

## EVALUACIÓN DEL EFECTO ALELOPÁTICO DE TRES ESPECIES DE *EUCALYPTUS*

### EVALUATION OF ALLELOPATHY IN THREE *EUCALYPTUS* SPECIES

Walter Murillo<sup>1,2</sup>, Winston Quiñones<sup>1</sup>, Fernando Echeverri<sup>1</sup>

#### Resumen

A través de un estudio bioguiado se estableció el efecto alelopático de los extractos de tres eucaliptos sobre soya, tomate y lechuga. Sorpresivamente los extractos menos polares fueron más activos que los polares. Un derivado de floroglucinol fue identificado como uno de los compuestos activos y fue identificado por 1D y 2D RMN; además, se detectaron otras sustancias estructuralmente relacionadas con la misma actividad.

*Palabras clave:* *Eucalyptus*, alelopatía, acilfloroglucinol, soya, tomate, nmr.

#### Abstract

Through a bioguide study was established an allelopathy effect of three eucalyptus extract on soybean, tomato, and lettuce. Surprisingly, less polar extracts were more actives than polar extracts. A phloroglucinol derivative was identified as an active compound and identifies by 1D and 2D NMR., and it was identified by 1D and 2D NMR; in addition other structurally related compounds were detected and exhibited the same activity.

*Key words:* *Eucalyptus*, allelopathy, acylfloroglucinol, soybean, tomato, nmr.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente los eucaliptos son plantas de mucha importancia industrial por ser fuente de pulpa y papel; no obstante los productos químicos asociados no han recibido el interés adecuado como fuente de moléculas activas. Se conoce por ejemplo que en sus hojas y en el aceite se encuentran varias sustancias que exhiben diferentes actividades biológicas y entre estas un fuerte efecto alelopático (Behera et al., 2003; El-Darier, 2002; Saginga et al., 1992; Singh et al., 2003), convirtiéndose en una alternativa en la búsqueda de moléculas naturales con potencial acción herbicida (El-Khawas et al., 2005). Para co-

nocer sus reales posibilidades, en este trabajo y a través de un estudio bioguiado se analizó el efecto de los extractos de tres especies de eucaliptos sobre un grupo de plantas económicamente importantes. Finalmente, se determinó la estructura de uno de los compuestos activos y se establece su efecto diferencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Hojas de eucalipto.** Los eucaliptos se colectaron en la ciudad de Medellín (Antioquia) Colombia, en septiembre de 2005: *Eucalyptus globulus* (HUA 148531), *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) y

<sup>1</sup> Laboratorio de QOPN. SIU-Universidad de Antioquia, A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>2</sup> Correo electrónico: <wma178@yahoo.com>.

*Eucalyptus* sp. 3 (HUA148532), los dos últimos en proceso de determinación.

**Semillas.** Semillas de la variedad Soyica P-34 fueron proporcionadas por CORPOICA CI (Palmira, Colombia); semillas de tomate Riogrande y de lechuga (*Batavia*) fueron adquiridas comercialmente.

**Ensayos de germinación.** Inicialmente los ensayos de germinación se realizaron con semillas de lechuga, soya y tomate con el fin de comprobar la actividad de los extractos y la sensibilidad de las plantas. Para ello se colocaron en cajas de petri 20 semillas de las plantas antes mencionadas sobre papel filtro, con la posterior adición de 5ml de las soluciones de los extractos, preparadas a una concentración de 1.000 partes por millón al 1% en volumen de DMSO, con excepción del compuesto (**1**) del que se preparó una solución de 384 ppm. Cada experimento se realizó por triplicado. Las semillas se cubrieron con papel toalla húmedo y transcurridas 48 horas se adiciona nuevamente 4.0 ml de agua. Las semillas se mantienen en la oscuridad por 96 horas al cabo de las cuales se determina el porcentaje de semillas que germinan. Posteriormente las raíces se cortan, se secan en una estufa a temperatura controlada (70 °C) por un periodo de 18 horas y luego se pesa en una balanza analítica

**Extracción y aislamiento.** A través de un estudio fitoquímico bioguiado se aisló un compuesto activo, como se describe a continuación.

Aproximadamente 3.0 kg de hojas de *Eucalyptus globulus* (HUA 148531), *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) y *Eucalyptus* sp. 3 (HUA148532), se picaron por separado con etanol al 96%, se filtraron, evaporaron y posteriormente se particionó con hexano, acetato de etilo y metanol/agua. Con estos extractos se realizaron los ensayos de germinación. Por su actividad el extracto hexánico de *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) fue fraccionado en una columna de sephadex LH-20 eluyendo con hexano:diclorometano:metanol (2:1:1), colectándose 20 fracciones, que por su similitud en ccf se agruparon en otras

dos fracciones. La primera de ellas mostró un fuerte efecto inhibitorio de la germinación de semillas de tomate y lechuga y por tanto se fraccionó nuevamente en silica gel con hexano:acetato 2:1. De cinco fracciones colectadas, la primera fracción (fracción A) fue activa sobre el crecimiento de la raíz de tomate y por tanto se separó nuevamente por sephadex, dando lugar a tres fracciones; la última fracción fue separada en sus componentes por ccfp en hexano-eter 48:2 separándose dos bandas, de las cuales una de ellas corresponde al producto **1** (19.2 mg) y la otra (6.9 mg) a una mezcla de sustancias emparentadas estructuralmente con este mismo producto, según su espectro de RMN <sup>1</sup>H. Tanto el compuesto puro **1** como a segunda fracción de esta última cromatografía (fracción F) se sometieron a ensayos de inhibición y desarrollo radicular.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Efecto sobre la germinación de tomate y lechuga.** Los ensayos de actividad de los tres extractos hexánicos de eucaliptos mostraron que *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) posee una intensa actividad inhibitoria de germinación de semillas de tomate (94%), mientras que los mismos extractos de los otros eucaliptos mostraron niveles de 71% y 30% de inhibición.

El extracto de acetato de *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) fue casi similar en su capacidad inhibitoria de la germinación al hexano (76.4%), pero los de los demás eucaliptos fueron prácticamente inactivos.

En lechuga se observó que el extracto hexánico de *Eucalyptus* sp. 2 (HUA 148533) inhibe la germinación en un 93.4%, sin embargo los demás extractos ejercen un efecto inhibitorio superior al 70%.

La separación sucesiva del extracto hexánico a través de un estudio fitoquímico bioguiado permitió aislar finalmente el compuesto puro **1**, que inhibe la germinación de semillas de tomate en solo 22.4%, pero inhibe considerablemente el desarrollo de raíz en un 70%. La fracción A (de la cual se obtuvo el

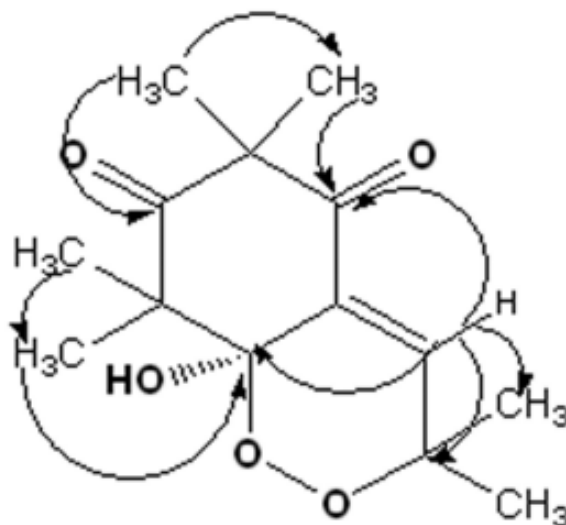
compuesto **1**) y una de sus fracciones, F, mostraron una actividad inhibitoria en la germinación (45% y 55%) y desarrollo de raíz (85% y 74.7%).

Más interesante aun, si bien el compuesto **1** es activo en semillas de raíz, no tiene ningún efecto apreciable sobre de soya, lo cual puede implicar una acción selectiva, que es muy importante si se tienen en cuenta la posibilidades de esa molécula como un potencial herbicida. Queda aun por establecerse su actividad sobre el crecimiento y reproducción de las malezas más comunes.

**Estructura del compuesto 1.** La estructura de **1** se elucidó por RMN de la manera descrita a continuación. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN indica la presencia de seis grupos metilo en la estructura ( $\delta$  1.0, 1.4, 1.5, 1.6) y otra señal sobre  $\delta$  7.0 ppm para un protón vinílico. En el experimento JMOD se aprecian claramente seis grupos metilo ( $\delta$  15.0, 21, 24.1, 24.3, 24.5 y 27), un metino vinílico en 143.4 ppm, cinco carbonos cuaternarios (52.0, 55.0, 79.85, 97.8, 132.1 ppm) de los cuales el penúltimo es del tipo hemiacetal, y dos carbonilos en  $\delta$  211.0 y  $\delta$  198.0. Esto indica una fórmula  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5$  y la estructura por la alta presencia de metilos y el tipo de carbonilo parece ser una acilfloroglucinol conocido como regulador G3 (Ghisalberti, 1995).

La información más concluyente acerca de la estructura se obtiene por el experimento HMBC (figura 1) donde se observa la correlación de los protones de uno de los metilos con los carbonilos, y de uno de estos (198.0 ppm) con el protón vinílico, el cual a su vez correlaciona con un carbono cuaternario oxigenado en  $\delta$  79.85, con un grupo metilo y con el carbono doblemente oxigenado en  $\delta$  97.8.

De esta manera se ensambla a estructura correspondiente al Inhibidor G3, reportado antes (Ghisalberti, 1995).



**Figura 1.** Estructura del compuesto **1**

En este trabajo se encontró un efecto alelopático pronunciado en una especie de eucalipto; la baja actividad de los extractos de las otras dos puede implicar diferencias metabólicas para generar compuestos alelopáticos como los inhibidores G.

La presencia de alelopáticos en eucaliptos tiene una gran trascendencia ya que en el país actualmente se hacen reforestaciones masivas con eucaliptos, en las cuales no se tiene en cuenta el impacto negativo que tienen sobre el futuro uso de esos mismos terrenos para la agricultura y aún para futuras reforestaciones con flora nativa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia, por la financiación de este proyecto y de igual manera a CORPOICA CI (Palmira, Colombia) por las semillas de soya proporcionadas.

## REFERENCIAS

- Behera N, Shani U.** 2003. Soil microbial biomass and activity in response to *Eucalyptus* plantation and natural regeneration on tropical soil. *Forest Ecolo. Man.* 174:1-11.
- Beninger WC, Hall JC.** 2005. Allelopathic activity of 7-O- $\beta$ -glucoronide isolated from *Chrysanthemum morifolium*. *Biochemical and Systematics Ecology*, 33:103-111.
- El-Darier SM.** 2002. Allelopathic effects of *Eucalyptus rostrata* on growth, nutrient uptake and accumulation of *Vicia faba L* and *Zea maiz L*. *Pakistan. Journal of Biological Science*, 1:6-11.
- El-Khawas S, Shenata M.** 2005. The allelopathic potentialities of *Acacia nilotica* and *Eucalyptus rostrata* on monocot (*Zea maiz*) dicot (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Biotechnology*, 4:23-34.
- Eschler BM, Pass DM, Willis R, Forley WJ.** 2000. Distribution foliar formylated phloroglucinol derivates amongst *Eucalyptus* species. *Biochemical Systematic Ecology*, 28:813-824.
- Ghisalberti LE.** 1995. Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. *Phytochemistry*, 41:7-22.
- Hong HN, Xuan TD, Eiji T, Hirroyuki T, Mitsuhiri M, Khanh TD.** 2003. Screening for allelopathic potential of higher plants from Southeast Asia. *Crop Proteccion*, 22:829-836.
- Rostein A, Lifshitz A.** 1974. The structure determination of two new acylphloroglucinols from *Myrtus communis L*. *Tetrahedron*, 30:991-997.
- Umehara K, Singh I, Etoh H, Takasaki M, Konoshima T.** 1998. Five phloroglucinol-monoterpene adducts from *Eucalyptus grandis*. *Phytochemistry*, 49:1669-1704.