 1H, 7.50 (d, J = 8 Hz), 2H, 7.20 (d, J = 8 Hz), 2H, 6.20 (d, J = 1.5 Hz), 1H, 6.10 (d, J = 1.5 Hz), 1H, 5.80 (d, J = 10 Hz), 1H, 5.20 (d, J = 10 Hz), 1H, 3.80 (s), 3H, 2.20 (s), 3H, 1.90 (s), 3H.

El espectro de masas, con las mismas condiciones anteriores, muestra señales a 386 (17), 286 (45), 167 (100), 136 (60), 107 (10).

El compuesto original da positivas las pruebas de cloruro férrico (color negro) y Shinoda (color rojo).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las pruebas químicas indican la presencia de OH fenólicos, unidos a un núcleo de flavonoide (Domínguez, 1973). El espectro de ¹H RMN muestra la presencia de un grupo -OCH₃, por la señal a 3.80, así como protones de un sistema -CH, a 5.00 y seis protones aromáticos, los cuales conforman dos grupos: cuatro protones con acoplamiento

to orto, de un sistema AB, señales a 7.45 y 7.00 y dos protones con acoplamiento meta, señales a 6.20 y 6.15. Los cuatro protones corresponden, por la magnitud de su desplazamiento, a los protones del anillo B del núcleo flavonoide y los otros dos al anillo A (Mabry et al., 1970); estos dos últimos protones se sitúan en C-6 y C-8, ya que biogenéticamente los flavonoides se encuentran generalmente oxigenados en C-5 y C-7 (Harborne et al., 1975).

La desaparición de las señales a 11.60 y 8.40 con la adición de D₂O corresponden a dos OH fenólicos, uno de los cuales se encuentra formando puente de hidrógeno con el carbonilo de C-4, y es el de 11.60. Para fijar la posición del otro OH fenólico, necesitamos más evidencias, que se discuten a continuación.

El aclaramiento de la señal a 4.60, con el mismo tratamiento anterior, indica la presencia de un OH de naturaleza alcohólica en C-3, posición que se confirma con el espectro de masas, dado que la señal a 285 se origina por pérdida de OH· del ión molecular y la de 273 por pérdida de CHO·, típicas de un dihidroflavonol (Harborne et al., 1975).

Queda entonces por determinar la posición del $-\text{OCH}_3$ y del otro OH fenólico, existiendo las posibilidades mostradas en la figura 3 para fijar estos grupos. La espectrometría de masas es fundamental para estos casos, ya que los flavonoides tienen una fragmentación originada por una Retro-Diels-Alder, a nivel del anillo C; de esta manera, el fragmento de masa 167 corresponde a un ión que porta todos los sustituyentes del anillo A. El peso de este ión muestra que en el anillo A existen los grupos $-\text{OCH}_3$ y OH; este último, como ya se dijo, se encuentra en C-5, según lo discutido en la primera parte y entonces el $-\text{OCH}_3$ necesariamente debe situarse en C-7, con lo cual queda automáticamente fijada la posición del OH fenólico, el cual, para conformar un sistema AB en el anillo B, debe situarse en C-4'.

Si supusiésemos que el OH fenólico está situado en C-7, entonces la fragmentación indicaría un ión importante con peso 153, el cual no se aprecia en nuestro espectro. La fragmentación se muestra en la figura 4.

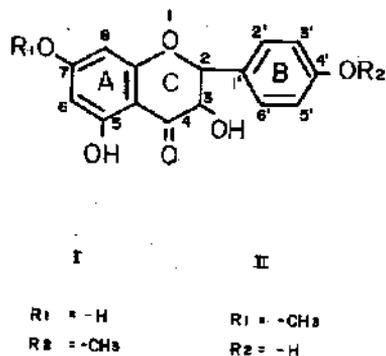
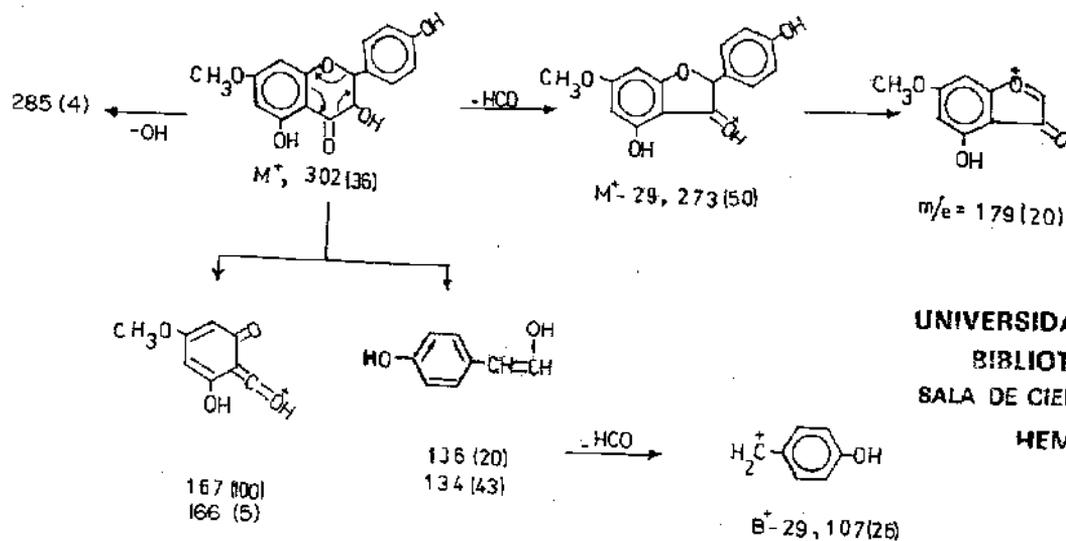


Fig. 3. Posibles estructuras del flavonoide aislado de la resina de las tres especies de *Eucalyptus*.

Los espectros del acetato confirman nuestra estructura; se aprecia en ^1H RMN dos clases de acetatos, uno alcohólico a 1.90 y otro aromático a 2.20. El OH en C-5 no acetila, pues las condiciones de la reacción de acetilación no son suficientes para romper el puente de hidrógeno. Además, los dos dobletes a 5.00 y 4.60 se encuentran, en el espectro del acetato, bastante desplazados por la cercanía de un grupo muy rico en electrones, como es el acetato en C-3. El espectro de masas nuevamente presenta un fragmento importante a 167, indicando ello que en esta parte de la molécula no ocurrió ninguna reacción de acetilación, pues allí no hay grupos susceptibles de reaccionar así; además, si allí hubiese ocurrido acetilación, este fragmento tendría un peso de 205, que no se aprecia en el espectro; por lo tanto, la estructura de esta sustancia es la II de la figura 3.

Este flavonoide se conoce con el nombre de 7-metoxiaromadendrin y ha sido aislado, entre otras plantas, de una Compositae (Hurabielle et al., 1982).

Como ya se mencionó, este flavonoide se encuentra exclusivamente en las resinas de las plantas enfermas, pues las cromatografías en capa fina en diferentes solventes así lo ha demostrado. Sin embargo, no se pudo determinar con certeza que la afección fuese ocasionada por un microorganismo, dado que la plantación de Ayapel que se tomó como referencia para la parte microbiológica, fue destinada a la producción de pulpa de papel. Por ello, esta sustancia no puede catalogarse con certeza aún como una fitoalexina, ya que ellas se definen como compuestos que se producen en las plantas como resultado de su interacción con microorganismos y además tienen capacidad antibiótica. Esta definición, no obstante es susceptible de ser modificada, puesto que no solamente los microorganismos inducen su producción, sino también algunos factores abióticos, tales como sa-



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
BIBLIOTECA CENTRAL
SALA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
HEMEROTECA

Fig. 4. Fragmentación del flavonoide en Espectrometría de Masas.

les de metales pesados, entre otros (Banks y Dewick, 1982); así mismo, la función antibiótica directa no necesariamente es su razón de ser, pues recientemente se ha encontrado fuertes evidencias que indican que las fitoalexinas pueden participar en funciones celulares internas, cuando las plantas son afectadas por microorganismos u otros factores adversos (Echeverri et al., 1985). Debido a lo anterior, y desde un punto de vista más amplio, 7-metoxiaromadendrin es un metabolito de stress, esto es, es una sustancia producida por la planta ante la influencia de factores adversos; lógicamente cuando este factor es un microorganismo, la sustancia es una fitoalexina.

Aún no se conoce con certeza el papel exacto de las resinas en la planta, pues algunos consideran que son productos del metabolismo, mediante el cual la planta se libera de altas concentraciones de sustancias potencialmente venenosas para ella, o bien, que son producidas como un mecanismo de defensa (Dell y McComb, 1978), pues se ha demostrado que algunas resinas impiden la pérdida de agua e imparten protección contra la radiación ultravioleta (Rhoades, 1977). Además, la composición de las resinas refuerza la posibilidad de que se trate de mecanismos de defensa, pues estas se componen principalmente, de un lado, de taninos y flavonoides (Dell y McComb, 1978), con los cuales se cambia drásticamente el pH externo, hasta niveles fuertemente ácidos. De otro lado, las resinas son muy ricas en terpenos, algunos de ellos estructuralmente relacionados con sustancias que requieren los insectos para su ciclo metabólico y que provienen de la vía acetato-mevalonato; estos terpenos de resinas pueden actuar como inhibidores enzimáticos que impiden la transformación de precursores a hormonas y feromonas (Goodwin, 1970), aunque existe también la

posibilidad de que los mismos insectos induzcan la producción de resinas en la planta con la finalidad de tomar de allí los bloques químicos con los cuales realizan su bioquímica normal y completa.

Respecto a los flavonoides, se encuentra una amplia bibliografía que ilustra su actividad biológica relacionada con los mecanismos de defensa de la planta. Algunos flavonoides son irritantes (Schildnecht, 1981), estrogénicos (Singleton y Kratzer, 1969), antimicrobianos (Mitscher et al., 1980), fitoalexinas (Ingham, 1972), alelopáticos (Star, 1980), insecticidas (Jacobson y Crosby, 1971) y su fisiología en plantas ha sido parcialmente elucidada (McClure, 1978).

Si es del caso que la enfermedad en *Eucalyptus* sea causada por microorganismos, se pueden sugerir varias razones para que la enfermedad siga desarrollándose, a pesar de que la planta produzca sustancias de defensa: o el patógeno metaboliza rápida y eficientemente la sustancia hasta un producto atóxico a él, o la virulencia es tal que la planta no alcanza a producir niveles adecuados de compuestos activos.

Queda entonces planteada la posibilidad de estudiar más a fondo el papel de las resinas como mecanismos de defensa de las plantas y la aplicabilidad potencial de sus compuestos en la protección de cultivos importantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Comité Central de Investigaciones de la Universidad de Antioquia la financiación de este trabajo, así como a COLCIENCIAS.

LITERATURA CITADA

- Banks, S. y P. Dewick. 1982. (—). Pisatin, an induced pterocarpan metabolite of abnormal configuration from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 21: 1605-1608.
- Dell, D. y A. McComb. 1978. Plant resins - Their formation, secretion and possible functions. *Botanical Research* 6:278-316.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México.
- Echeverri, F., J. Quijano y R. Salamanca. 1982. Polifenoles en la resina de *Eucalyptus globulus* enfermo I. *Actualidades Biológicas* 11: 48-50.
- Echeverri, F., J. Lanau y C. Peláez. 1985. Inducción de Fitoalexinas en Banano con aminoglicósidos. En archivo Depto. de Química, Universidad de Antioquia.
- Goodwin, T. 1970. Natural substances formed biologically from mevalonic acid. Academic Press, London.
- Harborne, J., T. J. Mabry y H. Mabry. 1975. The Flavonoids. Chapman & Hall, London.
- Hurabielle, M., J. Eberle y M. Paris. 1982. Etude des flavonoides d'*Artemisia campestris* sous-espèce glutinosa. *Planta Médica* 46: 124-125.
- Ingham, J. 1972. Phytoalexins and other natural products as a factor in plant disease resistance. *Bot. Rev.* 38: 343-424.
- Jacobson, M. y D. Crosby. 1971. Naturally occurring insecticides. Marcel Dekker Inc., New York.

- Mabry, T. J., J. Markham y M. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York.
- Mc Clure, J. 1978. Recent Advances in the Physiology of Plant Phenolics. *Rev. Lat. Quim.* 9: 152-157.
- Mitscher, L., Y. Park y D. Clark. 1980. Antimicrobial agents from higher plants. *Lloydia* 43: 259-269.
- Rhoades, D. 1977. Integrated antiherbivore, antidessicant and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 281-290.
- Schildnecht, H. 1981. Irritant and defense substances of higher plants. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 20: 164-184.
- Singleton, V. y F. Kratzer. 1969. Toxicity and related physiologic activity of phenolic substances of plant origin. *J. Agric. Food Chem.* 17: 497-501.
- Star, A. 1980. Frond exudate as allelopathic agents in *Ptyogramme*. *Bull. Torrey Bot. Club* 107: 146-153.

**STRUCTURE OF A STRESS METABOLITE FROM *EUCALYPTUS GLOBULUS*,
E. CITRIODORA Y *E. PULVERULENTUS***

ABSTRACT

A flavonoid, identified as 7-methoxyaromadendrin was isolated from the resin of diseased trees of Eucalyptus globulus, E. citriodora and E. pulverulentus. Although the flavonoid could be a phytoalexin, microbiological origin of the disease was not established so that the flavonoid could be a product of stress in the affected plants.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
BIBLIOTECA CENTRAL
SALA DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
HEMEROTECA

— **XX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Bogotá, Octubre 10 a 12 de 1985.

Se presentarán trabajos en las siguientes áreas:

- Básicas Médicas: Bioquímica, Fisiología y Microbiología.
- Estructura, Función y Sistemática Animal.
- Estructura, Función y Sistemática Vegetal.
- Ecología.

El tema central del congreso será: **BIOTECNOLOGIA.**

Informes: Olga Vasseur, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Tel. 233-54-11.