

INFLUENCIA DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LA *LACTUCA SATIVA*

NORMA I. KAMIYA, ALICIA BARDON* Y CESAR A.N. CATALAN

Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina.

Resumen

Se analizó el efecto de un hidroxiéster sesquiterpénico y de once lactonas sesquiterpénicas sobre el proceso de germinación de *Lactuca sativa*. Las principales alteraciones se producen a un nivel de radícula donde, en la mayoría de los casos, el efecto fue de inhibición del desarrollo radicular. Solo con dos lactonas a bajos niveles de concentración se observó un efecto promotor de la elongación radicular.

SESQUITERPENE LACTONE INFLUENCES ON *LACTUCA SATIVA* GERMINATION

Summary

Eleven sesquiterpene lactones and one sesquiterpene ester were assayed for effects on *Lactuca sativa* germination. Inhibition and alterations of the radicle growth were the main effects observed. Only two lactones at low concentrations promoted radical elongation.

Introducción

Las lactonas sesquiterpénicas (**LS**) son metabolitos característicos de la familia Compositae que en los últimos años han despertado un marcado interés por su variada actividad biológica⁽¹⁾.

Al presente no están claros los mecanismos que producen diversos efectos observados sobre procesos de germinación de semillas, crecimiento de bacterias, hongos y protozoos, síntesis de ADN y ADN polimerasa en tejidos tumorales, entre otros. Se ha

Palabras claves: Lactonas sesquiterpénicas; alelopatía; germinación de *L.sativa*; elongación radicular.
Key words: Sesquiterpene lactones, allelopathy, germination of *L.sativa*, radical elongation.

* Dirigir correspondencia.

sugerido que la actividad de las **LS** pueden deberse total o parcialmente a la propiedad del agrupamiento α -metilén γ -lactona de reaccionar con los grupos SH de enzimas para formar aductos tipo Michael⁽¹⁾.

Un aspecto de esta actividad son los efectos alelopáticos⁽²⁾ y en particular las interacciones planta - planta, cuyo estudio se ha encarado.

En este trabajo se analizan los efectos sobre la germinación ejercidos por un hidroxiéster sesquiterpénico y once **LS** diferentes al ponerse en contacto con semillas y radículas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids. Se ensayaron **LS** de cuatro tipos esqueletales, a saber: germacranólido (compuestos **1** a **6**), guaianólido (**10** a **12**), pseudoguaianólido (**9**) y elemanólido (**7**). El hidroxiéster **8** está basado en el esqueleto elemano.

Material y método

El compuesto **1** fue aislado de *Vernonia cognata* Less.⁽³⁾, **2** de *Vernonia squamulosa* Hook et Arn⁽⁴⁾, **3** *Vernonia pinguis* Grises⁽⁵⁾, **4** de *Mikania mendocina* Phil.⁽⁶⁾, **5** de *Mikania minima*⁽⁷⁾, **8** de *Onopordon acaulon* L.⁽⁸⁾, **9** de *Parthenium hysterophorus* L.⁽⁹⁾, **10** y **11** de *Vernonia nitidula* Less.⁽¹⁰⁾ y **12** de *Kaunia lasiophtalma*⁽¹¹⁾. Los productos **6** y **7** fueron sintetizados a partir de **5**⁽¹²⁾.

Las sustancias ensayadas fueron extraídas del material vegetal con cloroformo y luego aisladas y purificadas por cromatografía en columna de silica gel y por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa (C18 y C8). Los productos puros (pureza superior al 98%) se identificaron por métodos espectroscópicos, IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y EM.

Para observar alteraciones en el proceso de germinación se empleó el método de Kato⁽¹³⁾, con algunas modificaciones introducidas por los autores.

Se impregnaron papeles de filtro (Whatman GP) de 7,5 cm. de diámetro con soluciones de 200, 400, 600 y 1200 ppm de los compuestos a ensayar en CH₂Cl₂. Un papel impregnado únicamente con solvente se empleó como blanco. Se evaporaron los restos de solvente en un desecador al vacío y los papeles se colocaron en sendas cajas de Petri. Sobre cada uno de ellos se ubicaron 50 semillas de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids de tamaño y color uniforme y se agregó suficiente agua (bidestilada y filtrada por filtro de 0,2 μ) para mantener un ambiente húmedo. Las cajas de Petri se mantuvieron a oscuras por 96 hs. y luego se realizaron observaciones.

La fotografía N° 1 muestra la germinación y desarrollo de las plántulas de *L. sativa* después de 96 hs. en el experimento testigo.

La fotografía N° 2 muestra el desarrollo al cabo del mismo tiempo cuando el papel fue impregnado con 1200 ppm del compuesto **10**. Se observa una sensible inhibición en el desarrollo radicular.

La temperatura influye en la velocidad de crecimiento de la radícula. Se ha observado que temperaturas superiores a los 27°C aceleran a tal punto el desarrollo radicular que el tiempo que la radícula permanece en contacto con el papel impregnado en el aleloquímico es demasiado corto como para producir efectos diferenciales para cada concentración. Por debajo de los 23°C el proceso de germinación se alarga innecesariamente.

riamente. Por lo expuesto, los experimentos se realizaron a 25°C.

Cada experimento se repitió 2 veces para todas las concentraciones y para todos los compuestos, excepto **7** y **8** con los que se realizó solo una serie de experimentos debido a la limitada cantidad de sustancia disponible. Se promediaron los resultados de ambos ensayos.

No se observaron diferencias significativas al reemplazar el agua bidestilada y filtrada que humedece los papeles de filtro por una solución al 0,1% de Tween 80. Se especuló que un detergente podría favorecer la difusión de los aleloquímicos en el medio acuoso y mejorar el contacto radícula-sustancia. Ensayos en blanco permitieron asegurar que, a las concentraciones empleadas, el detergente no ejerce efecto alguno en el desarrollo de las plantas.

Se realizaron experiencias adicionales empleando 1200 ppm de los compuestos y agregando cantidades equimoleculares de cisteína con el objeto de establecer si los grupos sulfhidrilo juegan algún rol en el efecto alelopático observado.

En cada caso se efectuó la cuenta del número de semillas que se abrieron disparando su radícula, a las que se consideró como "semillas germinadas". Se midieron las longitudes de radícula y de hipocótilo con precisión $\pm$ de 1 mm y se calcularon las medianas de cada longitud.

Se realizaron observaciones bajo lupa y, en los casos de radículas muy afectadas, se efectuaron cortes transversales para microscopía óptica, tanto en radículas dañadas como en otras sanas, empleadas como testigo. Cada corte se impregnó con una solución acuosa de glicerina al 50% y luego se coloreó con una solución de safranina. La fotografía N° 3 (40X) muestra el corte transversal de una radícula de experimento testigo (blanco) donde se observan abundantes pelos radiculares con longitud normal. La fotografía N° 4 (40X) muestra un corte transversal de una radícula afectada por 1200 ppm de la lactona **5** donde se observa una marcada atrofia en el número y desarrollo de los pelos radiculares.

Resultados y discusión

Se analizaron los germacranólidos **1** a **6**, los derivados de elemano **7** y **8**, el pseudoguaianólido **9** y los guaianólidos **10**, **11** y **12** (Tabla 1). Estas sustancias son compuestos mayoritarios de la planta y puede suponerse entonces que, cantidades comparables a las empleadas en nuestro ensayos lleguen al suelo por procesos de lixiviación de las hojas por lluvia, niebla o rocío, por lixiviación o decaimiento de los desechos vegetales o por exudación de las raíces⁽¹⁴⁾.

Entre los compuestos ensayados hay diferencias esqueléticas y funcionales. Se han elegido compuestos con diferentes esqueletos pues, en experimentos relacionados con estimulación de la germinación, se ha sugerido⁽¹⁵⁾ una mayor dependencia con la distribución de los átomos de carbono en el esqueleto, antes que con la presencia de algún grupo funcional específico. Dentro de cada grupo con semejanzas esqueléticas, hay diferencias funcionales las que dan lugar a diferencias en la actividad dentro del grupo. Sin embargo, en general, se puede observar que:

- 1) Los porcentajes de germinación no difieren significativamente del observado para el experimento testigo (Tabla 2). Esto es de esperar si el mecanismo de germinación es influenciado únicamente por factores internos desencadenados por la humedad ambiente. Aparentemente no habría difusión de las sustancias ensayadas hacia el interior de las semillas.
- 2) La longitud del hipocótilo no se ve seriamente influenciada por las diferentes concentraciones de sustancias y solo a 600 o 1200 ppm, en plántulas afectadas (compuestos **3**, **4**, **5**, **7** y **8**), puede verse una caída de hasta un 30% en el promedio de elongación con respecto al testigo.
- 3) El fenómeno de dobles máximos o dobles mínimos de actividad a diferentes concentraciones, que había sido previamente observada⁽¹⁶⁾ aparece también en nuestros experimentos. La explicación bioquímica de este comportamiento podría vincularse con que el mismo compuesto actuaría sobre más de una enzima y entonces el resultado observado correspondería a una combinación de efectos.
- 4) El agregado de 400 ppm de cisteína unido a 1200 ppm del sesquiterpeno no provoca modificaciones mayores a un 15% con respecto a las observadas en los experimentos a 1200 ppm de compuesto puro. Es probable entonces, que las alteraciones observadas no estén relacionadas con el ataque de los aleloquímicos ensayados al grupo sulfhidrilo de enzimas.

Las mayores alteraciones se producen a nivel de la radícula. En la tabla 3 se indican porcentajes de mediana de longitud de radícula de cada grupo tratado con 200, 400, 600 y 1200 ppm de sustancia con respecto a la mediana del grupo testigo considerada como 100%. No solo se altera el proceso de alargamiento sino también aparecen modificaciones morfológicas que se observan a simple vista como torsión de las radículas y pérdida del geotropismo positivo (experimentos a 400, 600 y 1200 ppm con los compuestos **8** y **3**). En los casos de caída de la longitud radicular en más de un 40%, las observaciones al microscopio óptico mostraron una notable afección de los pelos radicales, con lo cual la radícula ve inhibida su capacidad de absorción.

Las sustancias **3**, **4**, **6**, **7** y **10** reducen a menos de la mitad la longitud de radícula a 1200 ppm. A 600 y 400 ppm producen este efecto solo los compuestos **3** y **8** y a 200 ppm ninguno de los analizados tiene un efecto tan drástico. Una estimulación del proceso de elongación solo se ha observado a ciertas concentraciones de los compuestos **2**, **5** y **12**.

Los compuestos **1** a **6** presentan un anillo de 10 Carbonos. El producto **1** (Glaucolide B) y el **2** (Glaucolide A) no afectan notablemente el proceso de germinación. Su rol ecológico se ha vinculado con la actividad molusquicida⁽¹⁷⁾ para **1** e insecticida⁽¹⁸⁾ para **2**.

Los compuestos **1**, **2** y **3** se diferencian del resto por no presentar una función exometilén y - lactona a la que numerosas publicaciones le han asignado una fuerte influencia en la actividad biológica^(1,9,19).

En **3**, aparentemente la presencia del agrupamiento hemiacetal cíclico, sería res-

ponsable de la actividad inhibitoria observada. Previamente⁽²⁰⁾ se ha informado sobre la actividad citotóxica de compuestos de estructura relacionada con **3**; es esta la primera observación de un efecto alelopático de estas circunstancias llamadas ésteres de ptiocarfol⁽²¹⁾ o hirsutinolides⁽²²⁾.

Los germacranólidos **4**, **5** y **6** poseen esqueletos más rígidos que **1** y **2** y contienen un sistema de exometilén γ - lactona. Ellos también producen alteraciones aunque sus efectos son más leves que los observados para el compuesto **3**. El heliangólido **4** produce disuasión a la predación por cierta clase de hormigas cortadoras⁽²³⁾ de la especie *Atta cephalotes*, de las selvas brasileñas. A productos estructuralmente relacionados con **5** y **6** se les han asignado propiedades citotóxicas y antibacterianas⁽¹⁾. A concentraciones mayores a 600 ppm el compuesto epoxidado **6** produce efectos inhibitorios mayores que **5** observándose también daños más drásticos en pelos radiculares.

Ensayos para probar actividad antimicrobiana⁽²⁴⁾ también mostraron que la esterificación de grupos hidroxilos o la epoxidación de dobles enlaces producen incrementos de la actividad.

Entre los derivados de elemanos que analizamos el compuesto no lactonizado **8** posee la mayor actividad. Cabe destacar que esta molécula presenta síntomas electrofílicos que pueden sufrir adiciones de Michael.

El compuesto **9** (Hymenin) es el único pseudoguaianólido analizado y se halla entre los compuestos menos activos de este trabajo. La actividad biológica de sustancias estructuralmente relacionadas con **9** es diversa⁽¹⁾.

Entre los guaianólidos, los compuestos **10** y **11** provocan inhibiciones importantes a 600 y 1200 ppm observándose alteraciones morfológicas en los pelos radiculares. Si bien el compuesto **12** reduce el desarrollo radicular a 400 y 1200 ppm no se han notado modificaciones morfológicas en las radículas.

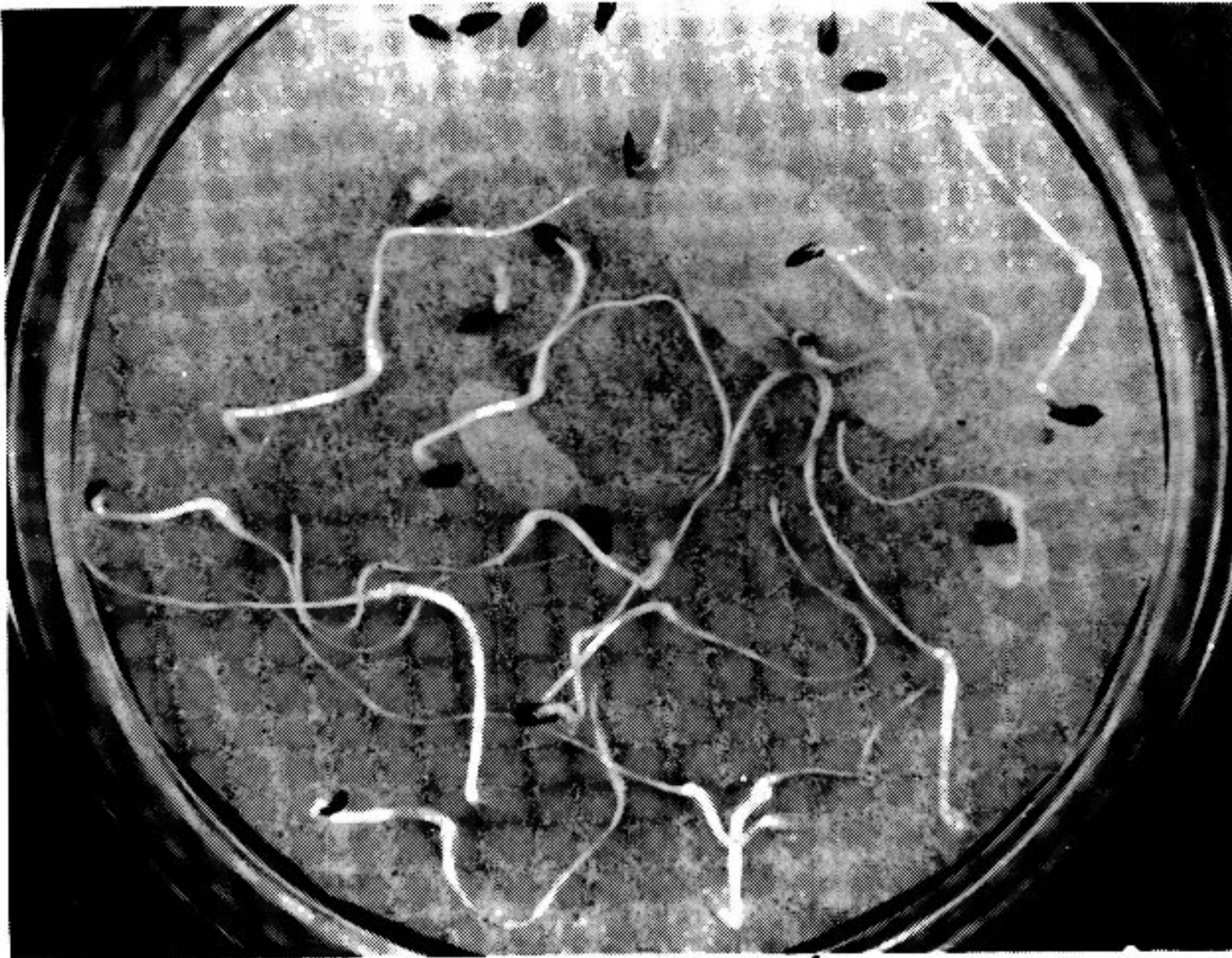
Recientemente se ha informado que el pseudoguaianólido **9** y el guaianólido **10** ejercen efectos citoprotectores leves sobre úlceras gástricas producidas por etanol⁽¹⁰⁾.

Análisis estadístico: Se realizaron dos tests no paramétricos para analizar las diferencias en los resultados para las distintas concentraciones de aleloquímico. Fueron el de "Kruskal y Wallis" y el "Test de la Mediana"⁽²⁴⁾. No se realizó el supuesto de normalidad.

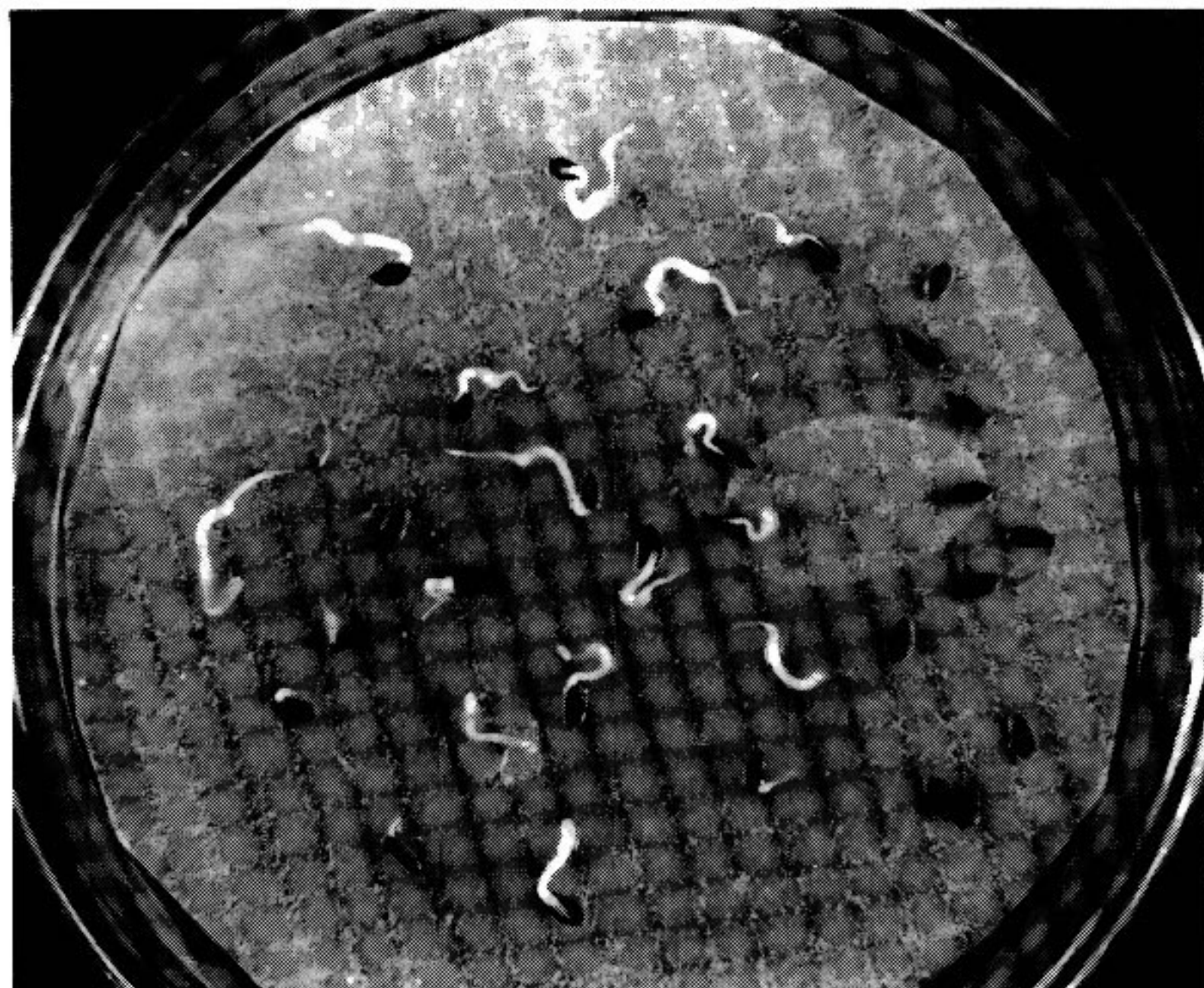
Agradecimientos

Al consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán por su apoyo económico. A la Lic. Adriana Elías por su colaboración en el tratamiento estadístico de los resultados. Al Dr. O. S. Giordano por suministrarnos una muestra pura de hymenin. A la Lic. M. Rodríguez de Sarmiento por su colaboración en el trabajo de microscopía.

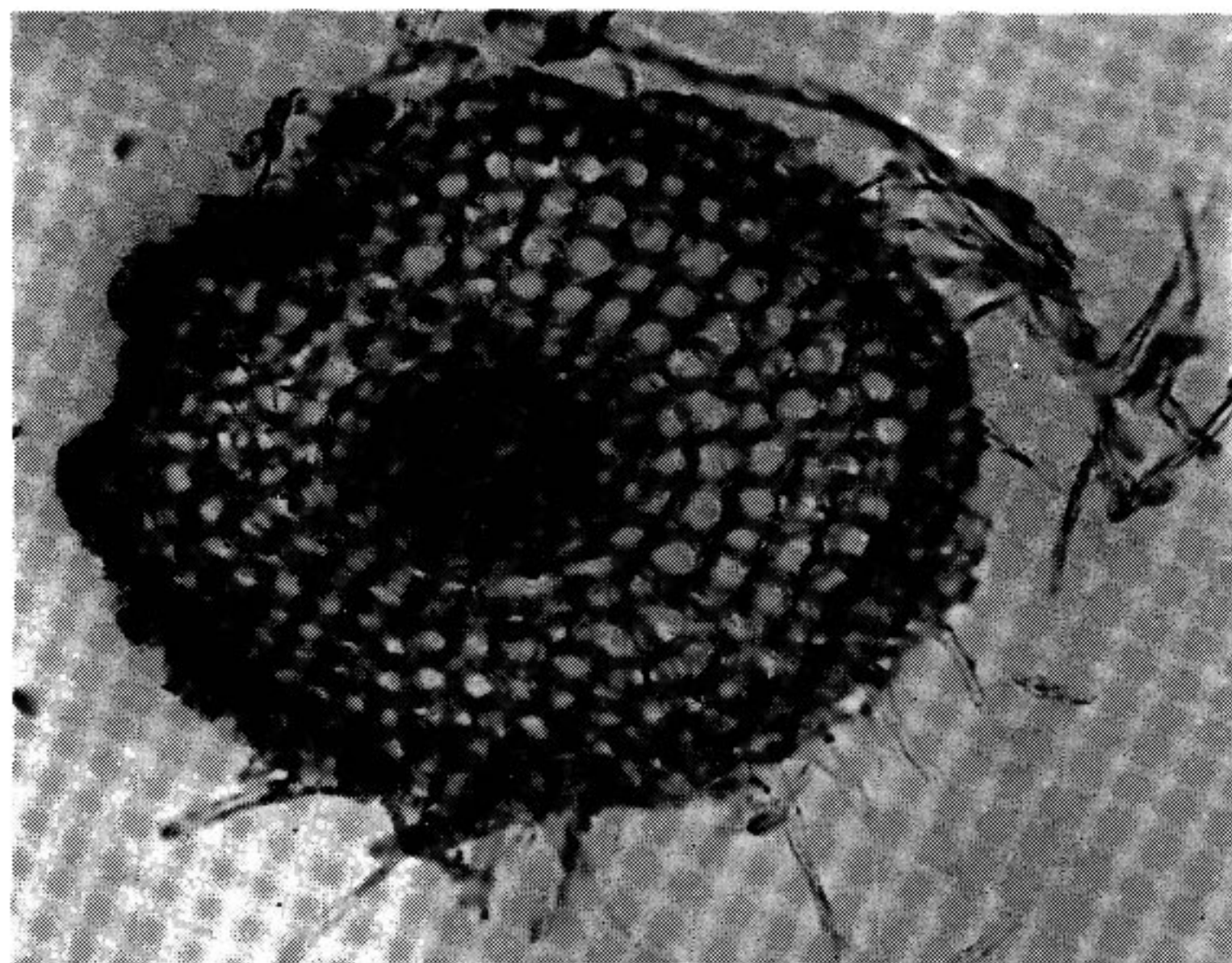
FOTOGRAFIAS



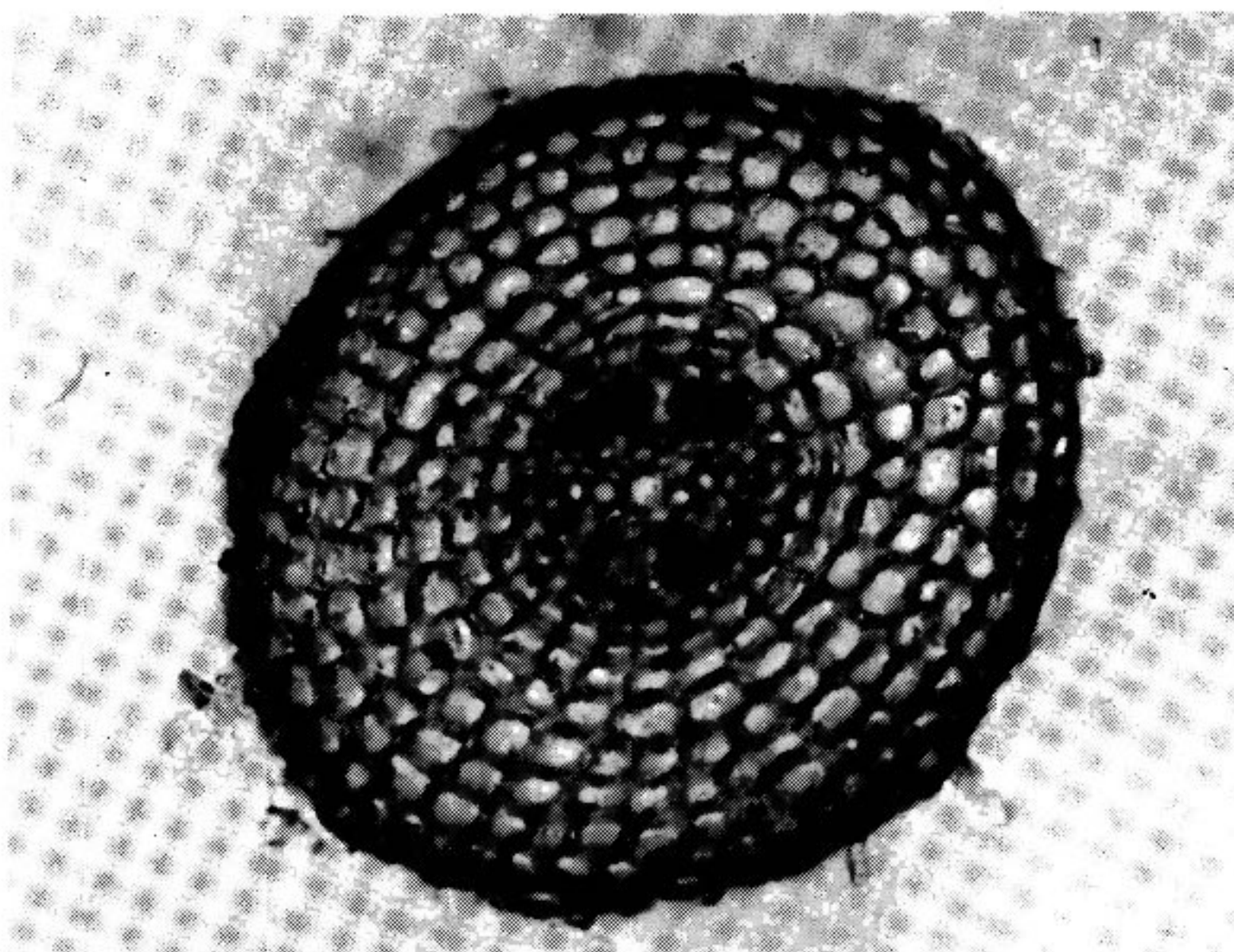
Fotografía N°1:
Caja de Petri con
plántulas de *L. sativa*
del experimento
testigo a las 96 hs.



Fotografía N° 2:
Plántulas
afectadas por 1200 ppm
del Compuesto 10
a las 96 hs.



Fotografía N° 3:
Corte transversal
de radícula no afectada



Fotografía N°4:
Corte transversal
de radícula afectada

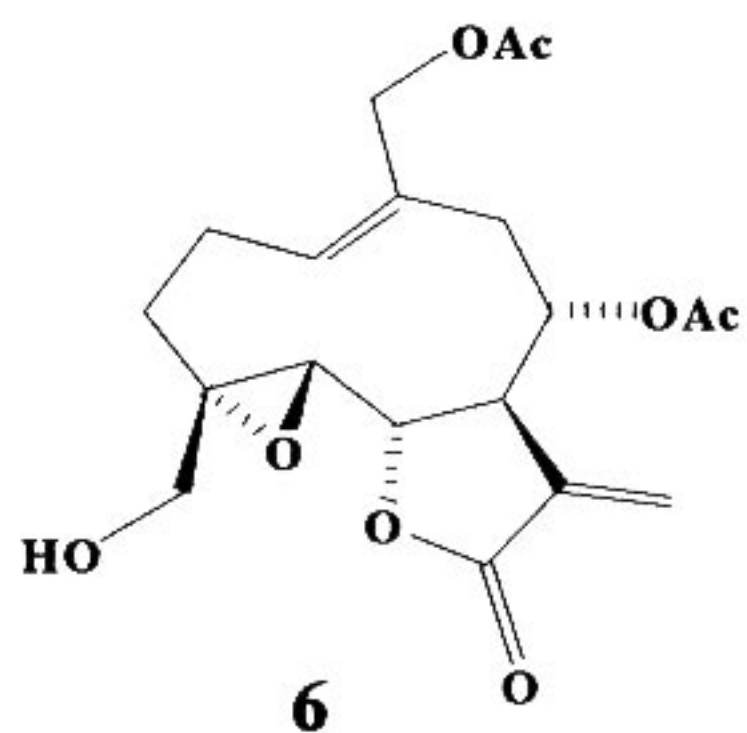
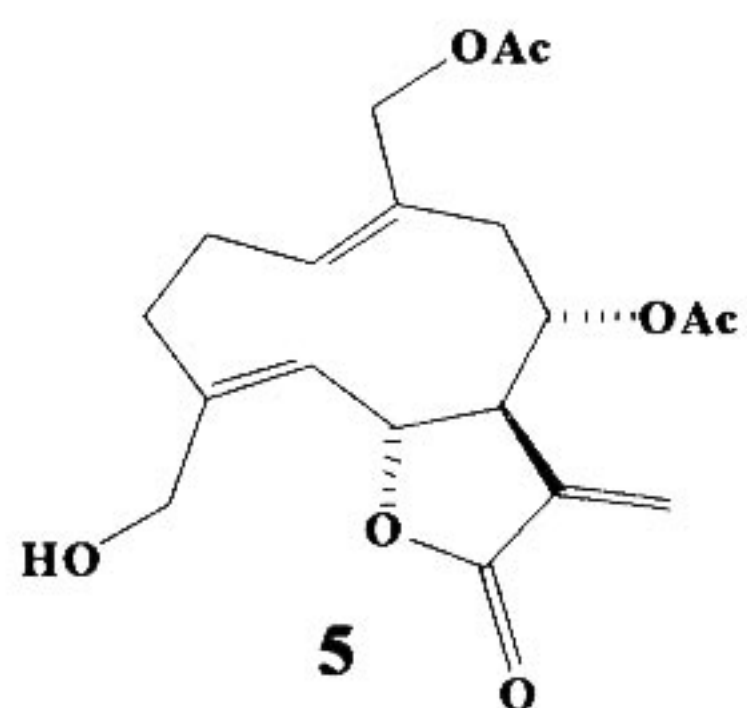
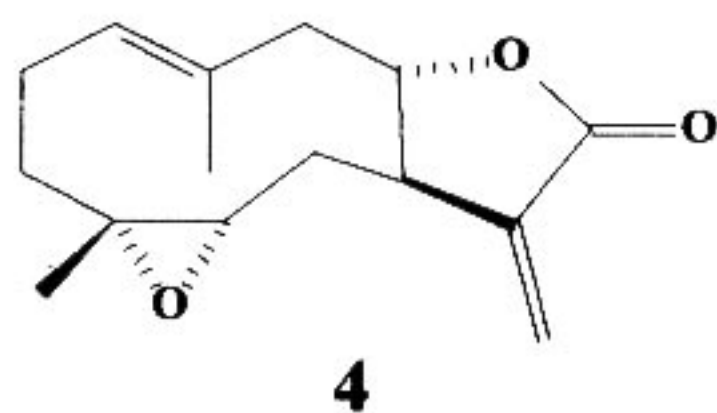
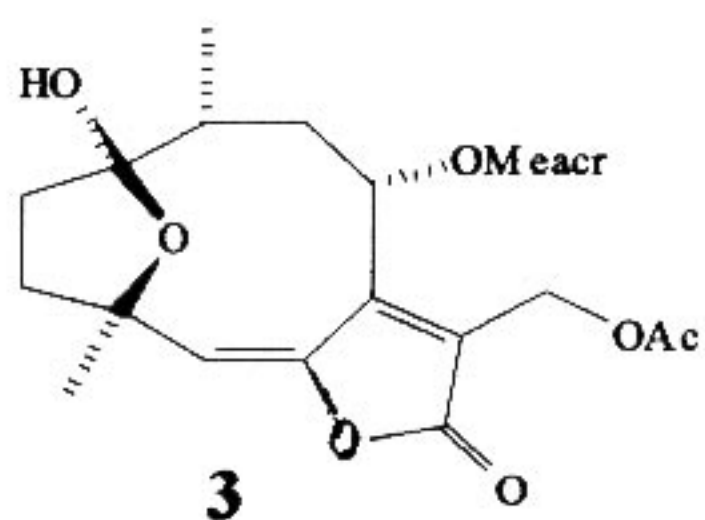
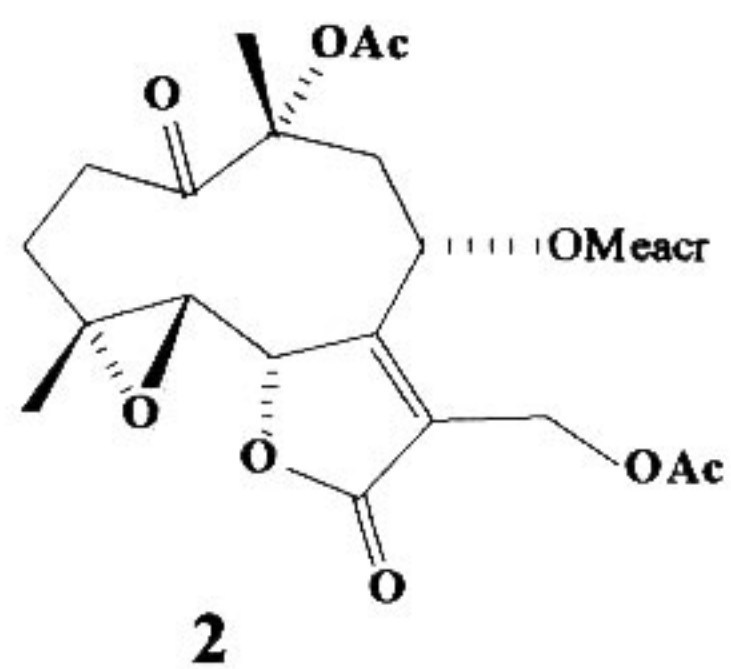
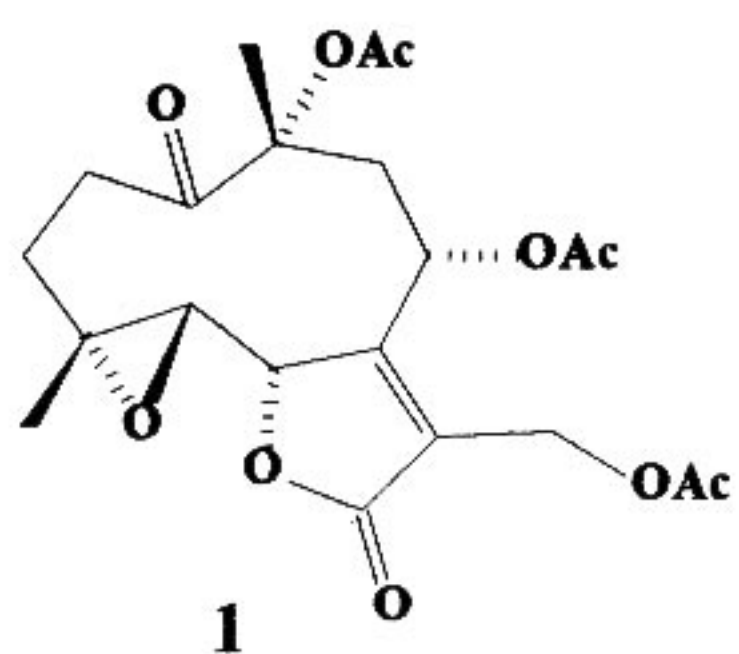


Tabla 1: Compuestos estudiados

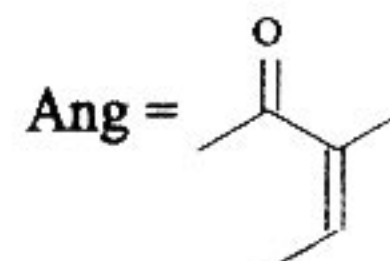
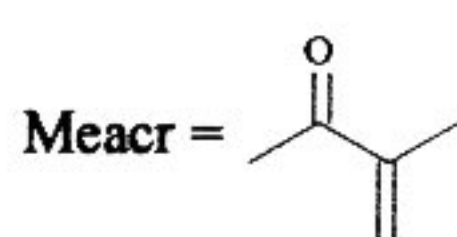
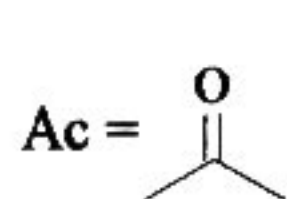
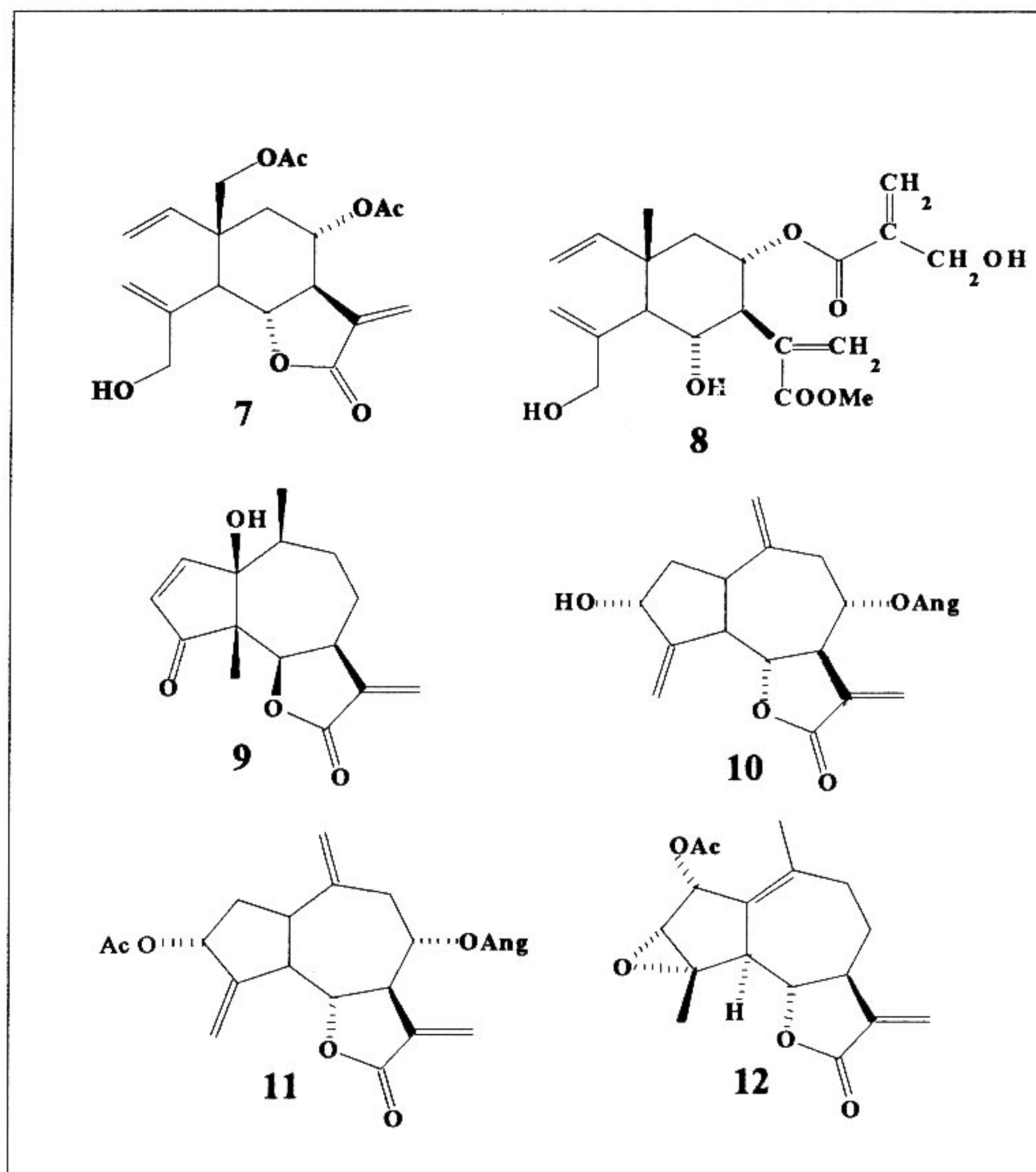


Tabla 1: Compuestos estudiados (Continuación)

Compuesto	200 ppm	400 ppm	600 ppm	1200 ppm
1	97	98	97	83
2	107	102	108	101
3	88	79	91	85
4	98	103	119	119
5	120	110	118	104
6	93	105	104	101
7	89	91	86	100
8	115	118	108	103
9	94	98	89	87
10	101	103	95	97
11	74	89	95	77
12	98	105	100	100

Tabla 2: Porcentajes de germinación con respecto al testigo tomado como 100%

Compuesto	200 ppm	400 ppm	600 ppm	1200 ppm
1	96	86	81	62
2	118	117	100	76
3	62	49	46	12
4	73	61	61	40
5	127	74	68	61
6	87	75	56	42
7	80	80	56	43
8	64	48	32	77
9	94	87	81	55
10	82	96	69	47
11	55	83	72	51
12	103	57	91	71

Tabla 3: Porcentajes de mediana de la longitud de radícula con respecto al testigo tomado como 100%

Bibliografía

- 1 Picman, A.K., (1986). **Biochem. System. Ecol.**, **14**: 255.
- 2 Fischer, N., Wiedenhamer, J. y Bradow, J., (1989). **J. Chem. Ecol.**, **15**: 1785.
- 3 Bardón, A., Catalán, C.A.N., Gutiérrez, A. y Herz, W. (1988). **Phytochemistry**, **27**: 2989.
- 4 Catalán, C.A.N., de Iglesias, D.I.A., Kavka, J., Sosa V. y Herz, W., (1986). **J.Nat.Prod.**, **49**: 351.
- 5 Resultados de nuestro laboratorio aún no publicados.
- 6 Resultados de nuestro laboratorio aún no publicados.
- 7 Cuenca, M. del R., Borkosky, S., Catalán, C.A.N., Goedken, V., Díaz, J. y Herz, W., (1993). **Phytochemistry**, **32**: 1509.
- 8 Cardona, L. Bardón, A., García, B. y Pedro, J.R., (1993). **Phytochemistry**, **33**: 1457.
- 9 Giordano, O.S., Guerreiro, E., Pestchanker M.J., Guzmán, J., Pastor, D. y Guardia, T., (1990). **J.Nat.Prod.**, **53**: 803.
- 10 Bardón, A., Catalán, C.A.N., Gutierrez, A. y Herz, W., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 1219.
- 11 Gutiérrez, A.N. de, Sigstad, E., Catalán, C.A.N., Gutierrez, A. y Herz, W., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 1219.
- 12 Cuenca, M. del R., Catalán, C.A.N. y Kokke, W.C.M.C., (1990). **J.Nat.Prod.**, **53**: 686.
- 13 Kato, T., Tsunakawa, M., Sasaki, N., Aizawa, H., Fujita, K., Kitahara, Y., y Takahashni, N., (1977). **Phytochemistry**, **16**: 45.
- 14 Putnam, A.R., (1983). **Chemical & Engineering News**, Abril 4: 34-35.
- 15 Fischer, N., Wiedenhamer, J.D., Riopel, J., Quijano, L., and Menelaou, M.A., (1990). **Phytochemistry**, **29**: 2479.
- 16 Macías, F., Galindo, J.C. and Massanet, G., (1992). **Phytochemistry**, **31**: 1969.
- 17 Alarcón, M.C.B., Callegari Lopes, J.L. y Herz W., (1990). **Planta Med.**, **56**: 271.
- 18 Burnett, W., Jones, S., Mabry, T.J. and Padolina, W., (1974). **Biochem. System. Ecol.**, **2**: 25.
- 19 Pettit, G., Herlad, D., Cragg, G. Rideout, J. and Brown, P., (1990). **J.Nat. Prod.**, **53**: 382.
- 20 Kupchan, S.M., Eakin, M.A. y Thomas, A.M., (1971). **J. Med. Chem.**, **14**: 1147.
- 21 Cowall, P.L., Cassady, J.M., Chancg, Ch. y Kozlowski, J.F., (1981). **J. Org. Chem.**, **46**: 1108.
- 22 Bohlmann, F., Brindöpke, G. y Rastogui, R.C., (1978). **Phytochemistry**, **17**: 475.
- 23 Hubert, T., Okunade, A., Wiemer, D., (1987), **Phytochemistry**, **26**: 1751.
- 24 Lee, K.H., Ibuka, T., Wu, R.Y., and Geissman, T.A., (1977). **Phytochemistry**, **16**: 1177.
- 25 Siegel, S. (1970). En: **Diseño experimental no paramétrico**, Trillas, México.