

ESTUDIO DE UNA FITOALEXINA DE BOROJOA CUATRECASAS (Rubiaceae)

Por: F. Echeverri (1)
J. Quijano (2)
F. Muñoz y E. Layos (3)

RESUMEN

Del fruto de Borojoa patinoi Cuatrecasas (Rubiaceae) se indujo y aisló una Fitoalexina que demostró propiedades antifúngicas contra el hongo Penicillium frequentans. Se propone una estructura para dicha Fitoalexina.

INTRODUCCION

Son ingentes los esfuerzos que en este momento se realizan en diferentes centros de investigación para detectar y aislar sustancias que provean protección, tanto a las plantas comestibles como a sus cosechas, contra aquellos factores que hacen que en este momento casi la mitad de los alimentos provenientes del suelo se echen a perder. Y no son solamente las plantas comestibles las únicas afectadas por dichos factores, pues las productoras de fibras, colorantes y principios biológicamente activos, sufren por igual tal consecuencia.

Dentro de los causantes de daños a las plantas y cosechas se hallan, entre otros, el suelo y su calidad, climatología, roedores, hongos y bacterias. Son estos dos últimos los que atraen la atención en el presente trabajo, puesto que son los más importantes y trascendentales. A través de los tiempos el ser humano ha tratado de dominar la influencia de estos microorganismos, desde los conjuros y promesas, hasta los sofisticados fungicidas y bactericidas de hoy; la inmensa mayoría de ellos de origen sintético o semisintético. Recientemente se ha aislado, caracterizado y ensayado biológicamente una serie de compuestos de origen vegetal, con buenos y prometedores resultados y carentes

casi completamente de las implicaciones producidas por los fungicidas utilizados tradicionalmente. Estas sustancias son conocidas como *Fitoalexinas*.

El significado del término se ha simplificado. Antes se definía a las fitoalexinas como compuestos que son formados o activados dentro de una célula viviente de una planta, debido a la influencia de un hongo, que biológicamente tiene una gran actividad contra ellos y que por ello, tienen la propiedad de prevenir el completo desarrollo de la infección incipiente. Esta definición dista mucho de la moderna, que define una fitoalexina como una sustancia que es producida en una planta bajo diferentes circunstancias extrañas a su ambiente habitual (entre ellas el ataque de hongos) y que no necesariamente posee actividad antifúngica.

Diferentes investigadores se han dedicado al estudio de estas sustancias: Ingham (1972), Hare (1966), y Kuc (1972). Son variados los factores causantes de la producción de fitoalexinas; entre estos se encuentran los meramente físicos (necrosis de tejidos), químicos (fungicidas, polipéptidos, como la Monicolina A.), biológicos (hongos y bacterias) y diversos (luz UV.). Esta influencia es semejante a la que sufre el organismo humano cuando se halla en

(1) Depto de Química - Postgrado, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

(2) Profesor, Depto. de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(3) Estudiantes egresados, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

un ambiente diferente al habitual y a menudo hostil a él, puesto que por variadas vías trata de restaurar su condición inicial. Tal es el caso, por ejemplo, de la producción de anticuerpos cuando un microorganismo lo ataca. A nivel investigativo, trata de inducirse la producción de fitoalexinas a partir de influencias biológicas, pues son estas mismas las que se tratan de contrarrestar. A menudo el tipo de estructura de la fitoalexina varía según la especie atacante y en general es diferente de especie a especie vegetal. Así, tenemos que la familia Leguminosae produce fitoalexinas del tipo isoflavonoide, tales como derivados Pterocarpanos y Coumestanos (Hijwegwn, 1973); la familia Solanaceae produce sustancias del tipo Sesquiterpénico (Stoessl y Col. 1976); la familia Orquidiaceae las produce del tipo Fenantrénico (Ward y Col. 1975); la Compositae, Poliactilénicas (Hargreaves, J. y Col. 1976).

El mecanismo de acción ha sido bastante discutido y usualmente se hallan teorías mutuamente contradictorias (Van Etten y Col. 1971); Partridge (1976) propone una explicación genética, mientras que Smith (1978) propone bases bioquímicas para tal mecanismo de acción, aunque el resultado es el mismo: inhibición de germinación de esporas en los hongos.

Generalmente las fitoalexinas que son aplicadas para combatir un microorganismo son metabolizadas por éste a compuestos que para sí mismo pueden ser inocuos o algo más potentes y que, como regla general, son de una actividad mayor contra otros microorganismos (Stoessl y Col. 1973; Ward y Col. 1977). Por lo tanto, las posibilidades de conseguir una variada gama de sustancias biológicamente activas son prometedoras.

Después de este breve repaso acerca de las fitoalexinas, las aplicaciones inmediatas saltan a la vista, si se aplican como fungicidas químicos ya que:

- a) Actúan en bajas concentraciones,
- b) La inmensa mayoría de ellas es antifúngica o bactericida,
- c) Presentan estructuras variadas, lo que previene una posible resistencia,
- d) Se hallan en numerosas plantas, es decir, todas ellas tienen la facultad potencial de producirlas,
- e) Fácilmente se pueden sintetizar o transformar química o microbianamente en el laboratorio.

Recientemente se han realizado estudios acerca de la incidencia de las Fitoalexinas en la salud humana (Haard 1979; Kuc y Col. 1976). Sin embargo, no es de esperarse graves consecuencias, porque a través de los tiempos el hombre ha consumido muchos alimentos contaminados o envejecidos. Algunas de las plantas que han demostrado capacidad para producir fitoalexina son: Berenjena (*Solanum melongena*), Tabaco (*Nicotiana tabacum*), Soya

(*Glicine max.*), Alubias (*Vigna sinensis*), Papa (*Solanum tuberosum*), Borrachero (*Datura stramonium*), Habichuela (*Phaseolus vulgaris*), Garbanzo (*Cicer arietinum*), Trébol (*Trifolium pratense*) y Orquídea (*Orchis militaris*).

OBJETIVO

El presente trabajo tiene por objeto la inducción, aislamiento y bioensayo de una fitoalexina producida por el fruto del árbol *Borojoa patinoi* Cuatrecasas (Familia Rubiaceae). Este fruto es de consumo habitual en la zona occidental de Colombia y ya ha sido estudiado en sus características nutricionales (Quijano y Arango, 1982). La inducción se realiza con el hongo *Penicillium frequentans*, que hace parte de la microflora normal y con el cual también se hacen los bioensayos para detectar la sustancia producida y medir su potencialidad fungicida. Además, se trata de crear metodología y estructura para desarrollar investigaciones más ambiciosas en el campo de los alimentos, con estas mismas sustancias, como por ejemplo, en arroz, maíz, frijol, cacao, café y demás productos básicos en nuestra alimentación. La búsqueda de este tipo de sustancias, se hace más imperativa a medida que el tiempo avanza, dado que se están presentando diariamente reacciones de resistencia a los fungicidas y bactericidas habituales, además de su baja biodegradabilidad y toxicología, tanto para humanos como para animales y otras plantas.

METODOLOGIA

El estudio de las fitoalexinas requiere cuatro pasos fundamentales, pero que tienen la ventaja de permitir, según las necesidades y equipo, cambios dentro de cada uno de ellos. Estas fases o pasos son:

- a. Inducción
- b. Extracción
- c. Aislamiento
- d. Bioensayo

a. *Inducción*

Diferentes organismos se han usado para inducir la formación de fitoalexinas en plantas. Habitualmente se utilizan *Monilla fructicola*, *Phytophthora vignae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* y *Penicillium frequentans*. En vista de que el último hace parte de la microflora normal del fruto y de que es un importante factor de putrefacción de muchos frutos, se eligió éste como inductor. La inducción además puede hacerse en muy diversas partes de la planta o en la planta entera (Keen, 1975). En este caso particular la inducción se realizó en el fruto total, previamente lavado con agua esterilizada, con las esporas del hongo en cuestión. Una vez realizado esto, se colocó el fruto (peso 500 g) a incubar a temperatura ambiente, en un sitio oscuro y húmedo por espacio de cinco días. Este tiempo de incubación depende en algunas ocasiones de la extensión del microorganismo en el fruto.

b. Extracción

Para realizar la extracción se utilizó una complementación de los métodos de Keen (1978) y Ward (1975), procediéndose de la siguiente manera: El fruto total inoculado se liberó del microorganismo con un lavado vigoroso en agua, hasta que se desprendió totalmente de él y para garantizar además que no se iba a extraer un metabolito del hongo. Se maceró en una parte de etanol y luego se colocó en un agitador automático a 110 RPM en 4 lits de etanol al 40o/o, dejándose durante 1 día, pasado el cual se centrifuga a 1000 G por 30 minutos, con lo que se remueven esporas y materia orgánica. La fase acuoetanólica se concentra a presión reducida y a 35° C hasta 100 ml, que luego se extraen tres veces por porciones de 50 ml de acetato de etilo, las que seguidamente se unen y desecan con sulfato de sodio y se evapora el acetato de etilo a presión reducida dejando un jarabe de olor característico.

c. Aislamiento

El extracto de acetato de etilo se pasó por una columna de 25 x 2 cm empacada con sílica gel (G 60) en cloroformo y eluyendo con el mismo solvente. De la fracción 100 - 200 ml, se recogieron 30 mg de un sólido resinoso verde de olor agradable, que se sometió a TLC con sílica gel GF 254, 0.5 mm de espesor, sin activar y usando como eluente la mezcla cloroformo: acetato de etilo (4:1). Se raspó la mancha correspondiente al RF 0.15, de una intensa fluorescencia verde al U V dejando 20 mg de otro sólido resinoso verde. El otro compuesto de RF 0.40 se descompuso rápidamente y no fue posible aislarlo para estudio. Se trató de cristalizar el primero de ellos en distintos solventes, pero esto no se logró (Ver figura 1).

d. Bioensayo

Para corroborar la inducción, presencia, aislamiento y propiedades de la fitoalexina en cuestión, cada uno de los siguientes extractos o compuesto puro se examinó con el hongo *Penicillium frequentans* en Saboraud e incubado a temperatura ambiente, solubilizándose en 0.01o/o de Tween 80, la cual también se examinó:

- I. Suspensión de esporas en Tween 80 al 0.01o/o.
- II. Extracto bruto etanólico al 40o/o, del fruto sano.
- III. Extracto bruto etanólico al 40o/o, del fruto enfermo.

- IV. Extracto clorofórmico del acetato de etilo, fruto sano.
 - V. Extracto clorofórmico del acetato de etilo, fruto enfermo.
 - VI. Sólido resinoso de RF 0.15.
- Se chequearon tres concentraciones relativas de cada una: 0.1o/o, 0.01o/o y 0.001o/o.

RESULTADOS

El sólido verde dió las siguientes propiedades espectrales (IR: Perkin Elmer 137, NMR: Varian T. 60A; UV: Cary 15): IR (CCl₄) en cm⁻¹: 2950 (f), 1750 (f), 1700 (m), 1610 (m), 1500 (m), 1240 (f), 730 (ancha) Figs. 2 y 3.

NMR (CCl₄): TMS ext. Valores en ppm y s: singlete, d: doblete, m: multiplete. 9, 8, s, 3; 7, 4, d, 3; 6, 9, s, 3; 6.75, d, 3; 5.95, m, 9; 3.9, s, 9; 2.3, d, 24; 1.9, s, 18; 1.5, m, 12; 1.2, d, 18; 0.9, d, 12.

UV max ((CCl₃): 263,321 nm.

Los resultados de los bioensayos fueron:

- I. Crecimiento normal.
- II. Crecimiento normal.
- III. Inhibición total del crecimiento.
- IV. Crecimiento normal.
- V. Inhibición total del crecimiento.
- VI. Inhibición total del crecimiento.

Estos resultados indican que efectivamente se indujo la producción de una fitoalexina en este fruto y que ella pudo aislarse. Para corroborar esto, se sometió a cromatografía un extracto clorofórmico (que se supone debió solubilizar a la sustancia de RF 0.15 en el caso de que existiera allí) del fruto sano, en el sistema cloroformo: acetato de etilo (2:1). Se reveló la placa con H₂SO₃: ácido acético (1 : 4) y antes se observó a la luz U V, no presentándose ninguna mancha a un RF similar o cercano. Por lo tanto, se excluye la presencia natural de esta sustancia, así como la suposición de que sea un producto metabólico del hongo, puesto que se lavó concienzudamente la superficie del fruto.

Con los datos espectrales disponibles se propone la siguiente estructura para tal fitoalexina, pues la cantidad aislada no permitió tomar un Espectro de Masas para corroborarla (Fig. 4).

FRUTO ENTERO

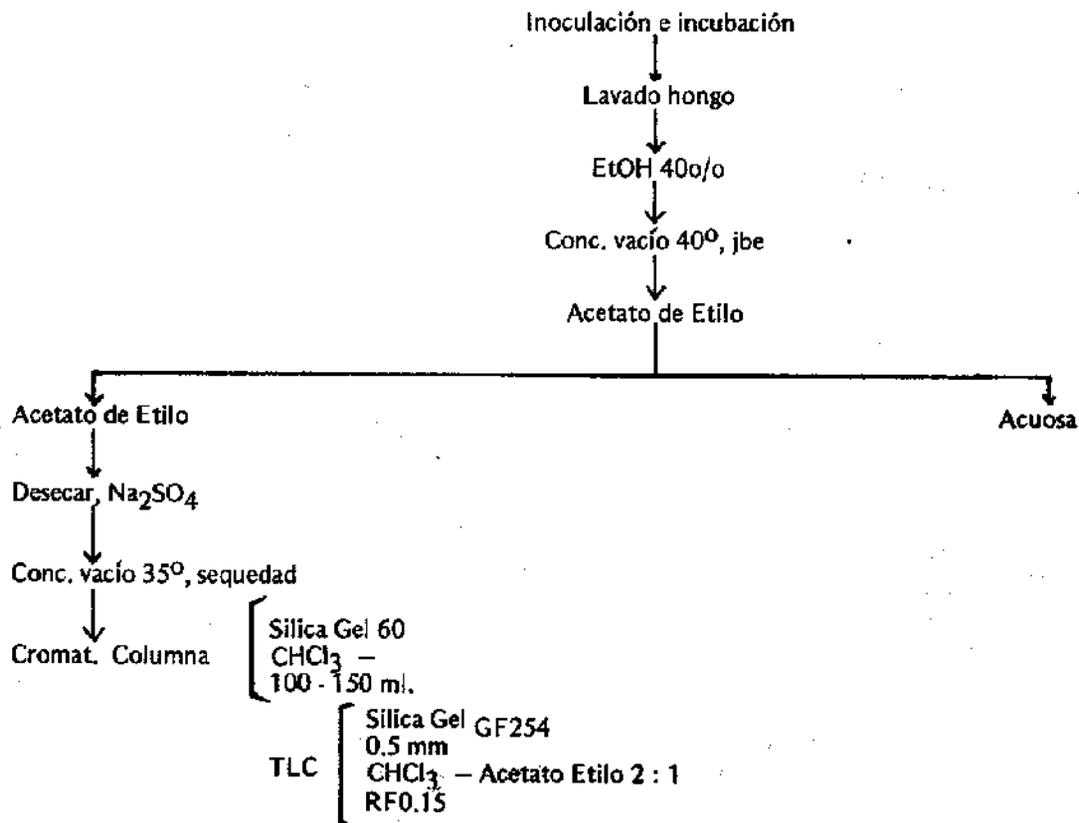
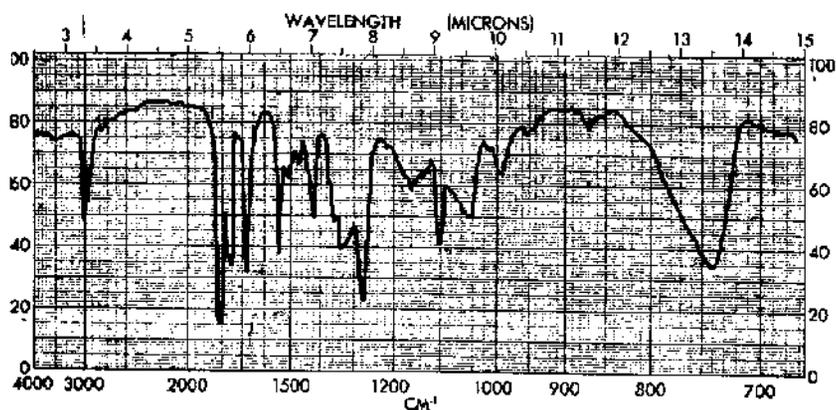


Fig. 1.
Extracción y aislamiento de la fitoalexina.



SPECTRUM NO. 1	ORIGIN <i>Faba sativa</i>	LEGEND	REMARKS
SAMPLE 18.30	<i>Faba sativa</i>	1.	Pct. <i>Faba sativa</i> a 18.30 cm⁻¹
P. D. P.	PURITY 100%	2.	
	PHASE ccl ₄	DATE 1-1-70	
	THICKNESS	OPERATOR M. M. W.	

Fig. 2.
Espectro de infrarrojo de la fitoalexina.

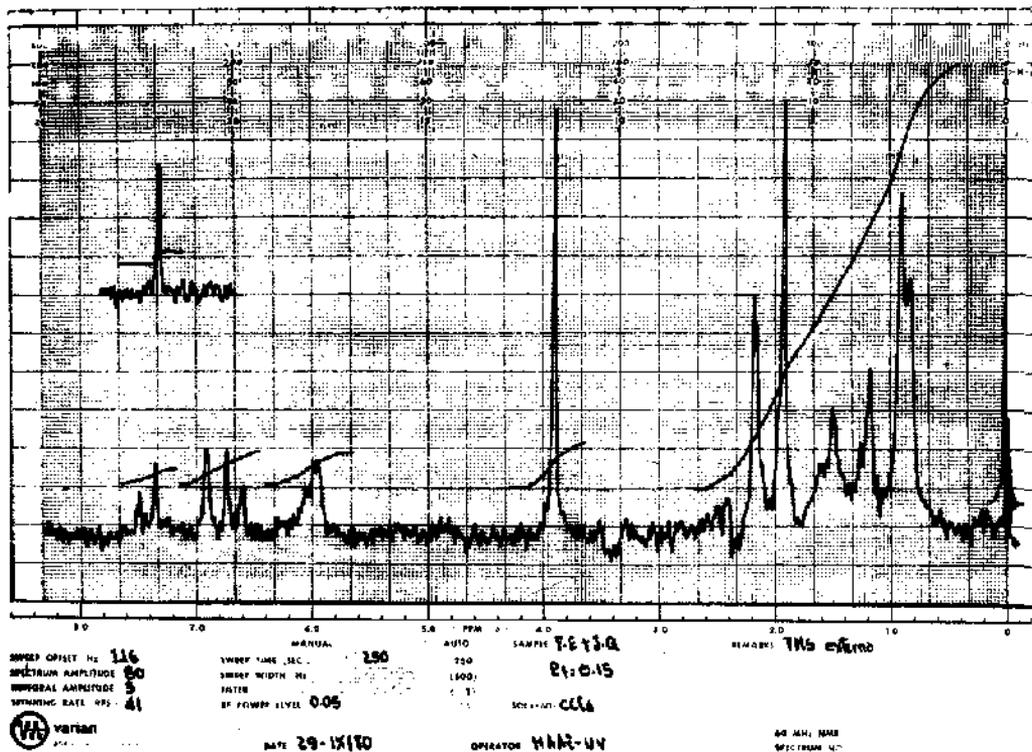


Fig. 3.
Espectro de resonancia magnética nuclear de la fitoalexina.

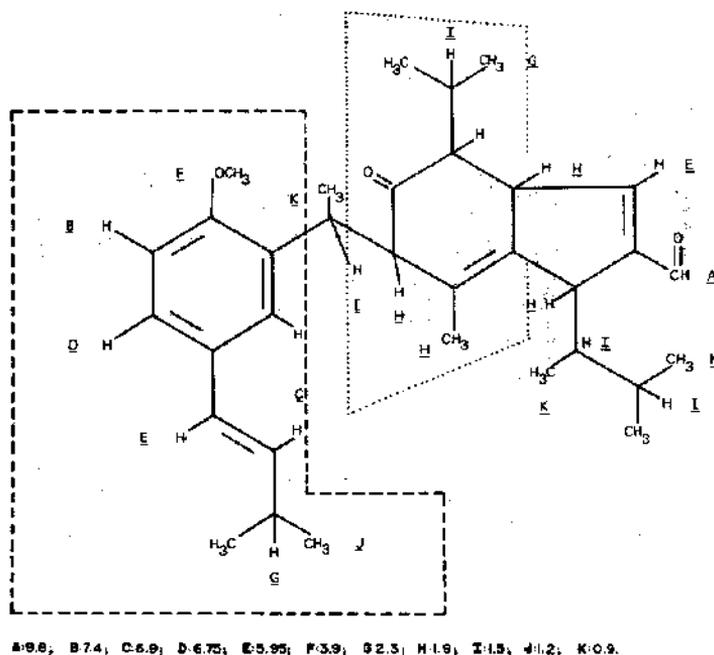


Fig. 4.

La estructura que se halla en el recuadro a líneas se determinó por espectroscopía y se corrobora por biogénesis, ya que es una parte común en la estructura de otras fitoalexinas. La que se halla en el recuadro punteado se determinó totalmente por espectroscopía.

BIBLIOGRAFIA

- Haard, N.E., et al., 1979. Stress metabolites in fruits and vegetables: Introduction. *J. Food Protect.* 42 (6), 495.
- Hare, R., 1966. Physiology of resistance to fungal diseases in plants. *The Bot. Rev. (Lanast)* 32: 95.
- Hargreaves, J., et al., 1976. Wycerone epoxide as a phytoalexin in *Vicia faba* and its metabolism by *Botrytis cinerea* and *B. fabae* in vitro. *Phytochem.* 15, 1119.
- Hiljwegen, T., 1973. Autonomous and induced Pterocarpanoid formation in the Leguminose. *Phytochem.* 12, 375.
- Ingham, J., 1972. Phytoalexins and other natural products as factors in plant disease resistance. *The Bot. Rev. (Lanast)* 38: 343.
- Keen, N.T., 1975. The isolation of phytoalexins from germinating seeds of *Cicer arletinum*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogaea* and other plants. *Phytopathology* 65: 91.
- 1978. Phytoalexins: efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. *Phytopathology* 62: 207.
- Kuc, J., 1972. Phytoalexins, plants and human health. En: J.V. Rodricks (Ed.) *Mycotoxins and other fungal related food problems*. ACS Adv. Chem. Ser., 149: 356.
- Partridge, J. et al., 1976. Association of the phytoalexin Klevitone with single-gene resistance of cowpeas to *Phytophthora vignae*. *Phytopathology* 66: 426.
- Quijano, J. y G. J. Arango 1982. Estudio químico del Borojó. *Rev. Lat. de Química (En prensa)*.
- Smith, D., et al., 1978. Klevitone - a membranolytic phytoalexin? *Abstr. 3rd Int. Cong. Plant Pathol., Aug. 1978. Munchen*, p. 245.
- Stoessl, A., et al., 1973. Postinfectious inhibitors from plants: fungal oxidation of Capsidiol in pepper fruit. *Phytopathology* 63: 1225.
- , et. al., 1976. Sesquiterpenoidal stress compounds of the Solanaceae. *Phytochem.* 15:855.
- Van Etten, H., et al., 1971. Studies on the mode of action of the phytoalexin Phaseollin. *Phytopathology* 61: 1363.
- Ward, E., et al., 1975. Loriglossol: an Orchid phytoalexin. *Phytopathology* 65: 632.
- , et al., 1975. Phytoalexins from potatoes: evidence for the conversion of Lubimin to 15 - dihydrolubimin by fungi. *Phytopathology* 67: 468.