

Libros de **Cátedra**

# Productos Naturales Vegetales

Jorge Ringuelet  
Sonia Viña  
(coordinadores)

FACULTAD DE  
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

**n**  
naturales



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# PRODUCTOS NATURALES VEGETALES

*Jorge Ringuelet y Sonia Viña*

*(coordinadores)*



2013

Productos naturales vegetales / Jorge Abel Ringuelet ... [et.al.] ;  
coordinado por Jorge Abel Ringuelet . - 1a ed. - La Plata : Universidad  
Nacional de La Plata, 2013.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0971-8

1. Química. 2. Metabolismo Vegetal. 3. Enseñanza Universitaria. I.  
Ringuelet , Jorge Abel II. Ringuelet , Jorge Abel , coord.  
CDD 540.711

Fecha de catalogación: 12/06/2013

**Diseño de tapa:** Dirección de Comunicación Visual de la UNLP



**Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata**

47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina

+54 221 427 3992 / 427 4898

editorial@editorial.unlp.edu.ar

www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2013

La Plata, Buenos Aires, Argentina

ISBN 978-950-34-0971-8

© 2013. UNLP-Edulp

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores de la presente obra deseamos agradecer muy especialmente a la ingeniera agrónoma Elsa Lucía Cerimele, por compartir con nosotros toda su experiencia durante su desempeño como profesora del Curso Bioquímica y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP, por sus aportes en la revisión de esta obra y por sus valiosas contribuciones para mejorarla. Le damos las gracias por continuar acompañándonos y dándonos su apoyo.

# ÍNDICE

<b>Prólogo</b>	3
<b>Capítulo 1.</b> Introducción a los productos naturales vegetales, <i>Jorge Ringuelet y Sonia Viña</i>	4
<b>Capítulo 2.</b> Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides, <i>Cynthia Henning</i>	18
<b>Capítulo 3.</b> Otros compuestos secundarios nitrogenados y compuestos azufrados, <i>Cynthia Henning y Roxana Yordaz</i>	62
<b>Capítulo 4.</b> Compuestos fenólicos, <i>Sonia Viña</i>	91
<b>Capítulo 5.</b> Terpenoides, <i>Jorge Ringuelet</i>	151
<b>Capítulo 6.</b> Intervención de los compuestos secundarios en las interacciones biológicas, <i>María Cecilia Arango</i>	191
<b>Los autores</b>	257

## PRÓLOGO

El maravilloso suceso de la vida tiene lugar en nuestro planeta asociado a la aparición de diferentes y numerosas moléculas orgánicas y a la complejidad de interacciones que se producen entre ellas. También la vida, a partir del intrincado diseño molecular sobre el que subyace, ha posibilitado la síntesis de innumerables compuestos con funciones diferentes y distribución variada.

El mundo vegetal es, quizás, el que muestra un abanico de moléculas más diverso y del cual el hombre ha hecho y hace una provechosa utilización.

La maquinaria química de un vegetal es tan ingeniosa que asombra al estudiar en su profundidad la estructura, función, metabolismo y regulación de cada molécula identificada y de los innumerables procesos en que participan a nivel celular.

Por otra parte, al no contar con el mecanismo de evasión y encontrarse ancladas al suelo o algún otro sustrato, las variadas especies vegetales han necesitado desarrollar mecanismos químicos de defensa que posibilitan su supervivencia frente al ataque de parásitos y herbívoros. A dichos mecanismos ha contribuido, sin lugar a dudas, el amplio espectro de sustancias orgánicas propias de los organismos vegetales.

A toda esa diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos *productos naturales vegetales*. En la elaboración de este texto hemos tratado de describir los más importantes, agrupándolos para un estudio ordenado.

Se ha iniciado la obra abarcando una serie de consideraciones generales sobre dichos productos. Seguidamente se han descripto las características estructurales, propiedades, distribución en la naturaleza, funciones en las plantas, actividades biológicas, biosíntesis y métodos de extracción y/o cuantificación de los diferentes productos naturales vegetales. Los grupos a los que se ha hecho referencia son: metabolitos secundarios nitrogenados y/o azufrados, sustancias fenólicas y compuestos terpénicos.

Se ha incluido, finalmente, un capítulo donde se trata, en particular, la vinculación entre distintos productos naturales vegetales y la adaptación de las plantas al medio ambiente, como así también su participación en las relaciones bióticas observadas en diferentes sistemas naturales y/o agroecosistemas.

El objetivo principal de la obra es resumir los aspectos más importantes de esta área para quien quiera profundizar en el estudio de diversas moléculas orgánicas distribuidas en el mundo vegetal. La misma es el resultado de la experiencia acumulada durante varios años por los docentes del curso Bioquímica y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Pretendemos modestamente que sirva de base y guía para los estudiantes de grado en áreas biológicas, como la Ingeniería Agronómica, Ingeniería Forestal, Biología, Ciencias Farmacéuticas y otras que pudieran estar relacionadas a este interesante campo de estudio.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN A LOS PRODUCTOS NATURALES VEGETALES

*Jorge Ringuelet*

*Sonia Viña*

### Clasificación de los componentes químicos vegetales

Un tejido vegetal, como toda materia viva, se encuentra en un estado dinámico-estacionario desde el punto de vista químico. Hay una constante síntesis y degradación de biomoléculas o metabolitos que determina el dinamismo de los sistemas biológicos, pero a su vez, al estar en equilibrio la velocidad de síntesis o aparición con la de degradación o desaparición de componentes celulares, las concentraciones de los mismos se mantienen aproximadamente constantes, estacionarias.

Los compuestos químicos celulares (metabolitos) pueden ser clasificados en *primarios* y *secundarios*. Los *compuestos primarios* serían todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Comprenden los *Glúcidos* o Hidratos de Carbono, los *Lípidos*, las *Proteínas* y los *Ácidos Nucleicos*.

Los glúcidos representan compuestos útiles como reserva energética (glucosa, sacarosa y almidón en plantas, glucógeno en animales), como material estructural y cementante (celulosa, pectinas, hemicelulosa en vegetales). Muchos de ellos son altamente solubles en agua y otros totalmente insolubles en agua y demás solventes, como es el caso de la celulosa.

Los lípidos son típicos compuestos de reserva energética y de carbono, componentes estructurales fundamentales de las membranas biológicas, solubles en solventes no polares.

Las proteínas son quizás los compuestos más versátiles, esenciales por sus actividades catalíticas, estructurales, hormonales y una gran diversidad de otras funciones.

Los ácidos nucleicos, en cambio, cumplen la primordial función de ser las moléculas depositarias de la información genética y permitirle a los seres vivos transmitir sus características a la descendencia.

Los *compuestos secundarios* cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general, directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos tales como la obtención de energía. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. Es decir que cumplen preferentemente funciones ecológicas.

De todos modos, hay moléculas cuya inclusión en alguno de estos agrupamientos es dificultosa o discutible ya que no cumplen con la totalidad de los criterios seleccionados en la clasificación, sino sólo con alguno/s de ellos. Un ejemplo sería el caso de la clorofila en las plantas superiores, que es vital para las mismas, aunque no es un componente que se presenta distribuido en todas las células del organismo sino sólo en tejidos verdes, fotosintéticos. No respondería estrictamente a las características de los compuestos primarios mencionados, pero sin su presencia las plantas carecerían de la capacidad de sintetizar las triosas que dan lugar al resto de los componentes glucídicos del vegetal.

### Características de los metabolitos secundarios o productos naturales vegetales. Definición

Gran diversidad de metabolitos secundarios han sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, terapéutica de cultivos,

perfumística, alimenticia (como suplementos, aditivos o colorantes), en el curtido de cueros, etc. Éstos son los comúnmente llamados *productos naturales vegetales* y representan moléculas con variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos.

En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos (Bandoni *et al.*, 2006).

Debemos aclarar que los metabolitos primarios también representan productos naturales, son parte de la maquinaria química vegetal y su utilización por el hombre en alimentación y en diversas industrias es esencial y muy conocida. Pero los metabolitos secundarios están restringidos generalmente al metabolismo de algunas especies vegetales o familias botánicas.

La glucosa es sintetizada vía fotosíntesis por prácticamente todas las plantas, mientras que la morfina por ejemplo es una estructura molecular biosintetizada solamente por especies de la familia *Papaveraceae*. Por ello, el término productos naturales vegetales se refiere generalmente a los metabolitos secundarios, con real o potencial utilidad para el hombre y/o para la adaptación de la planta al medio ambiente.

Como precursores *in vivo* de todos los metabolitos secundarios siempre aparece algún compuesto presente en una vía del metabolismo primario. Así es como los compuestos nitrogenados (aminas, amidas, glicósidos cianogénicos, alcaloides) tienen algún aminoácido o derivado de ellos como precursor en su ruta biosintética; compuestos de la vía primaria de las pentosas-fosfato como la eritrosa-fosfato y el fosfoenolpiruvato de la glucólisis dan lugar a las distintas clases de metabolitos fenólicos; los terpenoides tienen como precursores a intermediarios de la glucólisis o grupos acetilos. Esto pone en evidencia que hay una verdadera integración metabólica entre los compuestos primarios (principalmente glúcidos, lípidos y proteínas) y los compuestos secundarios.

Algunos metabolitos secundarios o productos naturales cumplen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Ciertos grupos actúan como pigmentos que proporcionan color a flores y frutos,

jugando un papel esencial en la reproducción al atraer a insectos polinizadores o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen una función protectora frente a predadores, como disuasorios, proporcionando al vegetal sabores amargos, convirtiendo a las plantas en materiales indigestos o venenosos. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Aunque algunos metabolitos secundarios se encuentran en animales (Luckner, 1972), la gran mayoría de los productos naturales de interés son de origen vegetal (Robinson, 1980).

En el presente texto, se tratarán los metabolitos secundarios de mayor relevancia en cuanto a la función que cumplen en las plantas, la utilización por parte del hombre y/o su potencialidad de uso en distintas industrias.

## Clasificación de los metabolitos secundarios

A fin de establecer un ordenamiento, estos compuestos se clasificarán teniendo en cuenta: su origen biosintético, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad. Los grandes grupos de metabolitos secundarios a tratar serán:

- *Compuestos nitrogenados y azufrados*, caracterizados por poseer nitrógeno y/o azufre en su estructura, de solubilidad y origen biosintético diverso pero mayoritariamente derivados de aminoácidos.
- *Compuestos fenólicos*, con al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría hidrosolubles y derivados biosintéticamente del ácido shikímico.
- *Terpenoides*, con la molécula de isopreno como unidad estructural, liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato - ácido pirúvico, dependiendo de la clase de terpenoides en cuestión.

Varios compuestos no esenciales considerados metabolitos secundarios distribuidos en plantas y microorganismos, pueden no estar incluidos en estos grupos por no compartir algunas propiedades o características.

## Estudio de los constituyentes químicos de las plantas

La disciplina que tiene como principal objetivo el estudio de los constituyentes químicos de las plantas es la *Fitoquímica*. El estudio de tales compuestos abarca: sus estructuras químicas, metabolismo (biosíntesis y degradación), distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa. Esta especialidad se apoya y participa de otras disciplinas como Biología Celular, Bioquímica y Fisiología Vegetal, Bioquímica Ecológica, Fitopatología, Sistemática Vegetal, entre muchas otras.

En cuanto a su aplicación, la Fitoquímica constituye una herramienta importante en las Ciencias Agrícolas y Forestales tanto en las áreas de producción vegetal y animal, como en lo relativo a tecnología agrícola y forestal, por su vinculación con las materias primas y productos finales de diversas agro-foresto-industrias. Asimismo, presenta aplicaciones importantes en relación a las Ciencias Farmacéuticas y la Biotecnología vegetal.

En este texto se hará hincapié en el estudio de los compuestos orgánicos producidos por el metabolismo secundario de las plantas, muchos de los cuales tienen interés terapéutico o industrial. Por otra parte, dichos compuestos están implicados en la adaptación bioquímica de la planta al ambiente, así como en otras interacciones químicas entre planta-planta, planta-animal y entre la planta y los factores abióticos del entorno.

Mientras que la Ecología como ciencia estudia o trata las interacciones entre organismos vivos en su hábitat, la Fitoquímica se aboca, entre otros aspectos de las plantas, a las interacciones a nivel molecular. Podemos definir entonces a la *Fitoquímica Ecológica* como la disciplina que tiene como objeto de estudio a las interacciones químicas entre las plantas, las plantas y los animales y las plantas con el medio en general.

Esta área de estudio permite profundizar los conocimientos sobre la arquitectura de los ecosistemas y el rol que juegan en las plantas los metabolitos secundarios. Como resultado de estos conocimientos basados en las interacciones químicas entre las plantas con otros organismos y el medio, se pueden lograr nuevas y útiles aplicaciones para el hombre en diversas áreas como farmacología, manejo y conservación del ambiente, cambio climático y prácticas agrícolas sustentables (Macías *et al.*, 2007).

Cabe señalar por otra parte que la *Bioquímica Ecológica* incluye en esos estudios las interacciones químicas entre todos los seres vivos y entre ellos y el medio ambiente (Harborne, 1985).

Para el estudio de esas interacciones debe priorizarse el análisis de la estructura y metabolismo de los metabolitos secundarios o productos naturales sintetizados en los tejidos.

Sin duda que la naturaleza, en especial las plantas, constituye la fuente más eficaz de estructuras moleculares que interactúan vinculando los diversos sistemas biológicos y el medio ambiente.

## Preparación del material vegetal para ser analizado

La composición química de los vegetales varía entre las diferentes especies, en las distintas partes de la planta y según sus estados fenológicos. Por lo tanto, el método de muestreo es fundamental en el momento de enviar para su análisis al laboratorio una muestra representativa de lo que se quiere estudiar. La forma de tomar la muestra depende del objetivo que se persigue.

Si se trata de plantas o partes de ellas, es fundamental evitar la contaminación de las muestras en estudio con plantas enfermas, heces, orina, tierra, etc.

La correcta identificación botánica del material es de primordial importancia en los análisis fitoquímicos. Se han cometido muchos errores en el pasado sobre la identidad de las plantas, por eso es esencial verificar que las especies hayan sido correctamente identificadas, ya sea para el estudio de nuevas sustancias presentes en las plantas o para el análisis de sustancias ya conocidas

obtenidas a partir de plantas en las que no habían sido determinadas con anterioridad.

La preparación del material a analizar depende de varios factores, como el método fitoquímico a seguir y el o los compuestos a determinar, entre otros.

Los métodos de análisis fitoquímico pueden ser de diversos tipos (Domínguez, 1973):

a) Histológicos, que consisten en la observación de cortes de tejidos que han sido tratados con reactivos que producen reacciones de coloración o precipitación ante la presencia de ciertos compuestos que quiere investigarse. Un ejemplo es la identificación de almidón en tejidos observando el color azul que se desarrolla ante la reacción con el reactivo lugol.

b) Químicos, que generalmente comprenden el tratamiento de extractos con reactivos que dan lugar a la producción de colores o precipitados característicos.

c) Físicoquímicos, como el uso de métodos cromatográficos y espectrométricos u otros métodos a partir de los extractos obtenidos del material en ensayo.

d) Biológicos, donde se observa el efecto de los extractos vegetales sobre cultivos de microorganismos, células, tejidos o sobre animales.

La investigación fitoquímica de una planta comprende varios aspectos:

- Extracción de los compuestos a analizar a partir de una muestra o espécimen.
- Separación y aislamiento de los mismos.
- Identificación y/o caracterización de los compuestos aislados.
- Investigación de las rutas biosintéticas de determinada molécula.
- Determinación o valoración cuantitativa.

En algunos casos se debe trabajar con material recién cosechado o recolectado, ya que los principios a estudiar sufren una rápida y fácil degradación. Pero en otras circunstancias, transcurre un tiempo variable entre la toma de muestras, la llegada al laboratorio y el comienzo de los análisis. En esos casos debe realizarse lo que se conoce como *estabilización* del material.

La planta recién cosechada continúa viviendo durante cierto tiempo a expensas de sus reservas y de los constituyentes del tejido; así se producen cambios químicos donde la planta aprovecha sus componentes merced a la acción de

enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, ruptura, reordenamiento, transferencia de grupos, condensación.

La mayoría de las alteraciones que se producen una vez que el material ha sido recolectado las podemos agrupar de la siguiente manera:

a) modificaciones de la estructura; b) caramelizaciones; c) pérdida de compuestos volátiles; d) fermentaciones; e) oxidaciones.

A fin de mantener una muestra sin cambios desde el momento en que se la obtiene, es necesario detener los procesos enzimáticos que comienzan en el mismo instante del corte.

La fijación relativa de la composición química de la planta se denomina *estabilización*. Antes de encarar un análisis químico el material debe ser estabilizado tratando de fijar la composición química del vegetal, procurando que la misma sea lo más parecida posible a la que tenía en su estado original.

Para llevar a cabo este proceso se pueden aplicar diferentes métodos que, en general, van a producir una deshidratación y una desnaturalización de los sistemas enzimáticos propios de los tejidos, inactivando la acción catalítica de los mismos.

Una forma práctica y sencilla de estabilización es mediante el tratamiento con calor, aplicado por ejemplo en estufa a una temperatura de referencia de 60°C hasta que las muestras alcancen peso constante. Otras variantes incluyen la conservación a bajas temperaturas, produciendo el congelamiento de los tejidos, o la liofilización o criodesecación, empleando en este caso bajas temperaturas acompañadas de un rápido descenso de la presión.

## Extracción de compuestos orgánicos

En la extracción y purificación de compuestos orgánicos mediante el empleo de solventes, se suelen seguir ciertas reglas basadas en las analogías estructurales existentes entre la sustancia a extraer y el disolvente que se empleará para tal fin. De este modo, para la extracción de glúcidos, lípidos, alcaloides, pigmentos, etc., a partir de los tejidos vegetales o animales que los

contienen (o de los líquidos orgánicos provenientes de ellos) se emplearán disolventes cuya estructura sea semejante o afín a la de las sustancias que se quieren extraer.

La polaridad de los compuestos es otro elemento a tener en cuenta al considerar la solubilidad de un soluto en un solvente dado. Es así que los solventes fuertemente polares disuelven solutos iónicos o altamente polares, mientras que los solventes poco polares no disuelven de manera eficiente los solutos iónicos pero sí a los solutos de baja polaridad.

Un factor vinculado a la polaridad de un solvente es su capacidad para formar uniones de tipo puente hidrógeno. Los solventes con posibilidad de formar este tipo de interacciones facilitan la disolución de sustancias que también pueden participar de estas asociaciones.

Desde el punto de vista general los solventes pueden clasificarse en *polares* y *no polares*, existiendo además algunos de *polaridad intermedia*.

- Disolventes *polares*: la polaridad de estos disolventes está vinculada no sólo al tipo de uniones interatómicas (de tipo iónicas o covalentes polares), sino también a la presencia de grupos funcionales polares (hidroxilo, amino) y la capacidad de formar uniones de tipo puente hidrógeno. Los compuestos con grupos funcionales polares son solubles en este tipo de disolventes, siempre que el componente hidrocarbonado no sea relativamente grande (no más de 4 átomos de carbono, como regla general). Dentro de esta clase de disolventes encontramos al agua, los alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol), la dimetilformamida (DMF), el dimetilsulfóxido (DMSO) y algunos ácidos de bajo peso molecular como el fórmico y el acético, aunque en este último caso hay que tener en cuenta la reactividad de los mismos.

-Disolventes *no polares*: poseen estructura de hidrocarburos, sin grupos que confieran una marcada polaridad a la molécula. En su estructura predominan las uniones químicas C-C. Entre éstos, y en orden de polaridad creciente, encontramos al éter de petróleo, tetracloruro de carbono, ciclohexano y benceno.

- Disolventes de *polaridad intermedia*: Son, en general, aquellos disolventes cuya estructura molecular es eléctricamente asimétrica. Es el caso típico de la

molécula de cloroformo, donde la distribución de polaridades creadas por los distintos tipos de uniones (de tipo covalente) crea una zona con densidad de carga negativa (átomos de cloro) y otra con densidad de carga positiva (átomo de hidrógeno) formando un dipolo. Entre este tipo de disolventes se encuentran también ciertos compuestos oxigenados que, al no poseer funciones hidroxilo como los alcoholes, pueden actuar como aceptores pero no como dadores en uniones de tipo puente hidrógeno. Es el caso del éter etílico, la acetona y el acetato de etilo.

### Agotamiento selectivo y sucesivo del material utilizando solventes de diferentes polaridades

El método clásico para obtener distintos constituyentes orgánicos de tejidos vegetales secos (madera, semillas, raíces, hojas) es una extracción continua del material pulverizado en un equipo *Soxhlet* con distintos solventes que permiten extraer las sustancias buscadas con un mayor o menor grado de pureza.

El material vegetal (seleccionado y pulverizado) es agotado en primer lugar con un solvente de tipo no polar o de polaridad intermedia: éter de petróleo, benceno, cloroformo, éter etílico, etc. Luego la muestra es tratada con distintos alcoholes como etanol, metanol (solventes de tipo polar) y finalmente con agua. Los extractos obtenidos se pueden dividir de la siguiente forma:

- A) Extracto etéreo.
- B) Extracto alcohólico.
- C) Extracto acuoso.

En el extracto etéreo se encuentran los compuestos químicos lipofílicos, y en los otros dos extractos, los compuestos hidrofílicos.

- A) El extracto etéreo contiene compuestos liposolubles, tales como:
  - Materia grasa (lípidos)
  - Aceites esenciales

- Esteroles (triterpenos)
- Carotenoides (tetraterpenos)
- Alcaloides (bases)
- Clorofila
- Vitaminas liposolubles

B) En el extracto alcohólico se pueden encontrar:

- Azúcares simples
- Glucósidos triterpénicos
- Compuestos fenólicos (taninos, pigmentos flavonoides)

C) Mediante el agotamiento del material con agua se obtienen compuestos hidrosolubles. Ejemplos:

- Glúcidos simples
- Glucósidos
- Alcaloides (sales)
- Vitaminas hidrosolubles

Generalmente, cuando el agotamiento con alcohol o metanol ha sido total, no es posible identificar los mismos compuestos químicos en el extracto acuoso. Cuando se requiere aislar compuestos hidrosolubles de tejidos de hoja, los lípidos deben ser removidos al principio, lavando el extracto repetidamente con éter de petróleo.

Para identificar los compuestos extraídos, los tres extractos son analizados separadamente a través de una metodología conforme a las características físico-químicas de cada grupo de principios activos.

Los extractos obtenidos pueden ser clarificados por filtración a través de celite con una bomba de vacío y luego concentrados a presión reducida. Esto se lleva a cabo generalmente en un evaporador rotatorio, en el cual se concentran las soluciones hasta lograr una reducción de su volumen, a temperaturas comprendidas entre 30 a 40° C.

Los extractos concentrados deben ser almacenados refrigerados y con el agregado de tolueno para prevenir crecimiento de hongos y evitar así pérdidas y alteración del material.

Las extracciones de compuestos volátiles de las plantas requieren precauciones especiales y procedimientos específicos.

## Métodos de separación e identificación

La química analítica cumple un rol fundamental en el análisis, aislamiento y cuantificación de los diferentes compuestos fitoquímicos, además de hacerlo en aspectos de investigación básica referidos al metabolismo vegetal.

Actualmente se van delimitando nuevos campos de estudio y, sumándose a las disciplinas involucradas con la genómica y la proteómica, se hace referencia también a la *fitómica*, un área que se aboca al análisis del metabolismo primario y secundario en las plantas, incluyendo helechos, musgos, hongos y algas (Stecher *et al.*, 2003).

El desarrollo completo de un determinado método analítico incluye una serie de pasos que involucran el almacenamiento de la muestra, su preparación, la separación y el aislamiento de analitos, su identificación y, finalmente, su cuantificación.

Todos los pasos implican un trabajo detallista y cuidadoso, aunque las instancias de preparación de la muestra y el aislamiento de los analitos suelen mencionarse como etapas críticas.

En la actualidad, la química analítica permite el estudio de componentes fitoquímicos a través de una serie de diversas técnicas de análisis. La Tabla 1 muestra una visión general de las que pueden ser utilizadas en fitómica.

En el presente texto no se abordarán temas específicos sobre fundamentos de las técnicas ni se realizará una descripción de equipos puesto que ello excede los objetivos de esta obra.

Dentro de las técnicas disponibles, los métodos cromatográficos guardan gran relevancia. Las técnicas básicas de separación son: cromatografía sobre papel, cromatografía en capa fina, cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La elección de cada una de ellas depende principalmente de las propiedades de solubilidad y volatilidad de los compuestos a separar.

Cromatografía	Cromatografía en capa fina (TLC)
	Cromatografía gaseosa (GC)
	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
	Cromatografía líquida capilar ( $\mu$ -LC)
Electroforesis	Electroforesis en capa fina (TLE)
	Isotacoforesis (ITP) (electroforesis a velocidad uniforme)
	Electroforesis capilar (CE)
Técnicas espectroscópicas	Espectroscopía UV
	Espectroscopía infrarrojo (IR)
	Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR)
	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)
	Espectroscopía de masas (MS)

**Tabla 1.** *Técnicas analíticas que se utilizan generalmente para el análisis de compuestos químicos vegetales. Adaptado de Stecher et al., 2003*

La cromatografía sobre papel es aplicable a los compuestos hidrosolubles de las plantas, principalmente glúcidos sencillos, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos. La cromatografía en capa fina se utiliza para separar lípidos, esteroides, carotenoides, clorofilas. La cromatografía gaseosa se aplica para aislar compuestos volátiles o que mediante una derivatización dan lugar a compuestos que resultan volátiles bajo las condiciones de corrida, tales como ácidos grasos, mono y sesquiterpenos, entre otros. Muchas veces estas técnicas se utilizan en forma combinada, por ejemplo: cromatografía en capa fina-cromatografía gaseosa, para separar una clase de compuestos en particular de las plantas.

Las técnicas cromatográficas pueden usarse en micro o en macro escala. En el último caso es común la cromatografía en columna.

Una técnica muy común de separación de compuestos en fitoquímica es la electroforesis. En un primer momento esta técnica se aplicó sólo para separar sustancias con carga como aminoácidos, algunos alcaloides, aminas, ácidos orgánicos y proteínas. Otras clases de compuestos neutros (azúcares, fenoles) también pueden ser separados en un campo eléctrico previa conversión de los mismos en complejos metálicos.

## Bibliografía

- Ávalos García, A.; Pérez-Urria Carril, E. (2009). "Metabolismo secundario de plantas". *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145.
- Bandoni, A.; Dellacasa, E.; Ringuelet, J. (2006). "Química y Aplicaciones de los Productos del Bosque", Capítulo III en: Leigue, L. (ed.). *Biomasa Forestal: Agregar valor a los desechos*. CYTED. 1 Disco compacto. Cochabamba, Bolivia.
- Domínguez, Xorge A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
- Harborne, J. (1985). *Introducción a la Bioquímica Ecológica*. Madrid: Alhambra.
- Luckner, M. (1972). *Secondary Metabolism in Plants and Animal*. Londres: Chapman and Hall.
- Macías, F.; Galindo, J. L.; Galindo, J. C. (2007). "Evolution and current status of ecological phytochemistry". *Phytochemistry*, 68, 2917–2936.
- Robinson, T. (1980). *The Organic Constituents of Higher Plants*. Amherst, Massachusetts : Cordus Press.
- Stecher, G.; Huck, C.W.; Stöggel, W.M.; Bonn, G.K. (2003). "Phytoanalysis: a challenge in phytomics". *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1): 1-14.

## CAPÍTULO 2

### COMPUESTOS SECUNDARIOS NITROGENADOS: ALCALOIDES

*Cynthia Patricia Henning*

#### Alcaloides

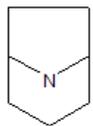
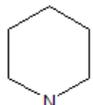
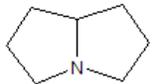
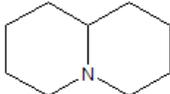
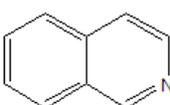
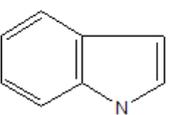
##### **Composición química y propiedades**

Constituyen un grupo de numerosos compuestos secundarios nitrogenados aislados tradicionalmente de plantas vasculares, aunque actualmente se ha reportado también la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en algunos animales, insectos y microorganismos.

Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico. El término alcaloide fue introducido por un farmacéutico alemán, Carl Meissner a principios del siglo XIX, para designar sustancias naturales que reaccionan como los álcalis (del árabe *al qaly*, la sosa y del griego *eidos*, el aspecto). Es difícil definirlos de manera precisa ya que establecer una frontera que los separe de otros metabolitos nitrogenados a veces no es fácil. En un principio se los definió como aquellas sustancias de origen natural, nitrogenadas y de reacción alcalina, derivadas biosintéticamente de aminoácidos, de distribución restringida y de actividad farmacológica significativa; aunque esta definición caracterizaría sólo a los alcaloides verdaderos. En cuanto a sus propiedades, la mayoría son de carácter básico, cristalinos, aunque algunos forman precipitados amorfos y unos pocos son líquidos a temperatura ambiente (como la nicotina, la conina y la esparteína); no tienen olor, son amargos y en general incoloros (aunque también hay excepciones, como la berberina y la sanguinarina). Su peso molecular oscila entre 100 y 900, y su basicidad se

debe a que normalmente el nitrógeno posee un par de electrones no compartidos. Se comportan como auxiliares en el mantenimiento del equilibrio iónico debido a su carácter alcalino y también son absorbentes de rayos UV, por la presencia de núcleos aromáticos en sus estructuras. La mayoría son ópticamente activos (levógiros), por presentar al menos un carbono asimétrico en su estructura. Precipitan de sus soluciones acuosas con sales de metales pesados (mercurio, cadmio, plomo), ácido pícrico y taninos. En base a que la mayoría reaccionan positivamente con este tipo de reactivos, es que se los ha denominado “reactivos generales de alcaloides”.

Los núcleos nitrogenados de los alcaloides cíclicos en general son sencillos, como se muestra en la figura 1:

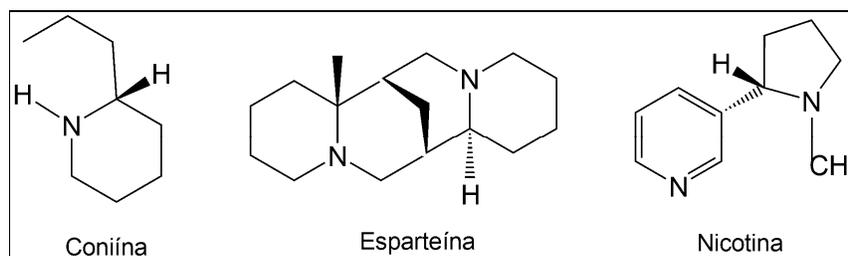
NÚCLEO ALCALOÍDICO	ESTRUCTURA	PRECURSOR BIOSINTÉTICO	EJEMPLO
PIRROLIDINA		ORNITINA	NICOTINA
TROPANO		ORNITINA	ATROPINA COCAÍNA
PIPERIDINA		LISINA	CONIÍNA
PIRROLIZIDINA		ORNITINA	RETRONECINA
QUINOLIZIDINA		LISINA	LUPININA
ISOQUINOLEÍNA		TIROSINA	CODEÍNA MORFINA
INDOL		TRIPTOFANO	PSILOCIBINA RESERPINA ESTRICHINA

**Figura 1.** Estructura de algunos de los núcleos alcaloídicos más sencillos

La característica de basicidad que poseen varía enormemente, dependiendo de la estructura molecular del alcaloide y de la presencia y localización de grupos funcionales. El átomo de nitrógeno hace que los alcaloides puedan protonarse en medio ácido y formar sales; pero si el alcaloide presenta grupos funcionales adyacentes que cedan electrones (por ejemplo grupos alquilo), la disponibilidad de electrones aumenta y el compuesto resulta más básico. Algunos alcaloides son neutros porque en su estructura se presentan grupos funcionales que atraen electrones, haciendo que los del nitrógeno se deslocalicen y no formen sales (por ejemplo, la papaverina, la ricinina y la colchicina). Unos pocos como la morfina, cocaína, pilocarpina y cafeína se disuelven en soluciones alcalinas porque son ligeramente ácidos. Por lo anteriormente expuesto pueden entonces presentarse libres (al estado de bases), como sales o como N-óxidos. Otra propiedad es que la solubilidad del alcaloide base y de sus respectivas sales, en agua y disolventes orgánicos, es opuesta (aunque hay excepciones). Esta última característica es generalmente tomada en cuenta para extraer y purificar a los alcaloides presentes en un material vegetal.

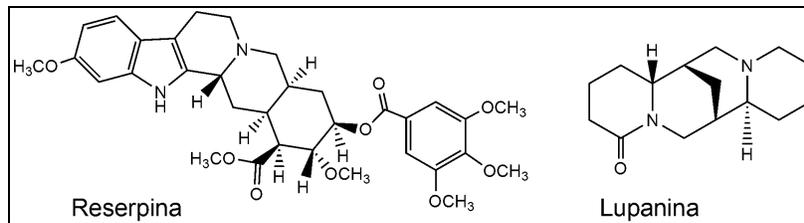
Según la composición elemental pueden clasificarse en ternarios o cuaternarios:

- los ternarios o no oxigenados por lo general se presentan como líquidos oleosos, volátiles y arrastrables por vapor de agua, características que se tienen en cuenta para su determinación cuantitativa a través de una destilación (ver: Métodos de extracción en este Capítulo). En la figura 2 se puede verificar la ausencia de átomos de oxígeno en las estructuras de laconiina en la cicuta (*Conium maculatum*), la esparteína en retama (*Spartium junceum*) y la nicotina en tabaco (*Nicotiana tabacum*).



**Figura 2.** Estructura de alcaloides ternarios, no oxigenados (C, H y N)

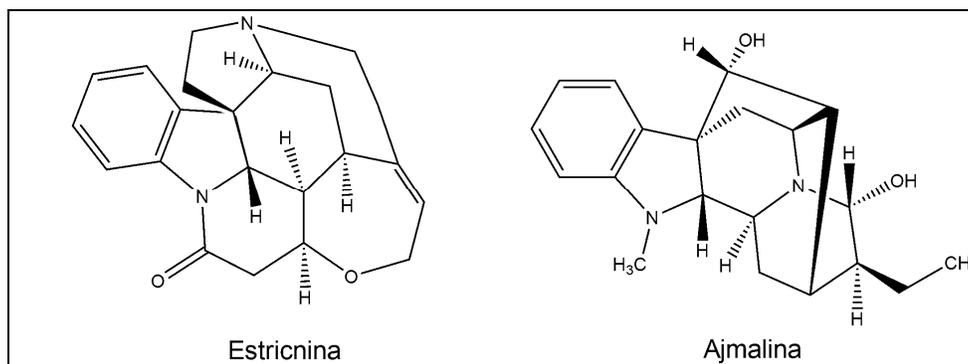
En cambio los oxigenados o cuaternarios (formados por C, H, N y O) son sólidos a temperatura ambiente, fijos y cristalizables. A este grupo corresponden la mayoría de los alcaloides. En la figura 3 se representan: la reserpina en *Rawolfia spp* y lupanina en diferentes especies de lupines (*Lupinus spp*).



**Figura 3.** Alcaloides cuaternarios: reserpina y lupanina

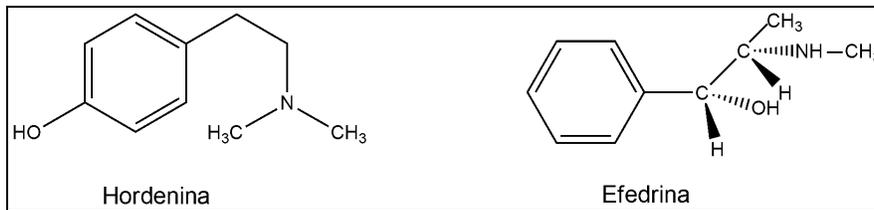
De acuerdo con la estructura molecular y su ruta biosintética, los alcaloides se dividen en tres grupos:

1) verdaderos o alcaloides propiamente dichos, que constituyen el grupo principal. Cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloides: tienen siempre un nitrógeno intracíclico (Figura 4), son de carácter básico y se presentan en la naturaleza normalmente formando sales con el ácido acético, oxálico, láctico, málico, tartárico y cítrico y tal vez lo que más los diferencia de los demás grupos es que se forman a partir de un aminoácido.



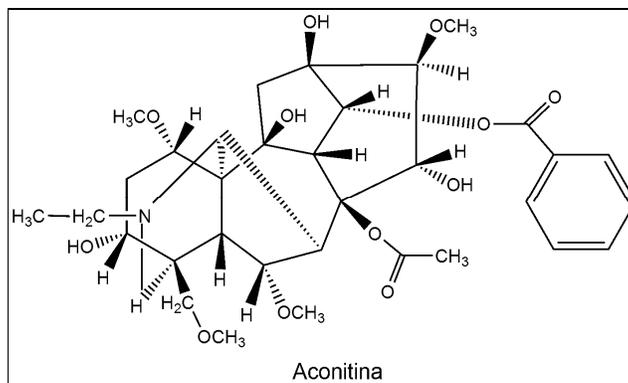
**Figura 4.** Estructura de algunos alcaloides verdaderos

2) protoalcaloides: pueden ser considerados aminas simples, poseen reacción básica y se forman *in vivo* a partir de aminoácidos pero, a diferencia de los alcaloides verdaderos, poseen el nitrógeno en una cadena lateral de la molécula (extracíclico), es decir que no está formando parte del núcleo heterocíclico; por ejemplo la muscarina (en setas del hongo *Amanita muscaria*), la mescalina (en cactus), la efedrina (en *Ephedra spp*) y la hordenina presente en cebada (*Hordeum vulgare*) en germinación (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura de algunos protoalcaloides

3) pseudoalcaloides: poseen normalmente todas las características de los alcaloides verdaderos pero no se forman a partir de aminoácidos. En la mayoría de los casos conocidos se trata de isoprenoides, de allí que se los nombre como alcaloides terpénicos; por ejemplo los alcaloides monoterpénicos, como la  $\beta$ -esquitantina en *Skytanthus acutus* (cuerno de cabra); alcaloides diterpénicos, como la aconitina (Figura 6) en tubérculos de *Aconitum napellus* (acónito); triterpenoides, como la tomatidina en *Solanaceae* y sesquiterpénicos en nenúfares (*Nymphaeaceae*). Igualmente se conocen sustancias nitrogenadas heterocíclicas que provienen del metabolismo del acetato, como la conina, principio tóxico de la cicuta.



**Figura 6.** Pseudoalcaloide aconitina (en los géneros *Aconitum* y *Delphinium*)

Hasta el momento se han aislado alrededor de 15000 alcaloides de las plantas (Thaiz y Zeiger, 2010: 381) y quedan aún muchos por descubrir y aislar, para completar el “screening” o cribado alcaloídico, y si se considera que se ha examinado menos del 20% de las especies de plantas superiores del planeta, es evidente que queda aún un amplio campo para su investigación. Por su importancia farmacológica, medicinal y agroquímica existe un incentivo para continuar con el estudio químico-biológico de muchos alcaloides. Es uno de los grupos de compuestos más importantes dentro de las sustancias de origen natural con interés terapéutico. Presentan notables propiedades fisiológicas y toxicológicas que se ejercen fundamentalmente sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), con predominio en alguno de sus niveles. Por estas razones pueden ser usados como fármacos. El uso prolongado de alguno de estos compuestos produce en el hombre acostumbamiento, que constituyen verdaderas toxicomanías, con dependencia física y psíquica y un aumento de la tolerancia.

Con referencia a la nomenclatura y debido a que a veces las estructuras son complicadas, sus nombres suelen estar relacionados con el origen botánico, como por ejemplo la atropina por el género *Atropa* o por la especie en la que se encuentra, como en el caso de la cocaína en el *Erythroxylon coca*. Otras veces se los relaciona por el nombre de la droga (ergotamina del ergot), por su acción farmacológica (emetina por los efectos eméticos) o en algunos casos el nombre de su descubridor. En el idioma español se ha aceptado que los alcaloides tengan una terminación “ina” (Valencia Ortiz, 1995: 153). Algunos alcaloides poseen derivados que reciben el nombre de alcaloides secundarios, y para diferenciarlos reciben nombres diferentes; por ejemplo el alcaloide principal de la corteza de quina, es la quinina y un alcaloide derivado secundario recibe el nombre de hidroxiquinina; la peletierina, posee dos alcaloides secundarios: la isopeletierina y la metilpeletierina. Cuando no se conoce bien la relación entre los primarios y los secundarios se suele agregar la sílaba “ni” o “di”, por ejemplo la gelsemina y la gelseminina; la pilocarpina y la pilocarpidina.

## Rutas biosintéticas

Debido a que muchos alcaloides tienen fórmulas químicas complejas y múltiples carbonos asimétricos, tanto la elucidación de sus estructuras químicas como el estudio de sus vías de biosíntesis han sido relativamente recientes y difíciles de resolver, y en algunos casos permanecen aún incompletas. Casi todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de la nicotina y la morfina han sido identificadas, pero luego de alrededor de 190 años después del aislamiento de esta última.

Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico, y otros. El heterociclo requiere de procesos inter o intramoleculares (Bruneton, 2001: 791) pudiendo participar una única molécula de aminoácido (como en el caso de la higrina, de la peletearina), dos moléculas del mismo aminoácido (para la formación de los alcaloides quinolizidínicos y bencilisoquinoleínas), dos aminoácidos diferentes (para el caso de la tubulosina), o varias moléculas del mismo aminoácido como en el caso de la esparteína.

En general la estructura carbonada del aminoácido es mantenida intacta en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono del ácido carboxílico sufre descarboxilación. En algunos casos la molécula requiere carbonos suplementarios, y éstos pueden ser proporcionados por grupos acetatos (en el caso de los tropanos), dimetilalilpirofosfatos (en las ergolinas y furoquinoleínas), o por el secologanósido en el caso específico de los alcaloides indolmonoterpénicos; es decir que, el resto de la molécula deriva de otras vías (la vía del acetato, la vía del ácido shikímico o la vía del ácido mevalónico). Las variaciones estructurales encontradas en los diferentes alcaloides, que se han ido sumando al *screening* o mapa alcaloídico, surgen de reacciones de oxidación, esterificación, acoplamientos, etc.

## Distribución y función biológica

Los alcaloides en vegetales están presentes en Angiospermas especialmente en Dicotiledóneas herbáceas y son más escasos en Monocotiledóneas y Gimnospermas. Algunas de las especies que tienen alcaloides pertenecen a las familias *Rubiaceae* (quina, café), *Papaveraceae* (adormidera, amapola), *Solanaceae* (tabaco, belladona, papa), *Lauraceae*, *Papilionaceae* (retama), *Ranunculaceae* (acónitos), *Eritroxilaceae*, *Asclepiadaceae*, *Berberidaceae*, *Apocinaceae*, entre otras. Se dice que la distribución de los alcaloides tendría cierta relación con las estructuras moleculares y las rutas biosintéticas: cuanto más simple es la molécula del alcaloide, y por lo tanto su biosíntesis, más extensiva es su distribución entre especies no relacionadas filogenéticamente (por ejemplo, la nicotina de estructura molecular sencilla, está ampliamente distribuida); mientras que los de estructura molecular más compleja actuarían como marcadores quimiotaxonómicos en ciertas especies, tal el caso de la morfina que se encuentra sólo en especies de *Papaver*, estricnina en *Strychnos nux-vomica* y otros muchos ejemplos.

Lo más frecuente es que en una misma especie se encuentren presentes varios alcaloides estrechamente vinculados químicamente (nornicotina, nicotina, anabasina y otros, en tabaco; morfina, codeína, papaverina y muchos más, en opio; y más de 100 estructuras alcaloídicas en la vinca). Se los ha encontrado en todos los órganos de la planta, mayoritariamente en hojas como la cocaína, nicotina y la pilocarpina, en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniína), en semillas (cafeína, piperina, teobromina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina), en la raíz (emetina y ceferina), rizomas de *Hydrastis*, etc.

La síntesis se lleva a cabo en determinados órganos de las plantas, por ejemplo: la morfina en el látex, la hiosciamina en la raíz, la cocaína en hojas; y algunos como la nicotina, se forman en la raíz y se translocan y almacenan en otras partes de la planta (en las hojas en el caso del tabaco). Su localización histológica por lo general es en tejidos periféricos: tegumentos de semillas, capas externas de frutos, cortezas de tallos y raíces, epidermis y capas

subepidérmicas de hojas etc.; y a nivel celular en las vacuolas celulares, en forma de sales (citratos, malatos, tartratos, benzoatos, etc.) o combinados con taninos, acumulándose en células epidérmicas, tejidos de crecimiento activo, vainas vasculares y vasos laticíferos. Algunas plantas de la familia *Solanaceae*, como papas, berenjenas, tomates, etc., contienen una serie de glicoalcaloides, entre los que se pueden citar como más importantes a la solanina, tomatina y la chaconina, que comparten el mismo núcleo esteroidal o aglicón triterpenoide: la solanidina, unido de diferente manera a moléculas de galactosa, ramnosa y glucosa. En la papa (*Solanum tuberosum*) este alcaloide se encuentra sobre todo en plantas inmaduras y en los nódulos verdosos de los tubérculos en germinación y parece tener una función protectora ya que aumenta su concentración frente a infecciones parasitarias o a la exposición a la luz. El consumo de los tubérculos en estas condiciones no produce envenenamiento salvo que la ingesta sea en grandes cantidades. Una forma de eliminar la solanina es cocinarla en agua con vinagre que después se descarta. Los síntomas de la intoxicación son: ardor de garganta, dolor de cabeza, abatimiento, vómitos, dolor de vientre y diarrea. Actúa como inhibidor de la colinesterasa y como irritante de las mucosas, causa inflamación de los túbulos renales y se sospecha que tiene acción teratogénica y agente causal de la espina bífida. En casos graves puede presentarse perturbación mental (a causa del edema cerebral), coma, calambres y también la muerte (especialmente en niños).

Los alcaloides han sido encontrados también en organismos animales pero sin que se haya definido aún, si la biosíntesis *de novo* ocurre en cada uno de ellos. Muchas mariposas y polillas toman los alcaloides de plantas que no son su fuente alimenticia, para convertirlos en feromonas (atrayentes) o sustancias de defensa frente a predadores. Otro caso muy particular es la presencia de morfina en glándulas secretoras y en la piel del sapo *Bufo marinus* (Croteau *et al.*, 2000: 1271). Se han encontrado alcaloides en algunos invertebrados marinos como la manzamina aislada de la esponja marina *Xestospongia ashmorica*. Excepcionalmente se los ha encontrado también en bacterias como la piocianina (en *Pseudomonas aeruginosa*) y en hongos como la psilocibina

(de hongos alucinógenos mejicanos), la nomina (del *Aspergillus nomius*) y la ergotamina (del hongo *Claviceps purpurea*).

La función de los alcaloides en las plantas no es aún clara, pero existen algunas sugerencias sobre el "rol" que juegan estas sustancias en los vegetales. La mayoría de ellos presentan acciones fisiológicas marcadas sobre el organismo animal, o bien son tóxicos para los insectos, como por ejemplo la cafeína, la solanina y el bien conocido efecto insecticida de la nicotina (Schmeltz, 1971: 45); es decir que estarían vinculados con funciones de defensa (Villarreal Villarreal *et al.*, 2009: 152) no sólo por su toxicidad sino también por su sabor amargo. Han sido citados algunos alcaloides con actividad antiviral (esparteína), bactericidas (lupinina, lupanina, angustifolina), nematocidas (anagrina, matrina y citisina), atrayentes o repelentes (Özçelik *et al.*, 2011: 396).

Debido a que, en su mayoría, los alcaloides están asociados con ácidos orgánicos que les facilita el transporte en la planta, pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo. Se los ha considerado también como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, pero resulta poco creíble que algunas plantas inviertan tanto nitrógeno para su síntesis sin un fin que las beneficie, como asociarlos a la protección del vegetal frente a microorganismos, virus, ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros. Algunos autores han demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina (diamina) se incrementan notablemente cuando las plantas se encuentran en suelos deficientes de potasio (Harborne, 1993: 82) y durante la germinación de semillas (en la cebada por ejemplo), es decir que podrían cumplir funciones como reguladores del crecimiento. Se ha sugerido que algunos alcaloides participan en el crecimiento del vegetal porque se sintetiza mayor cantidad en las etapas del metabolismo más intenso (equiparables con la hormona animal adrenalina); mientras que otros son sintetizados para influir positiva o negativamente sobre otras especies en determinado hábitat, es decir que serían sustancias alelopáticas. Ejemplos de probada actividad alelopática son: la narcotina, escopolamina, la atropina, cocaína, estroscina, entre otros. La

nicotina tiene propiedades inhibitorias de la síntesis de clorofila (Leicach, 2006: 45) y la cafeína mata ciertas malezas sin afectar algunas especies cultivadas como, por ejemplo, el poroto. La cinchonina, fisostigmina, quinina, cinchonidina, estriquina son reconocidos inhibidores de la germinación por su poder quelante y citotóxico. Los alcaloides purínicos del café (cafeína, teobromina y teofilina) se comportarían también como fitotoxinas (Leicach, 2006: 46). La gramina, es un alcaloide indólico que se exuda por las raíces de la cebada y se asocia con la resistencia al ataque de áfidos y a la inhibición del crecimiento de algunas malezas (como la *Stellaria spp.*) y de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Hong *et al.*, 2009: 262), siendo un importante aleloquímico natural para el tratamiento de aguas.

La actividad biológica de los alcaloides en el organismo animal es muy diversa. Algunos poseen acciones fisiológicas características, sean tóxicas o curativas para el ser humano, y por ello este grupo de compuestos ha atraído tanto la atención de los investigadores desde los comienzos de la química orgánica. En los seres humanos pueden tener dramática acción fisiológica y neurológica actuando generalmente sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otros al sistema nervioso simpático. Por ejemplo la cafeína y la nicotina excitan el SNC, la cocaína tiene acción euforizante porque actúa impidiendo la recaptación de dopamina de la terminal sináptica (se produce un mayor efecto de los receptores dopaminérgicos); pero también existen alcaloides con efectos depresores del mismo como la morfina. Otros alcaloides presentan actividad sobre el sistema nervioso autónomo, como por ejemplo la pilocarpina con propiedades parasimpaticolíticas; la atropina aislada de las hojas de belladona con actividad anticolinérgica; la efedrina aislada de las sumidades de efedra, útil como vasoconstrictor en casos de asma por sus propiedades simpaticomiméticas. Algunos alcaloides, como por ejemplo la cocaína aislada de las hojas de coca, presentan actividad anestésica local (hoy prácticamente sin utilidad en terapéutica, pero sí un extenso comercio como droga de abuso).

Farmacológicamente interesan por su acción toxicológica (efectos hepatotóxicos y cancerígenos, efectos alucinógenos, etc.), por actuar como

antifibrilantes, bloqueantes espasmolíticos, neuromusculares, antimaláricos, antineoplásicos, etc. La quinidina aislada de las cortezas de quina, por ejemplo, actúa sobre el corazón (con propiedades antiarrítmicas); la colchicina, en el azafrán silvestre (*Colchicum autumnale*) presenta actividad en el ataque agudo de gota (enfermedad inflamatoria articular en relación con el aumento de los niveles sanguíneos de ácido úrico); alcaloides como vincristina o vinblastina, con actividad antitumoral y que han resultado de gran eficacia en el tratamiento de determinados tipos de cáncer; etc. Por otra parte, se encuentran en algunas especies vegetales alcaloides especialmente tóxicos y que es preciso conocer como la aconitina de la raíz de acónito, los alcaloides piperidínicos del género *Senecio*, y otros, responsables de diferentes sintomatologías. Carod-Artal (2003: 860) cita varias especies con efecto neurológico y neurotóxico debido a la presencia de estos alcaloides tóxicos; como la cicuta (*Conium maculatum*) que contiene una toxina alifática llamada cicutoxina y al menos ocho alcaloides piperidínicos tóxicos y teratogénicos, entre los que se encuentran laconiina o cicutina, la  $\gamma$ -coniceína y la N-metilconiina, que actúan sobre el SNC, con efectos neurotóxicos serios que pueden llegar a provocar la muerte por parálisis respiratoria. Otros efectos observados son necrosis tubular aguda e insuficiencia renal y malformaciones en animales recién nacidos (por ingesta de cicuta de animales gestantes que además muestran debilidad neuromuscular y ataxia). Estos síntomas teratogénicos se han observado por ingestión de alcaloides piperidínicos presentes en *Nicotiana spp.* (*N. tabacum* y *N. glauca*) que en rumiantes provoca además síntomas cardíacos (fibrilación ventricular) y neurológicos con parálisis muscular y respiratoria (Panter *et al.*, 1999: 117); y también en ganado gestante que pasta lupines (*Lupinus spp.*) por contener alcaloides piperidínicos y quinolizidínicos (Molyneux y Panter, 2009: 143).

Dada la actividad y/o toxicidad tan marcada en muchos de estos compuestos, en bastantes ocasiones no se emplean las plantas que contienen alcaloides sino los alcaloides aislados de las mismas, bien controlados y dosificados.

Los alcaloides son compuestos que aún hoy siguen siendo estudiados no sólo para descubrir nuevas estructuras sino sus modos de acción. Por ejemplo, en la 4.<sup>a</sup> reunión del CCCF (Codex Alimentarius Committee on Contaminants in

Foods) llevada a cabo en marzo de 2011 (FAO, 2011) se decidió establecer un grupo de trabajo por medios electrónicos bajo la dirección de los Países Bajos para desarrollar un Documento de debate sobre los alcaloides pirrolizidínicos, a fin de recopilar información sobre la química de estos alcaloides, su toxicidad, los métodos de análisis disponibles, presencia en las plantas, alimentos, piensos, y otros datos relevantes.

### **Clasificación de alcaloides**

Para su mejor estudio se suele clasificar a los alcaloides en grupos y esta clasificación puede realizarse desde distintos puntos de vista: teniendo en cuenta su estructura química, sus rutas biosintéticas, sus propiedades farmacológicas, su distribución botánica, etc. Actualmente parece ser la clasificación biogenética la de elección, es decir, la que tiene en cuenta el origen biosintético de estos compuestos en los vegetales. Puesto que una gran parte de los alcaloides deriva de unos pocos aminoácidos, ya sea de cadena abierta o aromática, la clasificación más aceptada es la siguiente:

- I. Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos ornitina y lisina.
- II. Alcaloides derivados del ácido nicotínico.
- III. Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina: feniletilamínicos e isoquinoleínicos.
- IV. Alcaloides derivados del triptófano: indolmonoterpénicos, ergolínicos, etc.
- V. Alcaloides derivados del ácido antranílico: quinoleínas, quinazolininas y otros.
- VI. Alcaloides derivados de la histidina: imidazólicos.
- VII. Alcaloides derivados del metabolismo terpénico: diterpénicos y esteroídicos.
- VIII. Otros alcaloides: bases xánticas.

A continuación se describirán algunas características de cada grupo y subgrupos y se citarán además los ejemplos de mayor relevancia:

## I. Alcaloides derivados de aminoácidos ornitina y lisina

Este grupo abarca a los alcaloides tropánicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos y los piperidínicos.

▪ Alcaloides tropánicos: Son alcaloides presentes en familias como las *Solanaceae* (géneros: *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*), *Proteaceae*, *Eritroxilaceae* entre otras y se caracterizan por poseer una estructura bicíclica hidroxilada, que se origina por la condensación de un anillo pirrolidínico y otro piperidínico, compartiendo dos átomos de carbono. El anillo piperidínico presenta una conformación en forma de silla y una disposición espacial del grupo alcoholico situado sobre el C 3 que determina la existencia de dos tipos de estructuras tropánicas: 3- $\alpha$ -hidroxitropano (hiosciamina, escopolamina, atropina) y 3- $\beta$ -hidroxitropano (cocaína, tropococaína) como se detalla en la figura 7. Los alcaloides derivados del 3- $\alpha$ -tropanol son especialmente abundantes en la familia *Solanaceae*: belladona, estramonio, beleño; los derivados del 3- $\beta$ -tropanol se encuentran las hojas de coca (*Erythroxylum coca*).

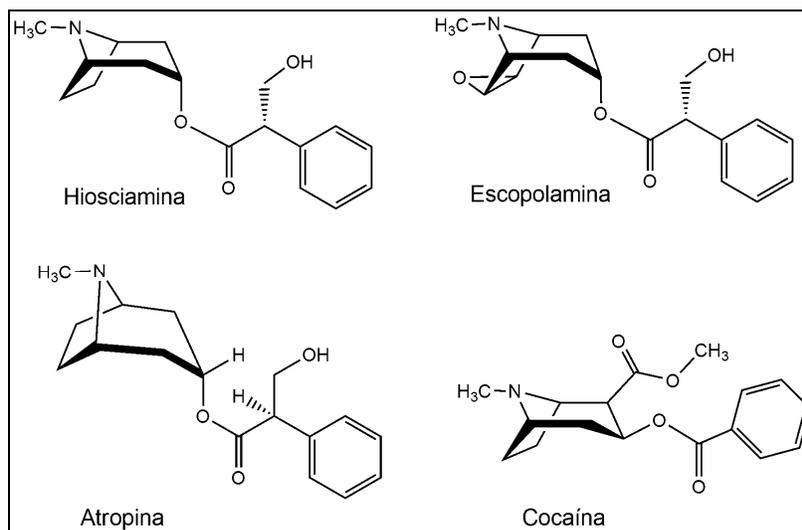
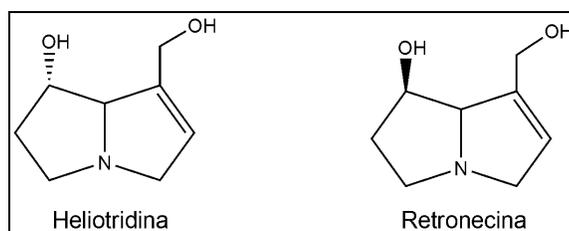


Figura 7. Alcaloides tropánicos

▪ Alcaloides pirrolizidínicos: la gran mayoría son ésteres formados entre aminoalcoholes de tipo pirrolizidina llamados necinas y ácidos alifáticos

monocarboxílicos. La estructura de estos alcaloides está basada en dos anillos de 5 átomos unidos, que comparten un átomo de nitrógeno (Figura 1). En la naturaleza por lo general los anillos tienen, como sustituyentes, grupos hidroximetilénos en la posición C-1 y grupos hidroxilos en C-7; esta estructura se conoce como necina. Son sustancias de alta diversidad estructural (se conocen aproximadamente unas 700), presentes en más de 200 plantas estudiadas de algunas familias como *Borraginaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* y *Apocynaceae*. En particular los géneros *Crotalaria*, *Heliotropium* y *Senecio* han sido causa de numerosos casos de envenenamiento de ganado, con importantes pérdidas económicas. Ejemplos típicos: la heliotridina y la retronecina (Figura 8), la senecionina, entre otros. Actúan como hepatotoxinas (por acumulación) y los síntomas de intoxicación en el hombre son afecciones crónicas tales como pérdida de apetito, dolores y distensión abdominal, ascitis o acumulación de líquidos en el abdomen, cirrosis hepática, etc. Son mutagénicos y carcinogénicos. También han sido causa de muerte en humanos, especialmente en países poco desarrollados.

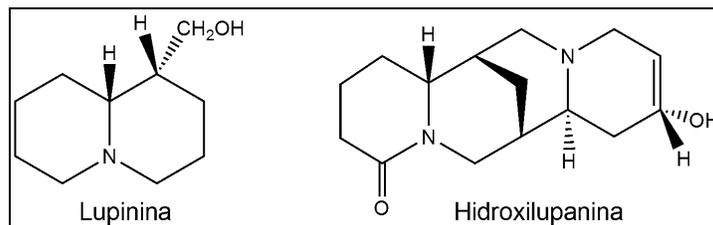


**Figura 8.** Alcaloides pirrolizidínicos

Carecen de aplicación terapéutica pero jugarían un papel defensivo en la planta. Tienen probado efecto antifúngico, como la acetil-traquelantamina que tiene un moderado comportamiento antifúngico frente a hongos patógenos de tipo *Fusarium*, y también actividad insecticida y antialimentario (como la spartioidina que repele en forma efectiva al lepidóptero *Spodoptera littoralis* y la supunina extraído del *Heliotropium sinuatum* (*Borraginaceae*) que afecta al coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (Villarreal-Villarreal, 2009:155)

- Alcaloides quinolizidínicos: derivan de la lisina y poseen en su estructura una o dos quinolizidinas (estructura heterocíclica nitrogenada bicíclica) por lo que se diferencian de otras estructuras alcaloídicas en las que coexiste la

quinolizidina unida a otra estructura nitrogenada diferente. Son especialmente abundantes en la familia *Fabaceae*, aunque también se han identificado en las familias *Chenopodiaceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae*, *Berberidaceae* y *Rubiaceae*. Dentro de este grupo se puede citar algunos que causan hepatotoxicidad y otros con actividad terapéutica, como la esparteína (Figura 2), extraída de la retama, que se usaba como medicamento tónico del corazón. Han sido también estudiados los alcaloides presentes en semillas, vainas y raíces del género *Lupinus spp.* Los lupinos amargos causan toxicidad por la presencia de lupanina (Figura 3), lupinina e hidroxilupanina (Figura 9), de acción excitatoria sobre el SNC y depresora de los centros respiratorios y vasomotores, observado especialmente en ovejas. También se han reportado casos de la “enfermedad del ternero torcido” en ganado vacuno por la presencia de anagirina, responsable de los efectos teratogénicos (especialmente en América del Norte).

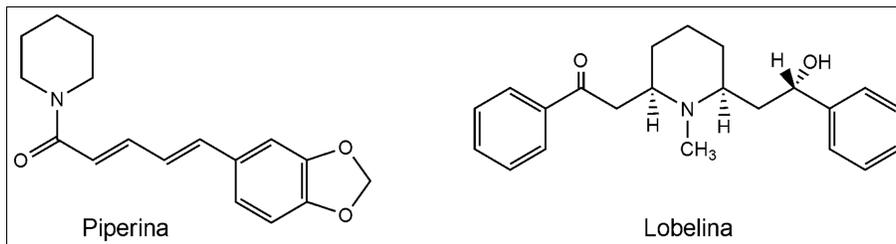


**Figura 9.** Alcaloides quinolizidínicos

Para uso medicinal los alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina, citisina, etc.) se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales.

- Alcaloides piperidínicos: Este grupo de alcaloides está constituido por el núcleo de la piperidina, sustituido por una cadena alifática, dependiendo de cada alcaloide. Un ejemplo de este grupo corresponde a la coniína (Figura 2) que se encuentra en la cicuta, que actúa como una neurotoxina que bloquea el sistema nervioso periférico (es tóxico para humanos y toda clase de ganado, menos de 0,2 g son fatales para humanos, con muerte causada por parálisis respiratoria). En *Punica granatum* (*Punicaceae*) se encuentra la peletierina entre un 0,5 y 0,7% que se extrae con fines antihelmínticos (tenífugo),

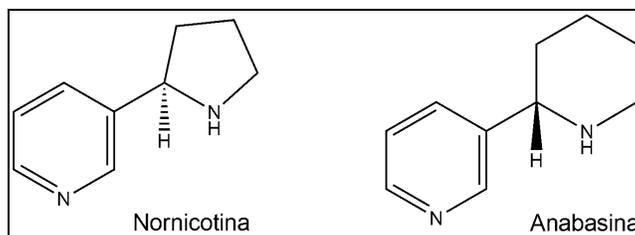
actualmente usada sólo en medicina veterinaria. Otros ejemplos que se pueden citar son la piperina en pimienta *Piper nigrum* (Piperaceae) que es depresora del SNC y la lobelina (Figura 10) extraída de *Lobelia inflata*, otro alcaloide piperidínico que se ha usado como sustitutivo de la nicotina en tratamientos para abandonar la adicción al tabaco y se ha aplicado también en tratamientos para la adicción o abuso de otras drogas, como la anfetamina, la cocaína o el alcohol (Farook *et al.*, 2009: 504).



**Figura 10.** Alcaloides piperidínicos

## II. Alcaloides derivados del ácido nicotínico

El ácido nicotínico, que se biosintetiza a partir del ácido aspártico por condensación con el gliceraldehído-fosfato (vía ácido quinolínico), es el precursor de los denominados alcaloides piridínicos. Son químicamente similares a los piperidínicos, excepto que su núcleo se encuentra insaturado. Ejemplos: la nicotina (Figura 2), la nornicotina (Figura 11), anatabina, ricinina, dioscorina, anabasina, miosmina, nicotirina, etc. En el tabaco (*Nicotiana tabacum*), los alcaloides se encuentran mayormente en las hojas, en cantidades variables dependiendo del modo de cultivo y de la variedad (entre un 2 a 10%). La nicotina producida por síntesis, tiene un alto grado de toxicidad, pudiendo ocasionar la muerte por parálisis cardíaca cuando se ingiere pura. La anabasina (Figura 11), de estructura similar a la de la nicotina, es un alcaloide que se encuentra en *Nicotiana glauca*. Su uso principal (histórico) fue como insecticida.



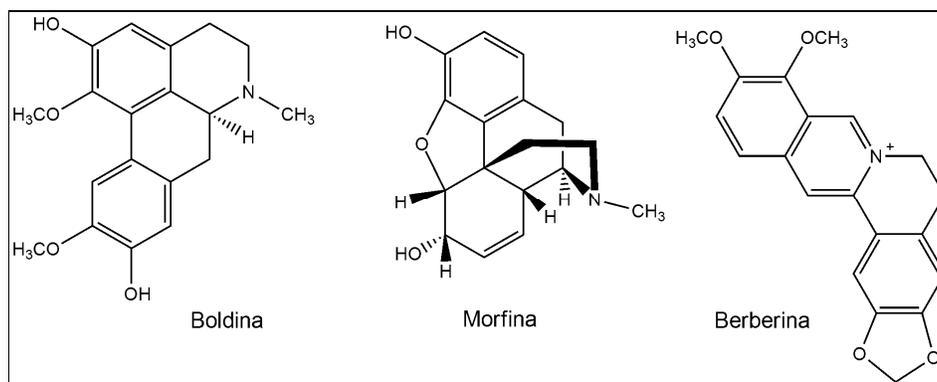
**Figura 11.** Alcaloides piridínicos

### III. Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina

Principalmente forman este grupo los alcaloides isoquinoleínicos, derivados químicamente de la isoquinoleína (1,2,3,4- tetrahidroisoquinoleínicos). Su biosíntesis tiene lugar cuando el aminoácido aromático se descarboxila, y se le une generalmente otro aminoácido desaminado (cetoácido o aldehído) o en contadas ocasiones, una unidad isoprénica. Los más importantes son los alcaloides bencil-isoquinoleínicos.

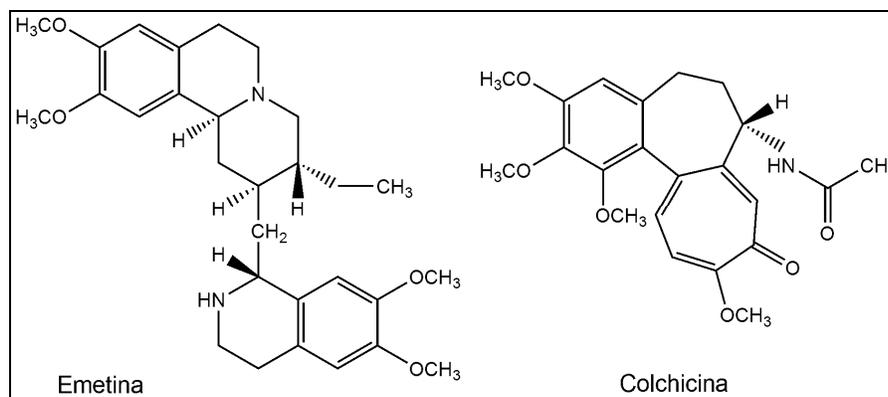
Según su formación en el vegetal y su estructura química podemos subdividirlos en varios grupos, citando entre los más interesantes:

- Bencil-isoquinoleínicos: la papaverina (Fig. 4), alcaloide aislado de las adormideras (*Papaver somniferum*) dotado de propiedades espasmolíticas, y la berberina (*Berberis vulgaris*) cuya estructura se muestra en la figura 12.
- Aporfínicos: Ejemplo: la boldina (Figura 12) alcaloide procedente del boldo (*Peumus boldus*) con efecto colagogo y colerético.



**Figura 12.** Alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos: fenilalanina y tirosina

- Morfinanos: son específicos del género *Papaver*. Por ejemplo: la tebaína, la codeína, la morfina (Figura 12), obtenida a partir del opio de las cápsulas de adormidera es considerado el analgésico por excelencia pero inductor de dependencia física y psíquica.
- Bisbencilisoquinoleínicos: dímeros como la tubocurarina y otros alcaloides de los curares o extractos complejos constituidos por especies vegetales diversas y de diferentes actividades terapéuticas. Se utilizan como pre-anestésicos y relajantes musculares.
- Fenetilisoquinoleínicos: Este tipo de alcaloides es poco común en la naturaleza; se han encontrado en especies de la familia *Liliaceae*, en las que el principal alcaloide es la colchicina (Figura 13) aislado de *Colchicum autumnale* usado en el tratamiento de la gota, tiene acción anti-inflamatoria y es un muy buen analgésico natural.
- Alcaloides de las *Amarilidaceae*: sólo existen en esta familia botánica. Por ejemplo en los narcisos, junquillos, ubicados en bulbos sobre todo, aunque pueden encontrarse en partes aéreas. No se utilizan con fines terapéuticos.
- Isoquinolein-monoterpénicos: son los alcaloides que incorporan una unidad de secologanósido (monoterpenos) en su ruta biosintética. Son los alcaloides de las *Rubiaceae*. Ejemplo: los alcaloides de las ipecacuanas (género *Cephaelis spp.*) como la cefelina y emetina (cefelina metil éster) (Figura 13), que poseen propiedades eméticas y antidisentéricas.

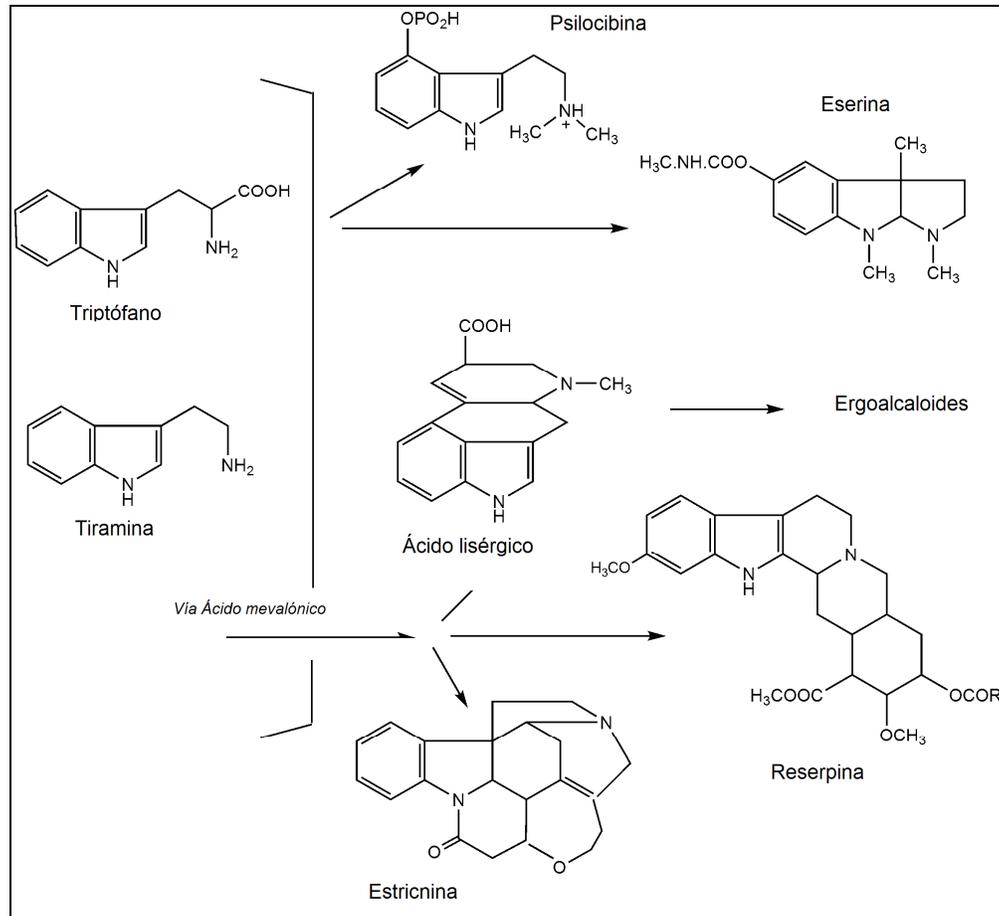


**Figura 13.** Otros alcaloides derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina

Es un grupo muy amplio de gran interés por su actividad farmacológica. Algunos autores incluyen además en este grupo a los alcaloides feniletilamínicos, cuyo nitrógeno no forma parte de un heterociclo y son considerados protoalcaloides, pudiendo citar a la efedrina (Figura 5), extraída de sumidades de la efedra y a la mescalina (Capítulo 3: Figura 2), presente en el peyote (*Lophophora willamsii*), con propiedades alucinógenas; considerados también ambos compuestos como aminas aromáticas.

#### IV. Alcaloides derivados del triptófano

Es un grupo muy numeroso de alcaloides (tal vez el más amplio de todos) que fue estudiado con detenimiento, a partir del aislamiento de la reserpina extraída de las raíces de la rawolfia (*Rauwolfia reserpina*, de la familia *Apocinaceae*) (Figura 3), por sus propiedades antihipertensivas y su poder tranquilizante. Años más tarde, el interés terapéutico de estas estructuras aumentó con el descubrimiento de las propiedades antitumorales de los alcaloides de tipo bisindólico (como la vinblastina) de la vinca (*Catharanthus roseus*). El aminoácido L-triptófano contiene el grupo indólico y es el precursor de estos alcaloides; aunque proceden en realidad de la triptamina, producto de la descarboxilación del triptófano, que se une en casi todos los casos a otras unidades, como son las unidades de mevalonato, acetato, de un aldehído monoterpénico (secologanósido) y otros compuestos. Es decir que tienen un origen biosintético mixto. A modo de ejemplo se esquematiza la ruta de síntesis a partir del triptófano en la figura 14:

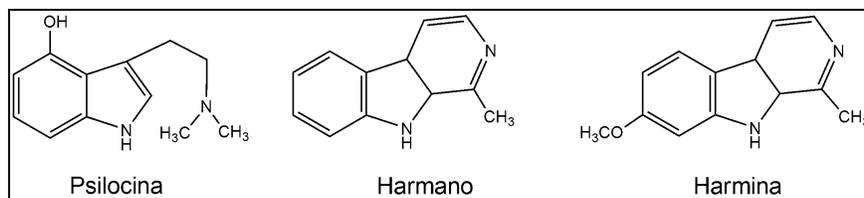


**Figura 14.** Ruta de síntesis de alcaloides derivados del triptófano. Fuente: Trease y Evans 1986: 621, modificado

Se los puede clasificar por su estructura en subgrupos:

### 1) Aminas simples y carbolinas:

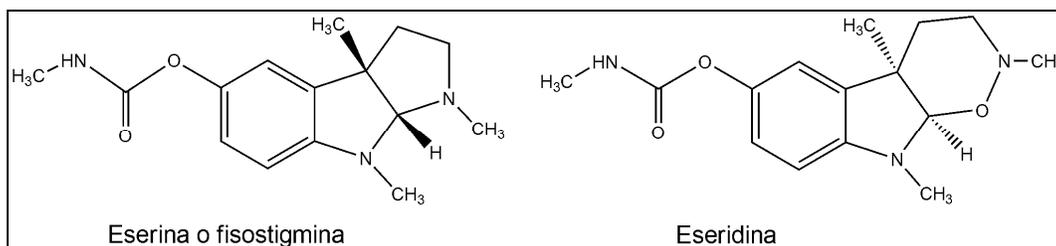
Son derivados de la triptamina que poseen propiedades alucinógenas como la psicocina y psicocibina presentes en el peyote y la gramínea de poco interés farmacológico pero sustancia de defensa en varias plantas (ver: Aminas vegetales en Capítulo 3). Las carbolinas se forman por condensación de un aldehído o cetoácido con la triptamina, por ejemplo el harmano y harmina, y otros en *Passiflora incarnata* (Figura 15).



**Figura 15.** Estructura de algunas aminas simples y carbolinas

2) Indolinas o alcaloides procedentes de la ciclación de la triptamina:

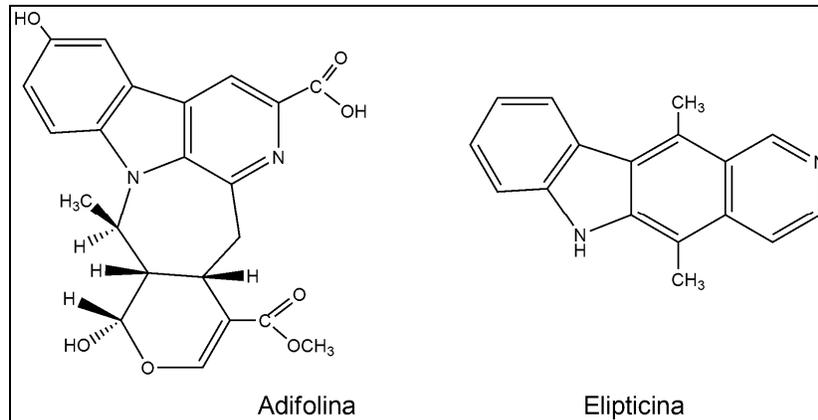
Dentro de este grupo podemos encontrar a la eserina o fisostigmina y la eseridina del Haba del Calabar o nuez de Eseré (*Physostigma venenosum*), alcaloide inhibidor de la enzima colinesterasa (Figura 16).



**Figura 16.** Alcaloides derivados de la triptamina: indolinas

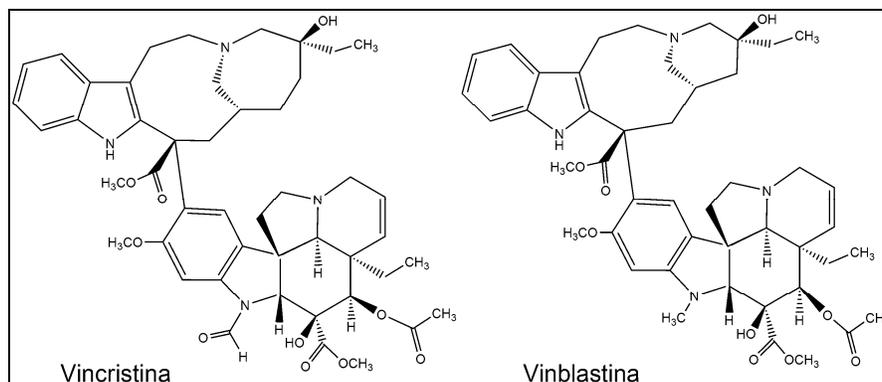
3) Alcaloides indol-monoterpénicos:

Estos alcaloides constituyen un grupo muy amplio, aproximadamente 2.000 compuestos diferentes, restringidos a un pequeño número de familias, entre ellas: *Loganiaceae*, *Rubiaceae* y *Apocynaceae*, siendo esta última la más importante en cuanto a alcaloides aislados. Se caracterizan por tener un único precursor común: la strictosidina. La variabilidad estructural puede ir unida a la parte triptamínica de la estructura; por ejemplo, el triptófano puede que se incorpore sin que sufra una descarboxilación, como en el caso de la adifolina de algunas especies de la familia *Rubiaceae* o perder carbonos de la cadena etanamina de la triptamina, como ocurre en la estructura de la elipticina (alcaloide con actividad antitumoral presente en especies de la familia *Apocynaceae*). En la figura 17 se detallan las estructuras de ambos ejemplos.



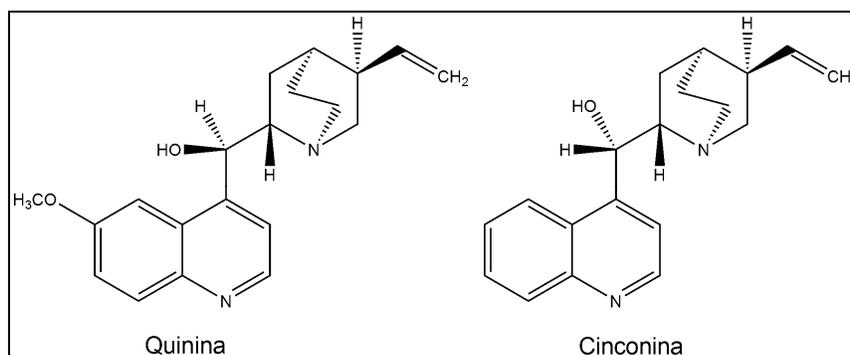
**Figura 17.** Alcaloides derivados de la triptamina: adifolina y elipticina

Otra variabilidad estructural muy importante es debida a la fracción monoterpénica, que proviene del secologanósido y es susceptible de diferentes reagrupamientos dando origen a estructuras tetra a heptacíclicas. Algunos ejemplos que podemos citar dentro de este grupo son: la ajmalina (Figura 4), la vindolinina, anodina; otros con estructura dimérica (producida por dimerización durante la biosíntesis) como la amataína (en *Apocynaceae*) o la toxiferina (bloqueante muscular aislado de *Strychnos spp*). En general poseen actividad farmacológica o toxicidad muy potente. La vincristina y la vinblastina (Figura 18), extraídos de raíces y hojas de la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), poseen actividad antimitótica y se utilizan en el tratamiento de ciertas leucemias; la brucina que en altas dosis produce una gran estimulación de todo el sistema nervioso central, al igual que la estricnina (Figura 4) que se utiliza como rodenticida; la reserpina (Figura 14) con actividad antihipertensiva y muchos otros ejemplos con actividad farmacológica.



**Figura 18.** Alcaloides derivados del triptófano aislados de *Vinca spp*

Algunos casos particulares que se incluyen dentro de este grupo, presentan una estructura con núcleo quinoleínico, producto de un reagrupamiento que transforma el núcleo indólico en una quinoleína (pero derivan de la estrictosidina). Es el caso de la quinina y la cinconina (Figura 19), extraídos de la corteza de la quina (*Cinchona officinalis*) con propiedades antimaláricas y antifibrilantes, respectivamente. Durante varios siglos la quinina fue el único agente capaz de curar el paludismo.



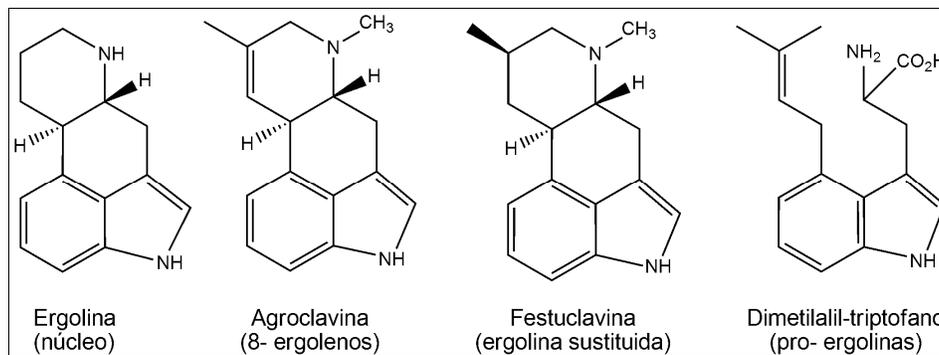
**Figura 19.** Alcaloides de la quina

#### 4) Alcaloides derivados de la ergolina o ergolínicos:

Su estructura química corresponde a la unión de un núcleo nitrogenado correspondiente a un indol con una quinoleína hidrogenada (tetraciclo octahidro-indol-quinoleínico). Se los encuentra presentes en hongos (*Ascomycetes*) y algunas especies de *Convolvulaceae*, de alto interés terapéutico. Estos alcaloides se clasifican según el ciclo básico en:

- ergolinas: como la festuclavina y el dihidrolisergol (con grupos metilo e hidroximetilo en el C<sub>8</sub>, respectivamente).
- 8- ergolenos: como la agroclavina, la elimoclavina y ácido paspálico (metil, hidroximetil y carboxil derivados en el C<sub>8</sub> respectivamente) presentes en géneros de la familia *Convolvulaceae*.
- 9- ergolenos: dentro de este grupo se citan a los alcaloides obtenidos de un hongo (del género *Claviceps*) de interés agronómico. Pueden tener estructura de aminoácidos, como la ergometrina; de péptido con ciclol (elemento estructural), como la ergopeptina; o de péptido sin ciclol como las ergopeptamas.
- 6, 7- secoergolinas: como la chanoclavina.
- pro-ergolinas: dentro de este grupo se encuentran las estructuras relacionadas como por ejemplo el dimetilalil-triptófano (precursor biosintético y los ácidos clavicipíticos).

En la figura 20 se representa la estructura básica de la ergolina y la de algunos derivados ergolínicos:



**Figura 20.** Alcaloides ergolínicos (derivados del triptófano)

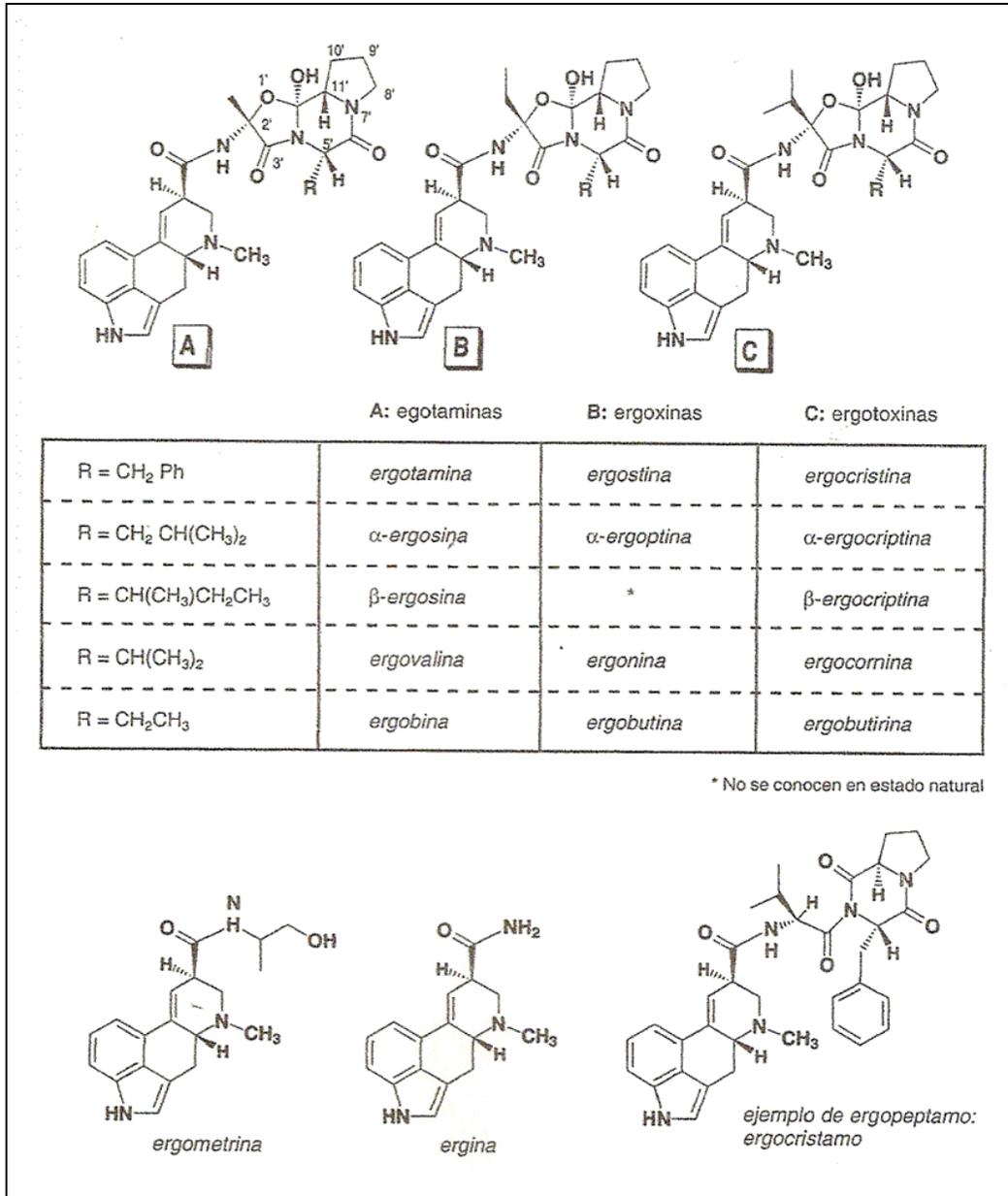
Dentro del grupo de los derivados de la ergolina encontramos algunos ejemplos de importancia agronómica, como los alcaloides presentes en festuca y centeno.

- La primera referencia con respecto a la toxicidad de *Festuca arundinacea* (festuca alta) en nuestro país fue en Balcarce en 1972 donde se describieron

por primera vez casos de esta intoxicación. Los alcaloides ergolínicos encontrados (ergovalina, ergovalinina y chanoclavina), están asociados a la infección por el hongo endófito *Neotyphodium coenophyalum* (o *Acremonium coenophyalum* de la familia *Clavicipitaceae*). Se detectan en plantas y semillas de esta planta que resultan tóxicos para animales produciendo lo que se conoce como Festucosis. La presencia de estas toxinas permite algunas explicaciones a síntomas como el efecto anemizante, menor consumo de alimentos, bajo aprovechamiento de la celulosa, renguera de invierno, asoleado del verano en bovinos, problemas en gestación y/o parto, bajas en la producción de leche y carne y hasta la muerte del animal; aunque no se ha llegado a tener una completa explicación de toda su problemática. La festuca produce además alcaloides pirrolizidínicos (lolinas) que aumentan de manera significativa sus niveles cuando se encuentra el hongo en simbiosis; y también un tipo de alcaloides del grupo diazofenantrénicos, como el caso de la perlolina de acción hipoglucemiante, aunque dicho efecto no estaría ligado a la festucosis. En la actualidad se utiliza la cantidad detectada de ergovalina como una medida de la contaminación endofítica de la semilla de festuca.

- Los alcaloides presentes en el centeno (*Secale cereale*, familia *Poaceae*), conforman una mezcla de alcaloides peptídicos o ergopéptidos (Figura 21), obtenidos del esclerocio del hongo *Claviceps purpurea* (de color pardo grisáceo o pardo purpúrea) que parasita el ovario de la flor, por lo que recibe el nombre de “Cornezuelo del centeno”, aunque también es parásito de otras gramíneas (trigo, triticale, cebada, avena, festuca, pasto ovillo, entre otros). Los alcaloides que sintetiza este hongo se denominan ergoalcaloides y son sustancias activas, altamente tóxicos, aunque en medicina se los emplea como vasoconstrictores. La droga es de composición compleja y contiene trazas de clavininas y dos grandes grupos representados por las ergopeptinas (80 %) y por un 20 % de amidas simples del ácido lisérgico. Las amidas simples poseen como compuesto mayoritario a la ergometrina, y una amida del ácido lisérgico (la ergina) en pequeñas cantidades. Por otro lado las ergopeptinas son insolubles en agua, están conformadas por la ergotamina y la “ergotoxina” que constituyen una mezcla de ergocornina, ergocriptina, ergocristina, y otros

(ergostina, ergoptina, ergonina, ergobutina, ergobutirina, etc.), que no poseen tanto interés terapéutico.



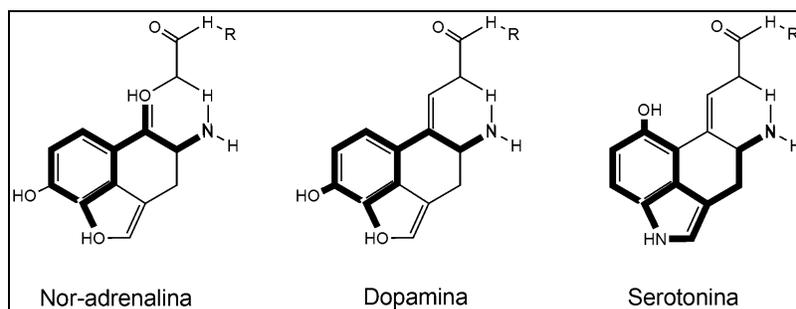
**Figura 21.** Principales alcaloides del cornezuolo del centeno (*Claviceps purpurea*). Fuente: Bruneton 2001: 979

El envenenamiento en el ganado por la ingesta de ergoalcaloides se conoce con el nombre de ergotismo o micotoxicosis causada por consumo de granos,

de alimentos elaborados con éstos, henificados o ensilados contaminados por el hongo.

En cuanto a su toxicidad en humanos se puede decir que tienen acción sobre el sistema nervioso simpático anulándolo, con disminución de la tensión, aumento de la vasodilatación cerebral y coronaria y efecto analgésico. Las epidemias de ergotismo se presentaron durante siglos en Europa Occidental como consecuencia de la ingestión de cereales contaminados por el hongo, con dos tipos de síntomas: gangrena o delirio convulsivo. Con el progreso de la agricultura y la diversificación de la alimentación, la frecuencia de casos de ergotismo disminuyó rápidamente, aunque en el año 1978 se refirieron alrededor de 50 muertes en Etiopía por consumo de cereales infectados.

En 1918 se consignó el aislamiento de la ergotamina y desde allí se puso en evidencia la actividad farmacológica de los alcaloides del cornezuelo del centeno, que es compleja y se debe principalmente a la analogía estructural que presentan con las aminas biógenas: nor-adrenalina, dopamina y serotonina (Figura 22). Esta analogía explica la afinidad de estos alcaloides y de sus derivados por los correspondientes receptores y su capacidad para ejercer efectos agonistas o antagonistas (Bruneton, 2001: 980).



**Figura 22.** Analogías de los alcaloides del cornezuelo del centeno con aminas biógenas  
Fuente: Bruneton 2001: 980

Por otro lado estos alcaloides al igual que sus derivados semisintéticos, tienen acciones terapéuticas. Por ejemplo, la ergometrina se utiliza como oxiótico en útero a término (aumenta las contracciones de la fibra muscular uterina para inducir el parto) y antihemorrágico post-parto; mientras que la ergotamina y ergotoxina tienen aplicación como vasoconstrictores para prevenir migrañas a

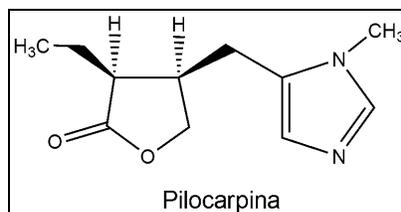
dosis bajas y vasodilatadores a dosis altas. Otro derivado de estos alcaloides es la dietilamida del ácido lisérgico, conocido como LSD, que es un potente y específico psicotomimético (alucinógeno que, con apenas un rango de microgramos, provoca esquizofrenia temporal en sus consumidores).

#### V. *Alcaloides derivados del ácido antranílico*

Este grupo de alcaloides abarca quinoleínas, quinazolininas y acridonas y su precursor es el ácido antranílico (que proviene de la aminación del ácido isocorísmico) que a su vez puede conjugarse con otros compuestos, es decir que tiene un origen mixto (como en el caso de las furoquinoleínas). Las funciones con las que se los vincula son: la actividad alelopática y también la resistencia de especies de algunas familias (como las *Poaceae*) frente a depredadores (insectos, hongos, bacterias, etc.). En cuanto a su distribución, para el caso de las quinoleínas y acridonas lo hacen en forma restringida (centrándose en la familia de las *Rutaceae*) y las quinazolininas en las familias *Acantaceae*, *Rutaceae*, *Zigofilaceae*, *Fabaceae*, y algunas especies de otras familias. Ejemplos: platidesmina, acronicina, vaticina, arborina, febrifugina, entre otros.

#### VI. *Alcaloides derivados de la histidina*

La histidina es el aminoácido del cual derivan los alcaloides imidazólicos. Estos alcaloides constituyen un grupo muy pequeño y de localización muy restringida en la naturaleza, como en algunas pocas especies de las familias *Rutaceae*, *Euforbiaceae*, *Fabaceae*, *Cactaceae*, etc. Cabe citar en este grupo a la pilocarpina (Figura 23) presente en *Pilocarpus spp.* (*Rutaceae*), especie arbustiva de la que se extrae este alcaloide, que posee actividad parasimpaticomimética y se emplea principalmente en forma de colirio en el tratamiento de glaucoma.



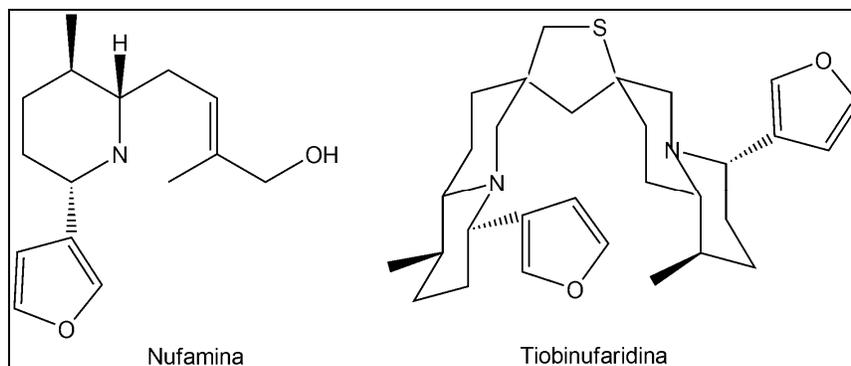
**Figura 23.** Alcaloide aislado de *Pilocarpus spp*

## VII. Alcaloides derivados del metabolismo terpénico

Estos alcaloides son considerados por algunos autores como pseudoalcaloides ya que, como ya se ha mencionado anteriormente, no provienen de aminoácidos sino que son terpenoides que posteriormente incorporan el nitrógeno a sus moléculas. Se los puede dividir en subgrupos según las unidades de isopreno presentes en sus estructuras:

### a) Alcaloides mono y sesquiterpénicos:

Son poco numerosos y de escaso interés farmacológico. Como ejemplo de monoterpénico se cita a la  $\beta$ -esquitantina en *Skytanthus acutus* (cuerno de cabra). Se han encontrado alcaloides sesquiterpénicos en rizomas de plantas acuáticas o nenúfares de los géneros *Nuphar* y *Nymphaea* (*Nymphaeaceae*), la mayoría con estructura quinolizidínica (nufarolidina, desoxinufaridina, nufacristina), otros piperidínicos (como la nufamina), e incluso algunos que incorporan azufre (como la tiobinufaridina) (Figura 24). Otros ejemplos dentro de este grupo son los alcaloides que se encuentran en los frutos del bonetero o evónimo (*Evonymus europaeus*). Muchas de las especies de *Dendrobium* (*Orchidaceae*) contienen alcaloides sesquiterpénicos. El más conocido es la dendrobina utilizada por los chinos por sus propiedades analgésicas, antipiréticas e hipotensoras.

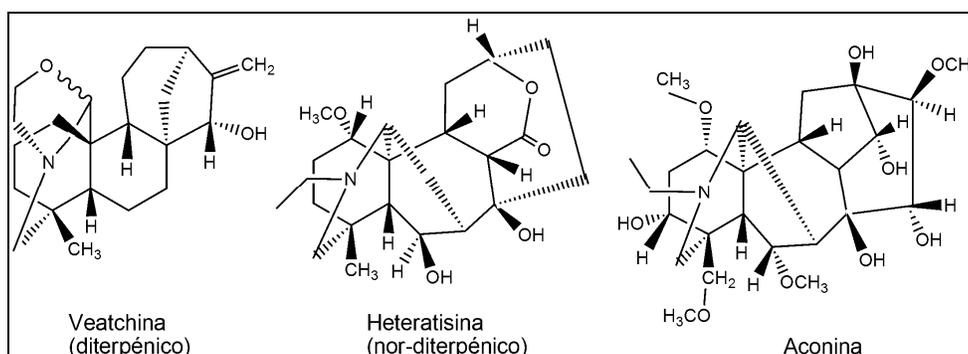


**Figura 24.** Estructuras químicas de alcaloides de las *Nymphaeaceae*

### b) Alcaloides diterpénicos

Se caracterizan por su gran toxicidad (neurotóxicos), ya que con sólo 2-5 mg puede producirse la muerte en el ser humano. Se encuentran en su mayoría distribuidos en especies de la familia de las *Ranunculaceae* (*Aconitum* y *Delphinium*) y en algunas de la familia *Rosaceae* (*Spiraea japonica*) y en *Garrya spp.*, el único género de la familia *Garryaceae*. Su estructura es siempre compleja pero su esqueleto posee 19 ó 20 átomos de carbono; es decir diterpénicos, del tipo atisina, veatchina o delnudina; o *norditerpénicos*, tipo aconitina, licoctonina o heteratisina (Figura 25).

Los ejemplos más citados son la aconina (Figura 25) y aconitina (Figura 6) presentes en raíces de acónito. La planta ornamental conocida como espuela de caballero o pie de alondra (*Delphinium consolida* L.) es potencialmente tóxica, con casos habituales de pérdidas en ganado en América del Norte especialmente.



**Figura 25.** Ejemplos de estructuras de alcaloides diterpénicos

c) Alcaloides triterpénicos:

Son muy raros, con pocos ejemplos. Quizás la única conocida es la dafnifilina, en la especie asiática *Daphniphyllum*.

d) Alcaloides esteroidicos:

Dentro de este grupo encontramos diversas familias que sintetizan este tipo de alcaloides, como las *Apocinaceae* (conesina en *Holarrhena spp*), *Buxaceae* (buxina en boj común o *Buxus sempervirens*), *Liliaceae* (jervina y protoveratrina en *Veratrum album*) y *Solanaceae* (glucoalcaloides de la dulcamara *Solanum dulcamara*, hierba mora *Solanum nigrum* y de la papa *Solanum tuberosum*). Estos últimos presentan estructura de glicósidos es decir que están unidos a azúcares. Por ejemplo, la  $\alpha$  solanina es un trisacárido derivado de la solanidina, al igual que la solamargina (Figura 26). Mientras que el tubérculo de papa contiene menos de 20 mg de alcaloides por cada 100 g de material fresco, los brotes, hojas y flores pueden contener concentraciones letales.

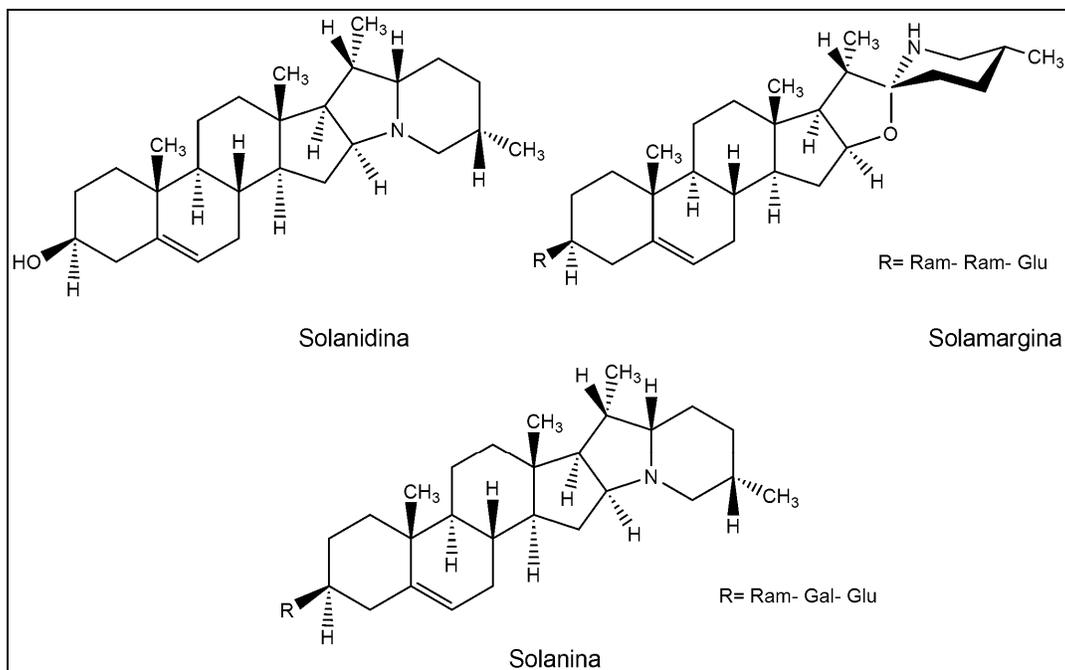
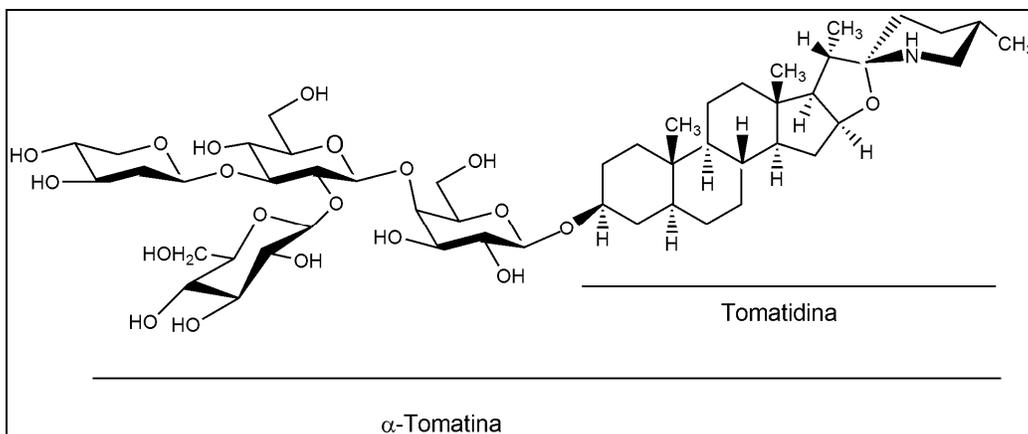


Figura 26. Alcaloides esteroidicos

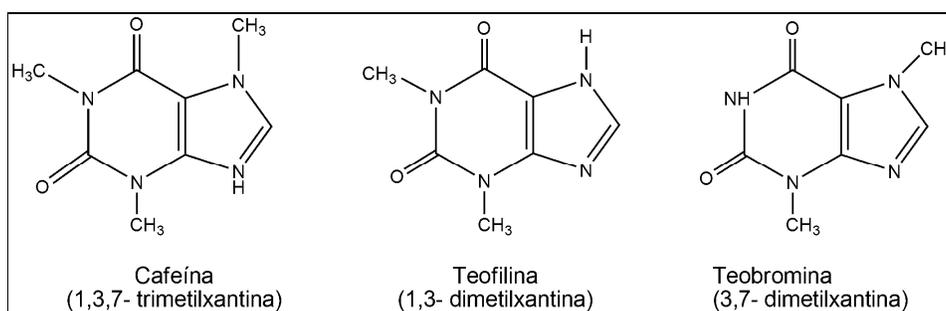
Otro ejemplo de alcaloide esteroídico presente en tomate (*Solanum lycopersicum*) es la tomatina, tetrasacárido de la tomatidina (Figura 27).



**Figura 27.** Alcaloide esteroídico en tomate

### VIII. Otros alcaloides: bases xánticas

Son alcaloides derivados de la xantina que poseen cuatro átomos de nitrógeno heterocíclicos. Químicamente derivan del anillo de la purina formado por condensación de una pirimidina con un imidazol. Las bases púricas de mayor interés por su uso en terapéutica son: 1,3,7- trimetilxantina, 1,3- dimetilxantina y 3,7- dimetilxantina, conocidas respectivamente como cafeína, teofilina y teobromina (Figura 28).



**Figura 28.** Estructura química de alcaloides derivados de la xantina

Presentan características especiales, tales como poseer un comportamiento anfótero y ser solubles en agua caliente y cloroformo (insolubles en agua fría y

en éter etílico), por lo que para muchos autores no se trataría de auténticos alcaloides. Las metilxantinas tienen en general un efecto estimulante sobre el sistema nervioso central, originando un aumento de la capacidad de alerta, pudiendo en altas dosis inducir nerviosismo, temblores e insomnio (cafeína: asociada a analgésicos y antihistamínicos). Son broncodilatadores, por relajación del músculo liso bronquial, especialmente la teofilina utilizada para los enfermos de asma. Sobre el corazón tienen efectos positivos y sobre los vasos producen por lo general dilatación, aunque pueden inducir vasoconstricción en el lecho vascular cerebral. Por otro lado, las metilxantinas presentan un ligero efecto diurético consistente en un aumento de la filtración glomerular y una disminución de la reabsorción tubular. Parece ser que el mecanismo de acción de estos alcaloides también está relacionado con la regulación celular de las enzimas implicadas en el metabolismo energético, induciendo una disminución de la síntesis de glucógeno y una activación de la glucogenólisis y de la lipólisis en las células hepáticas, adipocitos y células musculares. Por esta razón, las acciones de las drogas que contienen estos alcaloides presentan cierta similitud con otros compuestos como las catecolaminas en cuanto a su influencia sobre el metabolismo energético. La cafeína es consumida de forma habitual por la mayoría de la población mundial. Se encuentra presente en diversas plantas, especialmente en el café (*Coffea arabica*, *Rubiaceae*), té (*Camelia sinensis*, *Teaceae*), guaraná (*Paullinia cupana*, *Sapindaceae*) y yerba mate (*Ilex paraguariensis*, *Aquifoliaceae*).

### **Métodos de extracción, identificación y cuantificación de alcaloides**

El conocimiento de la solubilidad de los alcaloides y de sus sales posee considerable importancia farmacéutica, no sólo porque con frecuencia se administran productos alcaloídicos en solución, sino porque las diferencias de solubilidad entre los mismos dan lugar a métodos para su aislamiento a partir del material vegetal y para su separación de las sustancias no alcaloídicas también presentes en los extractos. Pese a que las solubilidades de los

distintos alcaloides y de sus sales son muy diversas (como cabía esperar de su estructura sumamente variada), puede decirse que, en general, las bases libres son muy poco solubles en agua, pero solubles en los disolventes orgánicos; y que con las sales suele ocurrir lo contrario, siendo generalmente solubles en agua y escasamente solubles en disolventes orgánicos. Por ejemplo, el clorhidrato de estricnina es mucho más soluble en agua que la estricnina base. Existen muchas excepciones a las anteriores generalizaciones: la cafeína (base) es extraída fácilmente del té con agua caliente y la colchicina es soluble en agua ácida, neutra o alcalina. Además diferentes sales de un mismo alcaloide muestran diferencias en lo que se refiere a solubilidad (por ejemplo, el sulfato de quinina es tan sólo soluble en una concentración de aproximadamente 1 parte en 1000 partes de agua), mientras que 1 parte de clorhidrato de quinina es soluble en menos de 1 parte de agua.

También se tiene en cuenta, para la separación y purificación de alcaloides, si son o no oxigenados ya que, los que no contienen oxígeno en su molécula, son generalmente volátiles (como los del tabaco) y se los extraerá entonces por métodos de destilación. Si son cuaternarios se tendrá en cuenta la solubilidad diferencial, pero considerando que algunos alcaloides no cumplen con la regla general, debiendo investigar sus características propias de solubilidad.

Los métodos de extracción varían según la magnitud y la finalidad de la operación, así como la materia prima. A veces se realizan extracciones a gran escala, en el campo, basadas en los principios señalados y se envían luego las mezclas impuras de alcaloides a una factoría para proceder a su separación y purificación que puede realizarse, a veces, por precipitación o cristalización fraccionada de sales (como oxalatos, tartratos o picratos). Esto se ha realizado con los alcaloides de la quina y de la coca en Sudamérica y en Indonesia, enviándose en bruto a Europa, Estados Unidos o Japón para su procesamiento.

Las técnicas de destilación, como ya se ha dicho, se utilizan para separar alcaloides volátiles y se realizan alcalinizando un extracto acuoso con una sosa cáustica, carbonato sódico o hidróxido de sodio al 10%, que provoca la liberación del alcaloide y luego es destilado por arrastre con vapor de agua,

recogiendo los alcaloides destilados sobre una solución ácida diluida, valorada y en exceso (titulación por retorno) para ser cuantificados. Esta metodología es la empleada para extraer y valorar alcaloides como la conina y la nicotina.

La materia prima y el objetivo que se persiga con la extracción de alcaloides determinará la metodología a seguir. En general los procedimientos a implementarse se separan por etapas:

- *Operaciones previas*: se trata de acondicionar el material antes de ser sometido a la extracción. Estos procedimientos pueden abarcar secado, pulverización, desengrasado, etc. Muchas veces se requiere de un tratamiento de secado previo, para reducir el tenor de humedad, con el fin de conservar la materia prima recién cosechada ante la posibilidad de no poder hacer la extracción en el momento de corte. Este secado generalmente evita procesos de pérdida o degradación de los alcaloides. La molienda del material hasta el estado de polvo hace que los disolventes, que se utilizarán durante la extracción propiamente dicha, puedan tener un mayor contacto con el material facilitando su aislamiento.

- *Extracción*:

Dada la importancia de los alcaloides se han desarrollado diversos métodos para obtenerlos, resultando muchos muy particulares, lo que no sorprende por la enorme variedad de estructuras que los caracteriza y el amplio rango de solubilidad y de otras propiedades que presentan (Lock de Ugaz, 1994: 225). Teniendo en cuenta principalmente el carácter básico y las características de solubilidad de cada alcaloide se utilizan diferentes disolventes, como por ejemplo: solventes orgánicos en medio básico, alcohol en medio neutro o levemente ácido, agua en medio ácido o vapor de agua para las extracciones por destilación (para generar el arrastre de los mismos cuando se trata de alcaloides volátiles). El contacto de estos disolventes con el material puede realizarse por maceración, mezcla, agitación, extracción continua, etc. A modo de ejemplo se plantean dos formas de llegar a un extracto alcaloídico:

- Procedimiento A: La materia prima pulverizada se macera con agua o alcohol débilmente acidificados (con ácido diluido como el HCl 1N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, o ácidos acético o tartárico al 10%). El extracto que contiene a los alcaloides al estado de sales (además de otros compuestos que se solubilizan en el solvente polar) es luego alcalinizado con una base (amoníaco, hidróxido de calcio o carbonato de sodio) para liberar a los alcaloides de su combinación salina y puedan finalmente ser extraídos con solventes orgánicos como el cloroformo, diclorometano, éter etílico, entre otros, obteniéndose por separación en una ampolla de decantación el llamado “extracto crudo”. Para purificar este extracto se lo agita a continuación con agua acidulada y se deja reposar para su separación en capas (utilizando la misma ampolla de decantación). Las sales de los alcaloides se encuentran ahora en el líquido acuoso, mientras que en la fase orgánica permanecen las impurezas (compuestos que se han solubilizado en ella y no forman parte de la fracción alcaloídica). Este procedimiento se repite varias veces para purificar el extracto.

- Procedimiento B: La materia prima, pulverizada, se humedece con soluciones diluidas de amoníaco o carbonato de sodio para liberar a los alcaloides. Seguidamente se procede a la extracción con disolventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, éter etílico, acetato de etilo, etc., que no sólo disolverán a los alcaloides al estado libre, sino que contendrán otros componentes liposolubles de la muestra. El extracto se trata luego con agua acidificada para que los alcaloides libres de la fracción orgánica formen sales y pasen así a la fracción acuosa. Las impurezas como los pigmentos y otros compuestos liposolubles no se solubilizarán en el extracto acuoso por poseer diferente solubilidad y se eliminan por separación de capas en ampollas de decantación. Los alcaloides son precipitados seguidamente por adición de un exceso de bicarbonato sódico o amoníaco, separándose por filtración o extracción con disolventes orgánicos.

Cabe aclarar que estos dos procedimientos son generales, y debe tenerse en cuenta que cada material vegetal tiene su metodología de extracción.

En escala de laboratorio el aislamiento de los alcaloides de cualquier vegetal que los contenga tiene como principio la separación de bases débiles,

medianas y fuertes debido a la acción de solventes de creciente polaridad y variaciones de pH (Sharapin, 2000: 75).

- *Purificación*: Las técnicas para la obtención de alcaloides puros incluyen procesos que permiten eliminar las impurezas y la metodología utilizada suele ser la aplicación de técnicas de extracciones sucesivas (por cambio de disolventes), de cristalización o técnicas cromatográficas: en capa fina (CCF), cromatografía gaseosa (CG), en columna (CC), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los métodos cromatográficos son especialmente útiles cuando se trata de mezclas complejas o cuando sólo se necesitan pequeñas cantidades de alcaloides.

- *Identificación y valoración*:

Los alcaloides no pueden ser identificados y valorados por un simple y único método ya que constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo. En general es difícil identificar alcaloides de una nueva especie si no se tiene alguna idea aproximada del tipo de alcaloide que se pretende aislar. La enorme cantidad de estructuras y propiedades, sumado a las diferentes solubilidades, hace que cualquier tipo de método de *screening fitoquímico* pueda fallar en la detección de compuestos particulares.

Una vez extraídos los alcaloides se los somete a pruebas de identificación o detección preliminar. La mayoría de los alcaloides en soluciones neutras o ligeramente ácidas, precipitan o dan coloraciones con una serie de reactivos que, por tal motivo, han sido denominados *reactivos generales de alcaloides*. Ellos son:

- el reactivo de Mayer - Valser (solución acuosa de tetrayodomercuriato de potasio),
- el reactivo de Wagner (solución de yodo en yoduro potásico),
- el de Dragendorff (solución de yoduro potásico bismúctico),
- el reactivo de Hager o Popoff (solución saturada de ácido pícrico),
- la solución de ácido tánico,
- el *p*-dimetilamino benzaldehído,

- el ácido sílico túngstico (reactivo de Bertrand).

Los tres primeros reactivos precipitan a los alcaloides de las soluciones acuosas débilmente acidificadas, bajo la forma de poli-yodatos complejos. Los precipitados pueden ser amorfos o cristalinos y de color variado: crema (Mayer), amarillo (Hager), castaño-rojizo (Wagner). Algunos alcaloides se apartan de esta regla y no dan positiva estas reacciones (la cafeína, derivado de la purina, no precipita como la mayoría de los alcaloides). Algunos de los reactivos específicos para estos alcaloides son:

- el reactivo de Van Urk (*p*- dimetil-amino-benzaldehído en HCl) para alcaloides que poseen núcleos indólicos, color azul-violáceo,
- el reactivo de Murexida (clorato potásico con una gota de HCl), que da color púrpura para las metil-xantinas,
- y el reactivo de Vitali Morin (ácido nítrico fumante en potasa alcohólica), que da reacción positiva para los núcleos tropánicos con la aparición de un color violeta.

Con referencia a la valoración o cuantificación de alcaloides de un material vegetal se pueden aplicar métodos volumétricos, gravimétricos, colorimétricos, cromatográficos (CCF, CG, HPLC), espectrofotométricos; muchas veces específicos para cada tipo de alcaloide.

*Caracterización de estructuras:* Debido a la gran diversidad de estructuras que pueden presentar los alcaloides, el hecho de tener como referencia la familia y el género de la planta del cual ha sido aislado, reduce el problema de su identificación a un número menor de posibilidades y clasifica al alcaloide dentro de un determinado tipo. Luego se aplican pruebas cromatográficas y de reacciones de identificación, junto con registros de espectroscopía UV e IR, Espectroscopía de Masas; RMN de protón, C13; Rayos X; con mediciones de Rotación específica, de Dispersión rotatoria óptica, Dicroísmo circular óptico, etc. Estas técnicas espectroscópicas incorporadas en las últimas décadas

permiten establecer las estructuras de alcaloides desconocidos aún siendo complejas, en muy corto tiempo.

### **Alcaloides importantes**

A continuación se resumen en orden alfabético los principales alcaloides:

**Aconitina:** Presente en el acónito. Es altamente venenoso.

**Ajmalina:** extraído de la *Rauwolfia serpentina*. Se utiliza como antiarrítmico (disminuye la excitabilidad del tejido cardíaco).

**Atropina:** del *Hyoscyamus niger*. Es anticolinérgico o antiespasmódico, analgésico.

**Anfetamina:** Sintetizado a partir de la efedrina. Tiene muchos derivados. Estimulante del sistema nervioso central.

**Atropina:** Se extrae de la *Atropa belladonna*, un arbusto venenoso. Tiene diversos usos en medicina.

**Berberina:** Este compuesto presenta actividad bacteriostática, bactericida, fungicida, antiviral, antiprotozoaria (antimalárica) e insecticida. En diferentes tipos de microorganismos inhibe el metabolismo.

**Cafeína:** Estimulante del sistema nervioso central, adictivo, se extrae del café (*Coffea arabica*). Cuando se extrae del guaraná se llama guaranina, del mate, mateína y del té, teína; pero son el mismo alcaloide.

**Cocaína:** Estimulante adictivo del sistema nervioso central, concretamente del sistema dopaminérgico (bloqueante adrenérgico). Se extrae de la hoja de la coca (*Erythroxylon coca*). Puede ser empleada en cirugía (como anestésico tópico o local). La mayor parte de la producción se destina a la extracción de cocaína, para su comercio ilícito.

**Codeína:** Se extrae del *Papaver somniferum*. Analgésico y antitusivo (sedante), hipnótico.

**Coniina:** Se encuentra en la cicuta (*Conium maculatum*). Es una neurotoxina que provoca parálisis del sistema nervioso motor.

**Colchicina:** Extraída originalmente de plantas del género *Colchicum*. Es venenosa. En medicina se usa actualmente en el tratamiento de la gota y se investiga sus posibles propiedades anticancerígenas.

**Efedrina:** Extraída originalmente de *Ephedra vulgaris*, muy usada en la medicina tradicional china. Es un estimulante del sistema nervioso simpático. Se emplea en medicina como descongestivo nasal, broncodilatador (en enfermos de asma), etc.

**Emetina:** *Uragoga ipecacuanha* Emético, expectorante, antipirético.

**Ergotamina:** Es el principal alcaloide del cornezuelo, un hongo parásito que afecta sobre todo al centeno. Se usa como vasoconstrictor para prevenir la migraña. Es un precursor del LSD.

**Escopolamina:** *Hyoscyamus niger*, es narcótico, sedante. Produce somnolencia y pérdida temporal de memoria. Se emplea para tratar mareos y náuseas en viajes, como antiparkinsoniano y para dilatar las pupilas en oftalmología.

**Estricnina:** *Strychnos nux-vomica*. Veneno.

**Gramina:** Aunque se encuentra en varias especies de plantas, es más fácil sintetizarlo químicamente. Se emplea para la obtención de triptófano.

**Heroína** (diacetilmorfina): Se sintetiza a partir de la morfina. Al igual que ésta, es analgésica, pero también tiene ciertos efectos estimulantes. Es muy adictiva, y el opiáceo de acción más rápida. Más potente que la morfina pero menos duradero.

**Higrina:** Se encuentra en las hojas de coca.

**Mescalina** (trimetoxifeniletilamina): Aislado del peyote y otras plantas cactáceas. Es un alucinógeno.

**Morfina:** Se extrae del opio. Posee fuertes propiedades sedantes, analgésicas, narcóticas y anestésicas. Por eso, es el más utilizado en medicina contra el dolor, especialmente el grave. Muy adictiva.

**Muscarina:** Aislada originalmente del hongo mosca. Es un fuerte activador del sistema nervioso parasimpático periférico, pudiendo llegar a la muerte (su antídoto es la atropina).

**Nicotina:** se encuentra en *Nicotiana tabacum*. Tóxico. Es un potente veneno usado como insecticida en fumigación en invernaderos. A bajas dosis, es estimulante. Causa la adicción al tabaco.

**Papaverina:** Se extrae del opio de la amapola. Relajante muscular. Se usa en medicina en el tratamiento de espasmos viscerales, vaso-espasmos (corazón y cerebro), etc.

**Pilocarpina:** Se extrae de la hoja de los arbustos del *Pilocarpus jaborandi*. Estimulante del sistema parasimpático. Se usa en el tratamiento del glaucoma.

**Piperina:** Se extrae de la pimienta negra, siendo responsable de su acritud. Es depresora del SNC, anticonvulsivante (ratas). Derivados sintéticos de esta piperina se utilizan como anti-epiléptico. Se usa en medicina tradicional y como insecticida.

**Psilocibina:** Se extrae del género de hongos *Psilocybe*. Es un alucinógeno.

**Quinina:** en *Cinchona officinalis*. Tratamiento de la malaria.

**Reserpina:** extraído de la *Rauwolfia serpentina*. Propiedades neurolépticas y antihipertensivas.

**Sanguinarina:** De la amapola de California (*Eschscholzia californica*). Antibacteriano (dentífricos).

**Vinblastina:** *Catharanthus roseus*. Antineoplásico.

**Vincristina:** *Catharanthus roseus*. Antimitótico.

## Bibliografía

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica - Plantas Medicinales* (2.<sup>a</sup> edición). Zaragoza: Acribia.
- Carod-Artal, F. J. (2003). "Síndromes neurológicos asociados con el consumo de plantas y hongos con componente tóxico (I). Síndromes neurotóxicos por ingesta de plantas, semillas y frutos". *Rev. Neurol.*, 36(9): 860-871.

- Croteau, R; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). Chapter 24: "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, B; Grisse, W & Jones, R (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp 1250-1318). Maryland USA: American Society of Plant Physiologists.
- FAO/OMS. Programa conjunto sobre normas alimentarias. Comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Documento de debate sobre los alcaloides de pirrolizidina (AP). 5.ª Reunión. La Haya (Países Bajos), 21-25 de marzo de 2011. En línea:  
<[http://www.cclac.org/documentos/CCCF/2011/3%20Documentos/Documentos%20Espa%C3%B1ol/cf05\\_14s.pdf](http://www.cclac.org/documentos/CCCF/2011/3%20Documentos/Documentos%20Espa%C3%B1ol/cf05_14s.pdf)>.
- Farook, J. M.; Lewis, B.; Gaddis, J. G.; Littleton, J. M.; Barron, S. (2009). "Lobeline, a nicotinic partial agonist attenuates alcohol consumption and preference in male C57BL/6J mice". *Physiology and Behavior*, 97(3-4), 503-506.
- Harborne J. B. (1993). *Phytochemical Dictionary. A handbook of Bioactive compounds from Plants*. London- Washington DC: Taylor & Francis Ltd.
- Hong, Y.; Hu, H.Y.; Xie, X.; Sakoda, A.; Sagehashi, M.; Li, F. M. (2009). "Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*". *Aquat Toxicol.*, 91(3): 262-69.
- Leicach, S. R. (2006). *Alelopatía. Interacciones químicas en la comunicación y defensa de las plantas* (1.ª edición). Buenos Aires: Eudeba.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales*. (2.ª edición). Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Molyneux, R. J.; Panter, K. E. (2009). "Alkaloids Toxic to Livestock". In: Cordell, G.A. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 67, 143-216). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Öözççelik, B.; Kartal, M.; Orhan, I. (2011). "Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids". *Pharmaceutical Biology* (Formerly *International Journal of Pharmacognosy*), 49 (4), 396-402.

- Panter, K. E.; James, L. F.; Gardner, D. R. (1999). "Lupines, poison-hemlock and *Nicotiana spp*: toxicity and teratogenicity in livestock". *J. Nat Tox.*, 1,117-134.
- Schmeltz I. (1971). *Naturally Occurring Insecticides*. (M. Jacobson, and D. G. Crosby, eds), New York: Marcel Dekker.
- Sharapin N. (2000). *Fundamento de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia: Pinzón R. (ed).
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5<sup>o</sup>Ed. (Fifth Edition). Chapter 13. Secondary Metabolites and Plant Defense. Massachusetts. USA: Sinauer Associates.
- Trease, G. E.; Evans, W. C. (1986). *Tratado de Farmacognosia*. 12.<sup>a</sup> Ed. Madrid, España: Interamericana.
- Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. Méjico: Trillas 235 pp.
- Villarroel Villarroel, L.; Gonzalez-Coloma, A.; Reina Artilles, M. (2009). "Insecticidas Naturales Nitrogenados", En: Burillo Alquézar, J.; Gonzalez-Coloma, A. (eds). *Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural* (pp. 220). Zaragoza.: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón.

## CAPÍTULO 3

### OTROS COMPUESTOS SECUNDARIOS NITROGENADOS Y COMPUESTOS

#### AZUFRADOS

*Cynthia Patricia Henning*

*Roxana Mariel Yordaz*

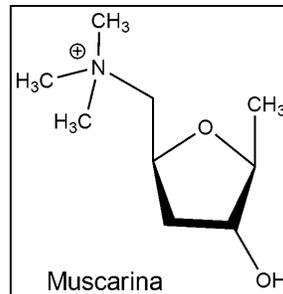
### Compuestos nitrogenados secundarios

#### Aminas

La distinción entre las aminas y los alcaloides no está aún bien definida. Las aminas en general tienen menores pesos moleculares que los alcaloides y el nitrógeno es acíclico. En plantas superiores existe una gran variedad de aminas que derivan frecuentemente de la descarboxilación de los respectivos aminoácidos o de la transaminación de los correspondientes aldehídos, especialmente en aminas alifáticas (Harborne, 1993: 75).

Las aminas vegetales se clasifican en tres grupos: monoaminas alifáticas, poliaminas alifáticas (incluyendo a las diaminas) y aminas aromáticas. Entre las del primer grupo se encuentran desde la metilamina ( $\text{CH}_3\text{-NH}_2$ ) hasta la hexilamina ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$ ), distribuidas en plantas superiores y hongos (generalmente presentes en flores y en los cuerpos fructíferos de ciertos hongos). La muscarina (Figura 1) es una trimetilamina aislada de la *Amanita muscaria*. Fue la primera sustancia parasimpático-mimética en ser estudiada y causa una profunda activación psiconáutica y en dosis altas puede ocasionar la muerte. Al ser una amina cuaternaria, la muscarina es absorbida menos eficientemente por el tracto gastrointestinal que las aminas terciarias, pero cruza con facilidad la barrera hematoencefálica e imita la acción del neurotransmisor acetilcolina en los receptores muscarínicos de acetilcolina. Ha

sido encontrada en cantidades inocuas en setas del género *Boletus*, *Hygrocybe*, *Lactarius* y *Russula*. También se encuentra en algunos hongos del género *Inocybe* y *Clitocybe*.



**Figura 1.** Estructura química de una trimetilamina

Las intoxicaciones por ingestión de setas del hongo con estos compuestos producen una estimulación colinérgica generalizada, ocasionando aumento de salivación, sudoración excesiva y lagrimeo. Estos síntomas pueden ser seguidos por visión borrosa, dificultad para respirar, fuerte dolor abdominal, náuseas y diarrea, cuando las dosis son altas. Puede causar la muerte (rara vez) por falla cardíaca o respiratoria en los casos graves. El antídoto específico es la atropina.

Las aminas alifáticas inferiores son en general compuestos bastante solubles en agua y alcoholes, volátiles, de olor desagradable y penetrante, pero que en ciertos casos atraen insectos transportadores de polen, esporas, etc. Las diaminas y poliaminas son menos volátiles, pero también presentan olores desagradables característicos, que recuerdan al amoníaco y al pescado poco fresco. De hecho, en la descomposición del pescado se libera trimetilamina, mientras que en la descomposición de la carne se producen diaminas como la putrescina (1, 4- diaminobutano) y la cadaverina (1, 5- diaminopentano). La cadaverina es una sustancia tóxica, irrita la piel, aunque en bajas concentraciones actúa como estimulador del crecimiento. Está presente en *Fabaceae*. Estas aminas a su vez han sido citadas como intermediarios metabólicos en la síntesis de algunos alcaloides. La agmatina es una diamina precursora de la putrescina, presente en granos de soja (*Glycine max*), semillas de sésamo (*Sesamun indicum*) y en cebada (*Hordeum vulgare*). También se la

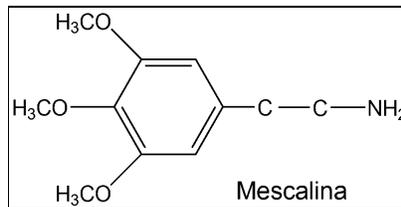
ha encontrado en algas marinas multicelulares, hongos y líquenes. Se han descubierto otras estructuras de poliaminas, que no son tan comunes y no tienen más que valor quimiotaxonómico y filogenético en plantas superiores y hongos.

Las poliaminas están presentes en plantas, animales y microorganismos. Son moléculas de naturaleza policatiónica y pueden unirse y estabilizar polímeros ricos en cargas negativas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos y proteínas. Se encuentran en la naturaleza no sólo como bases libres, sino también en forma conjugada con ácidos hidroxicinámicos, como por ejemplo la cafeoilputrescina (conocida como paulina). Las hordatinas en cebada tienen actividad antifúngica y derivan de la condensación de la agmatina con el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico. Algunas de las aminas más estudiadas son:

- la putrescina:  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$ ,
- la espermidina:  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$ ,
- la espermina:  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$ .

En cuanto a la función que cumplen en las plantas, se sabe que participan estimulando su crecimiento y desarrollo, actuando como reguladores en la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Entre los procesos fisiológicos se incluyen: la división celular, la diferenciación de hojas, flores y raíces, el desarrollo de la flor y del fruto, la senescencia de órganos, etc. (Tiburcio *et al.*, 1993: 357). Estas poliaminas han sido estudiadas en relación con la inducción a la floración estableciendo que una alta relación espermidina/espermina estimula la floración *in vitro* en varias especies. Los efectos de la putrescina suelen ser menores y más variables que los anteriores, sugiriendo que no actuaría *per se*, sino, probablemente, como precursor de la espermidina (Montero-Carmona y Jiménez, 2009: 15). Muchas de las funciones que cumplen las poliaminas son similares a las ejercidas por hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno). Su biosíntesis se produce a partir de la cadaverina (pentametilendiamina) y por transferencia de un grupo aminopropil proporcionado por una molécula de S-adenosil metionina descarboxilada.

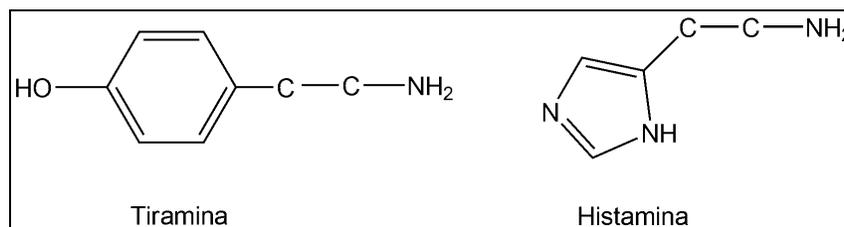
Con referencia a las aminas aromáticas, la más conocida en las plantas es probablemente la mescalina (3, 4, 5- trimetoxi-  $\beta$ -feniletilamina) presente en flores del cactus “peyote” (*Lophophora willamsii*), importante alucinógeno natural utilizado en otras épocas por los indios de Méjico en rituales religiosos. Entre los efectos que produce su ingestión podemos nombrar: visiones y alucinaciones, distorsión de las coordenadas espacio-temporales y alteraciones del esquema corporal.



**Figura 2.** Estructura química de la mescalina

Como la mayoría de estas aminas aromáticas tienen actividad fisiológica intensa, muchos autores las consideran dentro del grupo de los alcaloides. La mescalina (Figura 2) y la efedrina han sido también citadas en el capítulo 2 como ejemplos de protoalcaloides.

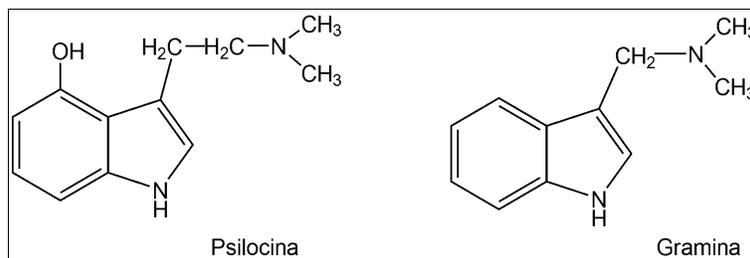
Otras aminas aromáticas de gran distribución son la tiramina y la histamina (Figura 3). La tiramina es una sustancia vaso-activa en el ser humano que puede producir migrañas. Se encuentra presente de forma natural en algunas especies de nueces, en ciertos alimentos fermentados (como quesos maduros), en el hígado de pollo, en ciertos pescados como los arenques y todos los de la familia de la sardina. Es un producto que se obtiene al convertir la tirosina (aminoácido presente en muchas proteínas) en epinefrina, hormona activa producida internamente en la glándula adrenal.



**Figura 3.** Estructura química de aminas aromáticas

La histamina es una sustancia muy importante en fisiología animal, desde el punto de vista del metabolismo cerebral y se encuentra distribuida en plantas como por ejemplo en la papa, en el fruto del banano (*Musa sapientum*), en espinaca (*Spinacea oleracea*), en plantas insectívoras como la *Drosera spp.* y en ortiga (*Urtica dioica*). Es una sustancia irritante y de acción broncoconstrictora y vasodilatadora. Las aminas anteriormente mencionadas son aminas primarias, pero existen además aminas secundarias y terciarias que no son tan comunes en los vegetales.

Los alcaloides psilocina (Figura 4) y su derivado fosforilado (la psilocibina) son consideradas aminas que poseen propiedades alucinógenas y están presentes en el peyote. La gramina es otra amina de poco interés farmacológico pero actúa como sustancia de defensa en varias plantas como en los géneros *Hordeum*, *Phalaris* y *Lupinus* (Figura 4).



**Figura 4.** Aminas aromáticas psilocina y gramina

## **Glicósidos cianógenos o cianogénicos**

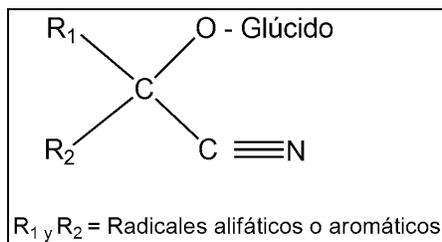
### *Generalidades, estructura química y propiedades*

En el reino vegetal existe una serie de plantas que sintetizan (por cianogénesis) compuestos denominados glicósidos cianógenos, capaces de liberar por hidrólisis ácido cianhídrico (HCN), un gas tóxico que participa de las interacciones planta-animal y que produce a menudo envenenamiento de ganado y ocasionalmente de personas. El ácido cianhídrico o ácido prúsico actúa como una toxina de rápida acción ya que es un potente inhibidor de la

función mitocondrial, cuando se combina con las metalo-proteínas del sistema de transporte de electrones en la cadena respiratoria, inhibiendo enzimas como las citocromo-oxidasas.

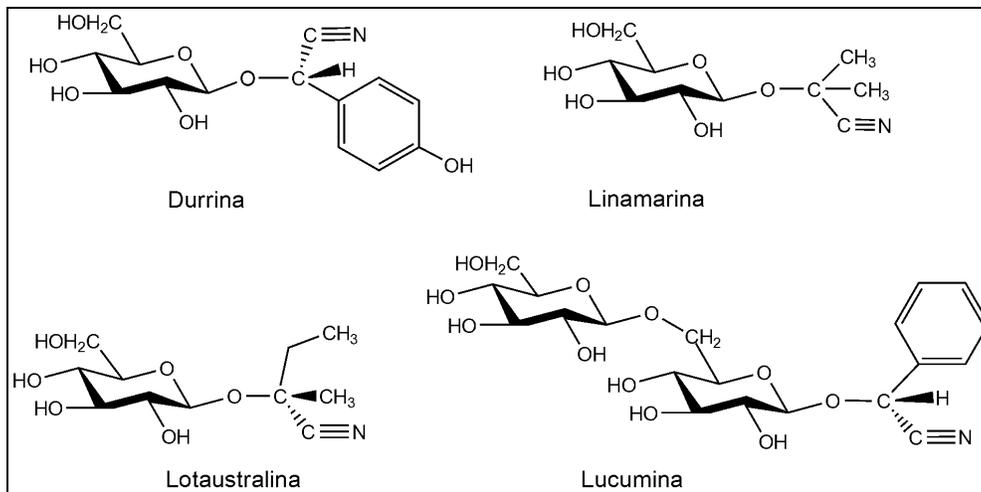
Estructuralmente están formados por un azúcar, un grupo ciano y un derivado carbonílico (aldehído o cetona) como se describe en la figura 5 correspondiente a la fórmula general. Casi todas las sustancias cianógenas son glicósidos de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (cianhidrinas). Biogenéticamente se encuentran estrechamente relacionados con otros glucósidos de  $\beta$  y  $\gamma$ - hidroxinitrilos que son no-cianogénicos.

Se han encontrado más de 50 tipos de glicósidos cianógenos naturales de los cuales todos tienen una misma estructura general, representada en la figura 5.



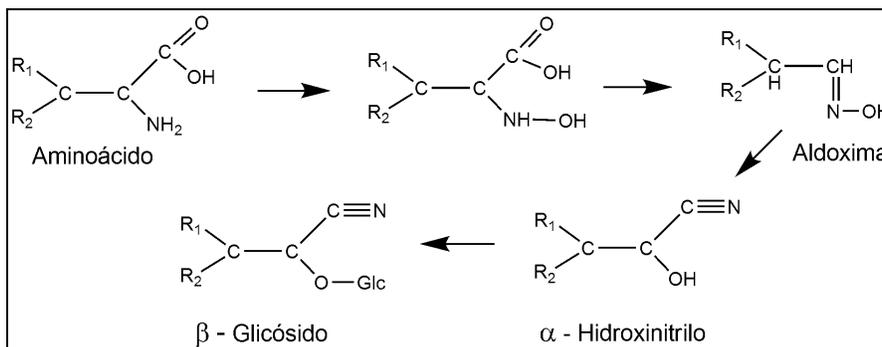
**Figura 5.** Estructura general de glicósidos cianógenos

En esta estructura las variables son: el azúcar que generalmente es un monosacárido como la glucosa (aunque puede ser un disacárido) y los radicales  $R_1$  y  $R_2$  que pueden ser alifáticos y/o aromáticos. También puede haber pares epímeros es decir que la quiralidad del carbono también se tiene en cuenta. Las estructuras de algunos de estos compuestos se presentan en la figura 6.



**Figura 6.** Estructura de algunos glicósidos cianógenos

Sus precursores biosintéticos son algunos aminoácidos que sintetizan a los diferentes glicósidos cianógenos (GC) por la vía de aldoximas y nitrilos (Figura 7). Para su mejor estudio se los suele clasificar a los GC en derivados de la valina, leucina e isoleucina: para la síntesis de linamarina, cardiospermina, proacacipetalina, y lotaustralina; los derivados de la fenilalanina, para generar prunasina, amigdalina, lucumina y vicianina; y los que derivan de la tirosina: taxifilina, durrina, trigloquinina, entre otros.



**Figura 7.** Síntesis de glicósidos cianógenos

Algunas características de estos compuestos son:

- sólidos, de gran toxicidad e importancia farmacológica.
- solubles en mezclas acuosas alcohólicas.
- sensibles a la hidrólisis, principalmente enzimática. Esta es una de las características más típicas, incluso con las enzimas de la misma planta aunque

se encuentren en células distintas, al triturar se desprende rápidamente HCN. Son también hidrolizables en agua caliente y en agua fría (aunque más lentamente) y por tratamiento con ácidos débiles (ya que si reaccionan con un ácido muy fuerte se obtiene el  $\alpha$ -hidroxiácido correspondiente).

### *Función biológica y distribución*

En la actualidad se conocen más de 2500 especies, distribuidas en unas 110 familias diferentes que presentan estos compuestos. Se encuentran presentes tanto en Angiospermas como en Gimnospermas, pero marcadamente en algunas familias como *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Araceae*, *Euphorbiaceae*, *Passifloraceae*, etc. Su presencia en los vegetales es un carácter de interés para la genética y la quimiotaxonomía.

La cianogénesis puede darse en cualquier parte de la planta: raíces (como en la mandioca), hojas, flores, frutos, etc. y/o en algún estado fenológico en particular; comúnmente se lo suele relacionar con el estadio vegetativo, como por ejemplo en los rebrotes de sorgo forrajero o después de una lluvia; aunque hoy en día, con un buen manejo y sembrando variedades mejoradas genéticamente para disminuir la concentración de estos compuestos, no debería haber problemas de intoxicación por HCN. A nivel celular se almacenan como precursores inactivos en compartimentos diferentes a los de sus enzimas hidrolíticas activadoras. Como otros metabolitos hidrosolubles son generalmente secuestrados en las vacuolas, siendo particularmente activos los mecanismos de glicosidación en especies productoras de compuestos tóxicos. Debido a que son sustancias tóxicas para el hombre y los animales, son conocidos desde hace mucho tiempo. Tribus primitivas conocían las propiedades venenosas de las raíces de *Manihot utilissima* (mandioca o cassava) y las usaban como alimento sólo después de quitarles el veneno. En 1830 se aisló la manihotoxina de las raíces de esta especie. Estos glicósidos se hidrolizan en el tracto intestinal del hombre por la flora microbiana, liberando el HCN. Una inadecuada cocción de las raíces, una ingesta semicruda y dietas

basadas exclusivamente en el consumo de la misma (pobres en proteínas) durante largos períodos, pueden producir síndromes neurológicos conocidos como enfermedad de Konzo (epidémica en África), aunque también provoca bocio, epigastralgia, distensión abdominal y vómitos. A pesar de ser raras las intoxicaciones agudas en el hombre, hoy en día son más serios los efectos a largo plazo producidos por el tiocianato formado durante el proceso de desintoxicación. La desintoxicación o detoxificación es también el tratamiento clínico que se realiza frente a intoxicación por cianuro, por medio del cual se suministra tiosulfato sódico vía intravenosa para transformar el ión cianuro en tiocianato y evitar la asfixia.

Para la planta la cianogénesis es sinónimo de defensa. La durrina ( $\beta$ -glicósido de *p*-hidroxi-mandelonitrilo), la amigdalina (D- mandelonitrilo genciobiósido) y la prunasina (DL- mandelonitrilo D- glucósido) se comportan también como sustancias alelopáticas, porque el hidroxibenzaldehído liberado al oxidarse origina el ácido *p*-hidroxibenzoico que, por ser fuertemente tóxico para muchas otras especies, posee por sí mismo actividad alelopática. La amigdalina y prunasina son frecuentes en semillas de *Prunaceae* y *Pomaceae* actuando como inhibidores de la germinación. La defensa por ácido cianhídrico no está restringida sólo al reino vegetal; también se verifica en el reino animal. Por ejemplo, los milpiés poseen esta clase de compuestos para protegerse del ataque de algún tipo de hormigas. Algunas mariposas nocturnas de color rojo ofensivo, también producen HCN en todas las etapas de su ciclo vital para hacerse desagradables a sus depredadores.

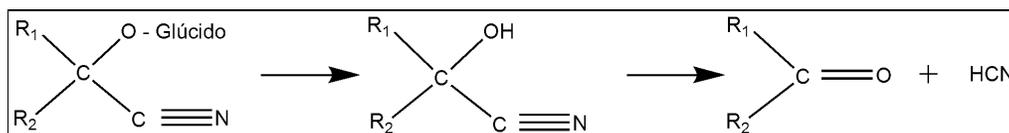
En la figura 8 se citan algunos ejemplos de GC, con su constitución química y la especie y familia botánica donde se encuentran.

Glicósido	Fuente	Familia	Constitución
Amigdalina	<i>Prunus amygdalus</i>	Rosaceae	D (-) mandelonitrilo genciobiósido
Linamarina	<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	acetona cianohidrín-glucósido
Prulaurasina	<i>Prunus laurocerasus</i>	Rosaceae	DL mandelonitrilo- D- glucósido
Manihotoxina	<i>Manihot utilissima</i>	Euphorbiaceae	acetona cianohidrín-glucósido
Durrina	<i>Sorghum vulgare</i>	Poaceae	B - glucósido de p-hidroxi-mandelonitrilo
Sambunigrina	<i>Sambucus nigra</i>	Caprifoliaceae	r (+) mandelonitrilo- D-glucósido
Vicianina	<i>Vicia angustifolia</i>	Fabaceae	Mandelonitrilo-vicianósido
Faseolunatina	<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae	acetona cianohidrín-glucósido
Prunasina	<i>Prunus serotina</i>	Rosaceae	D (-) mandelonitrilo D- glucósido

**Figura 8.** Ejemplos de glicósidos cianogénicos

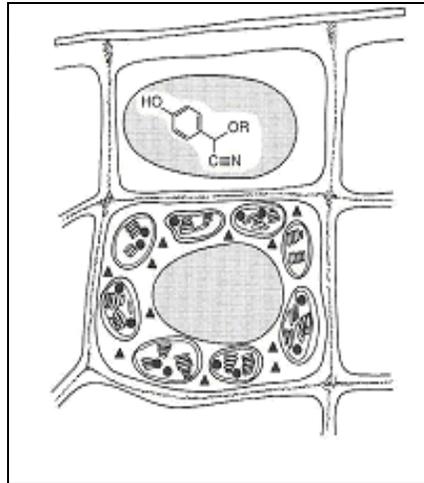
*Mecanismo de liberación del ácido cianhídrico. Ejemplos de interés agronómico. Biosíntesis. Métodos de identificación y cuantificación*

La hidrólisis de los glicósidos cianogénicos (GC) está estrictamente controlada. Todas las especies productoras de estos compuestos, también generan enzimas de tipo glucosidasas, aunque se diferencian de las  $\beta$ - glucosidasas comunes por su especificidad, por lo que usualmente se las denomina utilizando el nombre del sustrato sobre el que actúan. Estas enzimas están ubicadas físicamente en compartimentos celulares diferentes. Cuando cualquier tejido fresco es dañado o lesionado, por ejemplo por un animal herbívoro, se ponen en contacto la enzima con el sustrato y se desencadena entonces la reacción de hidrólisis. En una primera etapa se libera el azúcar y una cianhidrina de cetona o de aldehído que es un compuesto muy inestable, que por acción de otras enzimas del tipo hidroxinitril-liasas, en una segunda etapa produce la liberación de HCN y el compuesto ternario correspondiente, cetona o aldehído (Figura 9).



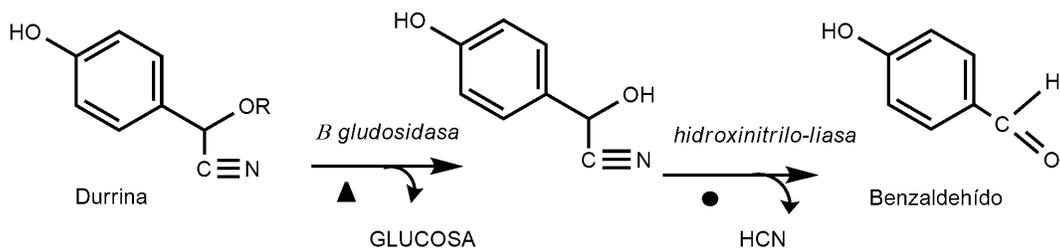
**Figura 9.** Mecanismo general de liberación de ácido cianhídrico

Un ejemplo de interés agronómico es la durrina presente en el sorgo forrajero. Es un glicósido cianogénico (presente en vacuolas de células epidérmicas) que al ser ingerido por el ganado, se pone en contacto con las enzimas que se encuentran en el mesófilo (Figura 10).



**Figura 10.** Durrina y enzimas compartimentalizadas

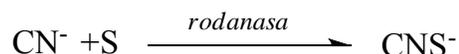
Este proceso se lleva a cabo durante la ingesta o masticación. Se produce entonces la hidrólisis y se libera el HCN (Figura 11), que actúa como toxina de rápida acción (al unirse fácilmente al sistema de la citocromo C oxidasa de la cadena transportadora de electrones), inhibiendo la respiración celular y pudiendo provocar incluso la muerte del animal. La durrina es frecuente entre especies del género *Sorghum* tanto cultivadas como silvestres.



**Figura 11.** Liberación de HCN a partir del glicósido cianogénico durrina

Algunos herbívoros especializados han adoptado como fuente alimenticia plantas cianógenas y para ello han adquirido la capacidad de desarrollar un mecanismo por el cual metabolizan a los GC (procesos de detoxificación).

Algunas pocas especies de Arthropoda (milpiés del género *Diplopoda*, *Chilopoda*) pueden sintetizar *de novo* estos GC y otros pueden secuestrarlos de sus hospedantes para utilizarlos en su propia defensa (Zagobelny *et al*, 2004: 293). También algunas babosas y caracoles han desarrollado mecanismos de adaptación al cianuro en sus dietas, por la acción de una enzima específica (la rodanasa) que, en presencia de azufre (proveniente del ácido mercapto-pirúvico), transforma el ión cianuro en tiocianato (mecanismo de detoxificación anteriormente citado).



Los tratamientos clínicos de desintoxicación por envenenamiento en ganado o animales de granja se basan en este mismo principio. Se suministra, por vía intravenosa, tiosulfato sódico que aporta el azufre necesario para que se produzca la reacción anteriormente citada y poder eliminar el cianuro.

El papel ecológico de estos glicósidos ha sido investigado en varias plantas y se ha podido comprobar que la cianogénesis no proporciona a las plantas cianógenas una protección completa frente al ataque de depredadores. Aunque la mayoría de los insectos no parecen ser disuadidos de alimentarse de estas plantas, es evidente su rol protector en ciertas etapas del desarrollo de las mismas. Por ejemplo, la langosta *Locusta migratoria* cuando utiliza al sorgo como fuente alimenticia, rechaza fuertemente las hojas jóvenes, pero come en cantidad las más viejas. Esto ocurre porque en los rebrotes y hojas tiernas se sintetiza mayor cantidad de glicósidos que liberan más rápidamente el cianhídrico.

En cuanto a su identificación, el ensayo más comúnmente utilizado para detectar heterósidos cianogénicos en extractos vegetales se llama ensayo de Grignard y se basa en que el HCN desprendido se combina con picrato de sodio para dar isopurpurato sódico de color rojo-ladrillo. El procedimiento consiste en colocar una muestra del vegetal triturado en un tubo de ensayo con

agua débilmente acidificada; se tapa con papel picrosódico (papel de filtro tratado previamente con disolución saturada de ácido pícrico y solución de bicarbonato de sodio y carbonato de sodio para formar el picrato de sodio). Se macera en un baño a 30-35 °C por unos minutos, para que se produzca la hidrólisis enzimática. El desprendimiento del HCN es rápido y tiene lugar en el transcurso de unos 10 ó 15 minutos. Si pasadas las 3 horas no hay cambio de coloración, se considera negativo el ensayo. Otro reactivo que da positiva la reacción frente al HCN liberado, es la tintura de guayaco en alcohol y sulfato de cobre, que produce una coloración azulada (reactivo de Schönbein).

La cuantificación se realiza mediante una argentometría. Dicha valoración se lleva a cabo aplicando el método de Liebig-Deniges que se basa en producir la hidrólisis del glucósido para que libere el HCN, que luego es destilado (recogiéndolo en solución de KOH diluido) y valorado con AgNO<sub>3</sub> 0,1 N (en presencia de IK para visualizar el punto final por opalescencia).

La cantidad de GC varía considerablemente con la edad de la planta, con las condiciones de almacenamiento de la materia prima y en algunos casos también según la época de recolección.

A continuación se detallan algunas cifras referidas a contenidos promedio en diversos materiales:

Mandioca (raíces)	linamarina/lotaustralina	33-84 mg/100 g
Mandioca (hojas)	linamarina/lotaustralina	77-100 mg/100 g
Ciruelas silvestres (hojas)	amigdalina	90-360 mg/100 g
Bambú (raíces verdes)	taxifilina	800 mg/100 g
Duraznos (semillas)	amigdalina	160 mg/100 g
Duraznos (hojas)	amigdalina	125 mg/100 g
Cerezos silvestres	amigdalina	90-360 mg/100 g
Lino (semillas)	linamarina	300-400 mg/100 g

## Glucosinolatos

Los glucosinolatos (antiguamente denominados heterósidos azufrados) son compuestos heterosídicos aniónicos responsables de olores fuertes, irritantes y de los sabores picantes característicos de especies como mostaza, rábano, berro, etc. La estructura básica de un glucosinolato contiene un azúcar, un grupo sulfato y una parte no glucídica variable y corresponde a la fórmula de la figura 12:

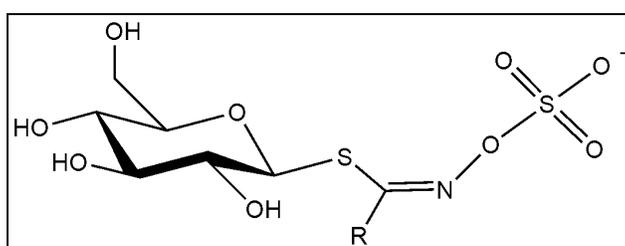


Figura 12. Fórmula general de los glucosinolatos

Se trata de glicósidos en los que participa generalmente la  $\beta$ -D-tioglucosa y una genina (aglucon) que corresponde a una oxima sulfatada, con radicales generalmente alquílicos de cadena sencilla o compleja, que diferencia a los diversos glucosinolatos. La mayoría presenta radicales (R) alifáticos, aunque algunos son derivados aromáticos o indólicos. Pueden presentarse naturalmente como sales de potasio aunque esto se ha establecido en pocos casos. La acción de enzimas específicas como las mirosinasas o tioglucosidasas producen por hidrólisis la liberación de moléculas de glucosa, sulfato inorgánico y una genina inestable que sufre un reagrupamiento, dando: isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos u otros compuestos relacionados (dependiendo de las condiciones de hidrólisis) que son productos reactivos, volátiles y de fuerte olor que provocan diferentes síntomas.

Se encuentran mayoritariamente distribuidos en especies de la familia *Brassicaceae* aunque también se han encontrado en *Resedaceae*, *Caricaceae*, *Tropaeolaceae*, *Capparidaceae*, etc. El contenido varía según la especie, la parte de la planta y las condiciones climáticas y de cultivo. Las semillas suelen ser una fuente de glucosinolatos aunque normalmente se presentan en toda la

planta y en diferentes estados fenológicos. Se conocen aproximadamente 80 compuestos de este tipo encontrados en alrededor de 400 especies y en ocasiones en una misma planta hay más de uno de ellos; a su vez un mismo glicósido presente en diversas especies puede formar productos volátiles diferentes. Algunas especies que sintetizan estos compuestos son: *Brassica campestris* (nabo), *B. chinensis* (col china), *B. napus* (colza), *B. nigra* (mostaza negra), *B. oleracea* (repollo), *Nasturtium officinalis* (berro), y *Raphanus sativus* (rábano) entre otras. La biosíntesis de estos compuestos en plantas deriva principalmente de aminoácidos y la diversidad de estructuras va unida a la de sus precursores:

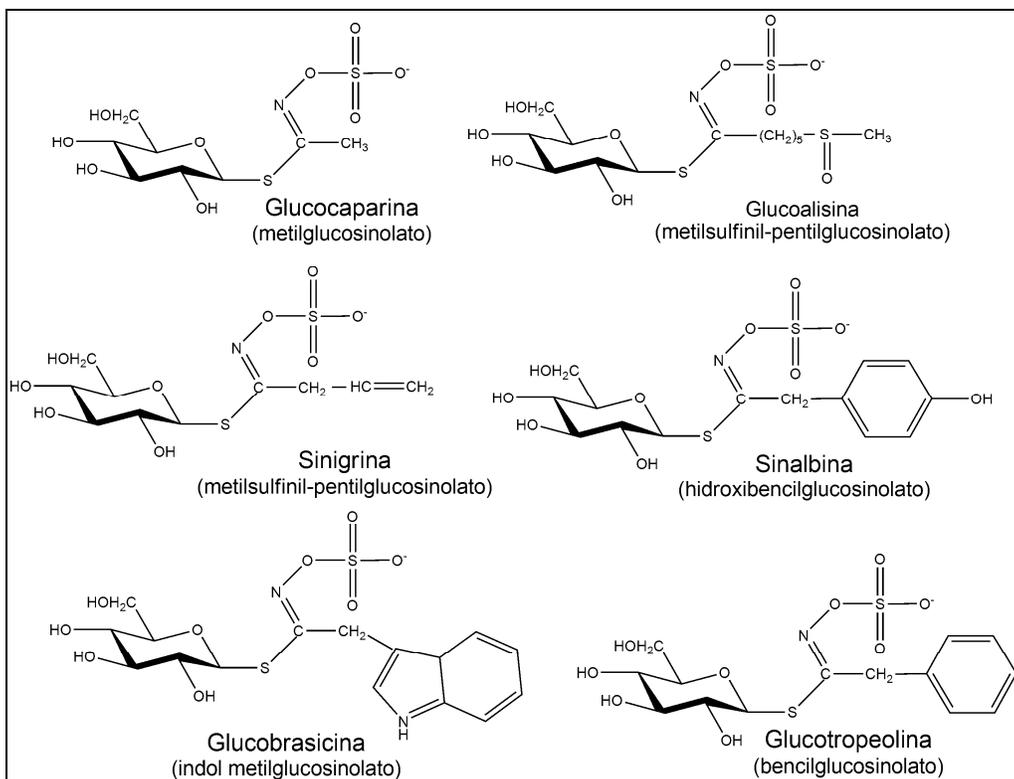
- tirosina: *p*-hidroxibencil-glucosinolato, en sinalbina (en mostaza blanca)
- fenilalanina: bencil-glucosinolato, en glucotropeolina (en mastuerzo)
- triptófano: 3-indolilmetil-glucosinolato, en glucobrasicina (en coles)
- homometionina: alil-glucosinolato, en sinigrina (en mostaza negra)
- homofenilalanina: fenetil-glucosinolato, en glucinasturtina (en berro)

Los glucosinolatos se formarían por descarboxilación de los aminoácidos en aldoximas que seguidamente incorporarían un átomo de azufre para luego unirse al azúcar (por el dador de glucosilos: UDP-glucosa) y una posterior sulfatación. Estas rutas metabólicas probablemente estén relacionadas con aquélla que utilizan las plantas para la síntesis de glicósidos cianogénicos.

Para su mejor estudio los glucosinolatos se puede clasificar según la naturaleza de sus radicales R en:

- alifáticos (gluconapina, progoitrina, gluconapoleiferina, glucobrasicanapina, sinigrina, glucoerucina, glucoaparina, glucoiberina, glucoiberiverina).
- aromáticos (gluconasturtina, glucotropeolina, glucosinalbina).
- indólicos (glucobrasicina, neoglucobrasicina).

En la figura 13 se representan algunas de las estructuras de los glucosinolatos más distribuidos:



**Figura 13.** Estructura de algunos glucosinolatos

La función que cumplen estos compuestos azufrados en las plantas está siendo aún dilucidada aunque se los ha vinculado con mecanismos de defensa, ya que se han estudiado varias de sus propiedades como agentes antibacterianos, repelentes, toxinas vegetales, protección contra parásitos y otras funciones. Es un ejemplo típico de compuesto repelente que actúa sobre los hábitos alimenticios atrayendo a insectos plaga de crucíferas (orugas y áfidos). La mariposa blanca de las coles (*Pieris brassicae*) y el pulgón del repollo (*Brevicoryne brassicae*), necesitan de estas sustancias para cumplir su ciclo utilizando las mismas como señales alimenticias o guías sensitivas, estimulantes de la oviposición, etc. Los isotiocianatos podrían tener un posible efecto neurotóxico por la ingestión sostenida de glucosinolatos con la dieta ya que reaccionarían con los grupos amino de la lisina modificando la estructura proteica a nivel de la tubulina de los axones (Hernández Triana, 1995). También se apunta al rol benéfico que juegan estos compuestos en los humanos, por ejemplo en la lucha contra algunos cánceres: el tiocianato e isotiocianato de

bencilo han demostrado, en laboratorio, inhibir el desarrollo de tumores en animales expuestos a agentes carcinógenos. La inclusión de hortalizas de la familia de las crucíferas parece ayudar a proteger contra cáncer rectal y de colon. La goitrina obtenida de especies de *Brassica* resulta de interés económico porque actúa como un compuesto goitrigénico o antitiroideo en los animales ya que inhibe la incorporación de yodo y la formación de la tiroxina. Los estudios más recientes sobre el rol de defensa en vegetales tal vez esté centrado en la obtención de variedades de colza (*Brassica napus*) con bajo contenido en glucosinolatos para que los residuos de extracción de aceite de sus semillas, ricos en proteína, puedan ser utilizados en alimentación animal.

#### *Mecanismo de defensa de la planta*

Las especies vegetales que contienen este tipo de compuestos presentan además, las enzimas específicas que los degradan, encontrándose ubicadas físicamente en compartimentos celulares diferentes; mientras que enzima y sustrato no se pongan en contacto no se producirá la reacción de hidrólisis.

Cuando un alimento posee cantidades considerables de este tipo de compuestos, el proceso de masticación hace posible el contacto del glucosinolato con la enzima desencadenando la hidrólisis y provocando los olores acre, que lo hacen menos palatable. Esto también ocurre durante el proceso de digestión llevado a cabo en el rumen de los rumiantes, provocando síntomas de intoxicación.

Los derivados de la hidrólisis (isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos y otros compuestos relacionados) pueden causar: irritación de mucosas, lesiones en hígado y riñón, inhibición del crecimiento y efectos antitiroideos (inhibiendo la absorción de yodo por parte de la glándula tiroidea que resulta en una disminución de la producción de la hormona tiroxina). Las aves de corral, porcinos y otros animales no rumiantes toleran por ejemplo hasta un 5-10 % de harina de colza en sus dietas y los síntomas de intoxicación en aves pueden incluir crecimiento deprimido, bocio, perosis, producción de huevos pobres en

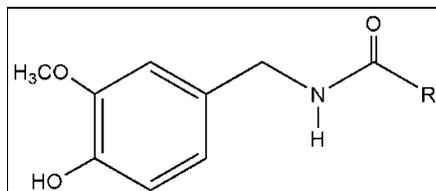
sabor, tiroides ampliada en embriones de pollo y daño hepático, mientras que en porcinos, conejos, corderos y bueyes los daños incluyen agrandamiento del hígado, disminución del crecimiento, bocio, aborto y muerte de fetos *in utero*.

## Otros grupos de compuestos nitrogenados

### Capsaicinoides

Una de las propiedades de los frutos del género *Capsicum* es su poder pungente o picante, atribuido a un conjunto de compuestos denominados capsaicinoides. Químicamente son vanilliamidas de los ácidos nonanoico y decanoico principalmente (Pastor de Abram, 2001: 110). El compuesto químico capsaicina o capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es el componente más activo de los pimientos picantes, el más abundante e importante y, aunque no tiene sabor, produce una intensa sensación picante y persistente calor. Es irritante para los mamíferos porque produce un fuerte efecto de ardor en la boca al ser ingerido el fruto. La capsaicina junto con otras sustancias relacionadas, se denominan en su conjunto capsaicinoides y son producto de rutas biosintéticas secundarias a partir de los aminoácidos fenilalanina, valina y leucina.

La capsaicina pura es un compuesto lipofílico, sólido cristalino parecido a la cera, poco volátil, inodoro, incoloro, muy soluble en alcohol etílico, insoluble en agua fría (Barragán, 2001: 171). Su estructura química básica corresponde a un tipo de amina exocíclica (Figura 14), aunque algunos autores los consideran dentro del grupo de los alcaloides y otros como amidas.



**Figura 14.** Estructura básica de los capsaicinoides

Con la aparición de nuevos métodos analíticos se pudo establecer que el poder pungente de los frutos maduros de los pimientos o ajíes (*Capsicum spp.*) se debe a la mezcla de los componentes: capsaicina, presente en un 75%, dihidrocapsaicina (DHC) en alrededor de un 20% y nordihidrocapsaicina (NDHC), la homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina (HC) en un rango del 4 % y otros en cantidades trazas (Pastor de Abram, 2001:111) siendo los dos primeros responsable en un 90% de la pungencia. Con respecto a la estructura química de los componentes citados, todos ellos tienen la estructura básica y lo que varía es el grupo R (Suzuki e Iwai, 1984: 284) como se detalla a continuación:

- para capsaicina, R= 8- metil – trans- 6 enoilo
- para la DHC, R= 8- metilnonanoilo
- para la NDHC, R= 7-metiloctanoilo
- para la homocapsaicina, R= 9-metil-deca-trans-7-enoilo
- para la homodihidrocapsaicina, R= 9-metildecanoilo

En cuanto a su distribución en el fruto de *Capsicum* los capsaicinoides se encuentran distribuidos en cutícula, epicarpio, placenta y semillas, en forma de gránulos cuando las concentraciones son altas; e intracelularmente en vacuolas de la placenta. Su contenido varía entre 0,003% y algo más del 1% de acuerdo a las diferentes variedades y el sabor picante se detecta a muy bajas concentraciones (desde  $1,5 \cdot 10^{-7}$ ).

El interés en estas sustancias se asocia a sus efectos sobre el sistema nervioso central y los beneficios nutricionales.

La presencia de capsaicinoides es lo que probablemente impide a animales herbívoros consumir los frutos de estas especies. Las aves en general no son sensibles a los capsaicinoides. Se usan como condimento alimenticio, en medicina contra el dolor y en los sprays defensivos contra delincuentes.

## Betalaínas

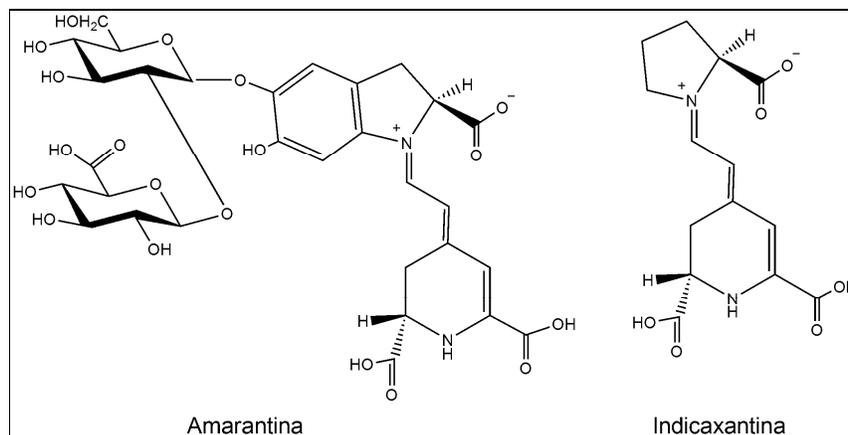
Las betalaínas son una clase de compuestos nitrogenados hidrosolubles que comprenden dos grupos de pigmentos: betacianinas (de color púrpura) y betaxantinas (de color amarillo).

En cuanto a su distribución en el reino vegetal se los encuentra en forma exclusiva en flores, frutos, órganos subterráneos coloreados y hojas de casi todas las familias de un único orden de plantas superiores, las *Centrospermae*, por lo que revisten interés taxonómico. Las especies de la familia *Caryophyllaceae* serían una excepción ya que los pigmentos rojizos hidrosolubles de estas especies corresponden a compuestos fenólicos, como ocurre en el clavel (*Dianthus caryophyllus*).

La especie *Bougainvillea glabra* conocida como Santa Rita (*Nyctaginaceae*) posee inflorescencias comúnmente cimosas y cada flor está acompañada por 1-3 brácteas o bracteolas subyacentes, cuya pigmentación corresponde a la presencia de betalaínas.

La amarantina (Figura 15) es una betacianina de color rojo-violáceo propia de especies de la familia *Amarantaceae* (presente en hojas de *Amaranthus caudatus* y *A. tricolor*) y de la familia *Chenopodiaceae* (en hojas de *Atriplex hortense* y *Chenopodium amaranticolor*).

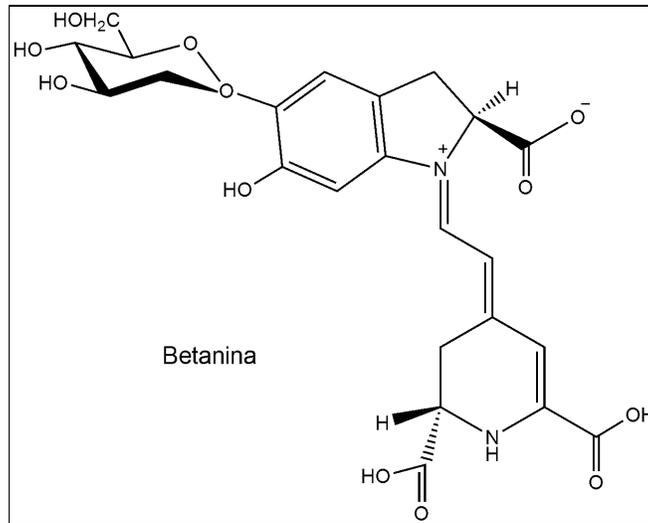
La indicaxantina (Figura 15) es el pigmento amarillo presente en flores y frutos de *Opuntia spp.* (*Cactaceae*) y corresponde al grupo de las betaxantinas. Algunos hongos no relacionados con este orden, contienen estos pigmentos en sus cuerpos fructíferos, (por ejemplo la musca-purpurina y la musca-aurina en *Amanita muscaria* e *Hygrocybe spp.*).



**Figura 15.** Estructura de algunas betalainas. Ejemplos

La síntesis de estos compuestos en algunos vegetales tiene su origen en el aminoácido 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA), que puede ciclarse (en cicloDOPA) o degradarse a ácido betalámico, compuesto precursor de ambos grupos de pigmentos. La condensación del ácido betalámico con distintas moléculas de aminoácidos o aminas, da lugar a la estructura de la betaxantina, mientras que la estructura de las betacianinas proviene de la condensación de la cicloDOPA con el ácido betalámico.

Se presentan muchas veces en forma de glicósidos cuyas geninas (porción no glucídica o aglicón) pueden ser switeriones di-hidroindólicos o di-hidropiránicos y la parte glucídica de las moléculas, azúcares como la glucosa (en betanina), la soforosa (en buganvilleína) y ácido glucurónico (en amarantina). Estos compuestos se descomponen fácilmente, por lo que resulta difícil aislarlos al estado puro, aunque se los puede separar sin problema por cromatografía. En raíces de *Beta vulgaris* (remolacha) se han encontrado mezclas de pigmentos de color púrpura, como la betanina e isobetanina (mezclas de pares epímeros) y otros de color amarillo, como la vulgaxantina. En la figura 16 se representa la estructura química del pigmento betanina (5- O-  $\beta$ -D- glucopiranosil-betanidina), extraído de frutos de *Portulaca grandiflora* y *Phytolacca americana*, que se utiliza como agente colorante en la industria de los alimentos.



**Figura 16.** Estructura del pigmento betanina (5- O-  $\beta$ -D- glucopiranosilbetanidina)

Algunas características de estos pigmentos, que los diferencia de otros pigmentos hidrosolubles son: su inestabilidad en soluciones ácidas calientes, propiedades espectrales y movilidad electroforética.

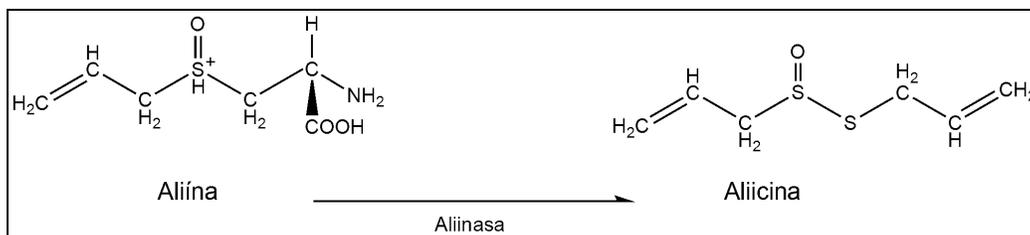
### Compuestos azufrados

Algunos compuestos carbonados sustituidos con átomos de azufre suelen ser responsables de particulares y variables sabores y olores en algunas plantas (desde deliciosos a nauseabundos). El metil-mercaptano ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ ) presente en raíces de *Raphanus sativus* (*Cruciferae*), aunque puede ser un componente de fracciones volátiles de algunas otras plantas en cantidades trazas, es el compuesto responsable del olor a repollo podrido. Este compuesto, como los demás compuestos azufrados, cumple funciones de defensa y es utilizado como pesticida y fungicida. La camalexina, compuesto alelopático que contiene azufre en su molécula, es sintetizado por algunas especies de *Brassicaceae* (= *Cruciferae*) ante el ataque de patógenos (Crawford *et al.*, 2000: 828).

Los compuestos azufrados suelen contener uno o dos átomos de azufre, como en el dimetil-disulfuro liberado de tejidos de muchas especies del género *Allium*. El ajo (*Allium sativum* L. de la familia *Liliaceae*) ha sido utilizado desde

siempre para los más variados fines. Luego de innumerables análisis químicos, los científicos llegaron a la conclusión de que la gran riqueza del ajo, se encuentra en sus componentes, especialmente en los derivados de azufre. Entre ellos, el más importante es sin dudas la aliicina (dialil-tiosulfonato) en estado fresco, responsable de la mayoría de las propiedades farmacológicas de la planta. Los compuestos azufrados, en general, suelen desempeñar una acción muy importante en la defensa de la planta contra insectos, hongos y bacterias existentes en la fauna y microbiota propias del suelo, además de ser responsables por un fuerte olor característico. La mayoría de los componentes azufrados no están presentes en las células intactas. Cuando un ajo es machacado, partido o cortado, varios de sus componentes azufrados son liberados, abandonan el interior de las células vegetales e interaccionan unos con otros para desencadenar una serie de reacciones químicas que generan un conjunto de componentes. Por ejemplo, la aliicina, en contacto con el aire se oxida dando disulfuro de alilo (1-7- ditio-octa- 4,5-dieno), componente mayoritario de la denominada “esencia de ajo”. A pesar de conocerse muchas de las propiedades de los compuestos azufrados, nos referiremos a la aliicina ya que no deja de suscitar el interés científico de muchos investigadores a lo largo del mundo.

La aliicina es el producto de la interacción entre una enzima, la aliinasa, y la molécula química denominada aliína o sulfóxido de S-alil- L- (+) cisteína, que se produce naturalmente en plantas tales como el ajo y la cebolla (Figura 17), luego de convertir rápidamente los intermediarios de dicha reacción (moléculas de ácido propen-sulfénico). La aliína es un compuesto inodoro que se ubica en el citosol; cuando la célula se rompe y se pone en contacto con la enzima que se sitúa en las vacuolas, tiene lugar la reacción anteriormente citada, resultando la formación de diferentes tiosulfatos y compuestos derivados relacionados con el ácido sulfónico.



**Figura 17.** *Compuestos azufrados en Liliaceae*

La descomposición de los sulfinatos tales como la aliicina puede ocurrir a través de diferentes vías metabólicas. Una de ellas combina tres moléculas de aliicina produciendo dos moléculas de ajoeno. A través de otras degradaciones no enzimáticas los tiosulfinatos se transforman en otros compuestos azufrados tales como los tiosulfinatos, cepenos, mono, di, tri y tetrasulfuros, tioles, tiofenos y anhídrido sulfuroso. Los extractos alcohólicos de ajo presentan productos de condensación de la aliicina (ajoenos) y también productos de cicloadición como las vinilditiínas (Bruneton, 2001: 208).

El ajo es un ingrediente utilizado en la medicina hace miles de años y sus virtudes farmacológicas no han pasado desapercibidas a lo largo de este tiempo. El vigor del ajo es el tema central de varias leyendas y la inspiración de muchos poetas clásicos y se hace mención del mismo hasta en la propia Biblia, cuando los israelitas lamentan el ajo dejado en Egipto cuando huyeron con Moisés. En varios registros jeroglíficos se muestra que el ajo fue dado a los esclavos que construían las pirámides para mantenerlos fuertes y saludables. También en Grecia antiguamente los atletas comían ajo crudo antes de las competencias y los soldados romanos comían la rama de la planta antes de ir a las batallas. De hecho, el ajo era el arma secreta del imperio Romano. Los centuriones comían ajo para prevenir enfermedades, especialmente las provocadas por las bacterias patógenas del aparato digestivo. Hipócrates, el padre de la medicina, recomendó el ajo para el tratamiento de infecciones, heridas, disturbios digestivos e inclusive la lepra. En la edad media el ajo fue muy utilizado para prevenir la propagación de la peste negra y también era un poderoso amuleto que espantaba los demonios y vampiros. Ya durante la Primera Guerra mundial, fue usado en la prevención de gangrenas cuando los hospitales de campaña estaban carentes de penicilina y sulfamida, por sus

propiedades antisépticas. Actualmente se sigue utilizando tanto por sus aplicaciones culinarias como por sus múltiples propiedades medicinales. De acuerdo con numerosos ensayos clínicos se puede considerar que el ajo es un fármaco eficaz en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis debido a su efecto positivo en la normalización de los valores de lípidos, la reducción moderada de la presión arterial y su actividad fibrinolítica y antiagregante plaquetaria. Las moléculas de aliicina pueden penetrar con facilidad las membranas biológicas y matar células (por ejemplo células cancerosas) pero su potencia es de corta vida, de ahí la dificultad de encontrar un sistema para enviarlas a un sitio específico; se relaciona con cierto tipo de cánceres y aún es tema de estudio.

A continuación se describen las diferentes actividades biológicas de los componentes azufrados del ajo:

Compuestos azufrados del ajo	Posible actividad biológica
Aliína Ajoeno (ajocisteína)	Hipotensora, hipoglucemiante Previene la formación de coágulos, ayuda a disolverlos. Anti-inflamatorio, vasodilatador, hipotensor, antibiótico.
Alicina y Tiosulfatos Alil mercaptano	Antibiótica, antifúngica, antiviral. Hipocolesterolemiante, previene la aterosclerosis, antitumoral, antidiabética, hipotensora.
Sulfuro de dialilo y afines	Hipocolesterolemiante. Aumento de la producción de enzimas desintoxicantes. Anticancerígeno. Previene los daños químicos del ADN.
S-alil-L- (+) cisteína y compuestos $\gamma$ -glutámico	Hipocolesterolemiantes, antioxidantes, quimioprotectores frente al cáncer.

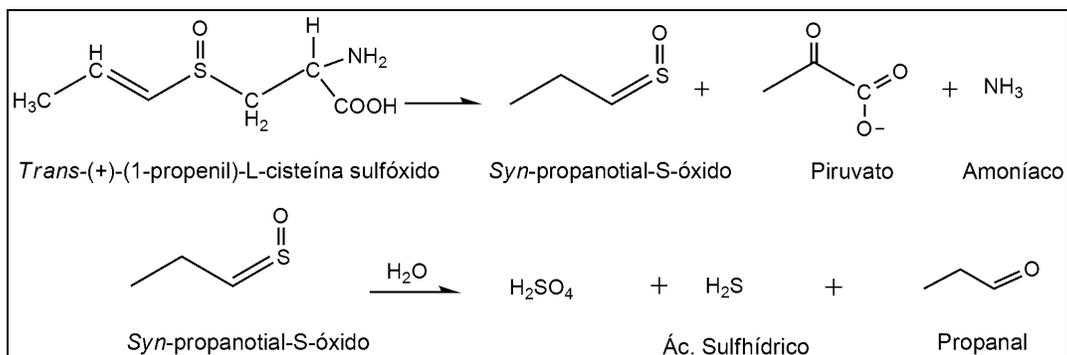
En Japón, luego de varios años de investigación, se ha desarrollado un producto denominado ajo negro, que se logra a través de un determinado proceso de cocción, con propiedades muy beneficiosas para la salud (10 veces más que las del ajo crudo común) y, lo que es también importante, sin el fuerte olor y sabor característicos. Uno de los atractivos de este producto, es que su

proceso de elaboración es totalmente natural, sin el uso o agregado de conservantes u otros aditivos químicos. Se conserva en buen estado durante un largo período, gracias a sus numerosas y consistentes cáscaras. La aliicina en el ajo negro conserva sus propiedades: ayuda al sistema inmunológico del cuerpo, es antioxidante, mantiene en buenos niveles la presión sanguínea y ayuda a eliminar lípidos y colesterol, previniendo de ese modo las enfermedades cardiovasculares. Se trata también de un energizante natural. Es consumido por deportistas y atletas de alto rendimiento. También combate el estrés y la depresión. A su vez tiene un sabor delicioso, un tanto dulce y de consistencia blanda, lo cual lo hace muy fácil de digerir, eliminando por completo el mal aliento posterior. Uno lo puede comer como si fuera un caramelo.

La cebolla (*Allium cepa* L.) también contiene compuestos azufrados (sulfóxido de trans-(+)-S-(1-propenil)-L-cisteína y otros derivados como la alqui y alcenil-cisteínas). Algunos estudios indican que los compuestos sulfurados que contiene la cebolla ejercen un efecto protector en el inicio de la carcinogénesis a través de un proceso de modulación enzimática en el metabolismo de las sustancias cancerígenas. Concretamente, los estudios realizados en humanos han mostrado un efecto protector frente al cáncer de esófago y estómago. Por otra parte, componentes derivados de las cebollas han mostrado poseer actividad antiasmática. La capacidad antiasmática y antiinflamatoria de las cebollas se debe en parte a la presencia de tiosulfatos. Además, la cebolla cruda ejerce un potente efecto antifúngico y antibacteriano. Tiene propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antiasmáticas y antidiabéticas. Reduce la hipertensión, la hiperglucemia y la hiperlipidosis, e inhibe la producción de plaquetas (al igual que la aspirina), lo cual puede ser bueno o malo de acuerdo al caso.

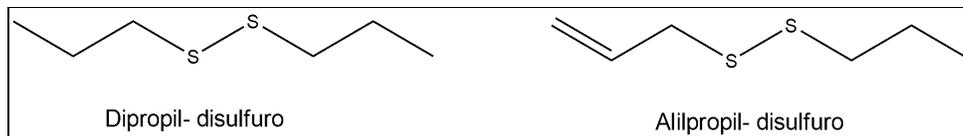
El mecanismo de liberación de estos compuestos es también a través de la acción de enzimas. Al ser cortados o machacados los tejidos, sus células se rompen y liberan una enzima (aliinasa) que reacciona con el azufre creando óxido de azufre, que a su vez es reorganizado por otras enzimas, esparciendo un gas llamado sulfóxido de tiopropanal o propanotial (gas lacrimógeno que es

su medio de defensa contra los depredadores). Este químico, al entrar en contacto con las glándulas lacrimales, envía señales de dolor a las neuronas sensoriales (responsables de convertir los estímulos externos en acciones internas), que devuelven la orden de limpiar el ojo con lágrimas. No se sabe con certeza por qué este propanotial es lacrimógeno, pero se cree es debido a que en contacto con el agua se descompone dando propanal, ácido sulfúrico y ácido sulfhídrico (Figura 18). Posiblemente es el ácido sulfúrico, un ácido muy fuerte, el que daña la membrana conjuntival y produce las lágrimas.



**Figura 18.** Productos de descomposición de compuestos azufrados en cebolla

El mal olor que deja la cebolla es debido a varias sustancias azufradas, el ácido sulfhídrico producido (que da olor a huevo podrido) y otros productos azufrados, como el dipropil-disulfuro o el alilpropil-disulfuro (Figura 19) que también colaboran con el mal aliento después de haber consumido cebolla.



**Figura 19.** Compuestos azufrados responsables del mal olor de la cebolla

## Bibliografía

- Barragán, V. (2001). "Capsaicina: Aplicaciones farmacológicas, limitaciones toxicológicas y desarrollo de nuevos fármacos". En: *Capsicum y sus derivados en Iberoamérica*. Ed. Loayza, I. Bolivia: CONACYT- CYTED.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica - Plantas Medicinales* (2ª edición). Zaragoza: Acribia.
- Crawford, N.; Kahn, M.; Leustek, T.; Long, S. (2000). "Chapter 16: Nitrogen and Sulfur". En Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp 786-849). Rockville, USA: American Society of Plants Physiologists.
- Harborne J. B. (1993). *Phytochemical Dictionary. A handbook of Bioactive compounds from Plants*. London- Washington DC: Taylor & Francis Ltd.
- Hernández Triana, M. (1995). "Glucosinolatos de la dieta, un posible factor causal de neuropatías con modificaciones del transporte axonal". *Rev. Cub. Aliment Nutr.*, 9 (1). En línea:  
<[http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol9\\_1\\_95/ali08195.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol9_1_95/ali08195.htm)>.
- Montero-Carmona W.; Jiménez, V. (2009). "Floración *in vitro* - revisión de literatura". *Biotecnología Vegetal* Vol. 9, No. 1: 3 - 18, enero - marzo, 2009.  
[http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc\\_view/1336-v9-n1-2009103-18.html](http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_view/1336-v9-n1-2009103-18.html)
- Pastor de Abram, A; Ferreira, F.; Morais H. (2001). Cap 3: "Metabolitos secundarios en especies del género *Capsicum*". En: *Capsicum y sus derivados en Iberoamérica*. Bolivia: Ed. Loayza I. CONACYT- CYTED:
- Suzuki, T.; Iwai, K. (1984). "Constituents of red pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *Capsicum* species". In: Brossi, A. (ed.). *The Alkaloids* (vol. 23, pp. 227-299,). New York: Academic Press.
- Tiburcio, A.; Figueras, X.; Campos, J. (1993). "Poliaminas" En: Azcón-Bieto, J y Talón, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. España: Interamericana - McGraw-Hill.

- Zagrobelny, M.; Bak, S; Rasmussen, A. V.; Jørgensen, B.; Naumann, C. M.; Lindberg Møller, B. (2004). "Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions". *Phytochemistry*, 65(3), 293-306.

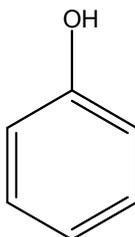
# CAPÍTULO 4

## COMPUESTOS FENÓLICOS

Sonia Z. Viña

### 1. Definición y propiedades generales

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol) (Figura 1). Los fenoles presentan comportamiento ácido dado que el oxígeno (-O) del grupo hidroxilo está fuertemente unido al anillo fenilo, mientras que el enlace relativamente débil entre el -O y el hidrógeno (-H) permite la disociación de un protón ( $H^+$ ) que puede ser liberado al medio, originando un ión fenolato cargado negativamente (Bowsher *et al.*, 2008: 364).



**Figura 1.** Grupo fenol característico de la estructura de los compuestos fenólicos

Actualmente, cerca de 10.000 compuestos fenólicos diferentes han sido identificados en la naturaleza y la mayoría de ellos son de origen vegetal.

Aunque el fenol como tal, libre, nunca ha sido encontrado en las plantas, su estructura puede usualmente reconocerse como componente de las moléculas correspondientes a los distintos compuestos fenólicos vegetales. Muchas sustancias fenólicas aparecen como derivados formados a partir de reacciones de condensación o adición.

Dado que una considerable proporción de esta clase de compuestos es sintetizada a partir de productos de la vía metabólica conocida como *vía fenilpropanoide*, los mismos son frecuentemente denominados *compuestos fenilpropanoides*. La estructura base de un compuesto fenilpropanoide corresponde a un anillo fenilo que presenta unida una cadena lateral de tres carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>).

Los llamados *polifenoles* son compuestos que presentan más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos bencénicos. El término puede generar cierta confusión dado que lleva a considerar que se trata de polímeros cuyas unidades sillares son moléculas derivadas del fenol, aunque por otra parte dichos compuestos también existen (Vermerris y Nicholson, 2006: 2). En este último caso sería más apropiado hablar de *polímeros fenólicos*, incluyendo dentro de este grupo a las *ligninas* y a los *taninos*.

Para los científicos que trabajan en el laboratorio con muestras vegetales y también para la industria de frutas y hortalizas procesadas, los compuestos fenólicos pueden acarrear ciertos inconvenientes.

En primer lugar, son fácilmente oxidables en contacto con el oxígeno del aire a partir de reacciones catalizadas enzimáticamente, formando posteriormente complejos de color pardo-amarronado (*melanoides*). Este fenómeno se conoce como pardeamiento enzimático y es muy común en ciertas frutas y hortalizas, que se pardean con facilidad cuando son cortadas y expuestas al aire (Figura 2).

Durante el procesamiento, los productos son cortados, ocasionando la pérdida de la compartimentalización celular y favoreciendo la interacción entre las enzimas y sus correspondientes sustratos.

La enzima polifenoloxidasas (PPO) cataliza la hidroxilación de monofenoles y la oxidación de los difenoles resultantes a quinonas, utilizando oxígeno como co-sustrato. Las quinonas polimerizan luego originando pigmentos de color pardo (Baldwin y Bai, 2011: 102). Otra enzima que también posibilita la ocurrencia de este tipo de pardeamiento es la enzima peroxidasa (POD), catalizando la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 2.** Pardeamiento enzimático en manzana

Para evitar la ocurrencia de este fenómeno y el aspecto desagradable que imparte a los productos vegetales procesados, en la industrialización de los mismos se lleva a cabo una inactivación por calor de las enzimas que lo propician, tratamiento conocido como *escaldado*. La acidificación del medio y el uso de agentes antioxidantes y quelantes, empleando por ejemplo ácido ascórbico, cítrico, málico, tartárico, succínico, constituyen también herramientas para reducir la incidencia del pardeamiento enzimático.

Sin embargo, en el procesamiento de otros productos como el té, el café, los dátiles o el cacao, es necesario que el fenómeno de pardeamiento enzimático se lleve a cabo para que los mismos desarrollen sus características sensoriales deseables (Gil *et al.*, 2005: 155).

Algunos compuestos fenólicos forman complejos con las proteínas e inhiben por lo tanto la actividad de ciertas enzimas. Los protocolos para el aislamiento de proteínas en el laboratorio incluyen pasos específicos necesarios para minimizar la interferencia de las sustancias fenólicas (Croteau *et al.*, 2000: 1250).

Es sabido también que los cultivos de tejidos vegetales pueden generar compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de callos (*callus*) y la

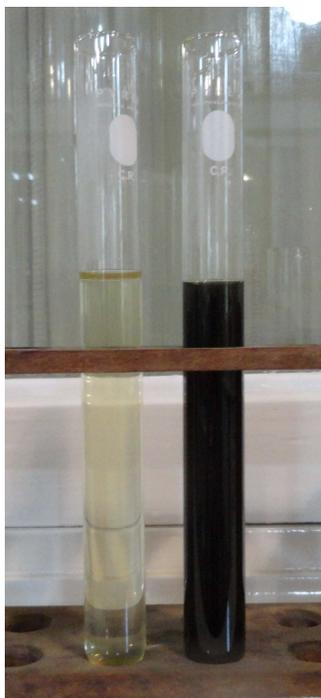
regeneración de plántulas. El cultivo de tejidos es una técnica que consiste básicamente en aislar una porción de la planta (*explanto*) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas necesarias para que las células expresen su potencial. Los callos se originan por la proliferación de células parenquimáticas que no presentan un patrón predecible de organización, se localizan en centros de actividad meristemática y frecuentemente aparecen en regiones cambiales rudimentarias, con zonas de diferenciación vascular. Una característica importante de los callos, desde un punto de vista funcional, es su crecimiento irregular, pudiendo potencialmente desarrollar raíces, brotes y embriones que forman plántulas (Lallana y Lallana, 2003: 81).

La mayoría de los compuestos fenólicos son hidrosolubles, solubles en solventes polares. La solubilidad en agua aumenta generalmente al aumentar el número de grupos hidroxilo. Además, en muchos casos los compuestos fenólicos se encuentran combinados con azúcares formando *glicósidos*<sup>1</sup>, favoreciendo la afinidad con el agua.

Si bien gran parte de los integrantes del grupo son hidrosolubles, hay algunas excepciones: la subclase de los *fenilpropenos* se caracteriza por ser soluble en solventes no polares mientras que la *lignina*, un polímero fenólico de estructura compleja, es una sustancia prácticamente insoluble, que se desarrolla como una impregnación de las paredes celulares vegetales.

Gran parte de los compuestos fenólicos se localizan en las vacuolas celulares, por su condición de ser compuestos hidrosolubles.

Otra propiedad común al grupo es que dan positiva la reacción de caracterización con  $\text{FeCl}_3$ , originando coloración verde, azul o negra según el compuesto involucrado. El  $\text{FeCl}_3$  es por lo tanto un reactivo general empleado para la detección de compuestos fenólicos en extractos vegetales (Figura 3).



**Figura 3.** *Reacción de identificación con  $\text{FeCl}_3$ . A la izquierda se observa un extracto vegetal conteniendo compuestos fenólicos y a la derecha el mismo extracto, al que se le han agregado gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  al 5%*

## 2. Funciones

Existe cada vez más evidencia que lleva a considerar que los aspectos funcionales de los compuestos fenólicos deben ser analizados tomando como referencia la distinción entre compuestos primarios y secundarios (Strack, 1997: 387).

Por ejemplo, es sabido que muchos metabolitos secundarios son valiosos vehículos para el almacenamiento y que son también elementos indispensables en ciertas estructuras anatómicas y morfológicas (Strack, 1997: 387). Pero hay asimismo un creciente conocimiento acerca de que los compuestos fenólicos son también de importancia ecológica fundamental para la supervivencia de las plantas. Si no contaran con los compuestos secundarios, muy probablemente las plantas no habrían evolucionado hacia tan amplio rango de especies

diferentes y no podrían haber sido capaces de mantener su coexistencia en los diferentes hábitats.

Las funciones biológicas de los compuestos fenólicos vegetales son muchas y muy variadas, comprendiendo desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, venenos y disuasorios alimentarios (algunos son tóxicos para mamíferos e insectos), compuestos alelopáticos, componentes estructurales y agentes antifúngicos y antimicrobianos. Varios fenólicos cumplen funciones específicas para la planta, como inhibidores de la germinación, protectores contra la radiación ultravioleta (UV), moléculas de señalización, entre otros roles.

Algunos compuestos fenólicos revisten gran importancia como materiales que contribuyen al soporte de las células. Forman parte integral de la estructura de las paredes celulares, principalmente los materiales poliméricos tales como ligninas, cutinas y suberinas, que actúan como soporte mecánico y barreras contra la invasión microbiana (Strack, 1997: 388).

La lignina, en particular, constituye un material estructural componente de las paredes celulares vegetales. Luego de la celulosa, es el segundo compuesto orgánico más abundante sobre la Tierra. Se ha postulado que su síntesis fue la que permitió a las plantas pasar desde un ambiente acuático a uno terrestre, durante su evolución. Como ya se ha mencionado anteriormente, constituye una impregnación de la pared celular que, junto con la celulosa, otorga rigidez a los tejidos, posibilita el crecimiento en altura y la conducción de agua a través de los elementos anatómicos de conducción: las traqueidas (en Gimnospermas) y los miembros de vasos leñosos (en Angiospermas) que conforman el xilema. Recordemos que estos elementos deben soportar, en muchos casos, elevadas presiones negativas. Desde otro punto de vista, la prácticamente nula digestibilidad de la lignina para la mayoría de los organismos la convierte en un efectivo disuasorio alimentario. Muchos herbívoros evitan el consumo de materiales lignificados simplemente porque se trata de productos altamente resistentes al ataque mecánico y enzimático.

En cuanto a las funciones biológicas que desempeñan, los compuestos fenólicos forman parte de los denominados *mecanismos químicos de defensa*

contra ciertos herbívoros y microorganismos patógenos. Pueden actuar como antibióticos y pesticidas naturales.

Los herbívoros reaccionan sensiblemente al contenido de compuestos fenólicos en las plantas. Los ácidos fenólicos simples, como así también los taninos complejos y las resinas fenólicas son eficientes disuasorios, como por ejemplo en las interacciones entre ciertas aves y plantas donde los fenólicos interfieren en el proceso de digestión a nivel de la microflora del ciego (Strack, 1997: 388).

Determinados fenólicos pueden acumularse como compuestos inducibles de bajo peso molecular denominados *fitoalexinas*, a modo de respuesta frente a un ataque microbiano. Las plantas son capaces de identificar o reconocer este ataque detectando moléculas que son sintetizadas por los parásitos, las que reciben el nombre de *elicitores*.

En base a lo expuesto, es de destacar que las fitoalexinas son de naturaleza post-infeccional y que, aunque pueden estar presentes de antemano en bajas concentraciones en la planta, se acumulan rápidamente como compuestos inducidos luego de un daño o un ataque. Contrariamente, las llamadas toxinas pre-infeccionales son compuestos constitutivos de las plantas. Están presentes en los tejidos sanos, en concentraciones lo suficientemente altas como para protegerlos de una posible infección (Strack, 1997: 389). En este caso suelen ser denominadas *fitotoxinas*.

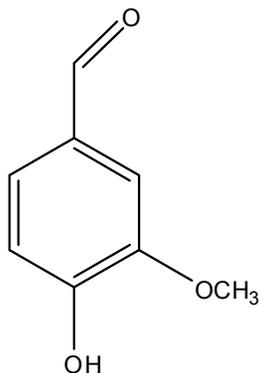
Dentro del grupo de los compuestos fenólicos que actúan como fitoalexinas y/o fitotoxinas, las hidroxycumarinas y los conjugados hidroxycinamatos revisten importancia. Como ya se ha mencionado anteriormente, contribuyen a los mecanismos de resistencia a las enfermedades en las plantas.

Los compuestos fenólicos pueden acumularse en respuesta a muy diversos factores de estrés. Hay una fuerte evidencia de que la radiación UV causante de daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) induce la acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos capaces de absorber radiación comprendida en dicha franja del espectro electromagnético (entre longitudes de onda que abarcan los 200 y 400 nm). Esto ocurre principalmente en los tejidos epidérmicos de las plantas.

Los flavonoides, especialmente las antocianinas, pueden aparecer transitoriamente durante la ontogenia vegetal. Esto puede observarse en plántulas y hojas jóvenes y sugiere, al menos como especulación, que podrían desempeñar funciones fisiológicas relacionadas con la percepción de la luz (Strack, 1997: 388).

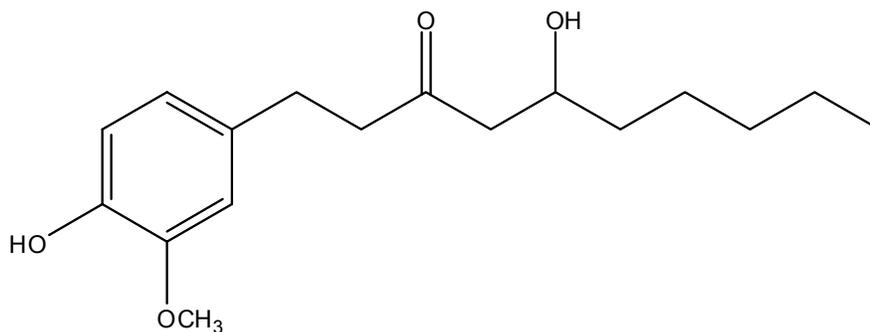
Dado que algunos cumplen roles como pigmentos y co-pigmentos y otros contribuyen a ciertos aromas y sabores característicos de algunas especies vegetales, determinados compuestos fenólicos actúan como atrayentes de agentes polinizadores y dispersores de frutos y semillas. La función más significativa de los pigmentos flavonoides (un grupo muy numeroso de compuestos fenólicos), especialmente las antocianinas junto con las flavonas y flavonoles como co-pigmentos, es su contribución a la coloración de órganos vegetales tales como flores y frutos. De allí surge su relevancia en los procesos de polinización y dispersión de semillas.

Los derivados volátiles del ácido benzoico están presentes en las esencias florales de más de un centenar de especies pertenecientes a 30 familias botánicas diferentes y ellos actúan como atrayentes de polinizadores. Por ejemplo, la vainillina (Figura 4), es un componente de esencias presente en las flores de las orquídeas *Vanilla planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitiensis* (Bowsher, et al., 2008: 364). Su *flavor*<sup>2</sup> contribuye también a la dispersión de frutos de varias especies.



**Figura 4.** Estructura química de la vainillina o 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído

Los sabores y aromas producidos por los compuestos fenólicos comprenden desde los placenteros y agradables correspondientes a las vainillinas, a los pungentes del jengibre (gingeroles) (Figura 5), los pimientos (capsaicina<sup>3</sup>) y la astringencia<sup>4</sup> que aportan los taninos.



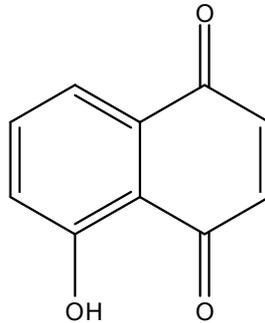
**Figura 5.** Estructura química del compuesto gingerol

Los sabores amargos tienden a repeler a la mayoría de los herbívoros y la astringencia afecta marcadamente la palatabilidad. Por ejemplo, el ganado evitará consumir plantas que contengan un alto tenor de taninos.

Algunos de los fenólicos aromáticos se emplean como agentes saborizantes en alimentos, tales como el eugenol presente en el clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*), el cinamaldehído de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y la miristicina de la nuez moscada (*Myristica fragans*) (Bowsher *et al.*, 2008: 364). Cabe señalar sin embargo, que la mayoría de los componentes de los aceites esenciales extraídos a partir de especies aromáticas pertenecen al grupo de los terpenoides, que serán analizados más adelante en este libro (Capítulo 5).

En ciertas circunstancias, algunos compuestos fenólicos son sintetizados por determinadas especies vegetales y pueden afectar el crecimiento de otras plantas que competirían por espacio físico, luz, agua y nutrientes. Los compuestos fenólicos pueden influir en la competencia entre plantas y pueden por lo tanto comportarse como *sustancias alelopáticas*. Existen compuestos fenólicos hidrosolubles, tóxicos, tales como fenoles simples (por ejemplo: hidroquinona), hidroxibenzoatos e hidroxicinamatos que actúan de la manera descrita.

Una toxina conocida aislada a partir de especies del género *Juglans* es la juglona (5-hidroxi-naftoquinona) (Figura 6), que resulta altamente tóxica para un amplio grupo de especies vegetales. En la planta se la encuentra como un glicósido, que carece de toxicidad pero que se activa por hidrólisis y oxidación luego de su liberación a partir de las hojas, cuando éstas alcanzan el suelo.



**Figura 6.** Estructura química de la juglona

Existen también compuestos fenólicos presentes en exudados de raíces, que pueden actuar como toxinas. La especie *Parthenium argentatum* de la familia *Asteraceae*, conocida como guayule y productora de un caucho natural, exuda cinamato. Este compuesto resulta tóxico para la misma planta, ocasionando un fenómeno de autotoxicidad. El cinamato puede reducir la competencia entre miembros de la misma especie o de especies diferentes (Strack, 1997: 389).

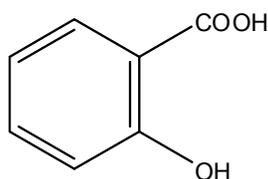
Muchos fenólicos simples están involucrados en las interacciones bioquímicas entre plantas. Algunos otros ejemplos comprenden a los ácidos siríngico, cafeico y ferúlico, que por constituir compuestos solubles en agua son rápidamente liberados a partir de las hojas y raíces al suelo circundante, donde actúan como inhibidores de la germinación. Estos compuestos alelopáticos se acumulan en especies como *Pteridium aquilinum*. Llamativamente hay también cierta evidencia de auto-envenenamiento, dado que esta especie de helecho puede llegar a degenerar luego de varios años de crecer en el mismo terreno (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Los hallazgos más recientes, referidos a la función de los compuestos fenólicos (y más específicamente de los flavonoides) se relacionan con el rol que

desempeñan como moléculas señal (o como sustancias de reconocimiento de hospedantes) en la interacción entre bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico y ciertos miembros de la familia Leguminosas (*Fabaceae*). Estas plantas exudan flavonoides que actúan selectivamente en los rizobios como inductores de la transcripción de genes asociados a la nodulación, activando ciertas proteínas reguladoras.

La gran mayoría de los ejemplos mencionados constituyen claras ilustraciones de las *funciones ecológicas* que los compuestos fenólicos pueden llevar a cabo.

Por otra parte el ácido salicílico (Figura 7), un representante del grupo de los fenólicos, actúa como un regulador clave en el desarrollo vegetal y en la activación de respuestas defensivas por parte de las plantas. Es sabido que este compuesto se presenta como una molécula señal ampliamente distribuida para la inducción sistémica de genes que expresan proteínas relacionadas con la resistencia y con la respuesta oxidativa que precede a la muerte celular, durante el ataque de patógenos (Bowsheer *et al.*, 2008: 365), entre otras funciones muy importantes.



**Figura 7.** Estructura química del ácido salicílico

### 3. Clasificación

Existen diversos criterios para clasificar a los compuestos fenólicos. En el presente capítulo se dará una versión resumida de los distintos grupos que comprenden. No se pretende dar un detalle completo de las numerosas clases

que abarca este grupo tan diverso, sino sólo señalar algunos de los ejemplos más relevantes desde nuestro punto de vista.

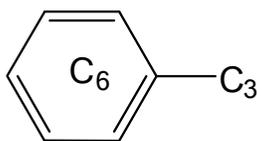
Se describirán a continuación las principales características de los grupos más abundantes de compuestos fenólicos vegetales, entre ellos: fenólicos simples, flavonoides y estilbenos, ligninas, taninos.

### 3.1. Compuestos fenólicos simples

Los fenólicos simples abarcan a su vez tres grupos de relevancia: los fenilpropanoides simples, las cumarinas y los derivados del ácido benzoico.

#### 3.1.1. Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides simples comparten la estructura fundamental fenilpropanoide, portando una cadena lateral, lineal, de tres átomos de carbono que se encuentra unida al anillo fenilo constituido por seis carbonos (Figura 8). Los fenilpropanoides representan las unidades centrales que componen a prácticamente todos los compuestos fenólicos.



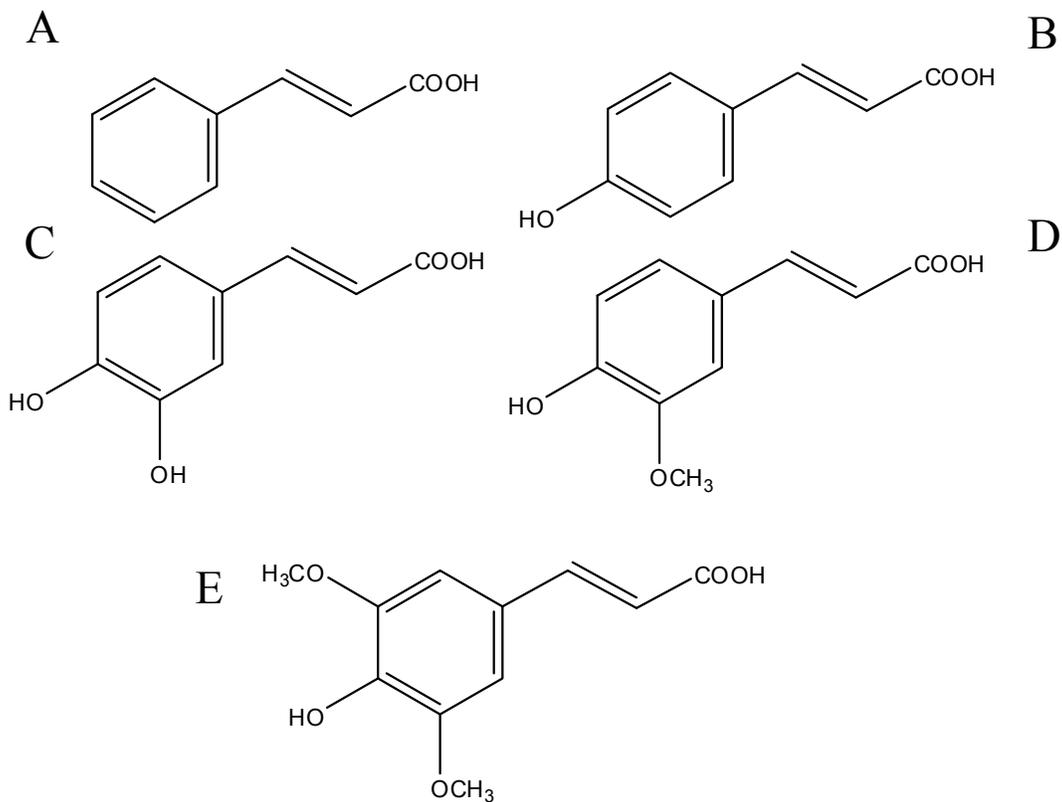
**Figura 8.** Estructura general de los compuestos fenilpropanoides

Algunos ejemplos comprendidos dentro de este grupo corresponden a los ácidos: cinámico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Figura 9 A-E).

Los aniones cumarato, cafeato, ferulato y sinapato reciben colectivamente el nombre de *hidroxicinamatos* y se acumulan frecuentemente en las plantas como derivados conjugados<sup>5</sup>, manteniendo la estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Los principales

tipos de conjugados son los ésteres y amidas. Los glicósidos aparecen menos frecuentemente.

Ciertas formas insolubles de los hidroxicinamatos se presentan unidas a polímeros tales como cutinas y suberinas, ligninas o polisacáridos en las paredes celulares (Strack, 1997: 397).



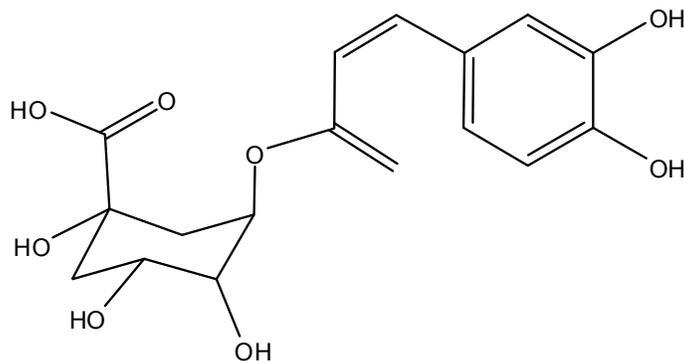
**Figura 9.** Estructuras químicas de los ácidos: cinámico (A), *p*-cumárico (B), cafeico (C), ferúlico (D) y sinápico (E)

Los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico se acumulan frecuentemente como sus respectivos ésteres tartrato: los ácidos cutárico, caftárico y fertárico (Crozier *et al.*, 2006: 12).

Asimismo, muchas frutas y hortalizas presentan en su composición ciertos derivados del ácido cafeico conjugado con el ácido quínico, entre ellos los ácidos clorogénicos. Según Crozier *et al.* (2006: 12) los ácidos clorogénicos

representan aproximadamente un 10% de las hojas de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y de las semillas procesadas del café robusta (*Coffea canephora*), una especie de café originaria del África occidental.

El ácido clorogénico (Figura 10) actúa como antioxidante e inhibidor de carcinógenos, sin embargo su presencia en semillas oleaginosas y en granos puede acarrear problemas nutricionales. Cuando se encuentra en concentraciones comprendidas entre 2-4% en productos que se incorporan a las raciones para el ganado, tales como la harina de girasol remanente de la extracción de aceite, puede afectar la actividad de enzimas hidrolíticas e interferir en la digestión y asimilación de proteínas, aminoácidos y minerales. Tales inconvenientes buscan resolverse mediante el desarrollo y selección de variedades de girasol con bajo contenido de ácido clorogénico o bien ensayando tecnologías que permitan remover dicho compuesto a partir de la harina de girasol (Makkar *et al.*, 2007: 89). Las semillas de colza y sus productos derivados pueden presentar inconvenientes similares.



**Figura 10.** Estructura química del ácido clorogénico o ácido 3-O-cafeoilquínico

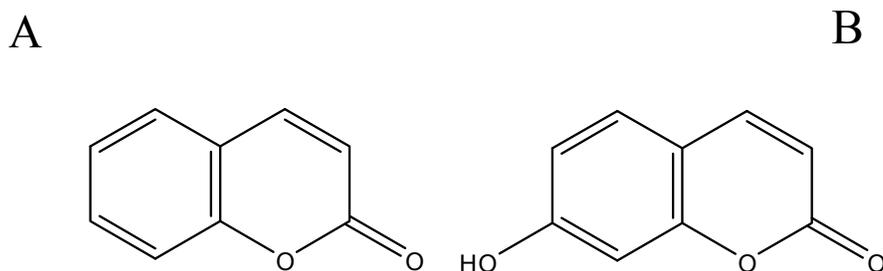
Se ha señalado cierta correlación entre la distribución de los conjugados hidroxicinamatos y el ordenamiento y clasificación sistemática de las especies vegetales. Por ejemplo, los clorogenatos son comunes en las familias

*Asteraceae*, *Solanaceae* y *Rubiaceae*. Otro ejemplo es la ocurrencia característica de un éster sinapato, la *sinapilcolina* (sinapina), en *Brassicaceae*. Como se ha referido previamente, compuestos fenilpropanoides simples tales como los ácidos cafeico y ferúlico se encuentran en el suelo en cantidades significativas y se ha evaluado experimentalmente que son capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de diversas plantas.

### 3.1.2. Cumarinas e hidroxycumarinas

Este grupo de compuestos fenólicos simples también presentan el esqueleto básico fenilpropanoide, pero difieren de los fenilpropanoides simples en que la cadena lateral forma una estructura cíclica, un anillo. Corresponden a lactonas<sup>6</sup> fenilpropanoides.

Algunos ejemplos que pueden mencionarse incluyen a la cumarina, la umbeliferona (7-hidroxycumarina) (Figura 11 A y B), la esculetina (6,7-dihidroxycumarina) y la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina). Se ha mencionado que los dos últimos compuestos se originarían por adición de sustituyentes oxigenados al anillo aromático de la umbeliferona (Sollai *et al.*, 2008: 2187).

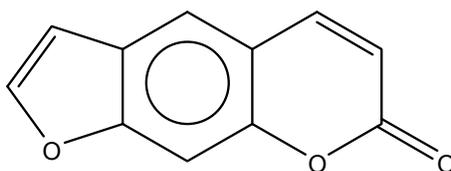


**Figura 11.** Estructura química de la cumarina (A) y de la 7-hidroxycumarina o umbeliferona (B)

Dentro de las cumarinas policíclicas suele describirse como un subgrupo al de las *furanocumarinas*. Dichos compuestos contienen un anillo furano unido al grupo fenilo, como puede observarse en la estructura del psoraleno (Figura 12),

un representante de este grupo de sustancias. Otros ejemplos de furanocumarinas son el metoxipsoraleno, la xantotoxina, el bergapteno y la esfondina (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Son particularmente tóxicos cuando resultan activados por la incidencia de luz ultravioleta A<sup>7</sup>. Una vez activados, adquieren la propiedad de unirse a las bases nitrogenadas derivadas de la pirimidina (citosina y timina) que componen los nucleótidos del ADN. Este fenómeno produce el bloqueo de la transcripción a ácido ribonucleico (ARN) y de los mecanismos de reparación del ADN, conduciendo en última instancia a la muerte de las células (Taiz y Zeiger, 2010: 377).



**Figura 12.** Estructura química del psoraleno, una furanocumarina

Esta clase de compuestos son especialmente abundantes en plantas de la familia *Apiaceae* (*Umbelliferae*). Algunas especies vegetales que sintetizan furanocumarinas son el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*), la chirivía (*Pastinaca sativa*) y la maleza *Heracleum mantegazzianum*.

En ciertas ocasiones, las furanocumarinas activadas son causantes de severas reacciones en la piel. Por ejemplo, el personal dedicado a la cosecha de plantas de apio, en especial de ciertos materiales que tienen la capacidad de acumular furanocumarinas en altas concentraciones, puede presentar reacciones adversas frente a la presencia de estas sustancias si no se toman las medidas de precaución necesarias.

Algunas furanocumarinas son compuestos constitutivos de las plantas, mientras que otras se forman después de una infección o por efecto del daño mecánico, es decir que se trata en este caso de fitoalexinas.

Se ha mencionado que en el apio, la concentración de estos compuestos puede incrementarse considerablemente si la planta sufre algún tipo de estrés o es afectada por patógenos (Taiz y Zeiger, 2010: 377).

Según Bowsher *et al.* (2008: 364), existen algunas orugas que son capaces de alimentarse de plantas que contienen furanocumarinas. La estrategia desarrollada para protegerse de dichos compuestos consiste en este caso en enrollarse ellas mismas en el interior de las hojas, a fin de resguardarse de la luz solar hasta que la digestión haya sido completada.

### 3.1.3. Derivados del ácido benzoico

Los compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico presentan una estructura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, como se observa en las estructuras químicas de la vainillina (Figura 4) y del ácido salicílico (Figura 7).

El nombre del ácido salicílico deriva de *Salix* dado que fue aislado por primera vez a partir de este género botánico. Ya ha sido mencionado que el ácido salicílico funciona como una molécula señal que activa la expresión de enzimas que participan en varios mecanismos de defensa. Muchas plantas muestran un incremento en el contenido de ácido salicílico luego de ser infectadas por virus, hongos, ser expuestas a la radiación UV o a estrés por ozono (O<sub>3</sub>) (Heldt, 2005: 439).

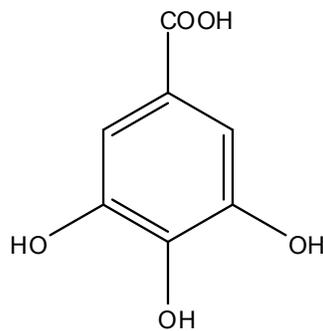
El ácido salicílico está directamente involucrado en el crecimiento vegetal, en la termogénesis<sup>8</sup>, la inducción floral y la captura de iones. Afecta la biosíntesis de etileno, el movimiento estomático y puede revertir la acción del ácido abscísico sobre la abscisión foliar. Otros roles asignados a este compuesto tienen que ver con el incremento en los niveles de clorofila y pigmentos carotenoides, la tasa fotosintética y las variaciones en la actividad de algunas enzimas celulares (Hayat *et al.*, 2007: 1).

Se ha comprobado que una dosis determinada de ácido salicílico puede proveer a una planta de una mejor protección contra patógenos. Este principio ha sido usado comercialmente: un análogo del ácido salicílico puede ser

aplicado en pulverizaciones sobre plantas de trigo para prevenir la infección del mildew (Heldt, 2005: 439).

Como integrantes de este grupo también se menciona a los ácidos gálico (Figura 13) y a su derivado, el ácido elágico. Estos últimos compuestos (también designados como ácidos fenólicos e hidroxibenzoatos) son componentes de una clase de taninos, los llamados *taninos hidrolizables*.

La denominación dada al ácido gálico deriva del término francés *galle*, que significa “agalla”.



**Figura 13.** Estructura química del ácido gálico, componente de taninos hidrolizables

Las *agallas* o *cecidias* (Figura 14) corresponden a estructuras anormales de los tejidos u órganos vegetales, generadas como respuesta a la presencia o actividad de un organismo inductor (generalmente un insecto). La planta reacciona básicamente con un desarrollo anormal o patológico de sus células, tejidos u órganos. El agente inductor o cecidógeno utiliza la agalla como un medio para nutrirse y protegerse del medio ambiente y de sus enemigos naturales.

La característica distintiva de las agallas, que las diferencia de otras anomalías que pueden presentarse en los tejidos vegetales, es que la reacción de la planta ante el ataque del organismo foráneo involucra procesos de hiperplasia (multiplicación anormal de las células) e hipertrofia (crecimiento anormal de las mismas) (Nieves-Aldrey, 1998: 4).



**Figura 14.** *Agallas en tejidos vegetales*

Se conocen más de 13.000 especies de insectos inductores de agallas. Más del 90% atacan a plantas Angiospermas. Los mismos incluyen insectos picadores (tisanópteros, hemípteros y especialmente homópteros) y representantes de otros órdenes de insectos (coleópteros, lepidópteros, dípteros e himenópteros). En el primer caso, la formación de agallas está relacionada básicamente con la alimentación; para los insectos del segundo grupo, las agallas se desarrollan en las plantas consecuentemente con la oviposición y el desarrollo de las larvas.

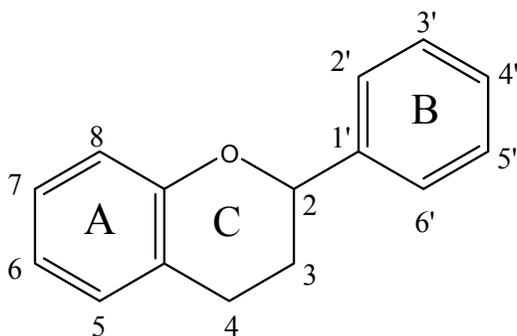
Como ya ha sido mencionado previamente, tanto el ácido gálico como su dímero, el ácido elágico, son componentes de los taninos hidrolizables, y éstos son precisamente compuestos de defensa inducidos en agallas vegetales.

### **3.2. Flavonoides y estilbenos**

#### *3.2.1. Flavonoides*

Los flavonoides son un grupo muy diverso de compuestos fenólicos, de los cuales se conocen más de 6.000 estructuras diferentes.

El esqueleto común a todos los integrantes del grupo consta de dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que por lo común forma un tercer ciclo (anillo C) (Figura 15).



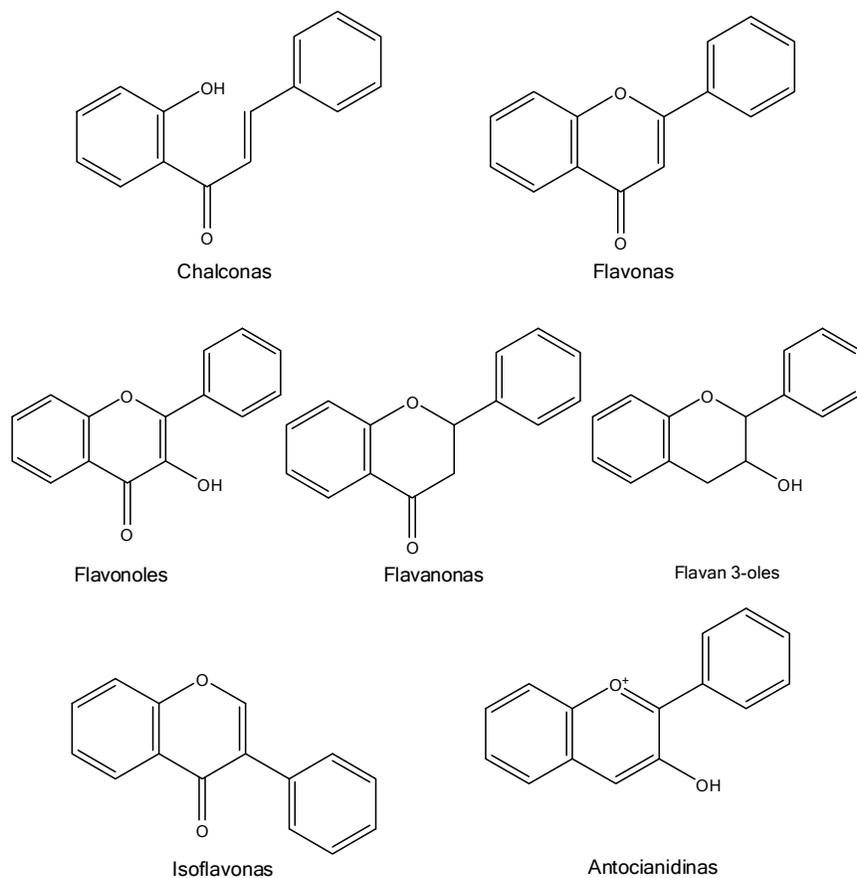
**Figura 15.** Estructura general de los compuestos flavonoides

Dependiendo del grado de oxidación del anillo central, se obtienen las diferentes estructuras de cada compuesto flavonoide en particular.

Dentro de las principales clases de flavonoides están comprendidos: chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas. Asimismo los compuestos flavonoides incluyen a las unidades monoméricas de los denominados *taninos condensados*, las proantocianidinas o proantocianidoles. Las estructuras básicas correspondientes a cada uno de estos grupos se muestran en la Figura 16.

Los pigmentos flavonoides son responsables de gran parte de las coloraciones de las flores de Angiospermas, junto con los carotenoides (ver Capítulo 5).

A diferencia de los carotenoides, los flavonoides son compuestos que presentan afinidad con el agua, se acumulan en las vacuolas celulares y otorgan asimismo una mayor variedad de colores, comprendidos desde el rojo carmesí al azul y violeta, rosado, blanco y amarillo.



**Figura 16.** Estructuras químicas de las distintas clases de flavonoides

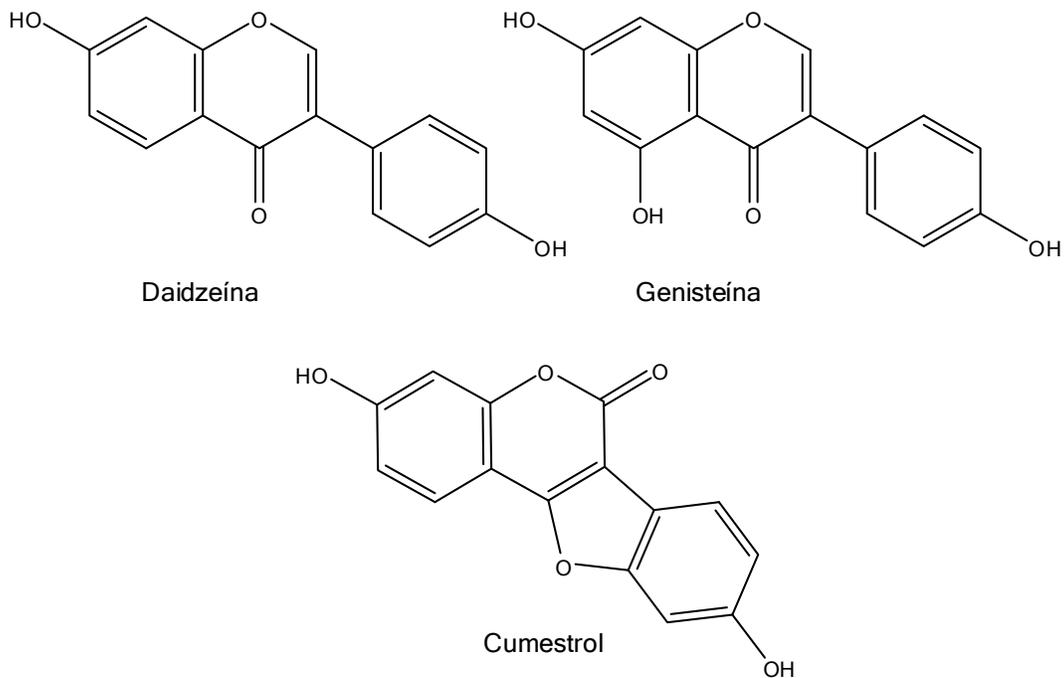
A continuación, se reseñan brevemente algunas características distintivas de cada grupo de flavonoides:

- Chalconas y flavanonas. En el caso de las chalconas, el puente de tres carbonos no forma la estructura cíclica mencionada anteriormente y que da lugar al anillo C.

Las flavanonas son isómeros de las chalconas pero puede observarse en su estructura la formación del anillo C. No existe el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 de dicho anillo. Esta última característica las distingue de las flavonas, que sí presentan el enlace C=C dentro del anillo central.

- Isoflavonas. Las isoflavonas son isómeros de las flavonas, siendo la diferencia entre ambos grupos la posición del anillo B: mientras que en las flavonas se encuentra unido al C<sub>2</sub>, en las isoflavonas aparece en la posición C<sub>3</sub>. Se halló que las isoflavonas son casi exclusivas de la familia *Fabaceae* (Leguminosas), con altas concentraciones en especies como la soja (*Glycine max*).

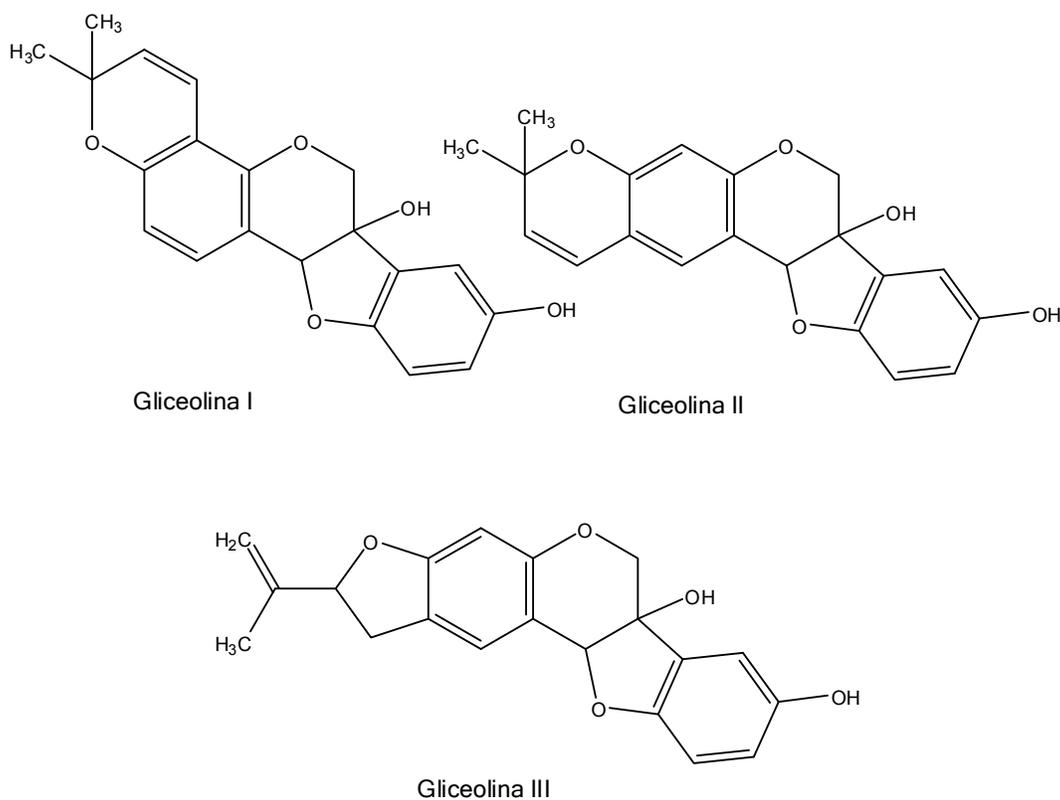
Comprenden un grupo de sustancias con fuerte actividad estrogénica. Son también abundantes en algunos cultivares de tréboles y alfalfa, habiéndose señalado como causantes de infertilidad en ganado ovino. La explicación reside en la similitud de su estructura con la de ciertas hormonas esteroideas (principalmente el estradiol, que anula la ovulación) que hace que las isoflavonas sean capaces de unirse a los receptores de los estrógenos. Las isoflavonas daidzeína, genisteína y el cumestrol (Figura 17) presentes en dichas especies vegetales tienen suficiente actividad estrogénica como para afectar en distinto grado la reproducción de animales en pastoreo. Han sido llamados *fitoestrógenos*.



**Figura 17.** Estructuras químicas de las isoflavonas daidzeína, genisteína y cumestrol

El cumestrol, además de la actividad señalada, es considerado una fitoalexina de la soja, un compuesto antimicrobiano de bajo peso molecular que es sintetizado *de novo* y se acumula en la planta luego de la exposición a microorganismos.

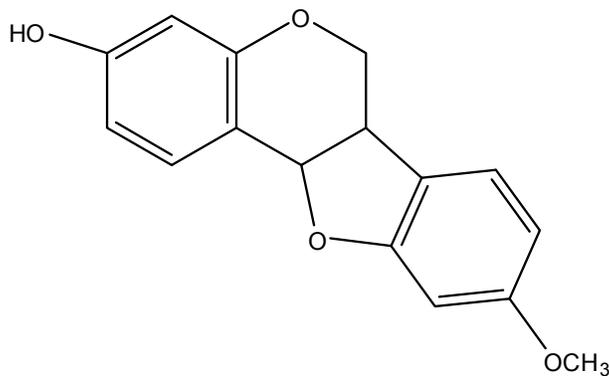
Gran parte de las investigaciones referidas a la defensa de la planta de soja se han enfocado en las fitoalexinas gliceolina I, II y III (Figura 18). Se ha llegado a demostrar que la gliceolina previene la acumulación de aflatoxina B1 en cultivos del hongo *Aspergillus flavus* (Boué *et al.*, 2000: 2167). Las concentraciones de este compuesto pueden incrementarse con la aplicación de ciertos herbicidas sobre la planta de soja. Investigaciones previas se han referido también a los mecanismos desencadenados en las plantas de soja como respuesta a la incidencia del hongo *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Boué *et al.*, 2000: 2168).



**Figura 18.** Estructuras químicas de las fitoalexinas de soja: gliceolinas I, II y III

La alfalfa cultivada (*Medicago sativa* L.) es el hospedante de diversos hongos patógenos. Varios trabajos de investigación indican que la acumulación de fitoalexinas del grupo de las isoflavonas, con acción antimicrobiana, constituye un factor importante de resistencia a dichos patógenos.

La medicarpina (Figura 19) presente en ciertos cultivares de alfalfa, un derivado de las isoflavonas perteneciente a la clase de los *pterocarpanos*, ha sido mencionado en este caso como una de las principales fitoalexinas en esta especie (Dalkin *et al.*, 1990: 440).



**Figura 19.** Estructura química de la medicarpina, una fitoalexina presente en alfalfa

- Flavonas y flavonoles. Los flavonoles se distinguen de las flavonas por presentar un grupo hidroxilo unido al C<sub>3</sub> en el anillo C.

Estudios fitoquímicos indican que la simple diferencia de estructuras entre flavonas y flavonoles es de considerable importancia filogenética, siendo las flavonas más frecuentes que los flavonoles en las flores de las familias botánicas más evolucionadas.

Las flavonas y flavonoles presentan coloración que puede variar entre amarillo pálido y blanco. En algunos casos se trata de compuestos incoloros.

En las flores actúan generalmente como co-pigmentos de las antocianinas. El fenómeno de copigmentación se interpreta como un mecanismo intermolecular entre las antocianinas y el co-pigmento, estableciéndose puentes de hidrógeno entre ambos.

Las flavonas y flavonoles están también muy difundidos en las hojas. Presentan absorción máxima en la región UV del espectro electromagnético. Como pigmentos protectores, impiden o reducen el daño que produce la radiación UV sobre las plantas.

Dado que las flavonas y flavonoles generalmente absorben radiación de menor longitud de onda que otras clases de flavonoides, como por ejemplo las antocianinas, en muchos casos no son visibles al ojo humano.

Sin embargo, insectos como las abejas cuya visión abarca parte del rango ultravioleta del espectro electromagnético pueden responder al estímulo de las flavonas y flavonoles como atrayentes.

Se ha comprobado que frecuentemente las flavonas y flavonoles se disponen en un patrón simétrico de cintas o líneas, puntos, manchas o círculos concéntricos llamado “guías del néctar”. Se piensa que las guías del néctar ayudan a indicar a los insectos la localización del néctar y del polen (Taiz y Zeiger, 1998: 365).

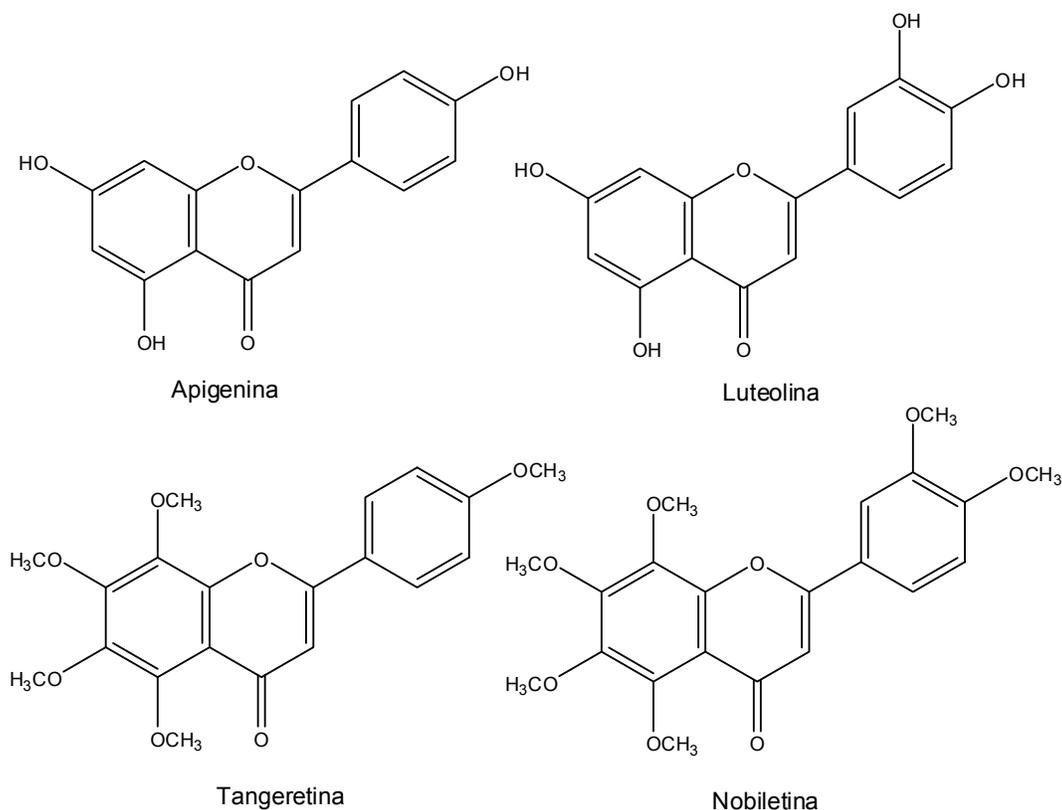
Como se ha indicado anteriormente, ciertas flavonas y flavonoles son emitidos como sustancias señal por raíces de Leguminosas (*Fabaceae*) a fin de inducir en bacterias del grupo de los rizobios la expresión de genes requeridos para la nodulación.

Entre los ejemplos correspondientes a flavonas pueden mencionarse a apigenina y luteolina, presentes en apio, perejil y otras plantas herbáceas y a tangeretina y nobiletina, compuestos polimetoxilados presentes en especies de *Citrus* (Figura 20).

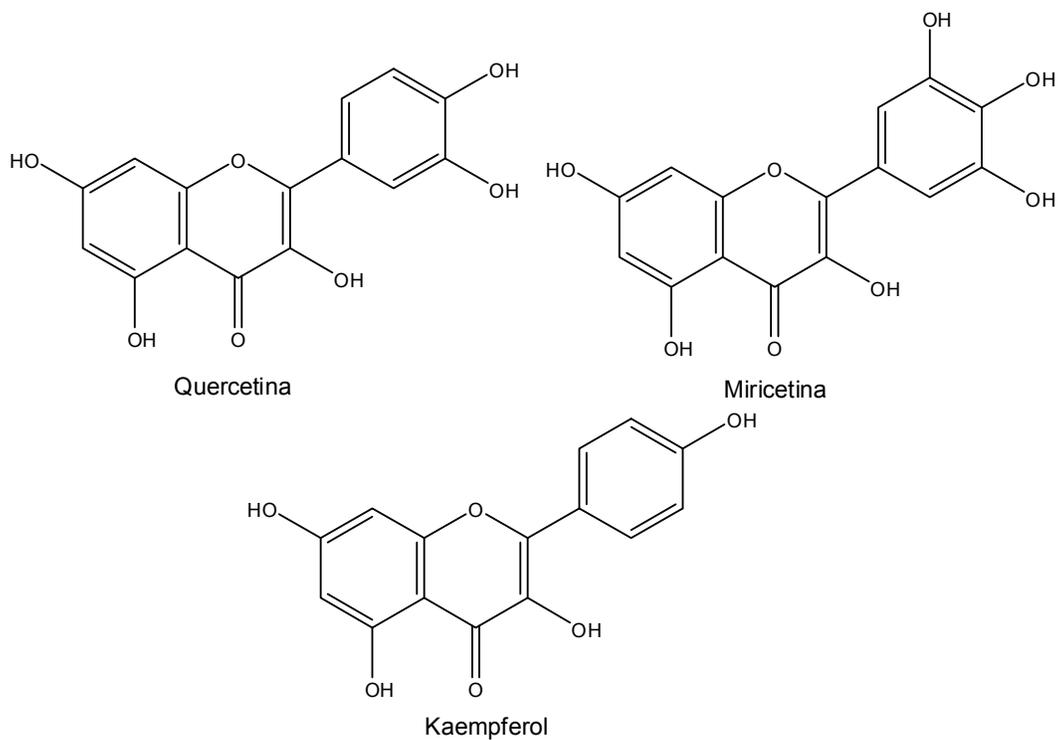
Dentro de los flavonoles se encuentran incluidos los compuestos quercetina, miricetina y kaempferol (Figura 21).

- Antocianinas. Las antocianinas representan dentro de los flavonoides el grupo responsable en mayor medida de un amplio rango de tonalidades, conjuntamente con otros flavonoides que se desempeñan como pigmentos accesorios. Las antocianinas son los componentes que otorgan la mayoría de las coloraciones rojas, azules, violetas y rosadas a flores, tallos, hojas, frutos, raíces y semillas.

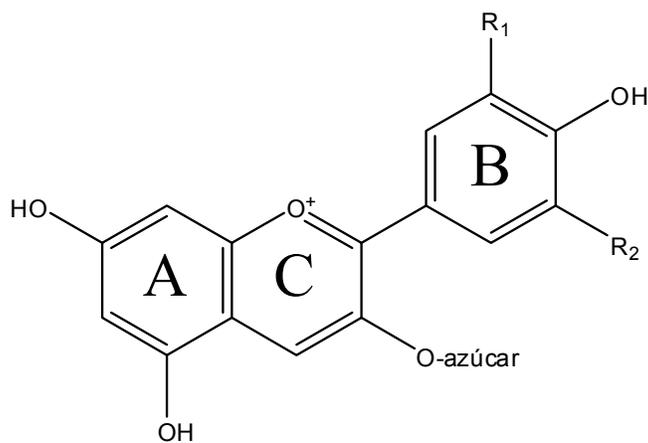
El carbono 4 en la estructura del anillo C no porta un átomo de oxígeno, por lo tanto se trata de derivados reducidos (Figuras 16 y 22). Poseen un átomo de oxígeno cuadrivalente y, como consecuencia de la carga positiva, las antocianinas son capaces de formar sales con ácidos; en las células pueden presentarse como cationes asociados con aniones de ácidos orgánicos. Se trata de glicósidos que presentan azúcares combinados generalmente en la posición 3 (Figura 22). El glicósido recibe el nombre de *antocianina* mientras que el aglicón, es decir la porción no glucídica de la molécula, es denominado *antocianidina*.



**Figura 20.** Estructura química de algunas flavonas



**Figura 21.** Estructura química de algunos flavonoles



**Figura 22.** Estructura química de los pigmentos antocianicos

La manifestación de la coloración de estos compuestos está influida por varios factores. En cuanto a la expresión del color asociada a las variaciones en la estructura química, el anillo B presenta diferentes alternativas en sus patrones

de sustitución. Pueden presentarse grupos funcionales hidroxilo y/o metoxilo reemplazando a los átomos de hidrógeno en diferentes posiciones (3', 4' y/o 5') y de esta forma se da origen a las distintas clases de pigmentos antociánicos.

Así, las pelargonidinas presentan colores anaranjado-rojizos; las cianidinas otorgan tintes rojos y magentas y las delphinidinas, púrpuras y azules (Tabla 1). La tendencia general indicaría que a un mayor número de sustituyentes –OH los colores tienden a ser más azulados.

Por otra parte, la incorporación de grupos metoxilo en las estructuras moleculares, como en el caso de la peonidina, petunidina y malvidina (Tabla 1), conduce al desarrollo de colores rojo brillante y rojo borgoña.

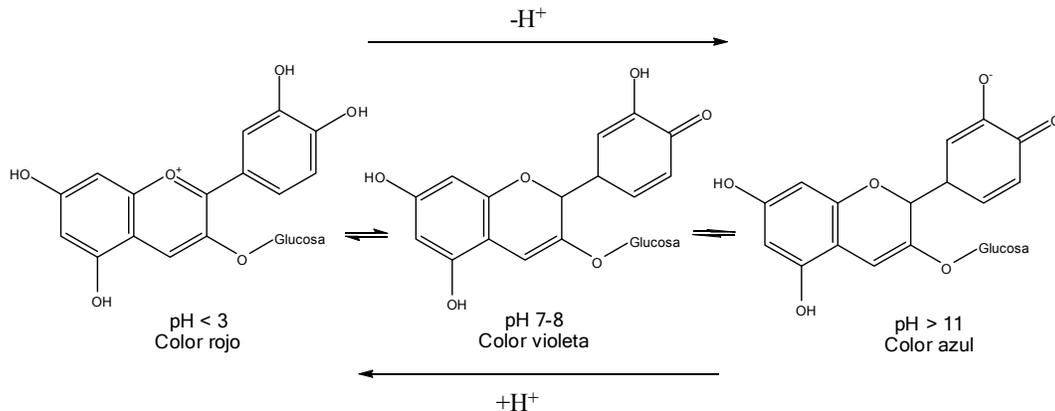
El pH del medio también ejerce marcada influencia en la coloración de los pigmentos antociánicos. Cuando el medio es alcalino, los grupos hidroxilo ceden sus protones y los electrones se encuentran más deslocalizados en la forma básica. Ello conduce a que el color vire progresivamente hacia el azul. Cuando el pH desciende, el color cambia al rojo (Figura 23).

La presencia de iones metálicos también tendrá incidencia en el color final de los compuestos antociánicos, generalmente otorgando al mismo un tinte más azulado. Los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  son mencionados al respecto. Los mismos participan formando complejos con las antocianinas e incluso con otros pigmentos flavonoides accesorios (co-pigmentos).

Antocianidina	Sustituyente R <sub>1</sub>	Sustituyente R <sub>2</sub>	Azúcar	Color
Pelargonidina	-H	-H	glucosa	rojo anaranjado
Cianidina	-OH	-H	glucosa	rojo
Delphinidina	-OH	-OH	glucosa	violeta azulado
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-H	glucosa, rutinosa	rosado
Petunidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	glucosa	violeta
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	glucosa	violeta rojizo

**Tabla 1.** Ejemplos de antocianidinas indicando los sustituyentes en el anillo B (Figura 22) y el color característico. Adaptado de Bowsher et al. (2008) y Heldt (2005)

Se han señalado otros factores adicionales responsables de la expresión final del color de las antocianinas, entre ellos la concentración de las mismas en los distintos tejidos, el acompañamiento de flavonas y flavonoles como co-pigmentos, la presencia de carotenoides, etc.



**Figura 23.** Efecto del pH sobre la estructura química y el color de las antocianinas

### 3.2.2. Estilbenos

Se trata de un grupo de compuestos estrechamente relacionados con los flavonoides, por compartir precursores en común durante su proceso de biosíntesis e incluso por presentar ciertas propiedades similares (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

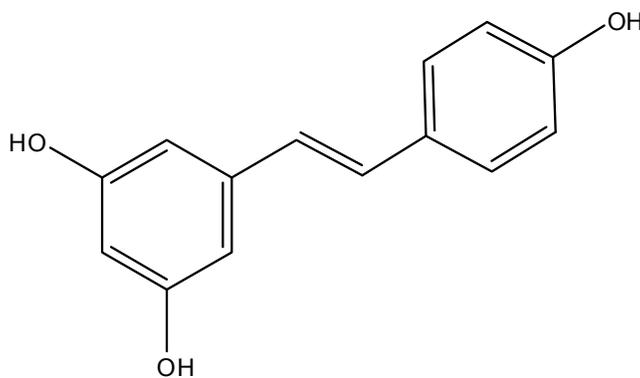
La estructura de los estilbenos está representada por dos anillos fenilo unidos entre sí mediante un puente de dos átomos de carbono (puente eteno). Se encuentran en un grupo relativamente pequeño de especies (pino, vid, maní, entre otras) y muestran una diversidad interesante de actividades biológicas. Particularmente, se los ha mencionado como sustancias con efectivas propiedades antifúngicas.

Se ha trabajado en la incorporación en plantas de tabaco y de alfalfa de los genes que codifican para la síntesis de la enzima estilbeno sintasa en las uvas. Las plantas modificadas fueron capaces de sintetizar estilbenos y mostraron

una mejor resistencia a hongos patógenos tales como *Botrytis cinerea* y *Phoma medicaginis*, respectivamente (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Dentro del grupo de los estilbenos se ubica al *resveratrol* (Figura 24), un compuesto que actúa como fitoalexina, hallado en concentraciones relativamente elevadas en las uvas y consiguientemente en vinos tintos (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

La *viniferina* es otro ejemplo dentro de este grupo, sintetizada también por las plantas de vid (Heldt, 2005: 447).

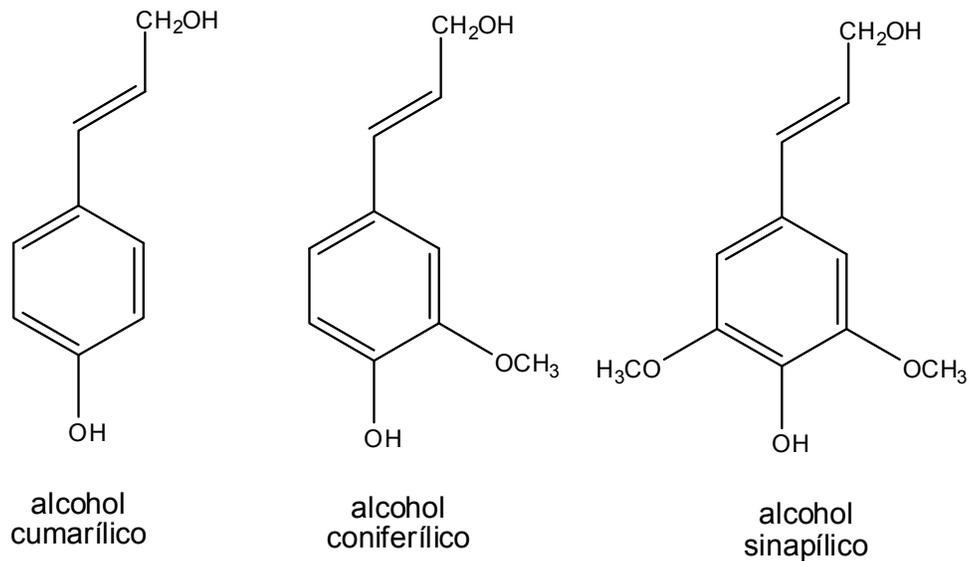


**Figura 24.** Estructura química del resveratrol, perteneciente al grupo de los estilbenos

### 3.3. Lignina

Se trata de un polímero complejo, heterogéneo, formado mayoritariamente por derivados fenilpropanoides que corresponden a los llamados *monolignoles*: los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 25). La diferencia estructural entre estos compuestos radica en la cantidad y posición de los grupos metoxilo unidos al anillo fenilo. Las subunidades fenilpropanoides derivadas de los correspondientes alcoholes, tal como se incorporan al esqueleto de la macromolécula son las subunidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S). Debido a las diversas estructuras de resonancia, se establecen muchas combinaciones posibles en el polímero complejo. La mayoría de los monolignoles reaccionan para formar uniones C-C o C-O-C,

construyendo un polímero altamente ramificado. Los grupos hidroxilo libres están presentes sólo en unas pocas cadenas laterales de la lignina y en ciertos casos resultan oxidados a funciones aldehído o carboxilo (Heldt, 2005: 443).



**Figura 25.** Estructura química de los monolignoles componentes de las ligninas

En la estructura compleja de la lignina pueden aparecer asimismo pequeñas cantidades de intermediarios de la biosíntesis de monolignoles, como así también algunos fenilpropanoides como *p*-cumaratos, ferulatos y *p*-hidroxibenzoatos (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

La composición de las ligninas varía entre diferentes *taxa* e incluso puede diferir entre una célula y otra o entre diferentes sectores de la pared celular.

En plantas Dicotiledóneas prevalecen las subunidades derivadas de los alcoholes coniferílico y sinapílico (ligninas G y S, respectivamente). Las plantas Monocotiledóneas sintetizan lignina con predominio de subunidades derivadas del alcohol cumarílico (ligninas H).

En las Gimnospermas se observa mayoritariamente la ocurrencia de subunidades procedentes del alcohol coniferílico. Esta composición revela un mayor número de enlaces C-C que en la lignina de Angiospermas.

Aproximadamente una tercera parte de la madera seca está representada por lignina. La producción de celulosa y papel requiere que la lignina sea removida mediante procesos costosos y que implican riesgos de contaminación ambiental.

La madera de Gimnospermas, además de presentar distintas propiedades estructurales, requiere un tratamiento químico diferente al de la madera de Angiospermas cuando es destinada a la producción de papel. Los enlaces C-C adicionales que se presentan entre las subunidades G hacen de la lignina de Gimnospermas un material más resistente al ataque químico.

Se han aplicado técnicas de ingeniería genética a plantas de álamo a fin de que las mismas produzcan moléculas de lignina con mayor aptitud para la producción de pasta de celulosa, requiriendo menor intensidad en los tratamientos químicos aplicados. En el caso de especies Gimnospermas no se mencionan ejemplos de este tipo de manipulación (Bowsher *et al.*, 2008: 370).

La lignina se encuentra unida covalentemente a la celulosa en las paredes celulares vegetales. Además de proveer resistencia mecánica a los órganos vegetales tales como tallos o vástagos y otorgar estabilidad a los tejidos vasculares del xilema, la lignina cumple también una función defensiva en las plantas. Es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y son escasos los géneros de hongos y bacterias capaces de degradar la lignina. Por otra parte, es sabido que la lignina participa también en ciertos procesos de cicatrización de heridas en órganos vegetales.

### **3.4. Taninos**

Los taninos son una variedad de polifenoles vegetales usados en el proceso de curtiembre para convertir la piel de los animales en cuero y hacerla así resistente al agua, al calor y al ataque de los microorganismos.

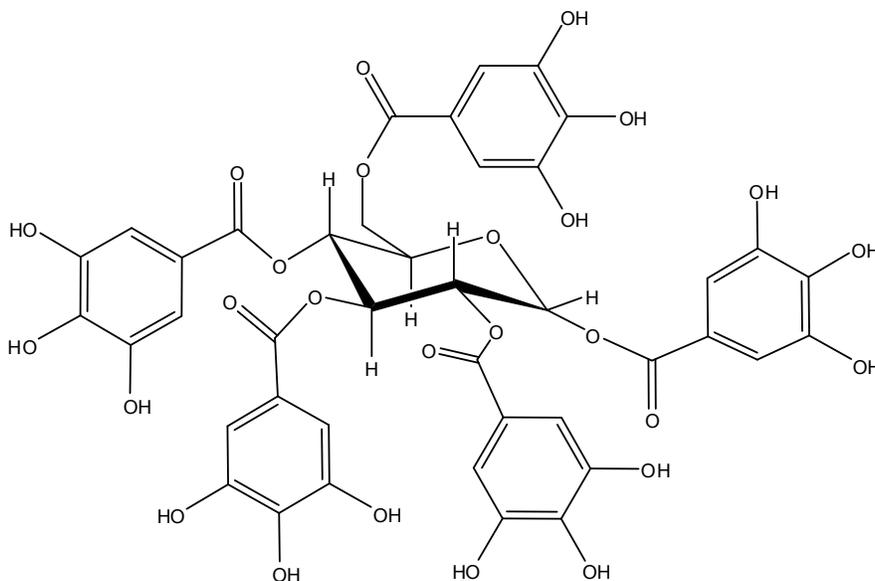
Durante la curtiembre se lleva a cabo la unión entre las proteínas de la piel (principalmente colágeno) y los taninos, a través de enlaces covalentes que se

establecen entre los grupos  $\text{-NH}_2$  de las proteínas y los grupos  $\text{-OH}$  fenólicos. También se establecen enlaces no covalentes, mediante puentes de hidrógeno. Los taninos aparecen en altas concentraciones en la corteza y leño de algunos árboles y en agallas vegetales.

Debido a su actividad antioxidante, estos polímeros fenólicos interactúan con los sistemas biológicos. Sus aplicaciones en diversas industrias derivan en gran medida de su capacidad para formar complejos con alcaloides, iones metálicos (hierro, manganeso, vanadio, cobre, aluminio, entre otros) y con macromoléculas como las proteínas. Por su capacidad de precipitar alcaloides, pueden ser utilizados en caso de intoxicación con dichas sustancias (von Poser, 2007: 1).

Los taninos se agrupan en dos clases principales:

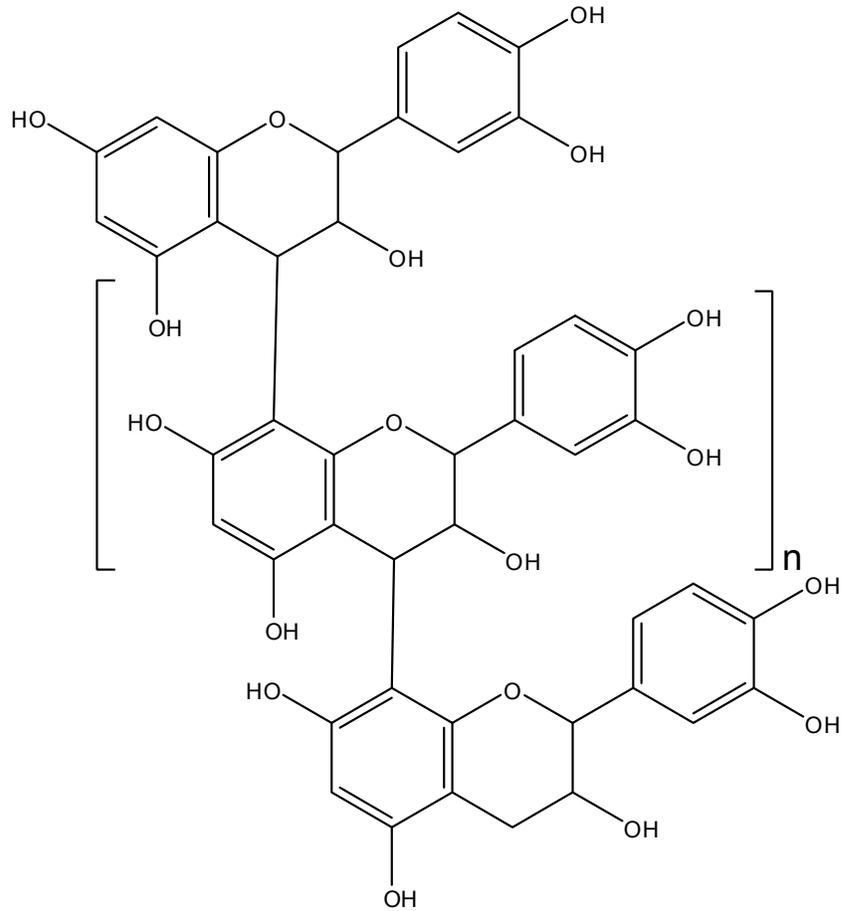
a) *Taninos hidrolizables*: se caracterizan por presentar estructura de glicósidos. La porción no glucídica (aglicón) corresponde a moléculas de ácido gálico o su dímero, el ácido elágico. Dentro de los azúcares, generalmente está presente la glucosa (Figura 26).



**Figura 26.** Estructura química de un ejemplo de taninos hidrolizables

b) *Taninos condensados*: se trata en este caso de polímeros cuyas estructuras están relacionadas con los compuestos flavonoides. Reciben también el

nombre de *proantocianidinas*, *proantocianidoles* o *leucoantocianidinas* (Figura 27).

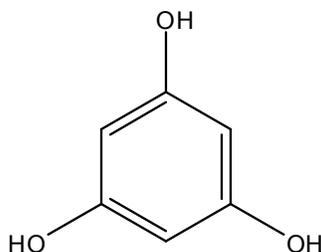


**Figura 27.** Estructura química de los taninos condensados

El término *proantocianidina* deriva de la reacción de oxidación que ocurre durante el calentamiento de estos polifenoles en soluciones alcohólicas ácidas, produciendo antocianinas, pigmentos de diferentes colores comprendidos entre el rojo y el violeta, a los que ya se ha hecho referencia con anterioridad. Las proantocianidinas contienen entre unas dos a cincuenta unidades de flavonoides.

Los taninos hidrolizables son más abundantes en Angiospermas Dicotiledóneas, en tanto que los taninos condensados son hallados tanto en Gimnospermas como Angiospermas.

Se menciona también un tercer grupo de taninos, de distribución mucho más restringida: el de los *florotaninos*, que consisten en polímeros de unidades de floroglucinol (Figura 28), obtenidos a partir de ciertas algas. Los mismos pueden encontrarse en concentraciones elevadas, de hasta un 15% del peso seco del material (von Poser, 2007: 1).



**Figura 28.** Estructura química del floroglucinol, unidad de los florotaninos

Los taninos tienen una masa molecular comprendida entre 500 y 3.000 Daltons. Independientemente de la clase a la que pertenezcan, se caracterizan por ser compuestos solubles en agua.

Como el resto de los compuestos fenólicos, los taninos son químicamente reactivos, capaces de formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Se trata de sustancias fácilmente oxidables, ya sea por acción de enzimas vegetales específicas o por efecto de metales (por ejemplo el ión férrico, bajo la forma de  $\text{FeCl}_3$ ), que produce el oscurecimiento de sus soluciones (Azeredo *et al.*, 2007: 20).

La actividad biológica de los taninos se correlaciona con su capacidad de unirse a las proteínas y combinarse con enzimas. Ha sido intensamente estudiada desde un punto de vista farmacológico la interacción de los taninos con enzimas que participan en procesos patológicos importantes.

Sus propiedades antimicrobianas también han sido ampliamente reconocidas y avalan algunos usos en medicina popular de plantas ricas en estos compuestos. Un ejemplo es la utilización de la especie *Maytenus ilicifolia* para el tratamiento de la úlcera, relacionada con la actividad antimicrobiana demostrada por los extractos de esta planta.

El crecimiento de diversos hongos, levaduras y bacterias resulta inhibido por los taninos. El mecanismo de acción se vincula con la capacidad de estas sustancias de inactivar a las enzimas, y a las proteínas en general, de los microorganismos. La infección de células vegetales se inicia frecuentemente con la secreción de enzimas microbianas que causan la lisis de las paredes celulares de las plantas. Estas enzimas pueden ser inactivadas cuando los taninos se unen a ellas (Heldt, 2005: 453).

Las investigaciones dedicadas a la búsqueda de agentes antivirales también han revelado que los taninos resultarían útiles al respecto, especialmente los taninos hidrolizables, mostrando mayor actividad aquéllos de menor peso molecular (von Poser, 2007: 1).

Como ya ha sido referido, los taninos son responsables de las propiedades de astringencia de ciertos órganos vegetales, como ocurre en el caso de diversos frutos que aún no han alcanzado su madurez fisiológica. La astringencia se produce debido a la unión de los taninos, abundantes en dichos órganos, con las proteínas de las mucosas y de la saliva, perdiendo esta última sus propiedades lubricantes.

Las altas concentraciones de taninos que se acumulan en frutos inmaduros actúan como un mecanismo de disuasión para herbívoros y posibilitan en cierto grado que los frutos alcancen su madurez y que no sean consumidos antes, favoreciendo la propagación de las semillas cuando éstas resultan viables y por ende, posibilitando la multiplicación natural de la especie.

Los taninos son responsables de una disminución de la digestibilidad de una planta, por establecerse la unión con las enzimas digestivas del animal que la consume.

Distintas variedades de sorgo (sorgos blancos, sorgos colorados) difieren en la concentración de taninos que se acumulan en los granos y esta diferencia se correlaciona con una diferente susceptibilidad al ataque de pájaros.

Un campo de creciente interés es el estudio de los efectos del consumo de plantas que contienen taninos en el ganado.

En ciertos casos se ha informado que los taninos pueden reducir el parasitismo intestinal. Los taninos condensados han mostrado efectos positivos sobre

ciertos rumiantes, referidos al aumento de crecimiento, de la eficiencia reproductiva, de la producción de lana en ovejas y de leche en bovinos.

Sin embargo, cuando estas sustancias se presentan en concentraciones elevadas, tienen influencia negativa en la ingestión voluntaria de alimentos y en la asimilación.

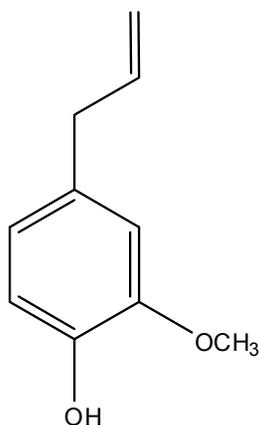
Los taninos son considerados factores antinutricionales por formar complejos con diversos tipos de moléculas, incluyendo no sólo proteínas (entre ellas las enzimas digestivas) sino también carbohidratos, vitaminas y minerales. Es importante el efecto mostrado por los taninos secuestrando el hierro de la dieta y sus consecuencias perjudiciales desde el punto de vista nutricional.

### **3.5. Otras clases de compuestos fenólicos y sustancias relacionadas a los mismos**

#### *3.5.1. Fenilpropenos*

Son un grupo particular de compuestos fenólicos, importantes por su contribución a ciertos sabores y aromas característicos de determinadas plantas. Los frutos de las *Apiaceae* (*Umbelliferae*) son especialmente ricos en fenilpropenos. Son aislados normalmente de los tejidos en la fracción correspondiente a los “aceites esenciales” (Capítulo 5), junto con ciertos terpenoides volátiles. Ejemplos particulares de compuestos clasificados dentro de este grupo han sido mencionados previamente en este mismo Capítulo: eugenol (Figura 29), cinamaldehído, miristicina, entre otros.

A diferencia de la mayoría de los compuestos fenólicos, los fenilpropenos son sustancias liposolubles.



**Figura 29.** Estructura química del compuesto eugenol

### 3.5.2. Lignanos

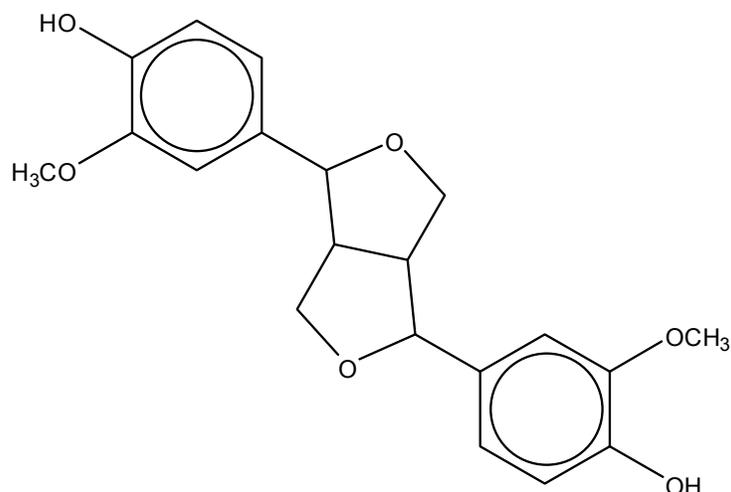
La dimerización de monolignoles conduce a la formación de *lignanos* y puede producirse a través de sus cadenas laterales o en ciertos casos por la condensación de los dos anillos fenólicos. Los lignanos vegetales se presentan también como oligómeros.

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal como sustancias de defensa.

El lignano *pinorresinol* (Figura 30) es un constituyente de la resina de *Forsythia spp* y se forma cuando se produce una herida en la planta. Actúa como inhibidor de ciertas enzimas microbianas. Otro lignano, el *malognol*, inhibe también el crecimiento de bacterias y hongos.

Ciertos lignanos presentan propiedades farmacológicas interesantes, como es el caso de la *podofilotoxina*, obtenida a partir del género *Podophyllum*, perteneciente a la familia *Berberidaceae*. Se trata de una toxina mitótica, que se ha evaluado como droga para combatir el cáncer (Heldt, 2005: 442).

La *arctigenina* y la *traqueologina*, procedentes de plantas trepadoras tropicales, se destacan por sus propiedades antivirales.



**Figura 30.** Estructura química del compuesto pinorresinol

### 3.5.3. Cutina y suberina

Los órganos vegetales que se hallan expuestos a la atmósfera se encuentran recubiertos por capas de materiales lipídicos que reducen la pérdida de agua y ayudan a bloquear la entrada de bacterias y hongos patógenos. Dentro de estos compuestos están incluidas ceras, cutina y suberina.

Las ceras, en su mayoría, se componen de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (entre 20 y 24 átomos de carbono) y alcoholes de alto peso molecular ( $C_{24}$ - $C_{32}$ ), constituyendo una de las clases de lípidos comprendidas dentro de los *lípidos simples*, junto con los triacilglicérols. En la composición de las ceras pueden presentarse también alcanos de cadena lineal, alcoholes y ácidos grasos libres, aldehídos de cadena larga, cetonas, etc.

La cutina y la suberina en particular presentan en su composición, además de ciertos ácidos grasos con características peculiares, una porción de la molécula que reviste naturaleza fenólica.

La cutina se distribuye principalmente como recubrimiento de los órganos aéreos, mientras que la suberina es propia de los órganos subterráneos de las

plantas, los tallos leñosos y las heridas en proceso de cicatrización. Ambos compuestos se encuentran frecuentemente asociados con ceras.

La cutina es una macromolécula, un polímero formado por una alta proporción de ácidos grasos de elevado peso molecular que se encuentran unidos entre sí a través de uniones éster, dando lugar a una estructura en red tridimensional, rígida.

Los ácidos grasos que la constituyen tienen generalmente 16 ó 18 átomos de carbono, saturados o insaturados. Se distinguen por la presencia de funciones hidroxilo o grupos epóxido, que se ubican en la parte media de la cadena o en el extremo opuesto al grupo carboxilo principal.

La *cutícula* que recubre las paredes celulares externas de las células de la epidermis vegetal está formada principalmente por cutina, sustancia que le otorga a esta estructura sus típicas propiedades de impermeabilidad al agua y a los gases. Es propia de plantas herbáceas.

La cutícula se describe como una secreción formada por múltiples mantos o estratos, compuesta exteriormente por una capa de ceras, una capa intermedia, gruesa, formada por cutina embebida en ceras (que correspondería a la cutícula propiamente dicha) y un estrato más interno formado por cutina y ceras mezcladas con las sustancias pécticas de la pared celular, celulosa y otros carbohidratos estructurales.

La estructura polimérica de la suberina no ha sido completamente dilucidada, pero se sabe que también se encuentra formada por ácidos grasos que portan grupos hidroxilo y epoxi combinados mediante enlaces éster. La principal diferencia observada con respecto a la cutina es la presencia de ácidos grasos dicarboxílicos y una mayor proporción de componentes de cadena larga y de compuestos fenólicos como parte de la estructura (Taiz y Zeiger, 1998: 349).

Según Heldt (2005: 444), se trata de un polímero compuesto por unidades fenilpropanoides, ácidos grasos de cadena larga ( $C_{18}$ - $C_{30}$ ), hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos ( $C_{14}$ - $C_{20}$ ). Los componentes fenilpropanoides se encuentran parcialmente unidos entre sí de manera similar a lo observado en la lignina. Ciertos grupos hidroxilo no participan en estas uniones y forman en cambio ésteres con ácidos grasos.

La suberina es un constituyente importante de las paredes celulares más externas de los órganos vegetales subterráneos.

Se asocia también a las células del súber de la *peridermis*, tejido constituyente de la corteza exterior de tallos y raíces que experimentan crecimiento secundario, en las plantas leñosas.

Al respecto, en los tallos de especies que manifiestan crecimiento secundario intenso la epidermis es reemplazada por la peridermis, otro tejido de protección derivado de la actividad de un meristemo secundario llamado *felógeno*. El mismo sufre divisiones periclinales dando lugar a células que se diferencian hacia el exterior como *súber* o *corcho* y hacia el interior como *felodermis* o *córtex secundario* (Cortés Benavides, 1986: 120). Cuando alcanzan la madurez, las paredes de las células del súber o corcho se suberifican y se produce la muerte de los protoplastos.

Las capas de súber protegen a las plantas contra la pérdida de agua, la infección de microorganismos y la exposición al calor. Por este motivo, algunas plantas son capaces de sobrevivir a la ocurrencia de incendios breves pudiendo continuar su crecimiento al extinguirse los mismos.

Al describir la estructura interna de la raíz se menciona a la *endodermis*, como la capa más interna del córtex, formada por una sola hilera de células. Las paredes de las células de la endodermis son inicialmente delgadas, a excepción de un engrosamiento en forma continua que se observa en las paredes radiales y transversales (Fahn, 1982: 22). La estructura recibe la denominación de *banda de Caspary*. Su función principal reside en impedir la difusión del agua a través de las paredes celulares y lograr que las soluciones atraviesen el protoplasma de las células endodérmicas. La naturaleza impermeable de la banda de Caspary se debe a la presencia de suberina, que actúa como una barrera de difusión entre el apoplasto del córtex de la raíz y el cilindro central. Al producirse la plasmólisis celular, se observa que el protoplasto se separa de las paredes tangenciales, pero permanece solidario en su extensión a la banda de Caspary.

En muchas plantas las paredes de las células de las capas más externas del córtex de la raíz, situadas por debajo de la epidermis, también se suberizan.

Ello hace que se diferencie una *exodermis*, con funciones de protección. Dicha estructura presenta similitud en cuanto a organización y composición citoquímica con la endodermis. Puede observarse una laminilla de suberina prácticamente continua que recubre internamente a la pared celular primaria, y en muchos casos se observa también deposición de lignina.

En las hojas de Monocotiledóneas, especialmente en Gramíneas (*Poaceae*), las vainas parenquimáticas que rodean a los haces menores se distinguen en vainas de una y de dos capas. Las células de la vaina más interna, el *mestoma*, son de menor diámetro en sección transversal, pero sus paredes son más gruesas y contienen láminas de suberina atravesadas por plasmodesmos (Fahn, 1982: 263). El mestoma guarda por tal motivo cierta analogía con la endodermis de la raíz. Se han observado capas de suberina en las paredes de la vaina parenquimática del maíz y de otras plantas C4.

La suberina aparece también en las zonas de abscisión foliar y en superficies afectadas por lesiones y/o enfermedades.

A modo de resumen, la Tabla 2 muestra una clasificación de los principales grupos de compuestos fenólicos. No se han incluido ciertas clases que, por motivos de extensión, no han sido desarrolladas en el presente texto. Entre las mismas se encuentran: a) ciertos fenoles simples con estructura C<sub>6</sub> incluyendo compuestos como hidroquinona y catecol; b) acetofenonas y fenilacetatos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>); c) xantonas (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); d) antraquinonas (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>); e) biflavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub> presentes en Gimnospermas.

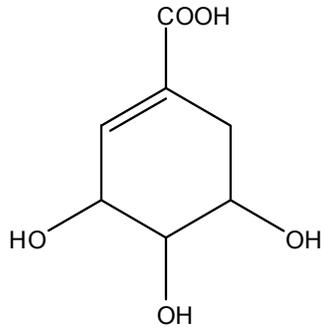
#### 4. Origen biosintético de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, dependiendo del grupo en cuestión, se originan a partir de las siguientes vías metabólicas secundarias:

- a) Directamente a partir del *ácido shikímico* (Figura 31), que es considerado el precursor común de todo el grupo.

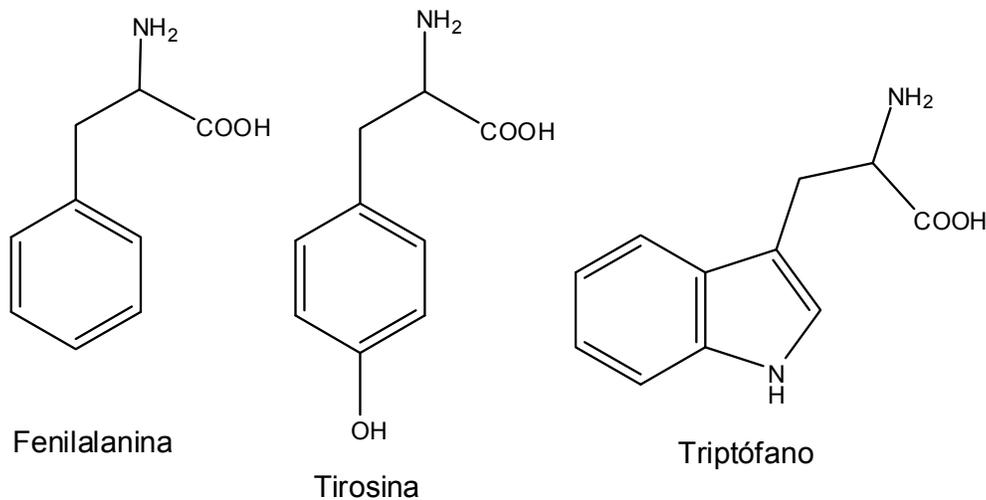
N° de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Ejemplos de compuestos	Ejemplo de ocurrencia
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos (hidroxibenzoatos)	Ácido gálico	Componente de taninos hidrolizables presentes en agallas vegetales
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos (hidroxicinamatos)	Ácido cafeico (anión cafeato)	Clorogenatos en <i>Solanaceae</i>
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Fenilpropenos	Eugenol	En aceites esenciales de varias familias botánicas
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas e hidroxicumarinas	Cumarina, umbeliferona, esculetina	Cumarina en <i>Melilotus alba</i> ; hidroxicumarinas en miembros de las familias <i>Rutaceae</i> , <i>Solanaceae</i> y <i>Apiaceae</i>
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona	Presente como un glucósido en <i>Juglandaceae</i>
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol	Uvas
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	Quercetina	Bajo la forma del glucósido rutina en varias familias botánicas
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós	Pinorresinol	En árboles de <i>Picea</i> y <i>Pinus</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub> :Glucosa	Taninos hidrolizables	Galotaninos	Taninos en agallas de <i>Rhus semialata</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados	Polímeros de catequiza	Taninos en la corteza de <i>Quercus robur</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas	Ligninas formadas por unidades guayacilo y guayacilo-siringilo	Ligninas en Gimnospermas y en Angiospermas, respectivamente

**Tabla 2.** Clases principales de compuestos fenólicos en especies vegetales. Adaptado de Strack (1997) y Bowsher et al. (2008)



**Figura 31.** Estructura química del ácido shikímico

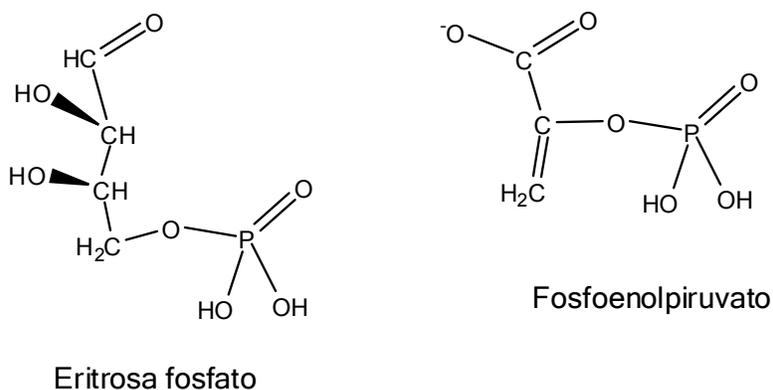
- b) A partir de los aminoácidos aromáticos, que derivan a su vez del ácido shikímico. Los aminoácidos aromáticos son fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 32). La fenilalanina en particular (y en algunos casos la tirosina) actúa como precursor de algunos grupos de compuestos fenólicos. Es denominada *vía fenilpropanoide*.
- c) A partir de una vía combinada, donde participan *compuestos fenilpropanoides* por un lado y por otro el *malonato* (anión del ácido malónico), bajo la forma de *malonilCoA* (malonil coenzima A). Esta es denominada *vía fenilpropanoide-malonato*. Recordemos que el malonilCoA deriva a su vez del acetilCoA.



**Figura 32.** Estructura química de los aminoácidos aromáticos

#### 4.1. Biosíntesis del ácido shikímico y de los aminoácidos aromáticos

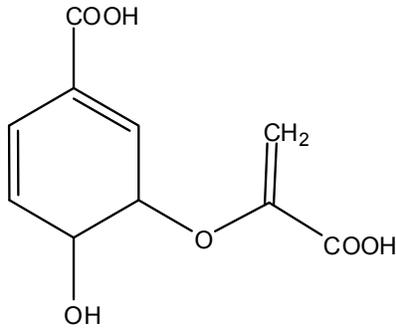
Los sustratos iniciales para la síntesis de ácido shikímico provienen de las vías de degradación de glúcidos. Los compuestos de partida son la eritrosa fosfato (4C), proveniente de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato (3C), compuesto intermediario de la glucólisis (Figura 33).



**Figura 33.** Estructura química de los compuestos precursores del ácido shikímico

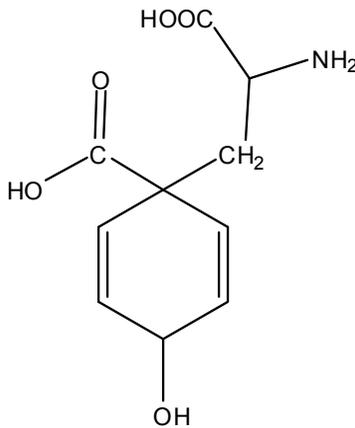
A través de intermediarios de siete carbonos y con aporte de electrones mediado por la participación de la coenzima de óxido-reducción nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), se sintetiza el ácido shikímico. Este compuesto fue aislado por primera vez en 1885 de los frutos de *Illicium religiosum* y su nombre deriva de esta planta oriental que es conocida como *shikimi-no-ki* en idioma japonés (Jiang y Singh, 1998: 4697).

Seguidamente, tras la ruptura de una molécula de adenosina trifosfato (ATP) y la incorporación de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato catalizada por la enzima EPSP sintasa (sintasa del ácido 5-enolpiruvilshikímico 3-fosfato), se llega finalmente a obtener el intermediario llamado *ácido corísmico* (Figura 34). Este compuesto representa un punto de ramificación en la ruta que conduce a la síntesis de los distintos aminoácidos aromáticos. Uno de los caminos lleva a la formación de triptófano, mientras que otro deriva hacia la formación de fenilalanina y tirosina.



**Figura 34.** Estructura química del ácido corísmico

En este último caso y a partir del ácido corísmico, luego de varias reacciones químicas que incluyen la transferencia de un grupo amino, se llega al metabolito precursor de la fenilalanina y la tirosina, el *ácido arogénico* (Figura 35).

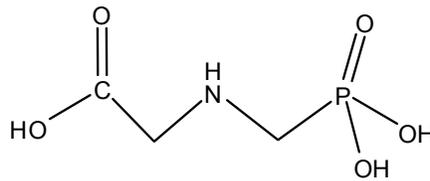


**Figura 35.** Estructura química del ácido arogénico

El herbicida de amplio espectro *glifosato* (Figura 36) produce la muerte de las plantas bloqueando uno de los pasos de esta ruta biosintética, aquél en el que participa la enzima EPSP sintasa. Actúa como un inhibidor competitivo de la EPSP sintasa en relación a uno de sus sustratos, el fosfoenolpiruvato; y como un inhibidor no competitivo con respecto al co-sustrato ácido shikímico 3-fosfato.

El glifosato es altamente específico y no afecta a otras enzimas dependientes del fosfoenolpiruvato (Bowsher *et al.*, 2008: 373).

Ciertos materiales genéticos han sido desarrollados como cultivos resistentes al glifosato, a partir de la introducción de genes de una cepa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (CP4) que codifica la síntesis de una enzima EPSP sintasa insensible al glifosato. Como ejemplos pueden mencionarse ciertos cultivares de algodón, soja y colza.



**Figura 36.** Estructura química del herbicida glifosato

La ruta del ácido shikímico es propia de bacterias, hongos y plantas pero no se lleva a cabo en animales superiores.

Los aminoácidos fenilalanina y triptófano son considerados aminoácidos esenciales y deben ser incorporados en la dieta de los vertebrados, incluyendo el hombre. La tirosina resulta esencial en animales jóvenes en crecimiento pero no en los adultos (Nelson y Cox, 2009: 686), los que pueden en principio sintetizarla siempre y cuando haya disponibilidad de fenilalanina a través de la dieta.

La vía del ácido shikímico, incluyendo los pasos finales que conducen a la síntesis de fenilalanina y tirosina, tiene lugar mayoritariamente en los plástidos (Bowsher *et al.*, 2008: 371).

#### 4.2. Reacciones iniciales de la vía fenilpropanoide

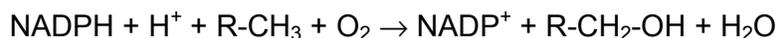
A partir de la fenilalanina se originan diversos compuestos fenilpropanoides, entre ellos el ácido cinámico que da origen a los fenoles simples y a otras sustancias derivadas.

La primera reacción que se lleva a cabo es una desaminación (se libera NH<sub>3</sub>) y a partir de la fenilalanina se obtiene el *ácido trans-cinámico* (C6-C3) (Figura 9). Esta reacción es catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), quizás la enzima más estudiada del metabolismo secundario vegetal. La estructura de esta enzima corresponde a un tetrámero compuesto por subunidades de 75 a 83 kDa.

En algunas Gramíneas, la tirosina se convierte en ácido 4-hidroxicinámico mediante un mecanismo análogo, catalizado por la enzima tirosina amonio liasa. El amoníaco liberado es probablemente reutilizado por acción de la enzima glutamina sintetasa (Heldt, 2005: 437).

Estudios realizados en varias especies vegetales han mostrado que la actividad PAL se incrementa debido a factores tales como bajos niveles de nutrientes e incidencia de hongos, entre otros. Por ejemplo, la formación de fitoalexinas fenilpropanoides luego de una infección fúngica responde a una inducción de la actividad PAL.

El producto de la actividad PAL, el ácido *trans*-cinámico, es convertido en ácido *p*-cumárico por adición de un grupo –OH en posición *para* en el anillo aromático (Figura 9). La enzima que participa, la cinamato 4 hidroxilasa (C4H), es una monooxigenasa que utiliza al citocromo P<sub>450</sub> como sitio de unión del O<sub>2</sub>. Se caracteriza por la presencia de un grupo hemo que absorbe luz a 450 nm de longitud de onda. Aunque en la reacción participa el oxígeno molecular, sólo se transfiere un átomo de O al sustrato (el ácido *trans*-cinámico), de ahí que reciba la denominación de *monooxigenasa*. La reacción global puede representarse de la siguiente manera:



Reacciones subsiguientes en la vía fenilpropanoide conducen a la adición de otros grupos –OH y de sustituyentes metoxilo (-OCH<sub>3</sub>), dando origen a los *ácidos ferúlico y sinápico* (Figura 9), que forman el grupo de los ácidos hidroxicinámicos.

Como ya ha sido señalado, el ácido *trans*-cinámico y los ácidos hidroxicinámicos son compuestos fenólicos simples, llamados fenilpropanoides, que dan a su vez origen a muchos otros compuestos fenólicos.

Por ejemplo, a partir del ácido *p*-cumárico por hidroxilación y formación de un éster intramolecular (lactona) se origina la 7-hidroxycumarina o umbeliferona (Figura 11). La introducción de dos átomos de carbono en la molécula de umbeliferona produce el compuesto psoraleno (Figura 12), que ya ha sido mencionado también como ejemplo de furanocumarinas.

Ha sido descrito que ciertos derivados del ácido benzoico, incluyendo al ácido salicílico (Figura 7) se forman por ruptura de un fragmento de dos carbonos a partir de compuestos fenilpropanoides (Heldt, 2005: 439). Sin embargo, persiste cierta discrepancia en cuanto las rutas biosintéticas que conducen a los compuestos formados a partir del ácido benzoico, entre ellos los ácidos gálico y elágico que constituyen las unidades estructurales de los taninos hidrolizables, los cuales podrían originarse directamente del ácido corísmico, en lugar de la vía fenilpropanoide (Bowsheer *et al.*, 2008: 370).

Uno de los pasos principales dentro de la vía fenilpropanoide es la formación de *p*-cumarilCoA a partir del ácido *p*-cumárico. La enzima participante es la 4-cumarato:CoA ligasa (4-CL). Esta enzima también reacciona con los ácidos cafeico, ferúlico y sinápico, para formar los ésteres respectivos con la Coenzima A. Se corresponde con un punto de ramificación importante en esta vía biosintética, entre las rutas que darán origen a los flavonoides y las que generarán los monómeros de las ligninas.

#### 4.3. Biosíntesis de lignina

Los componentes básicos para la síntesis de lignina son los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 25), que como ya se ha mencionado son colectivamente llamados monolignoles. La vía para la síntesis de lignina es actualmente sujeto de investigación y tema de debate. Restan aún por resolver determinados aspectos de la misma.

La síntesis de monolignoles requiere la reducción del grupo carboxilo (-COOH) de los ácidos correspondientes a alcohol (-OH). Es necesario previamente que el ácido se esterifique con la coenzima A, reacción que consume ATP.

En las sucesivas reducciones, el agente reductor que participa es el NADPH.

Las mismas tres enzimas que catalizan la conversión del ácido *p*-cumárico a alcohol cumarílico, catalizan también la formación de alcohol coniferílico y sinapílico a partir de los ácidos ferúlico y sinápico, respectivamente.

Según Heldt (2005: 441), los alcoholes coniferílico y sinapílico pueden ser también originados a partir del alcohol cumarílico mediante hidroxilación seguida de metilación.

La estructura de la lignina se forma por polimerización de una mezcla de los tres monolignoles indicados. La síntesis de este polímero fenólico tiene lugar externamente a la célula. Existen indicios de que los monolignoles son exportados de la célula bajo la forma de glucósidos que son luego hidrolizados mediante enzimas glucosidasas.

Se ha indicado también que las enzimas lacasa y peroxidasa participan en la combinación de los monolignoles.

La primera de estas enzimas es una monofenol oxidasa que oxida el grupo fenol a un radical y transfiere hidrógeno vía un ión  $\text{Cu}^{2+}$  (que actúa como un cofactor enzimático) al oxígeno molecular.

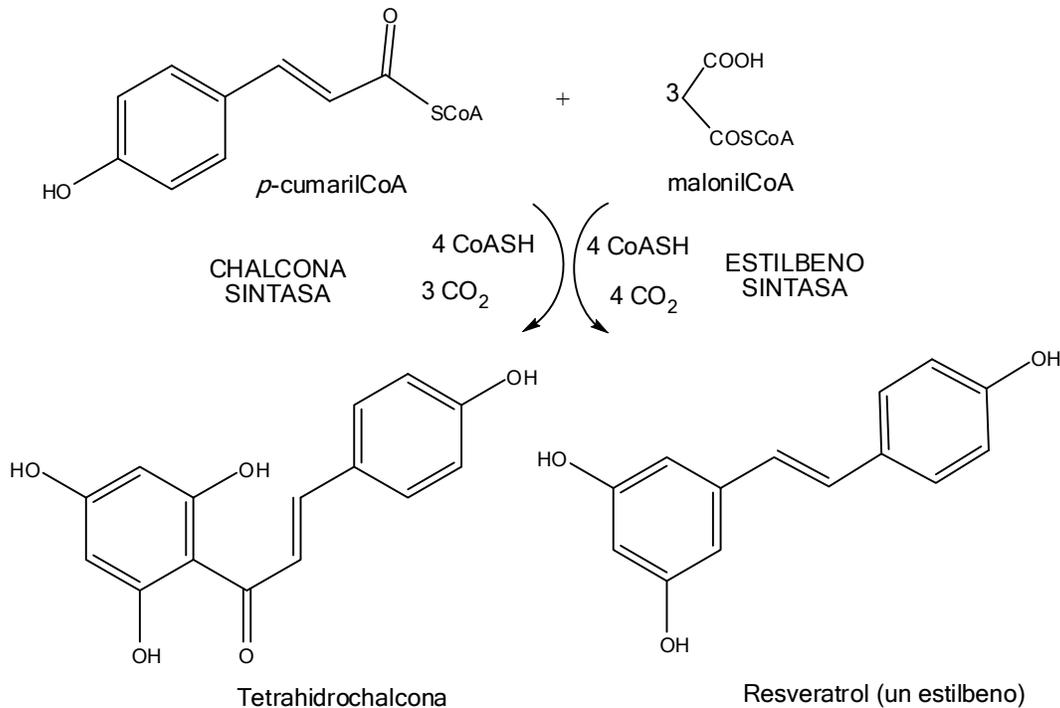
En el caso de las peroxidasas, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como agente oxidante. Los radicales fenólicos originados en este caso pueden dimerizar y finalmente polimerizarse a través de reacciones no catalizadas enzimáticamente.

Se ha postulado también que ciertas glicoproteínas extracelulares llamadas proteínas directrices o conductoras (*dirigent proteins*) son capaces de controlar la polimerización de los monolignoles (Heldt, 2005: 443).

#### **4.4. Vía fenilpropanoide-malonato**

Otra de las vías metabólicas que dan origen a parte de los compuestos fenólicos es la denominada vía fenilpropanoide-malonato. Las clases de

fenólicos originados a través de esta ruta son fundamentalmente los flavonoides y estilbenos (Figura 37).



**Figura 37.** Biosíntesis de flavonoides y estilbenos

En los compuestos flavonoides, como se ha mencionado previamente, un segundo anillo aromático se une a la porción fenilpropanoide de la molécula. Un precursor para la síntesis de flavonoides es la chalcona, sintetizada por la enzima chalcona sintasa (CHS) a partir de *p*-cumarilCoA y tres moléculas de malonilCoA. Esta reacción corresponde a la vía del malonato (Figura 37).

La liberación de tres moléculas de CO<sub>2</sub> y cuatro moléculas de Coenzima A hace que la síntesis de chalcona sea un proceso irreversible.

En la reacción general, el nuevo anillo aromático se forma a partir de tres residuos de acetato.

La estructura de la chalcona es convertida a flavanona por acción de la enzima chalcona isomerasa. La estructura cíclica se forma por la adición de un grupo

hidroxilo fenólico al doble enlace de la cadena carbonada que conecta los dos anillos. La flavanona es el compuesto precursor de los restantes flavonoides.

Por otra parte y tal como se indicó previamente, algunas especies vegetales presentan actividad estilbeno sintasa, mediante la cual la molécula de *p*-cumarilCoA reacciona también con tres moléculas de malonilCoA pero en este caso el carbono 9 de la cadena fenilpropanoide también se libera como CO<sub>2</sub> (Figura 37).

El estudio de las vías biosintéticas de los estilbenos es tema de interés por brindar nuevas posibilidades para combatir las infecciones fúngicas reduciendo el impacto del uso de agroquímicos.

## 5. Técnicas analíticas disponibles para el análisis de compuestos fenólicos relevantes desde el punto de vista de la alimentación animal

### 5.1. Cuantificación de ácido clorogénico

Como ya ha sido mencionado, las elevadas concentraciones de ácido clorogénico (Figura 10) en ciertos productos alimenticios pueden ser responsables de algunos problemas nutricionales observados.

La cuantificación de este compuesto puede llevarse a cabo a partir de la reacción con el ión titanio para formar un complejo coloreado cuya absorbancia es medida a 450 nm. La extracción se lleva a cabo con alcohol que luego es removido mediante evaporación al vacío. El residuo de la extracción se resuspende en acetona.

El reactivo de titanio se prepara disolviendo cloruro de titanio (TiCl<sub>4</sub>) en ácido clorhídrico (HCl) concentrado (37% p/v). Para la extracción, la muestra se trata a reflujo con etanol en agua (80%) ajustando el pH a 4,0. Una alícuota del extracto se seca al vacío a 50°C o mediante flujo de gas nitrógeno, retomando luego con acetona. Se adiciona seguidamente el reactivo de titanio y se procede a incubar a temperatura ambiente para leer la intensidad del color

desarrollado a 450 nm, comparando con el blanco. Se prepara una curva de calibración (0–200 µg/mL de ácido clorogénico) a fin de determinar el contenido de ácido clorogénico en la muestra problema (Makkar *et al.*, 2007: 89-91).

Esta técnica puede aplicarse también para cuantificar otros compuestos fenólicos, variando las longitudes de onda a la cual se leen los valores de absorbancia: los fenoles totales tienen su máximo de absorbancia a 410 nm y el catecol y la catequina a 430 nm (Makkar *et al.*, 2007: 89).

## 5.2. Gosipol

De acuerdo con su estructura química, el gosipol (Figura 30 Capítulo 5) es un aldehído polifenólico presente en las semillas de *Gossypium spp.* Sin embargo, por su origen biosintético es frecuentemente clasificado como un compuesto terpenoide (más específicamente un sesquiterpenoide), por tal motivo es mencionado también en el Capítulo 5 de esta obra. En esta sección se hará referencia a la determinación colorimétrica que permite su cuantificación en las semillas de algodón y sus productos derivados.

El gosipol resulta tóxico para los animales monogástricos, principalmente cerdos y conejos. Las aves muestran un mayor grado de tolerancia. La intoxicación con gosipol conlleva a constipación, disminución del apetito, pérdida de peso e incluso la muerte, causada por daño a nivel circulatorio.

Los métodos de análisis disponibles cuantifican gosipol libre y gosipol total, que incluye gosipol y derivados del gosipol, tanto libres como ligados.

Estas sustancias reaccionan con el compuesto 3-amino-1-propanol en una solución de dimetilformamida para formar un complejo diaminopropanol que reacciona a su vez con la anilina, obteniéndose dianilinosipol.

La técnica puede aplicarse a semillas de algodón, harinas, tortas y aceites crudos obtenidos de dichas semillas, no así a alimentos que contengan semillas enteras de algodón, no procesadas.

Los minerales, proteínas, aceites y polisacáridos presentes en la muestra pueden interferir y generar falsas respuestas positivas.

Los análogos del gosalol y sus derivados que presentan disponible una función aldehído también se cuantifican por este método.

El término gosalol libre y derivados del gosalol en subproductos de la semilla de algodón se aplica a compuestos solubles en mezclas acetona:agua al 70% bajo las condiciones del método. El gosalol y sus derivados reaccionan con tiourea y anilina en medio ácido, formando un complejo de color amarillo-anaranjado, cuya absorbancia se lee a 440 nm.

### 5.3. Cuantificación de taninos

Como ya ha sido indicado, los taninos son polímeros fenólicos que característicamente presentan la capacidad de combinarse con las proteínas dando lugar a complejos tanino-proteína.

Desde el punto de vista de la alimentación animal, la ingestión de especies vegetales que contengan taninos afecta la utilización de nutrientes, en especial de las proteínas, reduciendo también el consumo de alimentos. Ciertas clases de taninos resultan potencialmente tóxicos, principalmente a nivel del hígado y los riñones llegando a causar, en situaciones extremas, la muerte de los animales.

Suelen clasificarse, como ya ha sido mencionado, en taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas (Figuras 26 y 27).

Los procedimientos destinados a la cuantificación de taninos suelen dividirse en métodos químicos y en aquéllos basados en la precipitación de proteínas. Otros tipos de técnicas también disponibles corresponden a ensayos gravimétricos y bioensayos, entre otras.

Dentro de los métodos químicos, se encuentran los procedimientos para cuantificación de fenoles y taninos totales. Su fundamento es la ocurrencia de reacciones de óxido-reducción empleando reactivos como el de Folin-Ciocalteu o el de Folin-Denis, o la formación de complejos con metales, como el método que utiliza cloruro férrico.

El método de Folin-Ciocalteu es ampliamente usado para medir fenoles totales, a pesar de la interferencia que causan ciertos agentes reductores presentes en las muestras. Este método no permite distinguir entre taninos y fenoles que no pertenezcan a la clase de los taninos, a menos que se utilice una matriz sólida de polivinilpolipirrolidona (PVPP) asumiendo que los compuestos fenólicos capaces de unirse a proteínas también lo hacen a la PVPP (Makkar *et al.*, 2007: 70-79).

De esta forma, se procede a medir fenoles totales en extractos vegetales mediante el método de Folin-Ciocalteu, antes y después del tratamiento con PVPP. La diferencia entre ambos valores representa una medida del contenido de taninos.

Para taninos condensados pueden utilizarse los métodos que emplean vainillina por un lado, o butanol-HCl. El ensayo con butanol-HCl, con y sin adición de hierro, se fundamenta en la despolimerización oxidativa de los taninos.

El método de la vainillina ha sido aplicado a la medición de taninos condensados en sorgo, por ejemplo. Su especificidad es relativamente baja al igual que su reproducibilidad.

El método butanol-ácido, que es simple y más específico, produce antocianidinas de color rosado a partir de la ruptura oxidativa de los enlaces interflavanos de los taninos condensados, en presencia de ácidos minerales en solución alcohólica a 95°C. Se realizaron posteriormente algunas modificaciones sobre este método, incluyendo el agregado de hierro en el reactivo butanol-HCl con el objetivo de mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo.

Los procedimientos fundamentados en la precipitación de proteínas suministran mayor información sobre el valor biológico de forrajes y piensos que contengan taninos.

En estos casos, se procede a la formación de los complejos tanino-proteína y el contenido de proteína de los mismos se mide empleando el método de la ninhidrina para los aminoácidos liberados mediante hidrólisis alcalina a partir

del complejo. Es posible de esta forma estimar la capacidad de precipitación de proteínas de una muestra que contenga taninos.

Otra alternativa es proceder a la formación de complejos tanino-proteína sobre papel cromatográfico empleando albúmina de suero bovino. La proteína ligada a los taninos se colorea con el colorante específico Ponceau S. Luego se eluye el colorante ligado a la proteína y se lee la absorbancia del eluato a 525 nm. Mediante una curva de calibración los valores de absorbancia se convierten a contenido de proteína.

Los métodos espectrofotométricos cuantifican taninos en relación a un estándar determinado que puede ser ácido tánico, ácido gálico, catequina, taninos del quebracho, leucoantocianidinas, etc.

El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos.

Generalmente los métodos gravimétricos presentan menor sensibilidad que los métodos colorimétricos y demandan mayor tiempo.

Los procedimientos analíticos disponibles que implican la precipitación de proteínas por los taninos se llevan a cabo, en muchos casos, en condiciones distintas a las del rumen. Por tal motivo, los resultados obtenidos presentan aplicación limitada para predecir el valor nutritivo de alimentos que contengan esta clase de compuestos fenólicos.

Una alternativa para evaluar el efecto del contenido de taninos en muestras que serán suministradas a animales rumiantes, consiste en proceder a incubar la muestra problema junto con polietilenglicol 6000 (que inactiva a los taninos), aumentando de esta forma la producción de gas en un sistema *in vitro*. La solución tampón para la fermentación ruminal *in vitro* se prepara a partir de fluido recientemente recolectado del rumen de animales alimentados en forma controlada, que se mantiene a 39°C bajo un flujo de CO<sub>2</sub> hasta su uso. La composición del medio se prepara de acuerdo a lo señalado por Tilley y Terry (1963: 105). El porcentaje de incremento en la producción de gas durante un cierto tiempo de incubación se relaciona con el efecto de los taninos.

El contenido de taninos en leguminosas forrajeras también ha sido analizado mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

## Notas

<sup>1</sup> Los glicósidos son compuestos orgánicos formados por un azúcar simple (comúnmente un monosacárido) en el cual uno de los átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo (-OH) es reemplazado por otra molécula que generalmente presenta actividad biológica. Los glicósidos se presentan en abundancia en las plantas, algunos de ellos como pigmentos, y son usados en farmacología y en la industria de los colorantes, por mencionar algunos ejemplos.

<sup>2</sup> Algunas de las definiciones de *flavor* se refieren al conjunto de percepciones de estímulos olfativos y gustativos, táctiles y kinestésicos que permiten a un individuo identificar un determinado producto, por ejemplo un alimento. En el caso de los seres humanos, es posible en base a este atributo complejo establecer distintos niveles de agrado o desagrado y, por ende, de aceptabilidad.

<sup>3</sup> La capsaicina es un compuesto que presenta un anillo fenólico en su estructura, emparentado con los gingeroles. A la vez se trata de una sustancia nitrogenada donde el nitrógeno forma parte de una función amida. Su fórmula estructural ha sido presentada en el Capítulo 3 (Figura 14 del mencionado capítulo).

<sup>4</sup> La astringencia se describe como una sensación difusa de sequedad y aspereza que no se restringe a una región particular de la boca o de la lengua (Azeredo *et al.*, 2007:19).

<sup>5</sup> El término conjugación corresponde a la unión, principalmente a partir de una condensación, de varios compuestos monoméricos u oligoméricos, los cuales modifican notoriamente las propiedades del compuesto fenólico original. La conjugación puede producirse con carbohidratos, proteínas, lípidos, aminoácidos, aminas, ácidos carboxílicos, terpenoides, alcaloides o flavonoides.

<sup>6</sup> Cabe recordar que las lactonas son compuestos orgánicos del tipo de los ésteres cíclicos. Se originan a partir de la condensación de un grupo alcohol con un grupo ácido carboxílico dentro de una misma molécula.

<sup>7</sup> La radiación ultravioleta (UV) es una parte de la región no ionizante del espectro electromagnético que comprende aproximadamente el 8-9% del total de la radiación solar. Se la divide tradicionalmente en tres rangos de longitud de onda: UV-C (200-280 nm), que es extremadamente nociva para los organismos, pero no relevante bajo condiciones naturales de irradiación solar; UV-B (280-320 nm), de interés particular debido a que representa sólo aproximadamente el 1,5% del total del espectro, pero puede inducir diversos daños en las plantas; y UV-A (320-400 nm), correspondiendo al 6,3% de la radiación solar recibida, es la porción menos peligrosa de la radiación UV (Hollósy, 2002).

<sup>8</sup> La termogénesis (liberación de calor) ha sido descrita en organismos vegetales en relación con las funciones de la oxidasa alternativa que opera en las mitocondrias vegetales. Bajo este mecanismo, las mitocondrias de las plantas son capaces de oxidar equivalentes de reducción sin generar un gradiente electroquímico de protones ni ATP. Algunas plantas en particular aprovechan este aspecto de la actividad oxidasa alternativa a fin de volatilizar compuestos químicos que actuarán como atrayentes de polinizadores. Se sabe que la termogénesis se verifica en flores de plantas Angiospermas pertenecientes a las familias *Annonaceae*, *Araceae*, *Aristolochiaceae*, *Cyclanthaceae*, *Nymphaeaceae* y *Palmae*. En la actualidad se relaciona también a la termogénesis con la resistencia a factores de estrés y la regulación del metabolismo del carbono.

## Bibliografía

- Azeredo, H. M. C.; Brito, E.S.; Damasceno, L. F.; Pinto, G. A. S. (2007). “Capítulo 3 - Taninos e sua correlação com efeitos nutricionais e sensoriais em alimentos”. En: El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos. Cassel, E. y Figueiró Vargas, R. M. (orgs.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos*. Porto Alegre. Brasil. Programa CYTED – Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. EDIPUCRS.
- Baldwin, E. A.; Bai, J. (2011). “Chapter 4: Physiology of Fresh-Cut Fruits and Vegetables”. En: El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos. Martín-Belloso, O. y Soliva-Fortuny, R. (eds.) *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. . Boca Raton, FL. USA. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Boué, S.; Carter, C.; Ehrlich, K.; Cleveland, T. (2000). “Induction of the Soybean Phytoalexins Coumestrol and Glyceollin by *Aspergillus*”. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2167-2172.
- Bowsher, C.; Steer, M.; Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*. New York. USA. Garland Science. Taylor & Francis Group, LLC

- Cortés Benavides, F. (1986). *Cuadernos de Histología Vegetal*. Madrid. España. Editorial Marbán S. A.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). "Chapter 24: Natural Products (Secondary Metabolites)". En Buchanan, B. B.; Grissem, W.; Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, USA. American Society of Plants Physiologists.
- Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (Eds.). (2006). *Plant secondary metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford. UK. Blackwell Publishing.
- Dalkin, K.; Edwards, R.; Edington, B.; Dixon, R. (1990). "Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). 1. Induction of Phenylpropanoid Biosynthesis and Hydrolytic Enzymes in Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures". *Plant Physiol.* 92, 440-446.
- Fahn, A. (1982). *Plant Anatomy*. New York. USA. Pergamon Press.
- Gil, M. I.; Tudela, J. A.; Espín, J. C. (2005). "Capítulo 8. Pardeamiento". En: González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A.; Cuamea-Navarro, F. (eds.) *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. . Guadalajara, Jalisco, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Proyecto XI.22 "Desarrollo de Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados". CYTED.
- Hayat, S.; Ali, B.; Ahmad, A. (2007). "Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants". En Hayat, S. y Ahmad, A. (eds.). *Salicylic Acid- A Plant Hormone*. Dordrecht. The Netherlands. Springer.
- Heldt, H-W. (2005). *Plant Biochemistry*, Third Edition. MA, USA. Elsevier, Inc.
- Hollósy, F. (2002). "Effects of ultraviolet radiation on plant cells". *Micron* 33: 179-197.
- Jiang, S.; Singh, G. (1998). "Chemical Synthesis of Shikimic Acid and Its Analogues". *Tetrahedron* 54, 4697-4753.
- Lallana, V. H.; Lallana, M. del C. (2003). *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal* [en línea]. Consultado el 27 de diciembre de 2012 en: <[http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/BDesarrolloED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/BDesarrolloED.pdf)>.

- Makkar, H. P. S.; Siddhuraju, P.; Becker, K. (2007). *Methods in Molecular Biology, vol. 393: Plant Secondary Metabolites*. Totowa, NJ. USA. Humana Press Inc.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica. Quinta Edición*. Barcelona. España. Ediciones Omega.
- Nieves-Aldrey, J. L. (1998). "Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva". *Boletín SEA*, 23 3-12.
- Strack, D. (1997). "Chapter 10. Phenolic Metabolism". En: Dey, P. M.; Harborne, J. B (eds.). *Plant Biochemistry*. London. UK. Academic Press.
- Sollai, F.; Zucca, P.; Sanjust, E.; Steri, D.; Rescigno, A. (2008). "Umbelliferone and Esculetin: Inhibitors or Substrates for Polyphenol Oxidases?" *Biol. Pharm. Bull.* 31(12), 2187-2193.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology, Second Edition*. MA, USA. Sinauer Associates, Inc.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology, Fifth Edition*. MA, USA. Sinauer Associates, Inc.
- Tilley, J.M.; Terry, R.A. (1963). "A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops". *J. Br. Grasslands Soc.* 18, 104-111.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht, The Netherlands. Springer.
- von Poser, G. L. (2007). "Capítulo 1 - Taninos: actividades biológicas". En Cassel, E. y Figueiró Vargas, R. M. (orgs.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos*. Porto Alegre. Brasil. Programa CYTED - Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. EDIPUCRS.

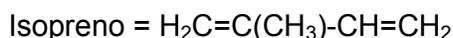
# CAPÍTULO 5

## TERPENOIDES

*Jorge Ringuélet*

### Características y clasificación

Un gran número de sustancias vegetales están incluidas en este grupo de metabolitos secundarios o productos naturales denominados *terpenoides*. Quizás es el grupo más numeroso, con varios miles de estructuras descritas. Todas tienen el mismo precursor biosintético (isopentenil-PP) y tienen como unidad estructural básica a la molécula de isopreno, de cadena abierta, ramificada e insaturada:



Sus esqueletos carbonados se forman por la unión de dos o más de estas unidades de 5 C, de ahí que también se los denomina isoprenoides.

Son liposolubles, o sea solubles en solventes orgánicos, aunque algunos se encuentran solubles en el contenido celular por estar formando parte de glicósidos o poseer alguna transformación estructural.

Se los clasifica según la cantidad de unidades de isopreno que contengan en su estructura (Cuadro 1). Cada una de estas clases de terpenoides tiene importancia en diversos aspectos; algunas en el crecimiento de las plantas, otras en el metabolismo, o en funciones ecológicas de las plantas.

N° unidades de isopreno	N° C	Nombre o clase	Ejemplos
1	5	Hemiterpenos	Isovaleraldehído en esencia de <i>Eucalyptus spp.</i> Componentes de aceites esenciales
2	10	Monoterpenos	Mentol, mirceno, limoneno, pineno. Otros componentes de aceites esenciales.
3	15	Sesquiterpenos	Ácido abscísico (hormona)
4	20	Diterpenos	Ácidos diterpénicos en resinas (ácido abiético) Fitol. Componentes de algunas esencias. Giberelinas. Steviósido. Diterpenos tóxicos.
5	25	Sesterpenos	En hongos. Escasos y poco importantes hasta el presente.
6	30	Triterpenos	Esteroles (colesterol). Triterpenos verdaderos: amirina, limonina
8	40	Tetraterpenos	Carotenoides (carotenos y xantófilas)
n	n	Politerpenos	Caucho en <i>Hevea brasiliensis</i> .

**Cuadro 1.** Principales clases de terpenoides en las plantas

Casi todos los terpenoides naturales tienen estructuras cíclicas con uno o más grupos funcionales (hidroxilos, carbonilos, etc.). Químicamente los terpenoides son, en general, solubles en lípidos y están localizados en el citoplasma. En el caso de los aceites esenciales, éstos se ubican generalmente en glándulas especiales en la superficie de las hojas, mientras que los carotenoides están asociados con cloroplastos en las hojas y con cromoplastos en los pétalos. Son extraídos de los tejidos de las plantas con éter o cloroformo y pueden ser separados por cromatografía en placas de sílico-gel usando los mismos solventes. Sin embargo ofrecen dificultad para ser detectados en pequeña escala, puesto que todos (salvo los carotenoides), son levemente coloreados y no hay un reactivo cromogénico para ellos. En el caso de los compuestos volátiles como los hemiterpenos, mono y sesquiterpenos, los métodos de identificación y cuantificación más recomendables y utilizados son los cromatográficos en fase gaseosa acoplados a espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) (Bandoni y Czepak, 2008).

Es común en los terpenoides encontrar pares de formas isoméricas aislados de las plantas, como es el caso del neral y geranial, dos monoterpenos isómeros

ópticos muy distribuidos, cuya mezcla en los aceites esenciales se conoce como "citral".

A los *Terpenoides* se les atribuye un gran número de funciones.

La producción, acumulación, emisión y secreción de terpenoides está generalmente asociada con la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas: tricomas glandulares, cavidades secretoras, glándulas epidérmicas, conductos y cavidades resiníferas, canales laticíferos.

### **Hemiterpenos**

Es el grupo más pequeño de terpenoides, constituidos por una sola unidad de isopreno, muy volátiles. El hemiterpeno mejor conocido es el **isopreno** propiamente dicho, producto volátil, que es emitido a través de las hojas por muchos vegetales principalmente árboles, helechos y plantas tropicales. La emisión foliar por año es verdaderamente importante y estimada en  $5 \times 10^8$  toneladas de carbono, siendo el principal catalizador de ozono troposférico (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

El isopreno y los monoterpenos son los más abundantes *Compuestos Orgánicos Volátiles Biogénicos* (COVB) emitidos naturalmente por la vegetación a la atmósfera, que se caracterizan por una alta reactividad en la interacción que efectúan en la troposfera durante períodos diurnos y nocturnos. La cuantificación de los COVB es fundamental cuando se intenta establecer una adecuada estrategia para el control del ozono troposférico. Se ha fomentado el uso de herramientas como la teledetección de imágenes satelitales y la aplicación de modelos matemáticos, permitiendo así obtener resultados aproximados de los aportes de los COVB y su contribución en la dinámica atmosférica con los posibles efectos nocivos para la salud humana, los ecosistemas y el medio ambiente (Camargo Caicedo *et al.*, 2010).

El ozono es uno de los gases que se encuentra en la estratósfera (región de la atmósfera terrestre situada entre los 15 y 50 km de altura) por encima de la troposfera (región hasta 15 km de altura, donde se encuentra el aire que respiramos). El ozono estratosférico actúa como un filtro que retiene gran parte

de los rayos ultravioletas provenientes del Sol, por lo que cumple un papel beneficioso para la vida sobre la Tierra. Una disminución en los niveles de ozono en esta región (“agujero de la capa de ozono”) puede resultar perjudicial por originar entre otros problemas cánceres de piel. Pero un aumento del nivel de ozono en la troposfera, región más cercana a la superficie terrestre, puede ser perjudicial a las vías respiratorias y otros problemas al medio ambiente por ser un activo oxidante fotoquímico.

Otro ejemplo de hemiterpeno es el isovaleraldehído, presente en el aceite esencial de varias especies de *Eucalyptus*. Se presenta como un líquido incoloro-amarillo pálido y olor frutado, recordando al durazno y cacao.

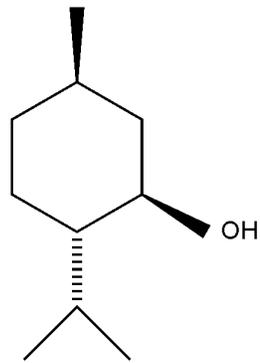
### **Monoterpenos**

Estos compuestos formados estructuralmente por la unión de 2 isoprenos, son abundantes en los aceites esenciales junto con sesquiterpenos, alcoholes simples, aldehídos simples y otros. Poseen punto de ebullición entre 140 y 180 °C, a diferencia de los sesquiterpenos que lo tienen por encima de los 200 °C.

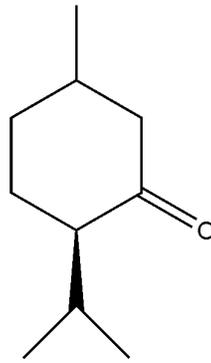
Pueden encontrarse ejemplos con estructura acíclica, monocíclica o bicíclica, que a su vez pueden ser hidrocarburos no saturados o pueden tener grupos funcionales oxigenados (alcoholes, aldehídos o cetonas):

- Acíclicos: entre otros hidrocarburos no saturados podemos mencionar al mirceno y ocimeno; con funciones alcohólicas: geraniol, nerol y linalol; con funciones aldehído: neral y geranial.
- Monocíclicos: como el mentol, mentona, limoneno.
- Bicíclicos: como el  $\alpha$  - pineno, tuyona, alcanfor, 1,8-cineol.

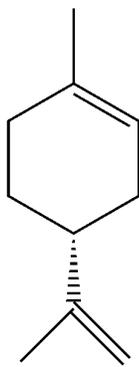
Algunas de las estructuras químicas de los ejemplos mencionados anteriormente se encuentran representadas en las Figuras 1-12



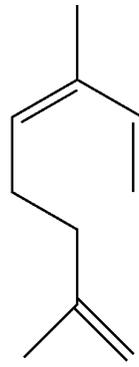
**Figura 1.** *Mentol*



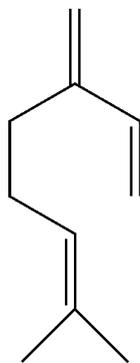
**Figura 2.** *Mentona*



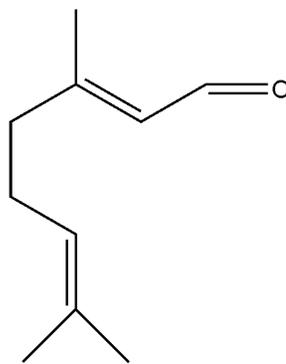
**Figura 3.** *Limoneno*



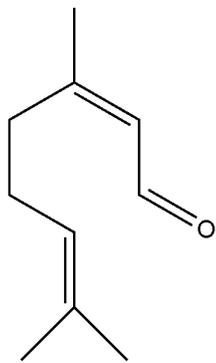
**Figura 4.** *Ocimeno*



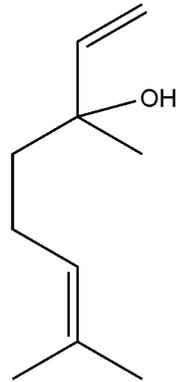
**Figura 5.** *Mirceno*



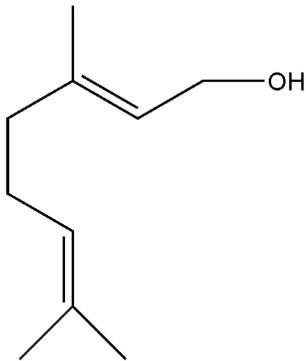
**Figura 6.** *Geranial*



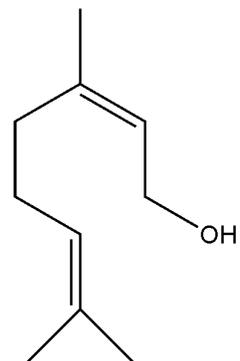
**Figura 7. Neral**



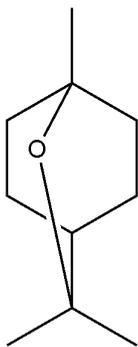
**Figura 8. Linalol**



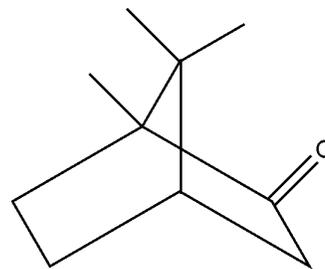
**Figura 9. Geraniol**



**Figura 10. Nerol**



**Figura 11. Cineol**



**Figura 12. Alcanfor**

El  $\alpha$  – pineno es el compuesto más difundido como componente de los aceites esenciales, mientras que el segundo más difundido se lo considera al

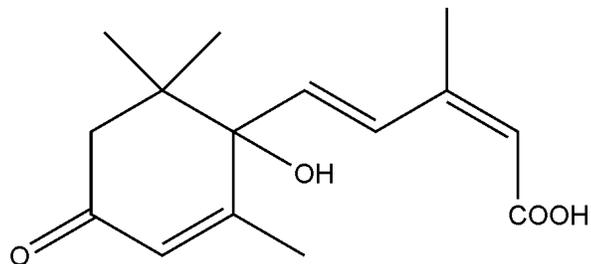
vulgarmente conocido como cineol o eucaliptol. Este último es el 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo octano, éter monoterpeno bicíclico ampliamente difundido en el reino vegetal (Villeco *et al.*, 2005). Varias especies del género *Eucalyptus* poseen altas cantidades de este monoterpeno, por lo que son fuente para la industria farmacéutica, perfumística y todas aquéllas que hacen uso de este producto natural. En *E. globulus* podemos encontrar aproximadamente 70 % o más de este compuesto, en *E. polybractea* un 90 % y en *E. cinerea* un 65 %. En hojas de laurel comestible, *Laurus nobilis*, se encuentra entre un 35 a 48 % y en sus hidrolatos hasta en un 69% (Di Leo Lira *et al.*, 2009).

### **Sesquiterpenos**

En este grupo tenemos ejemplos de moléculas con estructura acíclica como el farnesol (en aceite esencial de rosa y de *petitgrain*); monocíclicos como el  $\gamma$  bisaboleno o limeno (en aceites de limón, lima, bergamota, manzanilla, alcanfor); bicíclicos como el cariofileno (en aceites de clavo, lúpulo, canela).

Otros productos naturales con esta estructura son las lactonas sesquiterpénicas, presentes en muchas especies de la familia botánica *Compositae*, de importancia en quimiotaxonomía. Se conocen más de 500 estructuras con esta naturaleza y pueden clasificarse, de acuerdo con el esqueleto carbocíclico, en: germacranólidos, guayanólidos, eudesmanólidos y xantonólidos. Algunos poseen actividades antitumorales, antimicrobianas y citotóxicas. Un ejemplo es la artemisinina, en *Artemisia annua*, con actividad antimalárica, antitumoral y efectivo agente antiparasitario en el hombre y animales, con promisorios resultados en el control de nematodos de importancia en agricultura (D'Addabbo *et al.*, 2009).

El ácido abscísico (ABA) es otro ejemplo de sesquiterpeno, importante y muy distribuida hormona en plantas (Figura 13). Anteriormente conocido como abscisina o dormina, actúa sobre la apertura y cierre de estomas, sobre la abscisión de frutos y hojas. Es también un potente inhibidor del crecimiento, tiene efectos contrarios a los de las hormonas de crecimiento como auxinas, giberelinas y citocininas. Mientras que la concentración normal en vegetales es de 0,01 a 1 ppm, en plantas marchitas puede haber 40 veces más.



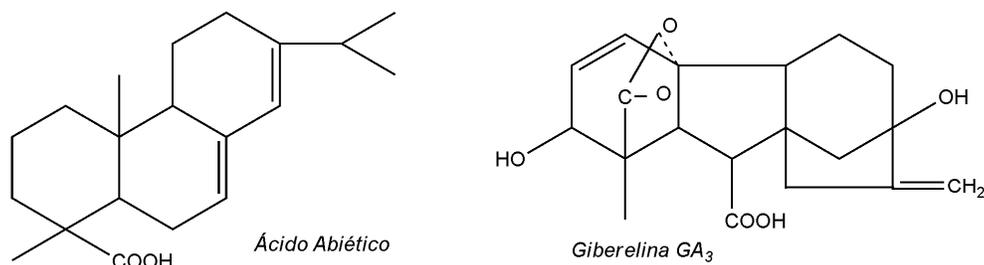
**Figura 13.** *Ácido Abscísico*

El gósipol es otro ejemplo de sesquiterpeno pero con estructura dímera o sea con 30 carbonos, polihidroxiado, por lo que se considera también como un compuesto fenólico (Figura 30), presente en semillas de algodón y tóxico para no rumiantes y rumiantes jóvenes. Como es termolábil, la semilla de algodón pierde su toxicidad al ser tratada con altas temperaturas en el proceso de extracción de aceite.

### **Diterpenos**

Poseen alto punto de ebullición por lo que no se los encuentra normalmente en las fracciones volátiles de los aceites esenciales, pero sí en las fracciones fijas que quedan después de su destilación. Son comunes en resinas de especies arbóreas como los pinos. En esas resinas algunos de los componentes importantes son el ácido abiético (Figura 14) y los ácidos *D* y *L*- pimárico (diterpenos cíclicos).

El amplio grupo de hormonas vegetales conocido como giberelinas también son diterpenos de relevancia, cuya acción como reguladores promueve el crecimiento del tejido vegetal. Se conocen aproximadamente 50 estructuras distintas de giberelinas, la mejor conocida es la giberelina GA<sub>3</sub> o ácido giberélico (Figura 14).



**Figura 14.** *Diterpenos*

El fitol es el único diterpeno acíclico importante que se conoce. Forma parte de la molécula de clorofila y a través de esta cadena alcohólica diterpénica se une a las membranas tilacoidales.

Existen grandes diferencias en la estructura de los distintos diterpenos identificados en cuanto a grupos funcionales y estados de oxidación.

Diterpenos tóxicos para animales superiores se han identificado como las grayanotoxinas en *Rhododendron spp.*, el atractilato en *Atractylis gumífera*.

Algunas algas rojas deben su color a quinonas diterpenoides como el denticulatol presente también en *Rumex chilensis* y la royleanona en *Inula royleana* (Valencia Ortiz, 1995).

El esclareol es un diterpeno bicíclico con grupos funcionales alcohólicos, que está adquiriendo gran importancia por sus propiedades biológicas y por ser material de partida para la síntesis de terpenoides de gran interés industrial. No se encuentra muy distribuido en la naturaleza pero se presenta en altas proporciones en sus principales fuentes naturales (*Nicotiana glutinosa* L. y *Salvia sclarea* L.) (Fernández Barrero, 2005: 223). A partir de este compuesto se obtienen fijadores utilizados en la industria perfumística registrados bajo diferentes nombres comerciales.

El paclitaxel (nombre comercial "taxol") es otro producto natural diterpeno (Figura 15), que se encuentra en las acículas y cortezas de varias especies de la familia botánica *Taxaceae*, entre ellas, *Taxus brevifolia* y *Taxus cuspidata*. Es uno de los 400 derivados taxoides y uno de los más complejos desde el punto de vista estructural, compuesto por un esqueleto central derivado terpenoide modificado por varias reacciones de hidroxilaciones y acetilaciones.

Su fórmula química es  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ . *T. cuspidata* es una especie medicinal tradicional en China empleada como antidiabética, diurética y emenagoga, pero es más conocida actualmente a nivel mundial, por su alta efectividad en tratamientos quimioterapéuticos contra varios tipos de cáncer. El rendimiento de este producto a partir de hojas y cortezas de esa especie es muy baja. Para obtener la cantidad de droga necesaria para el tratamiento de un paciente sería necesario cortar aproximadamente 12 árboles de varios años (Hartzell, 1991). Este problema limita el uso de esta especie como recurso para producir paclitaxel natural, por lo que se encuentran en desarrollo varias técnicas que incluyen cultivo de células, biosíntesis a partir de microorganismos y semi-síntesis del mismo (Galata y Mahmoud, 2012). Como la síntesis total de paclitaxel en laboratorio incluye costosos y complicados procedimientos, se ha encontrado que la semi-síntesis a partir de un precursor natural extraído puede dar lugar a paclitaxel con relativamente menos alteraciones químicas que su síntesis completa (Hu *et al.*, 2008).

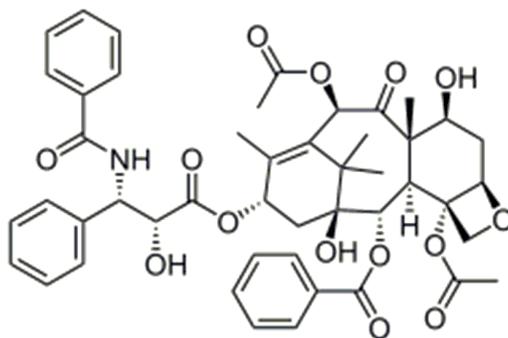


Figura 15. Paclitaxel

## Triterpenos

Poseen una estructura cíclica compleja, son ópticamente activos y generalmente difíciles de caracterizar por su falta de reactividad química. Han sido identificadas y caracterizadas muchas moléculas triterpenoides pero muy pocos tienen amplia distribución. Los que responden a la estructura típica de  $C_{30}$  se los denomina **triterpenos verdaderos**. Un ejemplo es la  $\alpha$  y  $\beta$  amyrina

(Figura 32) y sus derivados pentacíclicos ácido ursólico y oleanólico (Figura 31). Éstos se encuentran en los revestimientos cerosos de las hojas y frutos de manzanas y peras. Otros ejemplos se presentan en resinas y cortezas de árboles, en el látex de *Euphorbia spp.* y de *Hevea spp.* Algunos se caracterizan por presentar un gusto amargo, como la limonina en varios frutos de *Citrus*. Se la ubica dentro de los llamados limonoides y cuasinoides, triterpenos pentacíclicos amargos, de importancia en quimiotaxonomía, distribuidos en *Rutaceae*, *Meliaceae* y *Simaroubaceae*.

La azadiractina es un limonoide, químicamente complejo, presente en *Azadirachta indica* (“neem”), con potente actividad antialimentaria para varios insectos. Son varias moléculas distintas de azadiractina presentes en esa especie, todas relacionadas estructuralmente y en su actividad antialimentaria. Se utilizan productos a base de este limonoide para control de varias plagas en cultivos. Limonoides semejantes, extraídos de *Melia azedarach* (*Meliaceae*), también presentan interesantes actividades insecticidas sobre insectos-plaga (Díaz *et al.*, 2009).

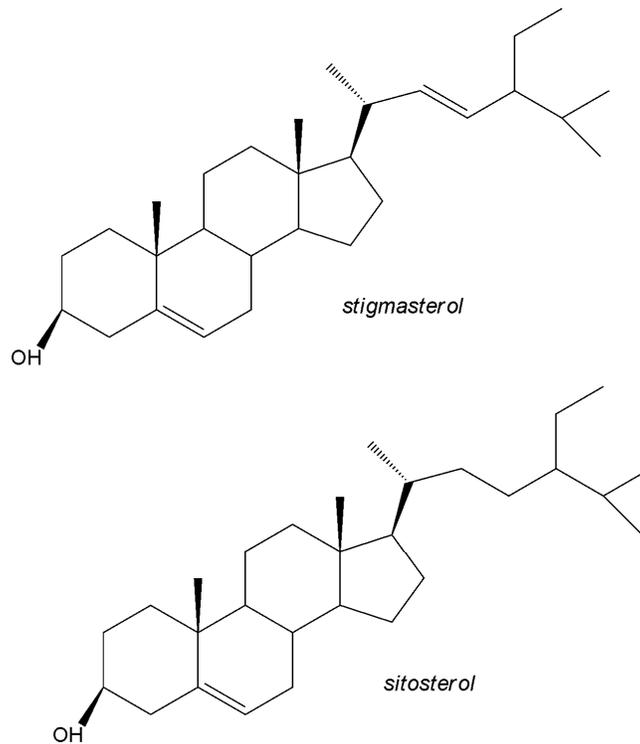
La cuasina y otros cuasinoides se encuentran en la especie tropical *Quassia amara* (“hombre grande”) y en la madera de varias especies de *Picrasma*, ambas pertenecientes a la familia *Simaroubaceae*. Extractos de *Q. amara* presentan una gran actividad como insecticida sobre plagas importantes en agricultura (Ocampo Sánchez y Díaz Rojas, 2006) (véase Capítulo 6).

Otros triterpenos con sabor amargo son las cucurbitacinas, presentes en semillas de especies de la familia *Cucurbitaceae* y en algunas *Cruciferae*.

Los triterpenos probablemente más distribuidos y más estudiados en su metabolismo y propiedades son los *esteroles*, que presentan una estructura basada en el ciclopentanoperhidrofenantreno, con varios grupos alcohólicos. Son sólidos a temperatura ambiente, su nombre deriva del griego “*stereos*” (sólido). Los presentes en animales son denominados zoosteroles, como el colesterol, componente mayoritario de las membranas plasmáticas animales y precursor metabólico de las hormonas esteroideas; otro es el 7-dehidro-colesterol que representa la vitamina D<sub>3</sub>. Algunos actúan como hormonas sexuales, otros como ácidos biliares. Algunos están distribuidos en hongos, los

micosteroles, como el ergosterol del cornezuelo de centeno. Este último es considerado también como un pseudoalcaloide.

Entre los fitosteroles, o sea los presentes en plantas, podemos mencionar al estigmasterol y sitosterol (Figura 16) formando parte de las membranas celulares y membranas de organelos; espinasterol en espinaca; campesterol en *Brassica campestris*. Generalmente tienen 29 C, mientras que la mayoría de los zoosteroles tienen 27, son derivados de los triterpenos verdaderos de C<sub>30</sub>.



**Figura 16.** Esteroles

Otro grupo de triterpenos estudiados es el de las *saponinas*. Se encuentran en el vegetal como glicósidos y han sido detectados en alrededor de 70 familias (Basu y Rastogi, 1967). Estas sustancias naturales se caracterizan por la propiedad de formar espuma en soluciones acuosas y hemolizar los glóbulos rojos de la sangre. Son sustancias tensioactivas. Su estudio en vegetales fue estimulado por la necesidad de obtener fuentes de sapogeninas que puedan ser convertidas en laboratorio en esteroles animales de importancia

terapéutica, como estrógenos y cortisona entre otros (Harborne, 1973). Las saponinas aisladas de *Quillaja saponaria* Molina, de *Gypsophila spp.* y de *Saponaria officinalis* son consideradas únicas por sus propiedades inmunoestimulantes e inmunomoduladoras (Céu Costa *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista agronómico, las saponinas presentes en algunos forrajes, tienen interés por la toxicidad ocasional que presentan para el ganado, como las saponinas en alfalfa.

Otros ejemplos de triterpenoides son los *glicósidos cardíacos* o cardenólidos, estudiados por su actividad farmacológica, específicamente sobre la función cardíaca. Los más conocidos y aprovechados industrialmente son los presentes en hojas de *Digitalis spp.* (*Escrofulariaceae*). Las osas que se encuentran en estos glicósidos se unen a los grupos hidroxilos y han sido aislados, en la hidrólisis de glicósidos cardíacos, más de 20 glúcidos; la mayoría de éstos se conocen naturalmente sólo en esta asociación (Harborne y Baxter, 1993). Como ejemplos podemos mencionar al purpúrea-glucósido A y B, glucogitaloxina en *D. purpurea* (“dedalera”); digoxina y lanatósido B en *D. lanata*. Otro ejemplo es la oleandrina, presente en hojas de *Nerium oleander* (“adelfa”). Varias especies de la familia botánica *Apocinaceae* también poseen glicósidos cardíacos, principalmente en semillas y cortezas. Se han utilizado extractos de estas especies como venenos de flechas (Trease y Evans, 1986.). Todos los glicósidos cardenólidos son muy tóxicos para los animales superiores y el hombre, su uso en farmacología debe realizarse con bajas y muy reguladas dosis (Taiz y Zeiger, 2010).

### **Tetraterpenos**

Los carotenoides son los tetraterpenos más conocidos y estudiados, de gran importancia en el metabolismo de la célula vegetal. Es el grupo de pigmentos liposolubles ampliamente difundido en plantas superiores y bacterias, el segundo pigmento más abundante en la naturaleza. En animales el carotenoide  $\beta$  caroteno (Figura 19) es esencial en la dieta, ya que es precursor de la vitamina A. Los carotenoides presentes en los animales superiores provienen

de su dieta; la leche y yema de huevo poseen carotenoides en su fase lipídica. El pigmento rojo de la langosta de mar, salmón y flamenco también es un carotenoide.

En cuanto a su estructura poseen una cadena poliénica, alternando enlaces carbono-carbono simples y dobles. Esta cadena actúa como cromóforo y es la responsable de la capacidad de estos compuestos de absorber luz en el rango visible, por lo tanto del color de estos pigmentos. La longitud de onda a la que absorben los carotenoides aumenta con la cantidad de dobles enlaces conjugados. El licopeno, que es el caroteno más insaturado, es rojo. La ciclización también influye en el grado de coloración. El  $\beta$  y  $\gamma$  caroteno, aunque tienen el mismo número de dobles enlaces conjugados que el licopeno, son de color naranja y rojo-naranja respectivamente. Debido a la existencia de estos dobles enlaces conjugados, todos los carotenoides presentan isomería *cis-trans*. En general en la naturaleza predominan los isómeros *trans*, aunque en algunos como el fitoeno predominan los isómeros *cis*.

En plantas superiores se localizan en los cloroplastos de tejidos fotosintéticos, junto a las clorofilas; en cambio en los tejidos no fotosintéticos como pétalos de flores, frutos y raíces como la zanahoria, los carotenoides se localizan en cromoplastos. Encontramos una compleja mezcla de carotenoides en algas y bacterias fotosintéticas.

Tienen dos funciones principales:

- Como pigmentos accesorios de la fotosíntesis, en el proceso de absorción de luz durante este proceso metabólico. El espectro de absorción de los carotenoides está comprendido entre los 450 y 550 nm, mientras que la clorofila absorbe en la región azul del espectro visible, aproximadamente 450 nm y en la región roja, 650 a 700 nm. Además previenen a la clorofila de la foto-oxidación, o sea de su destrucción en presencia de luz y  $O_2$ .

- Actúan como materia colorante, en flores, frutos y hojas no verdes. En flores, los carotenoides aparecen de color amarillo o anaranjado (narciso, pensamiento, caléndula, diente de león, crisantemos), mientras que en frutos pueden aparecer también con color rojo (ají, tomate). Hay unos pocos compuestos incoloros considerados carotenoides.

Los carotenoides más distribuidos podemos clasificarlos en dos grupos según sus características estructurales:

- 1) Hidrocarburos no saturados, como los carotenos y el licopeno.
- 2) Derivados oxigenados, como las xantófilas.

El más simple estructuralmente es el *licopeno*, presente en frutos de sandía y tomate. Su molécula es una larga cadena de 8 unidades de isopreno, con dobles ligaduras alternadas (Figura 17).

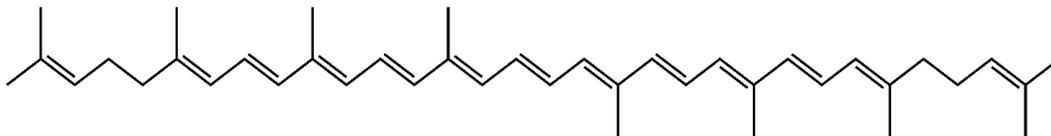


Figura 17. *Licopeno*

La ciclización del caroteno en un extremo representa a la molécula de  $\gamma$  *caroteno* (Figura 18), y la ciclización en ambos extremos a la de  $\beta$  *caroteno* (Figura 19), que es la provitamina A. El  $\alpha$  (Figura 20) y el  $\epsilon$  *caroteno* son isómeros del  $\beta$  *caroteno*, y se diferencian en la posición de las dobles ligaduras en los ciclos de los extremos.

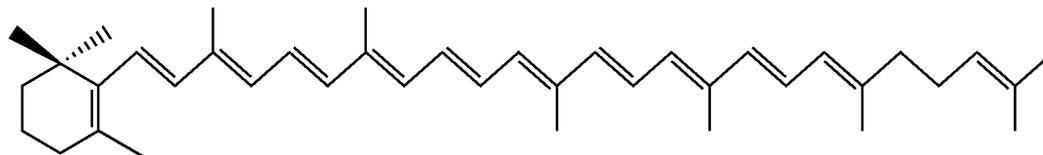


Figura 18.  $\gamma$  *caroteno*

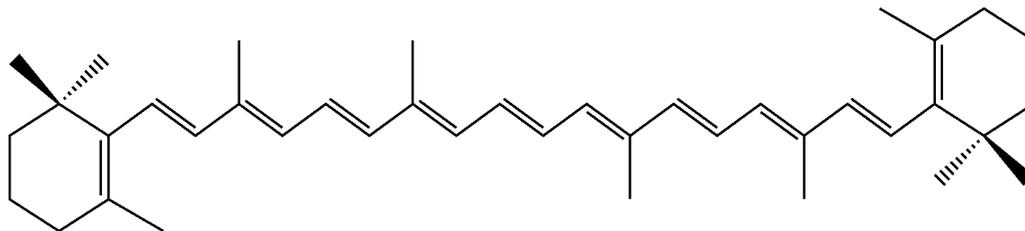


Figura 19.  $\beta$  *caroteno*

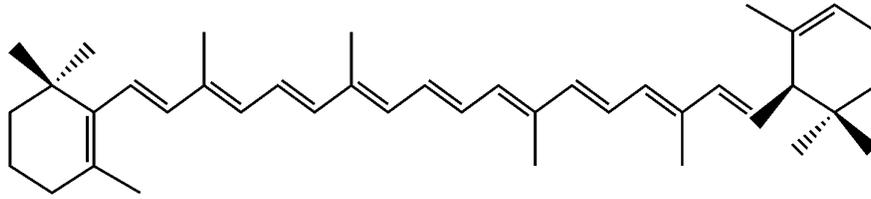


Figura 20.  $\alpha$  caroteno

Los carotenoides oxigenados son las *xantófilas*, principales constituyentes del pigmento amarillo de las hojas, clásico color “otoñal”, también presentes en muchas flores, frutos y en la yema de huevo.

La xantófila más difundida es la *luteína* (Figura 21), que posee la estructura del  $\alpha$  caroteno pero con un hidroxilo adicional en cada grupo terminal.

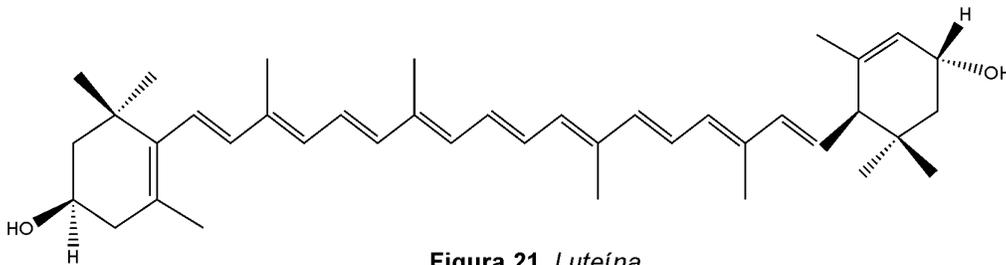


Figura 21. *Luteína*

Otro ejemplo es la *criptoxantina* (Figura 22), en mandarina y cáscara de naranja. Sólo contiene un grupo hidroxilo e igual estructura al  $\beta$  caroteno.

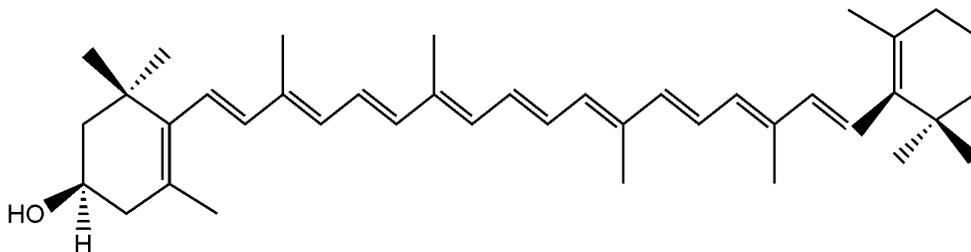
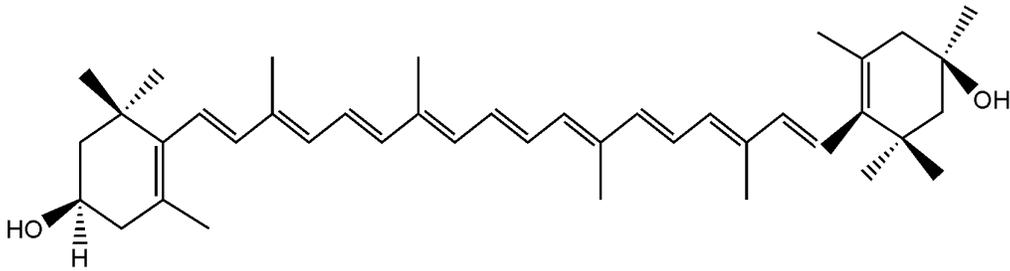


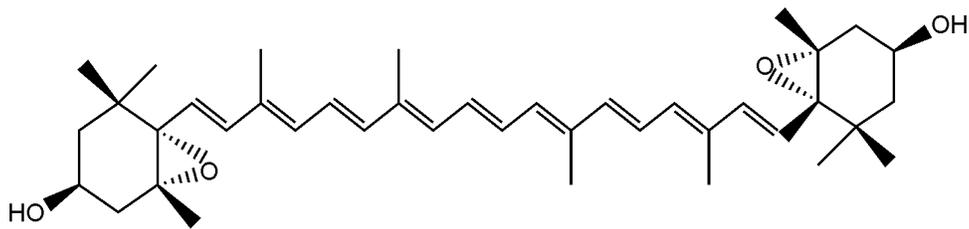
Figura 22. *Criptoxantina*

La *zeaxantina* en maíz, tiene dos funciones hidroxilos e igual estructura que el  $\beta$  caroteno (Figura 23).



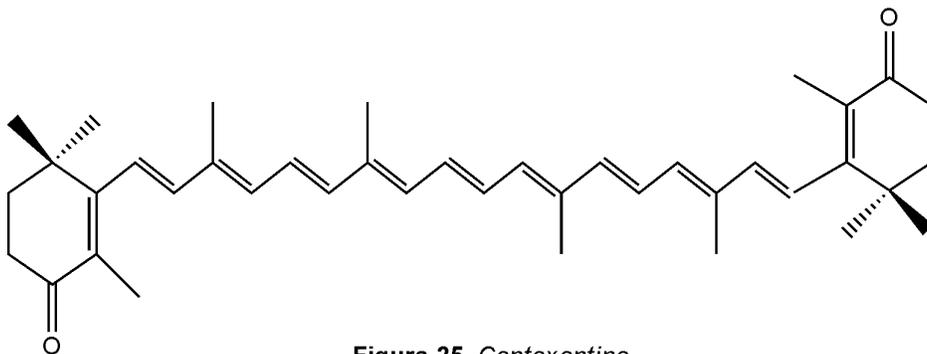
**Figura 23.** *Zeaxantina*

La *violaxantina* está presente en flores del género *Viola* y en todas las hojas verdes. En su estructura además de grupos hidroxilo tiene grupos epoxi (Figura 24).



**Figura 24.** *Violaxantina*

Además las xantófilas pueden contener grupos cetónicos, como la *cantaxantina* (Figura 25), en pétalos de algunas flores.



**Figura 25.** *Cantaxantina*

También hay xantófilas con grupos cetona e hidroxilo, como la capsorubina (Figura 26) en frutos de ají rojo.

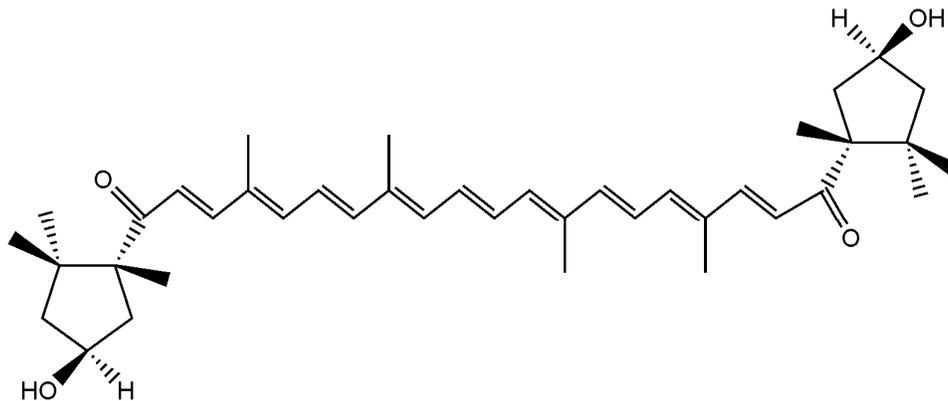


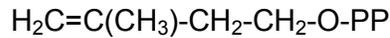
Figura 26. Capsorubina

Para la *extracción y separación* no hay un método universal, pero todos son similares en sus principios. Para extraerlos se utiliza un solvente orgánico como metanol, acetona, etanol, hexano o mezcla de dos o más de ellos. Para la separación e identificación se utiliza principalmente la cromatografía en capa fina.

Los carotenoides poseen gran importancia nutricional para el hombre y animales. Por la actividad como provitamina A del  $\beta$  caroteno y otros de estructura semejante, son importantes en la prevención de la degeneración macular de la retina, la disminución del riesgo en la formación de cataratas y proliferación de epitelios. También se han relacionado con un mejoramiento del sistema inmune, disminución del riesgo de cánceres y enfermedades cardiovasculares por la propiedad antioxidante de los carotenos a través de la desactivación de los radicales libres (van den Berg *et al.*, 2000). Además poseen acción protectora frente a la radiación UV, teniendo en cuenta la longitud de onda a la que absorben algunos carotenoides (Meléndez Martínez *et al.*, 2004).

## Biosíntesis de terpenoides

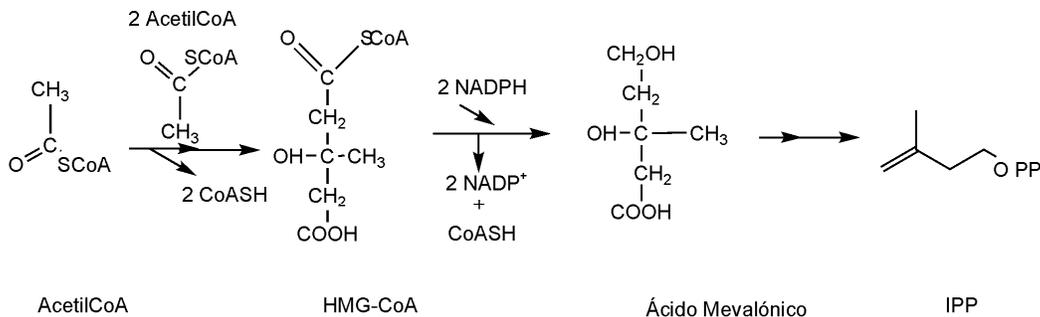
Aunque los terpenoides derivan estructuralmente de la molécula de isopreno, esta sustancia no es el precursor “*in vivo*”. En lugar de ella, el compuesto encontrado es el *isopentenilpirofosfato (IPP)*:



La biosíntesis de los terpenoides está *compartimentalizada*. Los sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) y politerpenos son producidos en *compartimentos citosólicos* y en el *retículo endoplasmático*, mientras que el isopreno (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>) y tetraterpenos (C<sub>40</sub>) se sintetizan en los *plástidos* (Croteau *et al.*, 2000).

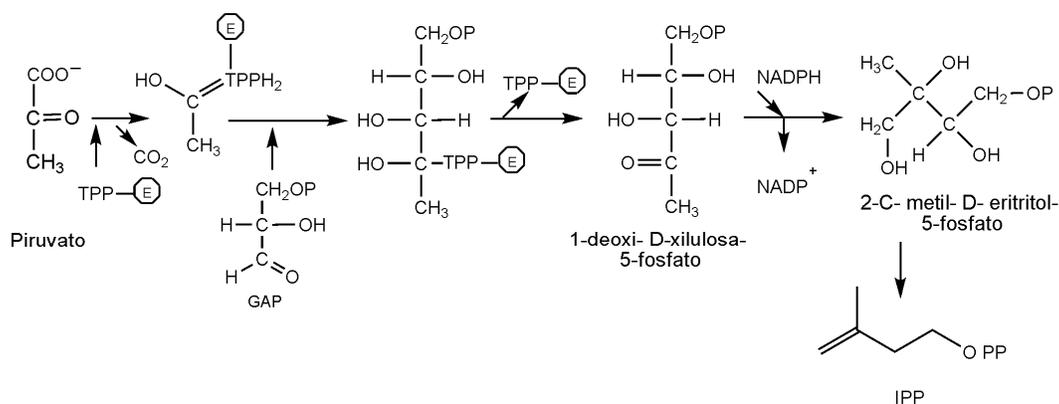
Las evidencias indican que las vías biosintéticas para la síntesis del IPP difieren mucho en esos compartimentos: la clásica *vía del ácido mevalónico* en el citosol y retículo endoplasmático, y la *vía del gliceraldehído fosfato y piruvato* en los plástidos.

En la *vía del ácido mevalónico*, reaccionan 3 moléculas de acetil-CoA para formar el compuesto intermediario hidroximetil glutaril Coenzima A (HMG-CoA), que se reduce para formar ácido mevalónico (C<sub>6</sub>). Dos fosforilaciones posteriores y una descarboxilación originan el IPP (Figura 27).



**Figura 27:** Biosíntesis del Isopentenilpirofosfato, vía del ácido mevalónico. Adaptado de Buchanan *et al.*, 2000.

En los plástidos, el IPP se sintetiza a partir del gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y el piruvato (Figura 28). En esta vía, el piruvato reacciona con la tiamina pirofosfato (TPP) para dar un esqueleto de dos carbonos: hidroxietil-TPP, que se condensa con el GAP. La TPP es liberada para formar un intermediario de cinco carbonos: 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato, que sufre un reacomodamiento y reducción para formar 2-C-metil-D-eritritol 4- fosfato y luego se transforma para dar el IPP.



**Figura 28:** Biosíntesis del Isopentenilpirofosfato, vía del gliceraldehído fosfato y piruvato. Adaptado de Buchanan et al., 2000.

Dos IPP se unen para dar *geranil-pirofosfato* (C<sub>10</sub>), el precursor inmediato de los *monoterpenos*. El *geranil PP* puede condensarse con otra unidad de IPP para producir el intermediario de C<sub>15</sub> *farnesil pirofosfato*, precursor de los *sesquiterpenos*. Este *farnesil PP* puede sufrir una extensión de su cadena al unirse con otra unidad de IPP para producir el intermediario de C<sub>20</sub> *geranil geranil PP*, precursor de todos los *diterpenos* vegetales.

Dos moléculas del intermediario *farnesil PP* pueden condensarse, actuando como catalizador la *escualenosintasa*, para formar otro intermediario importante en la biosíntesis de terpenoides como es el *escualeno*, precursor de los *triterpenos* (C<sub>30</sub>).

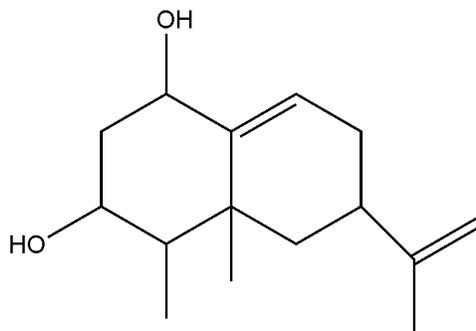
Los *tetraterpenos* (C<sub>40</sub>) se sintetizan a partir del *fitoeno*, producido por la condensación de dos moléculas de *geranilgeranil PP* y la participación de la

enzima fitoenosintasa a través de un mecanismo similar a la escualenosintasa. El camino biosintético es bien conocido, sin embargo son limitados los conocimientos sobre su regulación (Howitt y Pogson, 2006).

En plantas superiores pueden ocurrir polimerizaciones de IPP dando lugar a polímeros de largas cadenas, comúnmente secretadas como un látex por células especializadas. A estas moléculas se las denomina *politerpenos*. Un ejemplo es el caucho (isómero cis), producido por *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*), la gutapercha (isómero trans), y el látex producido por *Palaquium guta* (*Sapotaceae*).

Un gran número de terpenoides sintetizados en las plantas se originan por modificaciones de los esqueletos intermedios mencionados, en reacciones catalizadas por distintas enzimas *terpenoide-sintasas*. Esas modificaciones incluyen oxidaciones, reducciones, isomerizaciones y uniones que originan moléculas con distintas propiedades funcionales. Como ejemplos podemos mencionar:

- el capsidiol y gosipol (Figuras 29 y 30) como derivados del farnesil PP. El gosipol es un antioxidante e inhibidor de la polimerización, tóxico para animales monogástricos. Los cerdos y conejos son los más sensibles, mientras que las aves de corral son relativamente más tolerantes (Makkar *et al.*, 2007). Se lo encuentra en semillas de algodón (*Gossypium spp*).



**Figura 29.** *Capsidiol*

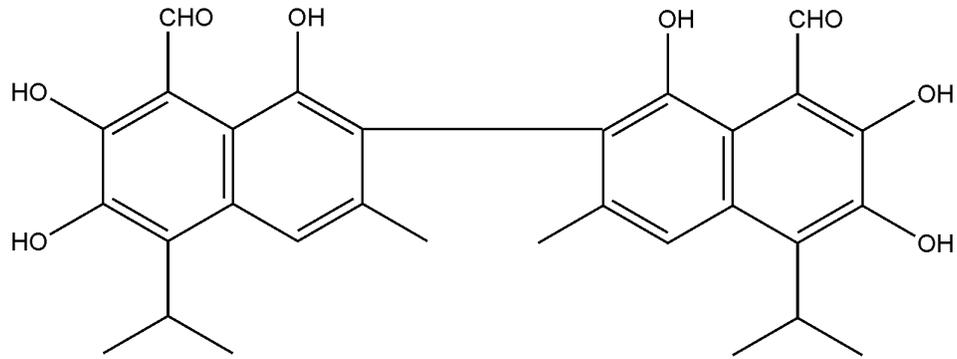


Figura 30. *Gossipol*

- el ácido oleanólico (Figura 31) y la  $\beta$  amyrina (Figura 32), ambos derivados del escualeno. El ácido oleanólico se encuentra como glicósidos en *Lonicera nigra* (*Caprifoliaceae*) y en la remolacha azucarera, *Beta vulgaris* (*Chenopodiaceae*). Los compuestos  $\alpha$  y  $\beta$  amyrina están presentes en el látex de varias especies, como *Erythroxylum coca* (*Erythroxylaceae*), *Ficus variegata* (*Moraceae*) y en resinas de *Canarium spp.*

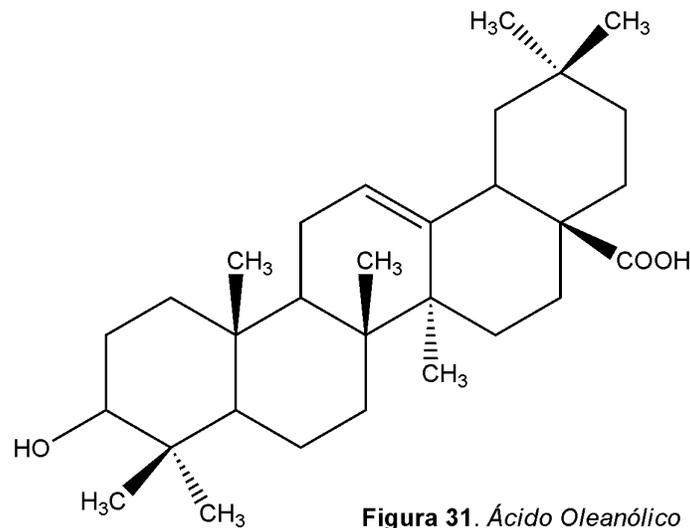


Figura 31. *Ácido Oleanólico*

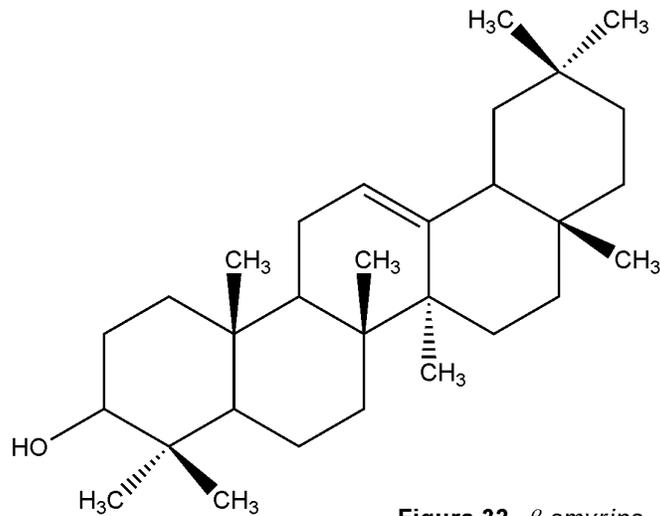


Figura 32.  $\beta$  amyrina

Desde el punto de vista cuali y cuantitativo, los *hemiterpenos*, *monoterpenos* y *sesquiterpenos* son los componentes principales de los *aceites esenciales*, de ahí que a estos productos naturales se los trate en este capítulo. De todos modos es importante señalar que también poseen otros componentes simples como ácidos, alcoholes, cetonas.

## Aceites Esenciales

El término aceite esencial o esencia presenta muchas dificultades cuando se busca una definición que generalice este concepto. Existen definiciones desde el punto de vista químico, botánico y desde una perspectiva industrial. Todas coinciden en aspectos tales como que son insolubles en agua, que pertenecen al metabolismo secundario de las plantas, que están formadas por varios compuestos químicos de estructura diferente y que todas poseen en su composición algún terpenoide.

Podríamos definir un aceite esencial como la fracción química de un vegetal que es arrastrada por vapor de agua, volátil, formada mayoritariamente por compuestos de naturaleza terpenoide y que generan el olor característico de ese vegetal. En su composición también se encuentran compuestos aromáticos derivados de fenoles, alcoholes simples, cetonas y otras moléculas alifáticas.

En ciertos ambientes industriales o técnicos se diferencian los términos aceite esencial y esencia, dejando este último término para los productos de síntesis y

el término aceite esencial para los naturales, producidos por las plantas. En el presente texto se los considera sinónimos.

Debemos señalar que forman parte del llamado metabolismo secundario, o sea se sintetizan a partir de metabolitos primarios como son los glúcidos, proteínas y lípidos, además de no ser esenciales para la vida de las células y no encontrarse en todas ellas. Recordemos que un concepto bioquímico indiscutible es aquél que señala que en toda célula para que tenga vida debe haber glúcidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En cambio no es necesaria para la célula la existencia de metabolitos secundarios.

Son productos que presentan una variada y compleja composición química, con grandes variaciones de calidad aun cuando provengan de una misma especie vegetal, como sucede con la gran mayoría de los productos naturales.

Sin embargo los aceites esenciales cumplen un papel determinado en las plantas que los poseen. En algunos casos se les atribuye funciones de defensa ante el ataque de microorganismos y/o animales depredadores. En otras se cree que la síntesis de estas fracciones químicas sirve sólo para poder transformar excedentes del metabolismo primario difícil de eliminar.

Lo indiscutible, a la luz de la historia de la humanidad, es que ésta hizo uso de las esencias y que las utiliza cada vez más, con diversos fines y en diferentes escalas. En antiguas civilizaciones se extraían para perfumar, para curar algunas afecciones y en definitiva siempre para buscar una mejor calidad de vida. Actualmente está en franca expansión el uso de aceites esenciales naturales principalmente en la industria alimenticia, farmacéutica, perfumística y cosmética, en reemplazo de productos sintéticos.

### **Propiedades físicas y químicas**

La caracterización de un aceite esencial se realiza efectuando diversas determinaciones físicas y químicas. Por su capacidad de refractar la luz, cada aceite esencial tiene un *índice de refracción* característico, dentro de un estrecho rango, por lo que esa medición es utilizada en el control de pureza y

en la evidencia de que es genuino. Como la mayor parte de sus componentes son ópticamente activos, la determinación del *poder rotatorio* es otra de las constantes utilizadas para su identificación.

La *densidad* es otra medida física utilizada para caracterizar esencias, siendo la mayoría menor a 1, o sea menos densas que el agua. Algunas de las más pesadas son la del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y nuez moscada (*Myristica fragans*).

En general los aceites esenciales son líquidos, con excepciones como el alcanfor (*Cinnamomum camphora*), palo santo (*Bulnesia sarmiento*), falso alcanfor (*Cinnamomum glandulífera*) que son sólidos a temperatura ambiente. Son translúcidos y de color débilmente amarillo, con excepciones como el aceite de ajeno (*Artemisia absinthium*) de color negro; el de manzanilla (*Matricaria recutita*) de color azul; el de bergamota (*Citrus bergamia*), verde.

Entre las determinaciones químicas se utilizan distintos índices como el de acidez, índice de éster, determinación de alcoholes, aldehídos, cetonas y otros. Con el desarrollo de las técnicas analíticas cromatográficas y la espectrometría de masas especialmente, actualmente en la industria se prioriza la determinación de la composición cuali-cuantitativa para el análisis de la calidad de un aceite esencial. Igualmente debe aclararse que en la industria perfumística no hay mejor evaluación que la organoléptica, o sea la apreciación del olor principalmente por parte de personal entrenado, basándose en parámetros subjetivos.

### **Composición de los aceites esenciales**

Con las tecnologías analíticas de las últimas décadas, se han podido identificar gran cantidad de compuestos en las esencias analizadas. En algunas se han identificado más de 100 compuestos, la mayoría terpenoides, aunque algunos son alcoholes simples, ácidos, ésteres, aldehídos o compuestos nitrogenados de sencilla estructura.

Cada componente le confiere una característica odorífera a la esencia, es responsable de una “nota” o “sensación al olfato”. Al estar combinadas las

distintas sustancias cambian la nota u olor, lo que caracteriza al aroma de la planta de la cual proviene.

Características odoríferas de algunos componentes de esencias:

<u>Compuesto</u>	<u>Nota</u>
Acetato de 3-hexenilo	herbácea
Acetato de bencilo	floral
Salicilato de bencilo	floral
Geraniol	floral, rosa, geranio
Linalool	herbácea
Acetato de linalilo	floral, herbácea
Cariofileno	madera
Benzoato de metilo	frutal
Pineno	madera
Farnesol	frutal

En la mayoría de las esencias existen 1 ó 2 compuestos mayoritarios y muchos compuestos minoritarios, algunos en proporción muy baja pero que le otorgan las características más deseables desde el punto de vista organoléptico.

El limoneno, que es un monoterpeno monocíclico, se encontró en un 96,02 % en la cáscara de la mandarina *Citrus nobilis*, mientras que en la mandarina *Citrus reticulata* se lo encontró en un 83,71%. Los componentes mayoritarios que le siguen al limoneno en *C. reticulata* son el  $\gamma$  terpineno con el 3,85 % y el terpinoleno en un 5,95%. En cambio en *C. nobilis* el más abundante después del limoneno es el  $\beta$ -mirceno con un 3,66%, todos monoterpenos monocíclicos. (Blanco Tirado *et al.*, 1995).

### **Distribución en las plantas**

Hay muchas familias botánicas en las que encontramos especies con aceites esenciales. Aunque se han señalado más de 60 familias, las más

características son las *Asteraceae* (o *Compositae*), *Labiatae*, *Umbeliferae*, *Mirtaceae*, *Rutaceae* y *Lauraceae*.

Se pueden encontrar localizados en distintos órganos de la planta. Algunos solamente en hojas y flores, otros sólo en la raíz, en la corteza, en los frutos, etc.

Algunos ejemplos:

En las raíces:

- Sándalo (*Santalum album*)
- Valeriana (*Valeriana officinalis* L)
- Aceite de vetiver (*Vetiveria zizanioides*)
- Aceite de jengibre (*Zingiber officinale*)

En las semillas y frutos:

- Aceite de anís (*Pimpinella anisum*)
- Hinojo (*Foeniculum vulgare*)
- Coriandro (*Coriandrum sativum*)
- Eneldo (*Anethum graveolens*)

En las hojas:

- Mentas (*Mentha spp.*)
- Orégano (*Origanum spp.*)
- Romero (*Rosmarinus officinalis*)
- Salvia (*Salvia officinalis*)
- Albahaca (*Ocimum basilicum*)
- Lemongrass (*Cymbopogon citratus*)

En el leño:

- Palo santo (*Bulnesia sarmientoi*)

En la corteza:

- Canela (*Cinamomun zeylanicum*)

En las flores:

- Lavanda (*Lavandula spp.*)
- Ylang-ylang (*Cananga odorata*)
- Jazmín (*Jasminum officinale* L, *J. grandiflorum* L)
- Rosa (*Rosa spp.*)

Algunas especies contienen esencias en diferentes partes de la planta, pero en muchos casos difiere enormemente la composición y por lo tanto sus propiedades y usos, según el órgano en que se encuentran.

Por ejemplo, es muy distinta la composición química y por lo tanto el aroma de la esencia extraída de los frutos del coriandro y la de sus hojas. Por ello en este caso hay que indicar si la esencia proviene de los frutos o de las hojas, aunque con esta especie es muy extraño que a alguien le interese la esencia de las hojas.

Lo mismo sucede con la esencia extraída de las cáscaras de los cítricos y de sus hojas. En el caso del limón, la esencia extraída de la cáscara es muy utilizada en todo el mundo, principalmente como aromatizante de bebidas. En cambio hay variedades de naranja donde el valor está en la esencia extraída de las hojas y brotes tiernos, en este caso se la denomina comercialmente como esencia de “petit grain” y es muy usada en perfumería.

En la corteza de la canela de Ceylán predomina el aldehído cinámico, en las hojas de la misma planta predomina el eugenol, mientras que el alcanfor es el componente mayoritario de las raíces.

En el caso de la ruda, *Ruta graveolens*, compuestos oxigenados como cetonas, alcoholes, furanocumarinas, predominan en las hojas, e hidrocarburos como geigerenos ( $C_{12}H_{18}$ ,  $C_{12}H_{16}$ ) son mayoritarios en las raíces.

Hay especies herbáceas donde la esencia se concentra en hojas, sumidades florales y flores propiamente dichas. En cambio en los tallos es muy bajo el contenido. Sin embargo, por el costo que tiene separar tallos de hojas, la extracción se realiza de toda la parte aérea de la planta. Es el caso de hierbas como las mentas, tomillo, orégano, romero, salvia, laurel y muchas otras.

## **Plantas aromáticas y plantas medicinales**

Al hablar de aceites esenciales no podemos dejar de mencionar al grupo de plantas aromáticas, ya que se llaman así justamente por ser las que sintetizan y acumulan esos compuestos. Aunque la gran mayoría de las plantas superiores sintetizan algún o algunos componentes volátiles y con olor característico, se llama aromáticas a aquellas que acumulan esas fracciones en ciertas estructuras anatómicas o cavidades extracelulares como glándulas epidérmicas, tricomas glandulares, canales resiníferos u otras. Además tienen importancia económica por la presencia de esos componentes. Como los aceites esenciales tienen alguna actividad biológica referida al tratamiento de trastornos o enfermedades, también se las considera plantas medicinales a las aromáticas. Pero la denominación de planta medicinal tiene una implicancia mucho mayor, ya que es aquella especie que por sus antecedentes puede ser utilizada para el tratamiento de alguna afección. Y esa actividad puede deberse a cualquier componente químico, no exclusivamente a un aceite esencial. Por lo tanto se puede afirmar que *toda planta aromática es medicinal pero no toda medicinal es aromática*. Hay muchas especies medicinales que no son consideradas plantas aromáticas, ya que de ellas no se extrae ningún aceite esencial. Es el caso de especies como *Aloe spp.*, *Silybum marianum* (cardo mariano), etc.

## **Determinación cuantitativa de aceites esenciales**

Existen varios métodos para conocer el contenido de aceite esencial en un material vegetal, pero todos se basan en las propiedades que tienen los mismos de ser arrastrables con vapor de agua y no miscibles con ella. Tradicionalmente el más utilizado en los laboratorios es el prescrito por la Farmacopea Europea y varios organismos de normalización (Real Farmacopea Española, 1997). Se lo denomina equipo con trampa Clevenger (Figura 33).

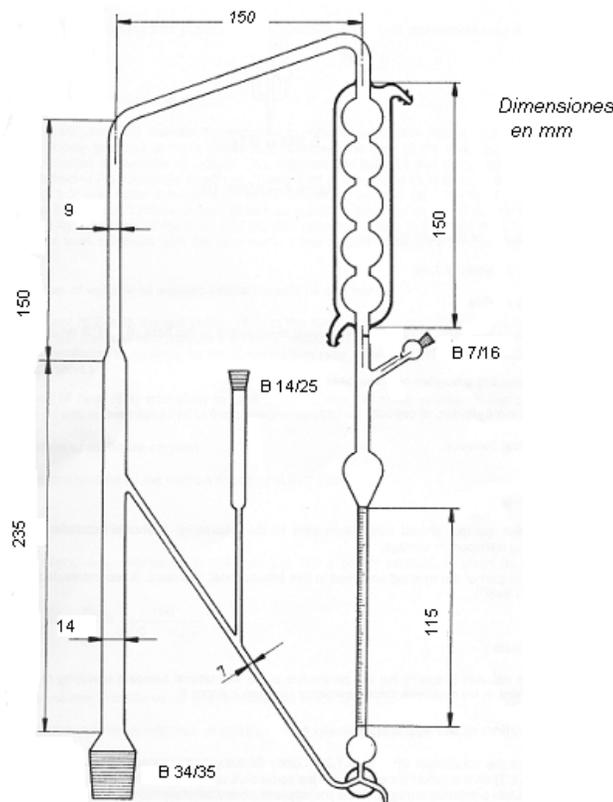


Figura 33 Trampa Clevenger

Se coloca el material vegetal exactamente pesado (50 a 100g según la especie) en un balón con agua, que se acopla a una trampa o colector especialmente diseñado para esta determinación.

Se coloca sobre una fuente de calor y se produce la destilación recibiéndose agua y aceite en el tubo graduado de la trampa (1 mL dividido en 0,01 mL). Terminada la destilación que puede tardar una o varias horas según el material, se mide el volumen de aceite para luego calcular el contenido expresado en porcentaje volumen/peso.

Los resultados obtenidos por este equipo de laboratorio no siempre son los obtenidos en equipos industriales. Tampoco la calidad obtenida es igual, ya que las condiciones en que se encuentra el material vegetal pueden alterar su composición, por ejemplo al estar inmerso en agua hirviendo varias horas pueden producirse hidrólisis de ésteres y/u oxidaciones de aldehídos y cetonas.

En los ensayos llevados a cabo en nuestros laboratorios se observa que en este equipo se obtiene aproximadamente un rendimiento 20 % mayor que el logrado en extracciones con destilador por arrastre con vapor en equipo a escala piloto.

### **Contenido de aceites esenciales en las plantas**

El contenido de aceites esenciales en las plantas se expresa generalmente en por ciento (%), pudiendo ser peso sobre peso (p/p) o volumen sobre peso (v/p). Como los aceites esenciales tienen una densidad muy cercana a la del agua, ambas expresiones no difieren mucho. Aunque la primera expresión es la más correcta, ya que en el mercado se comercializan por unidad de peso (kilogramos), en adelante se expresarán los valores en % v/p salvo que se indique lo contrario. O sea que el dato presentado corresponde a los ml de aceite esencial que rinden 100 gramos de material vegetal, obtenido en equipo con trampa Clevenger.

Es importante señalar que en todo valor de rendimiento o contenido debe indicarse si es sobre el material vegetal fresco, seco u oreado. Las diferencias pueden ser muy grandes ya que el contenido de agua de las plantas es muy variable de acuerdo al momento del día, a la época del año, al estado fenológico y la extracción de la esencia puede realizarse sobre el material luego de varias horas de cosechado o incluso sobre el material completamente deshidratado hasta peso constante al aire. Por ejemplo, plantas de menta al cosecharse pueden tener entre un 55 % a 70 % de agua, o sea un contenido de materia seca de 45 % a 30 % respectivamente. Apenas cortada comienza a perder agua por evaporación con una velocidad directamente relacionada a la temperatura y humedad relativa del aire que la rodea y a medida que se deshidrata, el rendimiento de esencia será mayor expresado en %, pero eso no indica que aumenta el contenido en la planta de menta, sino que aumenta la cantidad relativa al peso de la menta en estudio.

Pongamos un ejemplo:

- Una tonelada de *Mentha piperita* que al cosechar tiene 41,05 % de materia seca.

- Si la destilamos fresca, recién cortada, nos rinde 8 litros de esencia, por lo tanto el rendimiento es 0,8 % sobre el peso fresco (s/pf).

- Si la destilamos seca, nos quedan 410,5 kilos de menta y también nos rinde 8 litros de esencia, por lo tanto el rendimiento es 1,94 % sobre el peso seco (s/ps).

En muchos casos la destilación se lleva a cabo con el material que se cortó hace algunas horas y aún no se deshidrató totalmente. Lógicamente el rendimiento en % será intermedio entre los valores mencionados.

Hay que considerar en el ejemplo mencionado que si el secado del material fue llevado a cabo en buenas condiciones, la pérdida de esencia durante dicho proceso es despreciable. Por eso se menciona que en los dos casos (destilando el material fresco y seco) se obtienen 8 litros de esencia.

Al informar el contenido de esencias de una especie vegetal es importante como dato complementario indicar la procedencia de ese material y si es posible el estado fenológico de la planta, así como la parte de la cual se extrajo (toda la parte aérea, hojas, ramas, tallos, flores, frutos, semillas o raíces).

Entre muchos ensayos llevados a cabo en La Plata (Buenos Aires, Argentina), con material cosechado y destilado en la zona, mencionaremos algunos resultados obtenidos en el laboratorio de Bioquímica y Fitoquímica de la FCAyF-UNLP (Cuadro 2):

Material	Parte de la planta	Rendimiento*
<i>Aloysia triphylla</i> ("cedrón")	Hojas y tallos	0,50 % s/ps
<i>Artemisia absinthium</i> ("ajenjo")	Hojas y tallos	1,60 % s/ps
<i>Artemisia dracunculoides</i> ("estragón francés")	Planta entera parte aérea. Inicio de verano	0,63 % s/pf
<i>Bulnesia sarmientoi</i> ("palo santo")	Residuos de la industria maderera	1,4 % s/ps
<i>Cinamomum glandulifera</i> ("falso alcanfor")	Hojas. Invierno	4,5 % s/ps
<i>Cymbopogon citratus</i> ("lemongrass")	Planta entera parte aérea. En verano	0,32 % s/pf
<i>Laurus nobilis</i> ("laurel")	Ramas con flores	0,90 % s/ps
<i>Laurus nobilis</i> ("laurel")	Frutos maduros enteros	0,22 % s/pf
<i>Laurus nobilis</i> ("laurel")	Frutos maduros molidos	0,50 % s/pf
<i>Lavandula hybrida</i> ("lavandín")	Inflorescencias enteras pedúnculos	1,90 % s/pf
<i>Lippia alba</i> ("salvia morada") Quimiotipo linalol.	Ramas enteras en floración	0,83 % s/ps
<i>Lippia alba</i> ("salvia morada") Quimiotipo dihidrocarvona.	Ramas enteras en floración	1,36 % s/ps

<i>Lippia alba</i> ("prontoalivio") Quimiotipo carvona.	Ramas enteras e floración	1,43 % s/ps
<i>Lippia turbinata</i> ("poleo")	Hojas y tallos	0,80 % s/ps
<i>Melissa officinalis</i> ("melisa").	Planta entera parte aérea. Comienzo de floración	0,09 % s/ps
<i>Mentha piperita</i> ("menta inglesa")	Planta entera, parte aérea. Plena floración	2,1 % s/ps
<i>Mentha arvensis</i> ("menta japonesa")	Planta entera, parte aérea. Plena floración	2,8 % s/ps
<i>Mentha spicata</i> ("menta spearmint")	Planta entera, parte aérea. Plena floración	1,2 % s/ps
<i>Ocimum basilicum</i> ("albahaca").	Planta entera parte aérea. Comienzo de floración	0,09 % s/pf
<i>Ocimum basilicum</i> ("albahaca")	Planta entera parte aérea, en plena floración	0,56 % s/ps
<i>Origanum vulgare</i> ("orégano").	Planta entera, parte aérea. Plena floración	3,35 % s/ps
<i>Origanum X applii</i> ("orégano")	Planta entera, parte aérea. Plena floración	2,50 % s/ps
<i>Pelargonium graveolens</i> ("malva rosa")	Hojas y tallos. Comienzo de floración	0,10 % s/pf
<i>Rosmarinus officinalis</i> ("romero")	Planta entera, parte aérea. En floración	1,30 % s/ps
<i>Ruta graveolens</i> ("ruda")	Planta entera, parte aérea. En floración	0,62 % s/ps
<i>Salvia officinalis</i> ("salvia")	Hojas y tallos	2,36 % s/ps
<i>Satureja montana</i> ("ajedrea")	Planta entera parte aérea, en floración	0,36 % s/pf
<i>Thymus vulgaris</i> ("tomillo")	Planta entera parte aérea. En floración	0,80 % s/ps
<i>Tagetes minuta</i> ("chinchilla")	Inflorescencias y parte superior de los tallos y hojas	1,65 % s/ps
<i>Zingiber officinales</i> ("jengibre").	Rizomas frescos	0,13 % s/pf

\* s/ps = sobre peso seco. s/pf = sobre peso fresco

**Cuadro 2. Rendimiento de aceite esencial**

## Principales métodos de extracción

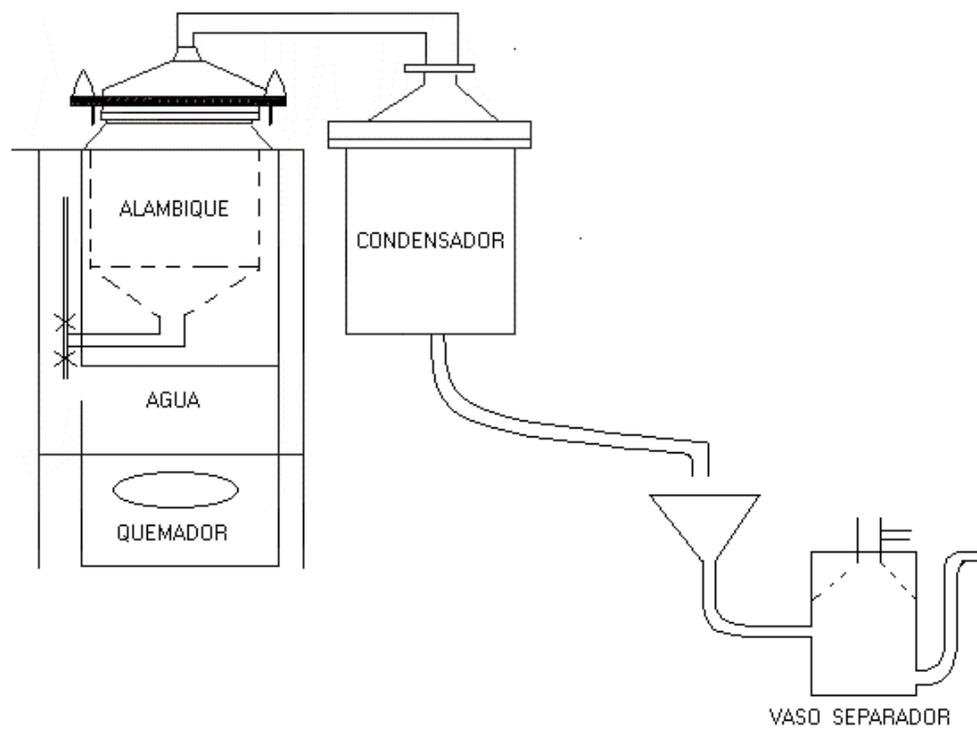
- Destilación con agua o *hidrodestilación*
- Destilación por arrastre con vapor
- Expresión
- Con fluidos en estado supercrítico
- Por microondas
- Enflorado

Los dos primeros procedimientos se basan en tres propiedades de los aceites esenciales:

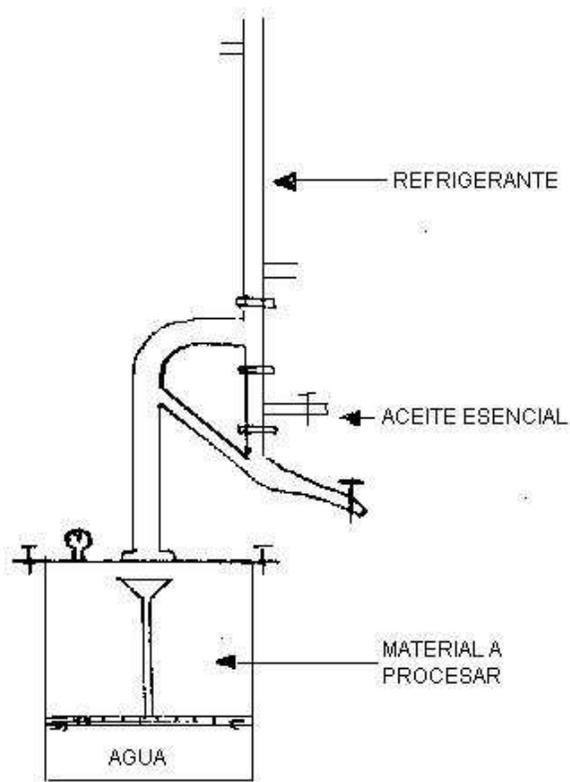
- Son arrastrables con vapor de agua.
- No son miscibles con el agua.
- La mayoría son menos densos que el agua, aunque algunos son más densos.

En la *hidrodestilación* el material vegetal a procesar se pone en contacto con el agua, se lleva a temperatura de ebullición y los vapores generados se hacen pasar por un condensador, así se reciben y se separa el aceite por ser inmisible con el agua. La recepción del aceite se hace en separadores de diferente diseño según se trate de un aceite más denso o menos denso que el agua. La gran mayoría son menos densos, o sea que son más livianos que el agua. Por este método en general se obtienen aceites esenciales con baja calidad, ya que el largo tiempo de contacto entre el vegetal y agua en ebullición puede producir polimerizaciones de algunos componentes monoterpénicos, hidrólisis de ésteres valiosos como los presentes en aceite esencial de lavandas y otras alteraciones no deseadas.

La destilación por *arrastre con vapor* es quizás la más antigua utilizada y la más difundida en la actualidad para hierbas y frutos secos. En estos métodos el vapor de agua se genera en un lugar separado del material vegetal. Se hace atravesar ese vapor por el material y así se arrastra el aceite volátil hasta un condensador, para recibir la mezcla líquida de agua y de aceite esencial en recipientes adecuados o “separadores”, que por diferencia de densidad permiten que se elimine el agua condensada y se retenga el aceite extraído. Existen innumerables diseños que varían en cuanto a la fuente de calor utilizada, tamaño de alambique (recipiente donde se coloca el material a procesar), tipo de condensador, separadores y otros accesorios (Esquema 1).



**Esquema 1.** Principales partes de un destilador por arrastre con vapor



**Esquema 2.** Destilador con refrigerante vertical

Los métodos por *expresión* son utilizados casi exclusivamente para la producción de aceites esenciales provenientes de cáscaras de cítricos. En el mundo existe un destacado mercado de aceites de limón, naranja, bergamota, mandarina y otras especies. Se obtienen a partir de las cáscaras residuales en las industrias de jugos y concentrados.

En estas metodologías, aplicadas actualmente sólo a gran escala, se utilizan equipos que comprimen las cáscaras para permitir la salida del aceite presente en las glándulas de las mismas. Hay distintos equipos que pueden procesar los frutos enteros o las cáscaras solamente. En todos los casos se obtiene una emulsión de aceite y agua, que debe separarse por centrifugación y/o decantación. De esta manera no se trabaja con las altas temperaturas presentes en los métodos antes citados y con ello se evita la alteración de componentes a veces minoritarios, pero que le otorgan el agradable aroma al producto buscado.

Con *fluidos en estado supercrítico* se extraen aceites esenciales sólo a nivel experimental en las últimas décadas, debido principalmente a su elevado costo en comparación con los métodos tradicionales. Se basa en la utilización de solventes adecuados que en su estado supercrítico (zona de un diagrama temperatura-presión en la que se interrumpe la curva que delimita los estados físicos sólido-líquido-gaseoso), un fluido cambia las propiedades de transporte y solubilidad. En estas condiciones de temperatura y presión el solvente logra mejor penetración y difusión en el material vegetal a procesar.

El solvente adecuado debe ser económico, inerte, debe mostrar afinidad con los compuestos a extraer, no inflamable y de baja toxicidad, entre otras características. El más utilizado es el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pues cumple con los requisitos mencionados. A escala industrial se está utilizando para algunos procesos como eliminación de la cafeína en el café, preparación de extractos de lúpulo y eliminación de colesterol en productos lácteos.

En la extracción por *microondas* se coloca el material a procesar con un solvente que no es afectado por las microondas, como el tolueno, hexano o tetracloruro de carbono. Al aumentar la temperatura por efecto de las microondas se rompen las estructuras que contienen el aceite, se libera éste, se disuelve en el solvente y la mezcla gaseosa solvente-aceite se trata como en los métodos tradicionales. Pueden completarse extracciones muy rápidas, pero a un elevado costo si se realiza a escala industrial (Collin, 1991).

## Bibliografía

- Azcon Bieto, J.; Talon, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: Interamericana.
- Bandoni, A.; Czepak, M. (ed.). (2008). *“Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas”*. Brasil: Univ. Fed. de Espírito Santo.

- Basu, N.; Rastogi, R. (1967). "Triterpenoid saponins and sapogenins". *Phytochem.* 6,1249-70.
- Blanco Tirado, E.; Stashenko, E.; Combariza, M; Martínez, J. (1995). "Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 697, 501-513.
- Buchanan, B., Gruissem, R., Jones, R. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Capítulo 24: Natural products (Secondary metabolites)*. Maryland: American Society of Plant Physiologist.
- Camargo Caicedo, Y.; Bolaño Ortiz, T.; Álvarez Mancilla, A. (2010). "Emisiones de Compuestos Orgánicos Volátiles de origen Biogénico y su Contribución a la Dinámica Atmosférica". *Rev. Intropica* 5, 77-86. ISSN 1794-161X.
- Céu Costa, M; Alves, S.; Ramos, S.; Teixeira, S.; Eleuterio, I.; Rodrigues, C. (2005). "Valorização de mono-,di- e tri-terpenos de Recursos Naturais de Interesse em Portugal". En: Fernández Barrero, A. (ed.). *Plantas Iberoamericanas como Fuente de Terpenoides Útiles en Química Fina* (pp. 237-280). Madrid: CYTED.
- Collin, F. (1991). "Huiles essentielles et extraits "micro-ondes". *Parfums, Cosm. Aromes.* (97), 105-112.
- Croteau, R.; Kutchan, T.; Lewis, N. (2000). "Natural Products (Secondary Metabolites)". En Buchanan, B.; Gruissem, R.; Jones, R. (ed.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (pp. 1250-1318) Maryland: American Society of Plant Physiologist.
- D'Addabbo, T.; Leonetti, P.; Carbonara, T.; Greco, P.; Avato, P. (2009). "Nematicidal activity of *Artemisia annua* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*". *8<sup>th</sup> Phytochemical Society of Europe Meeting on Biopesticides*. Abstracts (pp 44).La Palma, España: Real Sociedad Española de Química.
- Díaz, M.; Castillo, L.; González, A.; González Coloma, A.; Ibáñez, F.; Zoppolo, R.; Rossini, C. (2009). "Anti-insect activity of *Melia azedarach* fruits from

- Uruguay". *8<sup>th</sup> Phytochemical Society of Europe Meeting on Biopesticides*. Abstracts: (pp.45). La Palma, España: Real Sociedad Española de Química.
- Di Leo Lira, P.; Retta, D.; Tkacik, E.; Ringuelet, J.; Coussio, J.; van Baren, C.; Bandoni, A. (2009). "Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina". *Ind. Crops Prod.* 30, 259-264.
  - Fernández Barrero, A. (ed). (2005). "*Plantas Iberoamericanas como Fuente de Terpenoides Útiles en Química Fina*". Granada (España): Programa CYTED.
  - Galata, M; Mahmoud, S. (2012). "Bioactive Plant Isoprenoids: Biosynthetic and Biotechnological Approaches". *Studies in Natural Products Chemistry*, 37, 135-171.
  - Harborne, J. (1973). "*Phytochemical Methods*". Londres: Chapman & Hall.
  - Harborne, J.; Baxter, H. (1993). "*Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*". Gran Bretaña: Taylor & Francis.
  - Hartzell, H. (1991). "*The Yew Tree: A Thousand Whispers*". Hulogosi Communications Inc.
  - Howitt, C.; Pogson, B. (2006). "Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues." *Plant, Cell and Environment*, 29, 435-445.
  - Hu, Z.; Li Ou; Guo Lin Zhang; Yong Ping Yu. (2008). "Regioselective protection of 10-deacetylbaocatin III and semi-synthesis of paclitaxel". *Chinese Chemical Letters*, 19(2), 130-132.
  - Makkar, H.; Siddhuraju, P.; Becker, K. (2007). "Plant Secondary Metabolites". En: Walker, J. *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press.
  - Meléndez Martínez, A.; Vicario, I.; Heredia, F. (2004). "Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides". *Arch. Latinoam.Butr.*, 54 (2), 149-155.
  - Ocampo Sánchez, R.; Díaz Rojas, R. (2006). *Cultivo, conservación e industrialización del Hombre Grande (Quassia amara)*. San José de Costa Rica: Ed. Bougainvillea S.A.
  - *Real Farmacopea Española* (1997). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo de España.
  - Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5<sup>th</sup> ed). Sunderland, USA: Sinauer Associates.

- Trease, G.; Evans, W. (1986). *Tratado de Farmacognosia*. Madrid: Interamericana.
- Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. México: Trillas.
- van den Berg, H.; Faulks, R.; Granado, H.; Hirschberg, J.; Olmedilla, B.; Sandmann, G.; Southon, S.; Stahl, W. (2000). "The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects". *J. Sci. Food Agric*, 80(7), 880-912.
- Villeco, M; Muro, A.; Catalán, J.; Catalán, C. (2005). "Síntesis de derivados de 1,8-cineol, cariofileno y cariolan-1-ol con utilidad en perfumería y farmacología". En: Fernández Barrero, Alejandro (Ed.). *Plantas Iberoamericanas como Fuente de Terpenoides Útiles en Química Fina* (pp 189-211). Madrid: CYTED.

# CAPÍTULO 6

## INTERVENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SECUNDARIOS EN LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS

*María Cecilia Arango*

### 1. Definición de Bioquímica Ecológica

La Bioquímica ecológica es una ciencia que surgió del acercamiento de dos disciplinas, la Bioquímica y la Ecología. Se encarga de estudiar las bases moleculares de las interacciones entre microorganismos, plantas y animales y su adaptación al medio ambiente. Su contenido abarca también los fundamentos a nivel molecular de las estructuras de control que permiten a los seres vivos censar los cambios ambientales y modificar su morfología, fisiología y metabolismo para poder responder a dichos cambios. Una parte de esta rama de la ciencia estudia las rutas metabólicas que las plantas utilizan para sintetizar compuestos químicos como mecanismos de defensa contra la herbivoría.

Los metabolitos secundarios están implicados en la mayoría de las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, desempeñando una gran variedad de funciones. Muchos de ellos cumplen roles de defensa contra depredadores y patógenos y pueden actuar como agentes alelopáticos. Otra función que se les atribuye es la atracción de polinizadores y dispersores de semillas. Participan también ayudando a las plantas a sobrevivir en situaciones de estrés hídrico, salino o por contaminación con metales pesados, como así también protegen a las plantas de la radiación ultravioleta; incluso pueden actuar como señales moleculares en las relaciones simbióticas de las plantas con diversas variedades de hongos y bacterias del suelo.

Las plantas, a lo largo de la evolución, han desarrollado estrategias complejas para hacer frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, debido a que no

presentan un sistema inmunológico como el que poseen los animales superiores y a su imposibilidad de trasladarse y escapar de las situaciones adversas. Los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas presentan una gran diversidad de estructuras químicas, lo que comprueba en parte las diferentes estrategias de adaptación de las plantas (Harborne, 1993).

Se han observado diferentes perfiles metabólicos entre especies, entre miembros de una misma población y entre diferentes órganos de una misma planta. Debido al elevado costo energético que implica su biosíntesis, las plantas encauzan su metabolismo hacia un tipo u otro de compuestos secundarios dependiendo de los recursos disponibles (Bryant *et al.*, 1992).

El estudio de la Bioquímica ecológica puede constituir una base para el desarrollo de tecnologías tendientes a corregir los desequilibrios ambientales provocados por el uso indiscriminado de pesticidas (insecticidas, herbicidas y fungicidas) utilizados con el objetivo de incrementar el rendimiento de los cultivos, pero que afectan en forma negativa al medioambiente.

## 2. Interacciones planta-microorganismos patógenos mediadas por compuestos secundarios

Cuando un agente patógeno ataca a una planta se generan interacciones entre ambos que se traducen en una respuesta de defensa en la planta, activándose la transcripción de genes que codifican proteínas defensivas necesarias para impedir su invasión. La interacción entre ambos puede ser de tipo compatible o incompatible. Se dice que la interacción es compatible cuando el patógeno es virulento y logra invadir la planta degradando componentes de la pared celular de las células epidérmicas, hidrolizando ceras, degradando sustancias tóxicas presentes en el vegetal o segregando toxinas. Cuando el patógeno no logra invadir la planta, la interacción es de tipo incompatible; en este caso, la falta de virulencia del invasor se debe generalmente a la imposibilidad de superar las barreras estructurales y químicas que ofrece la planta o a que ésta activa una

serie de mecanismos de defensa con el objetivo de detener, morigerar o contrarrestar la infección.

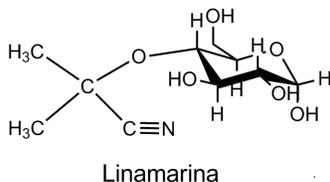
Como se ha mencionado en Capítulos anteriores, las plantas pueden tener mecanismos de defensa constitutivos o inducidos. La resistencia inducida es una forma de defensa activa, que involucra la expresión diferencial de genes junto con cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno, mientras que la defensa constitutiva o preformada, constituye un mecanismo de tipo pasivo de resistencia contra los patógenos.

## **2.1. Mecanismos de defensa**

### *2.1.1. Mecanismos de defensa constitutivos*

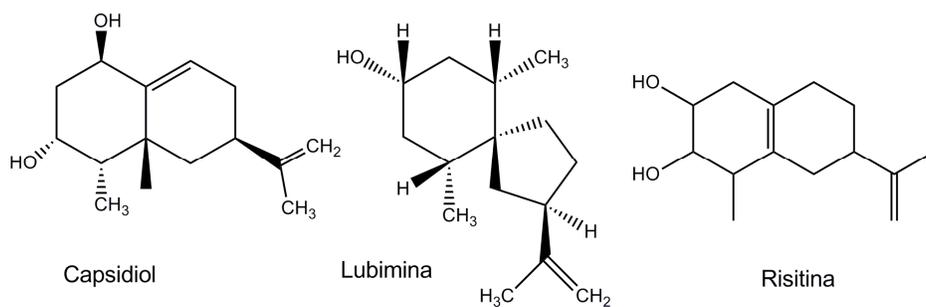
Los mecanismos de resistencia constitutiva se suelen dividir en estructurales y químicos. Los *estructurales* hacen referencia al desarrollo de diferentes estructuras ubicadas principalmente en la superficie de los tejidos o formando parte de la pared celular, cuya misión es actuar de barrera inicial a la propagación de microorganismos patógenos dentro de la planta, a corto plazo. Por ejemplo, las fibras de celulosa que forman la pared celular constituyen una barrera física que impide la entrada de insectos y microorganismos patógenos. Otro constituyente de la pared, la lignina, contribuye a aumentar la resistencia. La presencia de cutícula con depósitos de ceras y cutina, particularmente gruesa en las plantas xerófitas, impide la pérdida de agua de la planta y evita la entrada de hongos y bacterias; también en otras especies dificulta la formación de películas de agua en la superficie foliar después de las lluvias, lo que no permite la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos. La presencia de pelos o tricomas foliares, lenticelas y las diferentes estructuras de estomas son otros ejemplos de mecanismos de resistencia de tipo estructural. Estas barreras físicas pueden estar presentes sólo en determinadas etapas del desarrollo de la planta o en todo su ciclo biológico.

Las *defensas constitutivas químicas* se refieren a la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Se distribuyen estratégicamente en los diferentes tejidos, localizándose generalmente en tejidos superficiales de tallos, hojas y frutos. A nivel celular se los suele encontrar en vacuolas o en glándulas especializadas desde donde pueden ser liberados al citoplasma, o extracelularmente como resinas o material de la pared celular. Se han podido observar mayores concentraciones de dichos compuestos en las yemas en crecimiento de arbustos, en hojas jóvenes, órganos reproductores y de dispersión y, en general, en los tejidos nuevos, comparado con los tejidos viejos (Rhoades, 1979). Algunos autores han denominado *fitoanticipinas* a aquellos metabolitos secundarios que se encuentran en forma constitutiva (van Etten *et al.*, 1995). Estos compuestos pueden resultar tóxicos también para la planta que los produce, es por este motivo que las rutas biosintéticas, sus precursores y el almacenamiento de los metabolitos secundarios suele ocurrir en distintos compartimentos celulares. Por ejemplo, el sorgo (*Sorghum spp.*) y la yuca o mandioca (*Manihot esculenta*), presentan glicósidos cianogénicos en las vacuolas mientras que las enzimas que hidrolizan estos compuestos están ubicadas en el citosol. Cuando las hojas de la planta han sufrido un daño, el sustrato se pone en contacto con la enzima liberando HCN en última instancia (Capítulo 3: Figura 9). Algunos herbívoros han desarrollado en el transcurso de su evolución mecanismos para evitar sus efectos tóxicos. El glicósido cianogénico linamarina (Figura 1) se halla presente en *Lotus corniculatus*; como producto de la hidrólisis de este compuesto se libera una cetona y HCN en forma espontánea. El hongo *Stemphyllium loti* que parasita esta especie presenta cierto grado de tolerancia al cianuro. Estos microorganismos poseen la capacidad de degradar el cianuro a formamida ( $\text{HCONH}_2$ ), un compuesto menos tóxico, mediante la acción de la enzima cianuro hidratasa que es inducida en las esporas o micelio del hongo cuando está expuesto a bajas concentraciones de HCN (Powell *et al.*, 1983).



**Figura 1.** Glicósido cianogénico presente en *Lotus corniculatus*

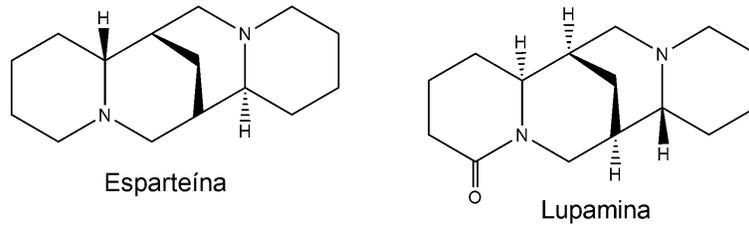
Muchos fenoles simples y polifenoles (taninos), terpenoides, glicósidos cianogénicos y alcaloides actúan como toxinas impidiendo la invasión de agentes patógenos. La mayoría de los compuestos fenólicos y alcaloides se almacenan en las vacuolas. Algunos de ellos se encuentran al estado de glicósidos para facilitar su solubilidad. Los terpenos se almacenan generalmente en estructuras especializadas como tricomas y pelos glandulares. Entre los terpenoides con actividad antimicrobiana encontramos al mentol (monoterpeno), los sesquiterpenos risitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el capsidiol en pimiento (*Capsicum annum* L.), el triterpeno cucurbitacina de las raíces de pepino (*Cucumis sativus* L.) con actividad nematocida (Figura 2).



**Figura 2.** Terpenoides con actividad antimicrobiana

Las coníferas sintetizan oleorresinas viscosas (mezcla de monoterpenos cíclicos volátiles y ácidos diterpénicos) como defensa contra ciertos tipos de escarabajos y sus hongos asociados (Leicach, 2006). Los terpenos volátiles expuestos al aire se oxidan y polimerizan formando masas cristalinas que sellan heridas impidiendo la entrada de patógenos. Los compuestos químicos que se encuentran en forma constitutiva pueden incrementar su nivel ante

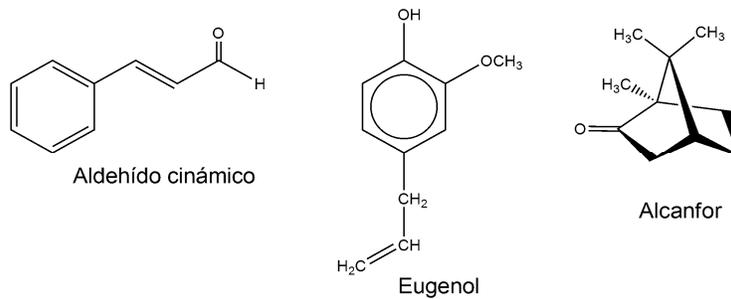
situaciones adversas. Por ejemplo, los alcaloides quinolizidínicos esparteína y lupamina (Figura 3) presentes en especies del género *Lupinus* actúan inhibiendo el crecimiento de hongos, bacterias y virus aumentando su síntesis en respuesta a heridas (De la Vega *et al.*, 1996).



**Figura 3.** Alcaloides con actividad microbiana

Los metabolitos secundarios, además de actuar como una barrera inicial para la propagación de patógenos potenciales, pueden ejercer una presión selectiva sobre las plantas y los patógenos, que con el transcurso del tiempo pueden desarrollar mecanismos de resistencia.

La canela (*Cinnamomum zeylanicum*), presenta diferentes metabolitos antifúngicos en distintos órganos de la planta. La corteza de su tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico; en sus hojas predomina el eugenol y en las células corticales de sus raíces prevalece el alcanfor (Senanayake *et al.*, 1978) (Figura 4).

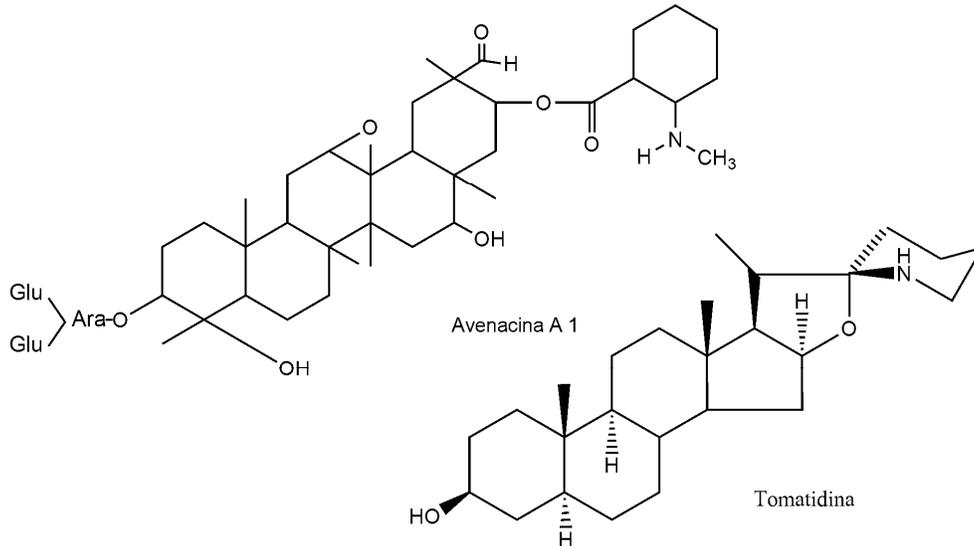


**Figura 4.** Metabolitos secundarios con actividad antifúngica presentes en canela

En la avena (*Avena sativa* L.) se concentra la producción de avenacina (saponina terpénica esteroidal) en la capa de células de la epidermis de raíces, compuesto que actúa sobre el hongo *Gaeumannomyces graminis* (Mansfield, 1983). En tomate se encuentra otra saponina, la alfa tomatidina (saponina de

origen esteroidal alcaloide) en toda la planta, pero en mayor concentración en tejidos jóvenes y frutos verdes (Figura 5).

Algunos alcaloides tóxicos se activan luego de la ingestión por el herbívoro o cuando se acumulan en una concentración que sobrepasa un umbral de toxicidad.



**Figura 5.** Saponinas con actividad antifúngica: avenacina A-1 presente en avena y tomatidina presente en tomate

### 2.1.2. Mecanismos de defensa inducidos

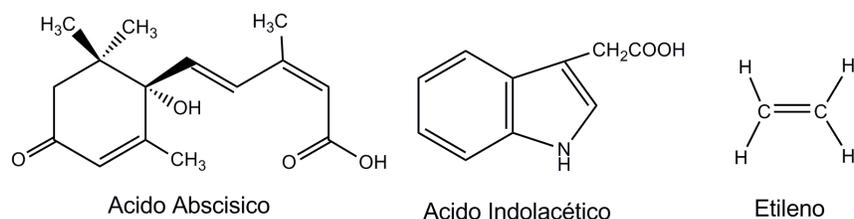
A pesar de las barreras naturales que ofrecen resistencia, algunos patógenos pueden entrar a las plantas por aperturas naturales, como por ejemplo las lenticelas de los tubérculos de la papa, a través de la cutícula cuando ésta ha sido dañada mecánicamente o atravesando la pared celular. En tales circunstancias, la planta puede activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección. Estos mecanismos constituyen las defensas inducibles, que se promueven en los organismos como respuesta al ataque de herbívoros y agentes patógenos (Collinge *et al.*, 1994) con el objetivo de conferir inmunidad o cierto grado de resistencia frente a futuros ataques que implican formación y cambios en las estructuras morfológicas y variaciones en la composición y/o concentración de compuestos químicos.

Las plantas con mecanismos de defensa inducibles presentan sistemas de percepción del invasor a partir de los cuales se activan genes implicados en la respuesta defensiva (teoría gen por gen). Este mecanismo es equivalente al sistema inmunitario animal “antígeno-anticuerpo”.

Los productos naturales que actúan como mecanismos de defensa inducibles son relativamente pocos y presentan una distribución restringida desde el punto de vista taxonómico. Estos compuestos pueden ser proteínas, glúcidos o metabolitos secundarios. Los metabolitos inductores de defensa pueden no ser específicos como es el caso de la quitina, que conforma la pared celular de los hongos, y es capaz de inducir la expresión de genes de defensa en las plantas ante un ataque fúngico. Este tipo de defensas se activan en general como respuesta a daños en los tejidos vegetales provocados por agentes patógenos o condiciones ambientales adversas.

Por otro lado, la inducción de los mecanismos de defensa puede ser de tipo específica, donde la planta reconoce al patógeno. Este mecanismo parece estar mediado por genes presentes en el patógeno y en la planta.

Los genes implicados en la respuesta defensiva codifican enzimas relacionadas con la formación de componentes de la pared celular, principalmente lignina, calosa y proteínas ricas en hidroxiprolina; enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas; la fosforilación y desfosforilación de proteínas; inhibidores de proteasas y la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP). Estas últimas se acumulan durante y después de una infección. Se caracterizan por ser de bajo peso molecular, resistentes a proteasas y de localización extracelular (van Loon y van Kammen, 1970). Las PRP se identificaron por primera vez en plantas de tabaco infectadas por el virus del mosaico del tabaco. La expresión de estas proteínas también puede ser inducida por reguladores de crecimiento como el etileno, ácido abscísico y ácido indol acético (AIA) (Figura 6) como por factores ambientales adversos. Incluso se han detectado en tejidos sanos.



**Figura 6.** *Hormonas vegetales implicadas en reacciones de defensa inducibles*

La lignina, si bien es un componente presente en las paredes celulares de varias especies, también se suele acumular en grandes cantidades en tejidos atacados por patógenos. La síntesis de lignina deriva del metabolismo de los fenilpropanoides y está regulada por la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) (Capítulo 4).

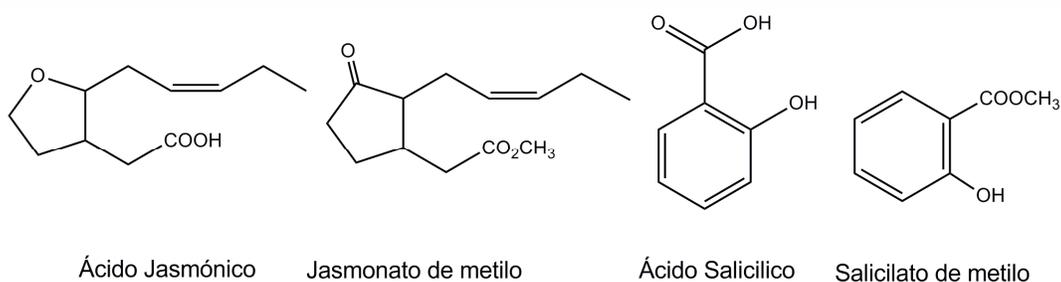
Las defensas en los tejidos vegetales son también inducidas por componentes de la pared celular de ciertos hongos producidos por la actividad de enzimas hidrolíticas del vegetal.

Entre los diversos procesos metabólicos desencadenados como respuesta a la inducción se encuentra también la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); estas especies inducen procesos oxidativos que aumentan el daño, como es el caso de la peroxidación de lípidos de membrana, la inhibición de enzimas y la ocurrencia de daños a nivel de los ácidos nucleicos.

Con el objetivo de regular los niveles excesivos de compuestos tóxicos y mantener el estado de óxido-reducción de la célula vegetal, se puede activar la síntesis de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa y catalasa y de metabolitos secundarios con actividad antioxidante como el ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, antocianinas, carotenoides y betalainas.

Como elementos de señalización volátiles se ha determinado también el aumento en la concentración de hormonas, que cumplen con la función de transmisión de la información en la planta y también entre plantas vecinas. El ácido jasmónico (AJ), el ácido salicílico (AS) y sus ésteres metílicos (Figura 7) y el etileno (Figura 6) son las más reconocidas entre los mecanismos de defensa.

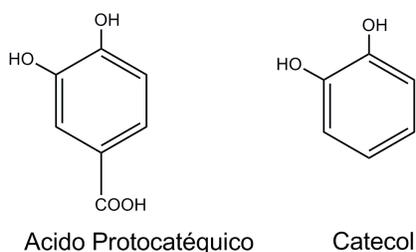
Estas hormonas junto con la producción de EROs regulan la expresión de determinados genes. Por ejemplo el AJ modula la síntesis de proteínas de la pared celular y de enzimas involucradas en el metabolismo secundario como acetilCoA carboxilasa, chalcona sintasa, PAL y polifenoloxidasas. La emisión de etileno por parte de los tejidos dañados activa genes defensivos en tejidos sanos distantes a la zona dañada o de plantas alejadas que podrían estar expuestas al mismo patógeno. El mecanismo de señalización del éster metílico del AS (precursor de la aspirina) es similar al del etileno, participando además en interacciones alelopáticas.



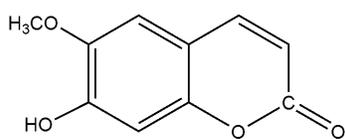
**Figura 7.** Hormonas naturales implicadas en procesos de defensa

Las EROs pueden provocar toxicidad, aumentando el daño y también pueden actuar como señales de activación de las rutas de defensa.

Los compuestos químicos inducidos están presentes normalmente en bajas concentraciones y suelen incrementarse frente a una infección, como ocurre con el ácido protocatéquico y el catecol (Figura 8) presentes en las cebollas moradas resistentes a la antracnosis, o la cumarina, escopoletina (Figura 9) y el ácido clorogénico (Capítulo 4: Figura 10) en papas infectadas con *Phytophthora infestans* (Mansfield, 1983).



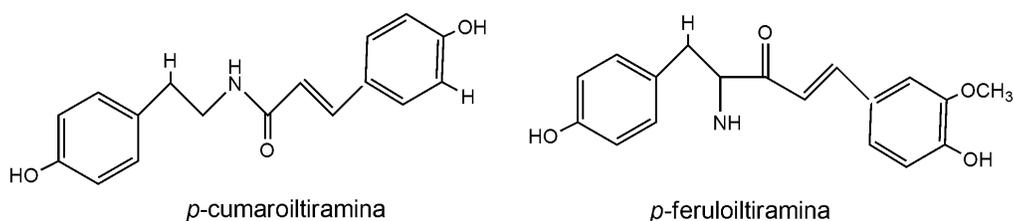
**Figura 8.** Compuestos fenólicos antimicrobianos presentes en cebollas moradas



Escopoletina

**Figura 9.** Antifúngico presente en papa

Los flavonoides naringenina y kaempferol (Capítulo 4: Figura 21) del arroz (*Oryza sativa* L.) inhiben el crecimiento del hongo *Xanthomonas oryzae* y la germinación de esporas de *Pyricularia oryzae*. En tomate (*Solanum lycopersicum*) la *p*-cumaroiltiramina y feruloiltiramina (Figura 10) (conjugados de fenilpropanoides con aminas) son inducidos como respuesta a daños. En *Sorgo bicolor* L. se acumula luteolina y apigenina (Capítulo 4: Figura 20) en forma de inclusiones en las células epidérmicas atacadas por el hongo *Colletotrichum graminicola*.



**Figura 10.** Amidas de ácidos hidroxycinámicos con actividad antifúngica

Los metabolitos inducidos también pueden encontrarse en forma inactiva en plantas sanas y luego de una infección convertirse en productos antifúngicos mediante reacciones bioquímicas que impliquen hidrólisis enzimática, como ocurre en algunas *Poaceae* como la avena y el sorgo que tienen en sus raíces glicósidos cianogénicos. Las plantas, después de ser atacadas por *Gaeumannomyces graminis* liberan HCN por intermedio de enzimas presentes en los tejidos sanos; el HCN es un compuesto perjudicial para el hongo (Grayer y Harborne, 1994). Ocurre lo mismo con los isotiocianatos producidos por la hidrólisis de los glucosinolatos (encontrados en las familias *Brassicaceae*, *Capparidaceae* y *Caricaceae*) por acción de las enzimas hidrolíticas

mirosinasas también llamadas tioglucosidasas (Rask *et al.*, 2000) (Capítulo 3). En este grupo de especies, cuando la planta es dañada tanto por factores físicos como biológicos, la enzima y el sustrato entran en contacto y los glucosilatos son hidrolizados en un compuesto inestable que en condiciones neutras o alcalinas del medio se transforma en un isotiocianato volátil con propiedades antifúngicas.

Otro grupo muy amplio lo constituyen las llamadas fitoalexinas, compuestos de bajo peso molecular que únicamente son sintetizados en respuesta al ataque de un patógeno y que su presencia está restringida al tejido dañado y las células adyacentes.

## 2.2. Respuesta hipersensible

La respuesta al daño ante la invasión de agentes patógenos puede estar localizada en el lugar de la infección o en sitios alejados al daño.

La respuesta local se denomina *reacción hipersensible* (HR) o muerte celular programada, caracterizada por la muerte rápida de las primeras células infectadas, observándose lesiones necróticas en el sitio de infección, privando al patógeno de nutrientes y soporte mecánico, aislándolo del resto de la planta y restringiendo su expansión. La HR se observa frecuentemente en las interacciones planta-patógeno de tipo incompatible, en la cual la planta presenta genes de resistencia y el patógeno posee genes de avirulencia. Esta respuesta se desarrolla aproximadamente 24 horas después del ataque del patógeno potencial. La HR se asocia también a la expresión de otros mecanismos de defensa como la acumulación de compuestos tóxicos para el patógeno, las fitoalexinas, deposición de lignina y suberina, de proteínas ricas en hidroxiprolina y proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP), las cuales se asocian con el fenómeno denominado resistencia sistémica adquirida o SAR (Ryals *et al.*, 1996).

La HR parece ocurrir como consecuencia de un programa activo y organizado de muerte celular y no como consecuencia del colapso celular pasivo producido

por el ataque del patógeno o la producción de toxinas derivadas de éste (Gilchrist, 1998). En este proceso se activan señales provocadas por la presencia de agentes altamente oxidantes tales como las EROs, entre ellas el anión superóxido y peróxido de hidrógeno y el incremento de óxido nítrico (NO). Luego, para contrarrestar el efecto oxidativo, la planta sintetiza antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa. Como respuesta a estas señales se activa la síntesis de metabolitos secundarios como polifenoles y enzimas PAL, peroxidasas y enzimas hidrolíticas como las quitinasas y  $\beta$  1,3 glucanasa.

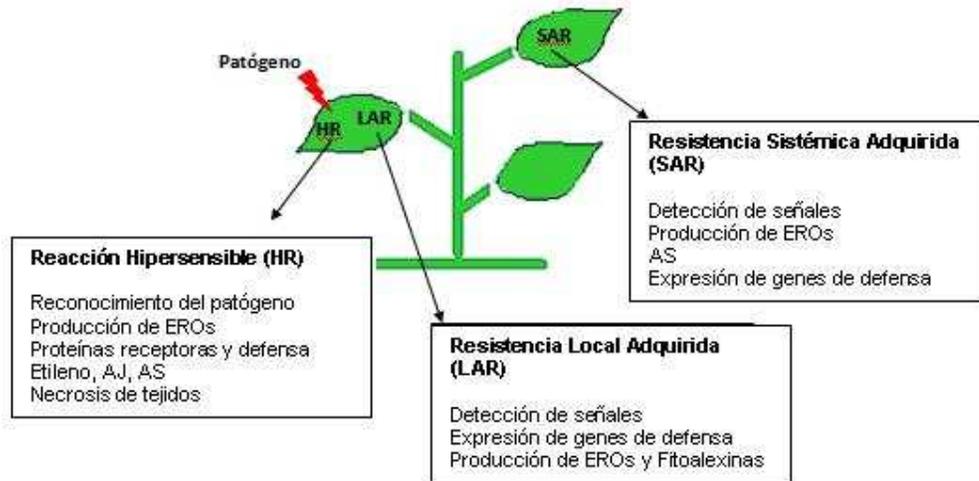
### 2.3. Resistencia local y resistencia sistémica adquiridas

El ataque local del patógeno capaz de producir lesiones necróticas puede también inducir otras respuestas denominadas resistencia local o sistémica. La respuesta local se conoce como *resistencia local adquirida* (LAR) y la de tipo sistémico *resistencia sistémica adquirida* (SAR).

La resistencia sistémica adquirida es una respuesta de defensa activa, de amplio espectro, que se asocia a una alta expresión de genes que codifican enzimas proteasas (Hammerschmidt, 1999). En la respuesta sistémica el patógeno induce lesiones localizadas similares a las de la HR produciendo una resistencia local (LAR) en el tejido infectado a partir del cual se producen señales que inducen resistencia en el resto de la planta (SAR). La SAR es generalmente efectiva contra hongos, bacterias, virus o nematodos, independientemente del organismo inductor (Ryals *et al.*, 1996).

Durante el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida se reconocen distintos procesos que implican la percepción de elicitores en el sitio de infección, reconocimiento del patógeno por la planta (HR), generación de señales metabólicas transmisibles a través de los tejidos (sistema vascular), amplificación de la señal a distancia, síntesis de AS y expresión de genes SAR (Attaran *et al.*, 2009). El AS es la molécula que ha mostrado mayor evidencia de estar involucrada en este proceso (Mauch-Mani y Métraux, 1998). Por este

motivo, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA, tanto local como sistémicamente (Ordeñana, 2002). La colonización de las raíces por microorganismos de la rizósfera<sup>1</sup> desarrolla un tipo de resistencia particular denominada resistencia sistémica inducida, en la que intervienen el ácido jasmónico y el etileno (Pieterse y van Loon, 1999) (Figura 11).



**Figura 11.** Reacciones de defensa que ocurren en las células infectadas (HR), en tejidos adyacentes (LAR) y en tejidos distantes (SAR)

## 2.4. Fitoalexinas

Los metabolitos que se sintetizan como respuesta al ataque de hongos fitopatógenos fueron denominados *fitoalexinas* en el año 1941 por Muller y Börger. Más tarde Paxton (1981) las definió como metabolitos secundarios de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos. La primera fitoalexina fue aislada y caracterizada en 1960 por Cruickshank y Perrin, y corresponde a un isoflavonoide pterocarpano, aislado a partir de vainas de arveja (*Pisum sativum*), al que se lo denominó *pisatina*. La activación de la síntesis de estos compuestos en las plantas se produce por acción de factores denominados

“elicitores o inductores” que pueden ser exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos y daños mecánicos; o bien pueden ser endógenos, producidos por las plantas en respuesta a determinadas situaciones de estrés.

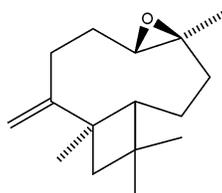
La síntesis de estos compuestos se restringe al lugar de la infección y las células adyacentes, acumulándose en los tejidos necrosados presentando una acción tóxica frente a un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas en plantas. La concentración de estos compuestos es baja antes de una infección y aumenta rápidamente pocas horas luego del ataque del patógeno (Taiz y Zeiger, 2010). Se pudo determinar también que la actividad antifúngica o antimicrobiana puede ser ejercida por un solo compuesto o una mezcla de varios de ellos en distintas concentraciones y proporciones.

Desde el punto de vista químico no existe una división estricta entre las fitoalexinas y los metabolitos antifúngicos y antibacterianos de tipo constitutivos. Se han identificado una gran diversidad de compuestos químicos con función de fitoalexinas de estructura química heterogénea, encontrándose terpenoides (sesquiterpenos, diterpenos), compuestos azufrados, nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y fenólicos.

Aún no está bien establecido si la capacidad de sintetizar metabolitos antifúngicos es una propiedad de la mayoría de las plantas o está restringida a determinadas especies y familias botánicas. Con respecto a ello se ha podido determinar que muchas familias botánicas producen fitoalexinas de la misma clase, motivo por el cual se las ha empleado en quimiotaxonomía (Seneviratne y Harbone, 1992). Por ejemplo en las *Fabaceae* numerosas especies sintetizan fitoalexinas de tipo isoflavonoide y en especies de la familia *Solanaceae* se encuentran fitoalexinas de estructura sesquiterpénica.

Las plantas leguminosas del género *Hymenaea* presentan un compuesto antifúngico en las hojas que se denomina óxido de cariofileno (Figura 12), que inhibe al hongo *Pestalotiopsis*. Este compuesto se encuentra formando parte de una mezcla de sesquiterpenos. La risitina, es una lactona sesquiterpénica aislada en papa (*Solanaceae*) también con efectos antifúngicos. Los derivados

del gossipol (Capítulo 5: Figura 30) en *Gossypium hirsutum*, *Malvaceae*, presentan actividad nematostática para *Meloidogyne incognita*.



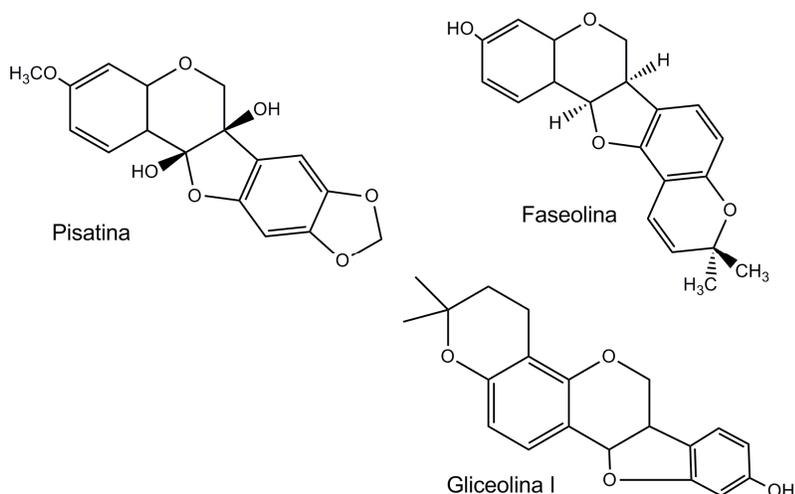
Óxido de cariofileno

**Figura 12.** Antifúngico del género *Hymenea*

Por otra parte, se ha determinado en las hojas de *Sequoia sempervirens* (*Cupressaceae*) una mezcla de monoterpenos que en determinadas concentraciones inhiben a los hongos endófitos de esa especie (Espinosa-García y Langenheim, 1991).

Algunos compuestos que forman parte de los aceites esenciales de las plantas aromáticas también pueden tener propiedades antifúngicas.

Entre los compuestos fenólicos encontramos a las cumarinas, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, fenoles simples, antraquinonas, fenilpropanoides (Capítulo 4). Las fitoalexinas más estudiadas son las derivadas del metabolismo de los fenilpropanoides, sintetizados a partir de la fenilalanina. En las leguminosas, se encuentran isoflavonoides con actividad antimicrobiana sintetizados a partir de fenilalanina y la vía del malonato. La pisatina en arveja (*Pisum sativum*), faseolina en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y gliceolina I en soja (*Glycine max*) son algunos de ellos (Figura 13). Los ácidos *p*-cumárico y ferúlico (Capítulo 4: Figura 9) en frutos de tomate infectados por *Botrytis cinerea* o en tubérculos de papa infectados con *Phytophthora infestans* sufren incrementos importantes. En las raíces de *Eucalyptus calophylla* infectadas por el hongo *Phytophthora cinnamoni*, se incrementa en forma significativa el contenido de fenólicos solubles seguido de un aumento de lignina y suberina.



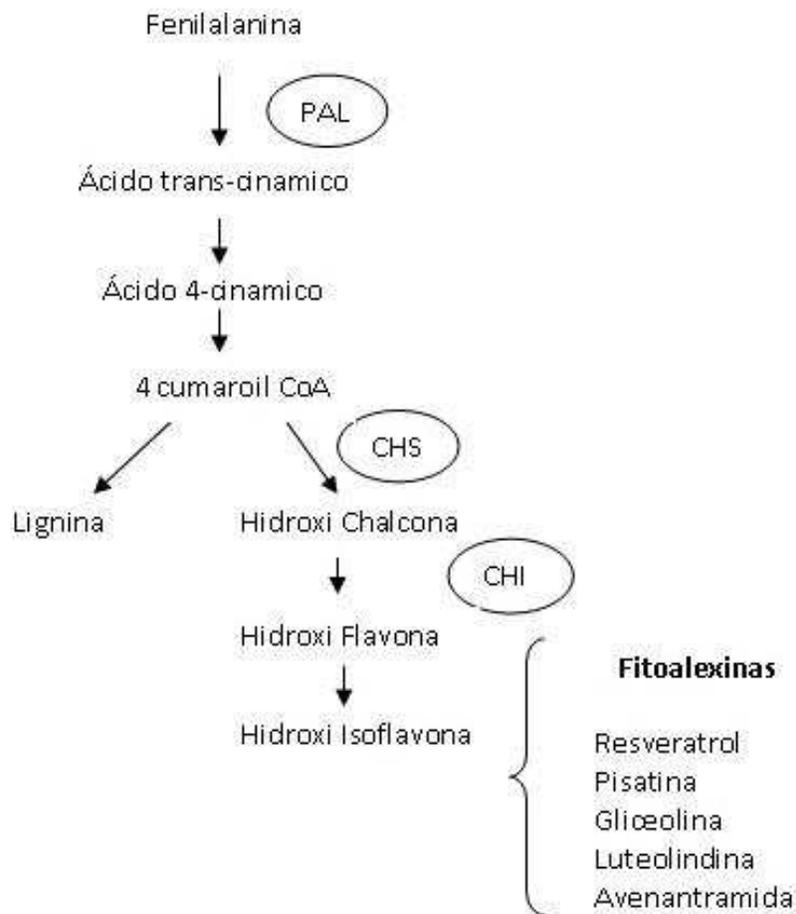
**Figura 13.** Estructuras de fitoalexinas aisladas de arveja, poroto y soja

La producción de fitoalexinas se asocia a la inducción de genes que codifican enzimas específicas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI) (Figura 14). Se ha señalado la existencia de tres genes para la PAL en poroto, detectándose hasta once isoformas de esta enzima. En poroto, la CHS es codificada por una familia de seis a ocho genes (Ryder *et al.*, 1987). Por ejemplo, se ha identificado a la gliceolina I en células de soja, fitoalexina de naturaleza fenólica sintetizada a partir de la fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual constituye un nematocida específico contra larvas de *Meloidogyne incognita* inhibiendo la respiración.

El mecanismo de inducción por el que se producen estas sustancias aún no está totalmente dilucidado, pero se han descrito en varias especies ciertos inductores producidos por los patógenos, que estimulan la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la planta, el cual codifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de las fitoalexinas. De acuerdo a ciertos estudios, parece que la transcripción del ARNm que promueve la síntesis de enzimas necesarias para la producción de fitoalexinas se inicia luego de producido el daño o la invasión del patógeno. Se han identificado receptores específicos en las membranas celulares de soja, los cuales parecen jugar un papel fundamental en la inducción de la acumulación de fitoalexinas en los tejidos infectados por hongos (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003).

Se ha observado que numerosos patógenos son capaces de detoxificar fitoalexinas lipófilas transformándolas en compuestos más polares reduciendo su toxicidad (van Etten *et al.*, 1989). Los mecanismos enzimáticos de detoxificación de fitoalexinas implican monooxigenación, desmetilación, reducción, hidratación, oxidación e hidroxilación.

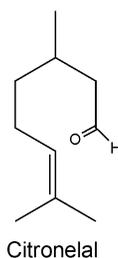
Algunos compuestos que actúan como fitoalexinas se han logrado aislar mediante la técnica de cultivo *in vitro* para luego poder investigar su contribución al control de plagas mediante pruebas biológicas.



**Figura 14.** Biosíntesis de fitoalexinas con estructura flavonoide. Sitios de regulación a nivel enzimático: PAL: fenilalanina amonio liasa, CHS: Chalcona sintasa, CHI: Chalcona isomerasa. Adaptado de Ordeñana, 2002

## 2.5. Interacciones planta-insecto

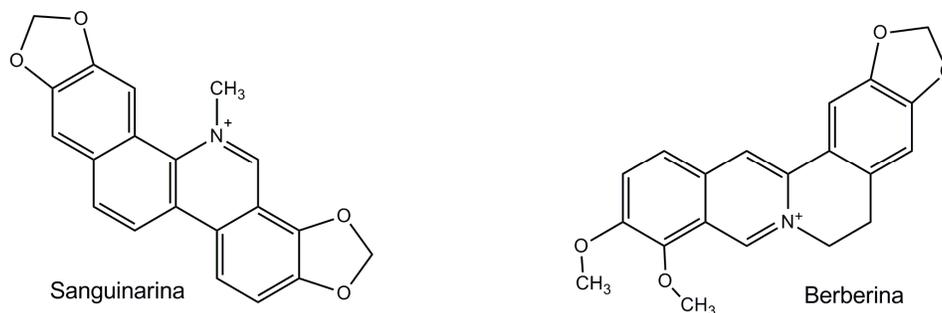
Los mecanismos de interacción planta-insecto son prácticamente los mismos que los estudiados para las interacciones planta-microorganismos. Los daños por mordeduras o las secreciones orales de los artrópodos actúan como inductores de defensas. Las plantas sintetizan metabolitos secundarios con acción tóxica y compuestos volátiles que actúan como repelentes de insectos. Entre estos últimos se encuentran aldehídos, alcoholes, ésteres y terpenoides, algunos de los cuales son específicos de cada especie. Ciertos compuestos emitidos por las plantas dañadas o sintetizados durante la oviposición de los insectos sirven para atraer enemigos naturales de herbívoros agresores, como por ejemplo ciertos terpenos volátiles combinados con oxilipinas (moléculas derivadas de los ácidos grasos poli-insaturados que se acumulan en respuesta al ataque de patógenos) son distinguidos por avispas parásitas de depredadores. Dentro de los terpenoides, el citronelal (Figura 15) actúa como repelente de insectos y las piretrinas como toxinas del sistema nervioso de los insectos. Los alcaloides presentes en forma constitutiva en algunas plantas pueden incrementarse en respuesta a una herida producida por insectos como es el caso de los N-acil derivados de la nicotina (Capítulo 2: Figura 2) de *Nicotiana sylvestris* que se sintetizan *de novo* en hojas dañadas afectando las larvas de *Manduca sexta* L.



**Figura 15.** Monoterpenoide repelente de insectos

La berberina y sanguinarina, alcaloides isoquinoleínicos (Figura 16), son tóxicos para insectos y vertebrados. Estos alcaloides interfieren en la transmisión de los impulsos nerviosos inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Algunos insectos parásitos pueden evitar la intoxicación

con alcaloides utilizándolos para la síntesis de compuestos activos contra sus propios depredadores. Por ejemplo, las larvas de *Utetheisa ornatrix* L. secuestran hasta la adultez los alcaloides pirrolizidínicos producidos por la leguminosa *Crotalaria* (*Crotalaria* spp, *Fabaceae*) los que utilizan como protección de sus depredadores, en este caso arañas nocturnas.



**Figura 16.** Alcaloides isoquinoleínicos tóxicos para insectos

Los flavonoides pueden modular la ingestión y el desarrollo de la oviposición en los insectos. La enzima polifenoloxidasas cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, dando como resultado quinonas sumamente reactivas, que se polimerizan formando productos que atrapan a los insectos o reducen la calidad nutricional de las proteínas. En maíz se ha observado la síntesis de proteasas cisteínicas ante el ataque de insectos. El ataque de insectos activa defensas de tipo local y sistémico mediante vías de señalización en las que están implicados la sistemina, el ácido jasmónico, el ácido galacturónico y el peróxido de hidrógeno.

La sistemina es un pequeño péptido formado por 18 aminoácidos que actúa como mensajero químico implicado en la transducción de señales generada por la mordida de un insecto identificado en plantas de la familia *Solanaceae*. El AJ lidera el sistema de defensa contra insectos herbívoros, que incluye la inducción de inhibidores de proteasas y la síntesis de compuestos fenólicos y enzimas polifenoloxidasas.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) interviene en la respuesta sistémica adquirida, catalizando el primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides y la

producción de ácido salicílico, el cual regula la producción de otros metabolitos de esta vía como el ácido clorogénico que actúa como disuasorio alimentario (Capítulo 4: Figura 10).

Los niveles de AJ y de AS están estrechamente relacionados. Altos niveles de salicilato inhiben la síntesis de ácido jasmónico y la capacidad de la planta para responder a las señales provenientes de una herida. Por otro lado, el ácido jasmónico bloquea la capacidad del ácido salicílico para producir proteínas inducidas por patógenos.

Las plantas también sintetizan pequeñas proteínas que actúan como inhibidores de proteasas a modo de respuesta al ataque de insectos. Estas proteínas bloquean la acción de proteasas intestinales del insecto y pueden provocar la muerte del mismo. Estos inhibidores se encuentran en granos y otros tejidos de reserva en una proporción de hasta el 15% del contenido total de proteínas. Las señales que inducen la síntesis de estas proteínas incluyen algunos oligosacáridos, ácido abscísico y sistemina.

Para evitar las barreras de defensa de la planta, los insectos desarrollan diversas estrategias como por ejemplo, incrementan su actividad proteolítica, inducen enzimas insensibles a los inhibidores de proteasas o expresan proteínas que degradan a dichos inhibidores producidos por las plantas. Además, algunos insectos desarrollan tolerancia a inhibidores de proteasas e incluso desarrollan mecanismos de detoxificación de metabolitos secundarios. La capacidad de desarrollar una determinada estrategia depende de la especie. Es interesante destacar que las plantas, los insectos y los microorganismos patógenos han sufrido una co-evolución. De esta forma, las plantas han evolucionado desarrollando nuevos mecanismos de detección de patógenos, mientras que éstos han evolucionado desplegando sofisticados mecanismos para sobrepasar la “vigilancia” de la célula vegetal.

## 2.6. Defensas químicas contra animales herbívoros

Como se ha indicado anteriormente, las plantas pueden sintetizar distintos metabolitos para hacer frente al ataque de herbívoros. Algunos de estos compuestos químicos pueden alterar los procesos digestivos dependiendo de la dosis consumida. Entre ellos se pueden citar a la celulosa, hemicelulosa, lignina y taninos que forman parte de la pared celular vegetal, como así también a la cutina que forma parte de la cutícula. Las ligninas son compuestos que interfieren en la digestión por sí mismas y por acomplejarse con hidratos de carbono o enzimas digestivas.

Los taninos condensados se encuentran en grandes cantidades en plantas leñosas y en algunas herbáceas. Estos compuestos tienen la propiedad de unirse a las proteínas (Capítulo 4) impidiendo su digestión. Algunos animales presentan mecanismos de desactivación de estos compuestos mediante unión a proteínas específicas de la saliva o en los rumiantes por la acción de bacterias ruminales con actividad hidrolítica, lo que les permite aprovecharlos desde el punto de vista nutricional.

Las toxinas vegetales actúan generalmente en bajas dosis, interfiriendo en los procesos bioquímicos fundamentales, bloqueando la actividad de determinadas enzimas. Entre los alcaloides, la cafeína (Capítulo 2: Figura 28) inhibe la síntesis de ADN y ARN; la colchicina (Capítulo 2: Figura 13), inhibe la mitosis celular; y la ergotamina (Figura 17) puede actuar como vasoconstrictor, necrosando los tejidos afectados.

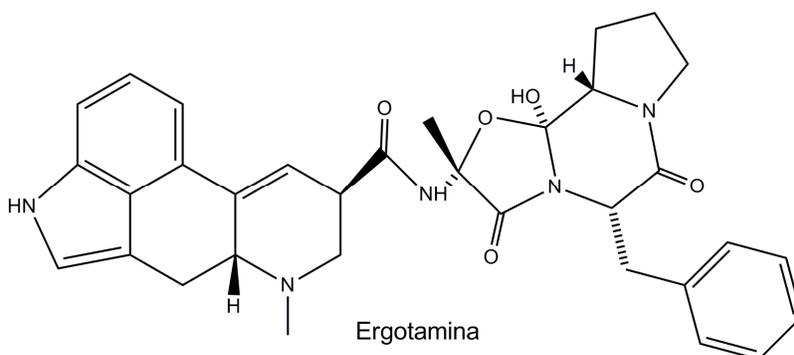


Figura 17. Alcaloide indólico

Los aminoácidos no proteicos y algunas proteínas pueden comportarse como toxinas. Estos aminoácidos y proteínas suelen acumularse en semillas cumpliendo el papel de protección frente a sus posibles consumidores y como reserva de nitrógeno. Por ejemplo, algunas especies del género *Vicia* son capaces de producir  $\beta$ -cianoalanina, que sustituye al aminoácido esencial alanina en la síntesis proteica, causando importantes trastornos a los herbívoros que consumen estas plantas. Un ejemplo de proteína tóxica es la ricina, presente en las semillas de *Ricinus communis*. Por otro lado, en algunas semillas de leguminosas podemos encontrar un tipo de glicoproteínas tóxicas, capaces de coagular los eritrocitos de la sangre, son las llamadas fitohemoaglutininas, con marcados efectos antinutricionales, pues pueden reducir la ingesta e inhibir el crecimiento de los animales afectados.

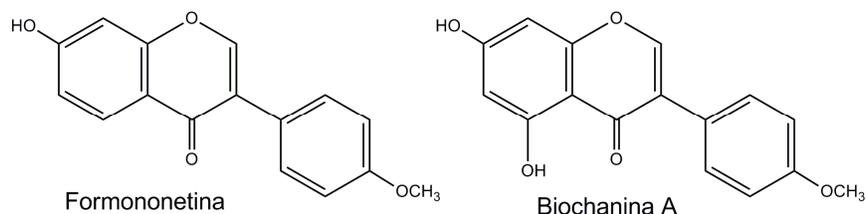
Tal como ha sido indicado (Capítulo 3), el ácido cianhídrico es una toxina que inhibe la respiración celular, y se encuentra en las plantas en forma de glicósido cianogénico. Cuando los tejidos vegetales de una planta con este tipo de compuestos son dañados, las moléculas del glicósido que están compartimentalizadas, se ponen en contacto con las enzimas (también compartimentalizadas)  $\beta$ -glucosidasa e hidroxinitriloliasa y, a continuación, se producen una serie de reacciones encadenadas que dan como resultado la liberación de ácido cianhídrico. Esta sustancia actúa en las mitocondrias bloqueando la acción de la enzima citocromo oxidasa, paralizando el transporte electrónico en la respiración celular, con consecuencias a veces letales para el herbívoro.

Los glucosinolatos actúan como repelentes alimenticios y pueden ser tóxicos para los herbívoros cuando se encuentran en altas concentraciones. La toxicidad de estos compuestos se debe a la capacidad que tienen para liberar isotiocianatos, compuestos potencialmente tóxicos, por acción de la enzima mirosinasa presente en la planta (Capítulo 3). Los glucosinolatos tienen una elevada actividad irritante del tracto intestinal, pudiendo provocar gastroenteritis aguda en el ganado. Estos compuestos se encuentran principalmente en especies de la familia *Cruciferae*, destacándose algunas especies silvestres del

género *Brassica*. Su concentración es elevada en semillas mientras que en tallo, hojas y raíces es diez veces menor (Duncan y Milme, 1989).

Algunas investigaciones sobre la colza (*Brassica napus*), una especie productora de aceite, se han centrado en la obtención de variedades con bajos niveles de glucosinolatos en los granos con el objetivo de aprovechar el elevado contenido de proteínas de éstos, luego de la extracción del aceite, y utilizarlos en alimentación animal. Estas variedades resultaron ser muy sensibles al ataque de plagas, es por ello que posteriormente se desarrollaron variedades con bajos niveles de glucosinolatos en semillas y alto contenido en hojas para mejorar su resistencia a las plagas.

Muchas especies de leguminosas forrajeras producen fitoestrógenos como mecanismo de defensa. Químicamente estos compuestos pertenecen a los grupos de flavonoides, isoflavonas, lignanos y estilbenos (Capítulo 4). Actúan principalmente sobre el sistema reproductivo de mamíferos, pudiendo afectar también el sistema renal, nervioso y cardiovascular. Entre los compuestos con actividad estrogénica diferenciados en especies del género *Trifolium* se encuentran las isoflavonas biochanina, formononetina (Figura 18) y genisteína y un cumestrano, el cumestrol (Capítulo 4: Figura 17). La concentración de este tipo de compuestos en la planta es variable dependiendo del estado fenológico y del ambiente. Por ejemplo, en el trébol rojo (*Trifolium pratense*) la concentración de formononetina es elevada antes de la floración y disminuye a partir de dicho estado (Boué *et al.*, 2003). Las semillas de la soja (*Glycine max*) son ricas en isoflavonas, principalmente la genisteína y la daidzeína (Capítulo 4: Figura 17).



**Figura 18.** Compuestos con actividad estrogénica diferenciados en el género *Trifolium*

### 3. Relaciones simbióticas entre microorganismos y plantas. Participación de compuestos químicos vegetales

Los microorganismos del suelo son los responsables de la ejecución y el control de muchas de las funciones esenciales que se llevan a cabo en él, como la descomposición de la materia orgánica, la producción de humus, el reciclaje de nutrientes, el flujo de energía, la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes esenciales, la producción de compuestos complejos que facilitan la agregación del suelo y la descomposición de xenobióticos<sup>2</sup>, entre otros (Moreira y Siqueira, 2002).

Muchos de estos microorganismos son benéficos y cumplen un papel fundamental; entre ellos se destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), los microorganismos fijadores de nitrógeno y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Azcón, 2000). Todos ellos influyen no sólo en el crecimiento y desarrollo de las plantas sino también contribuyen a la protección contra distintos tipos de estrés biótico y abiótico.

La mayoría de las plantas captan los nutrientes por medio de interacciones que establecen con los microorganismos que viven en la rizósfera, especialmente con aquéllos denominados simbioses.

#### **3.1. Micorrizas. Interacciones químicas involucradas en el proceso de micorrización**

Las micorrizas son definidas como una asociación simbiótica mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. En esta asociación mutualista, el hongo coloniza biotróficamente las células corticales de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a convertirse fisiológica y morfológicamente en parte integrante de dicho órgano. La planta hospedante proporciona al hongo los carbohidratos necesarios para su metabolismo y un hábitat ecológico protegido, mientras el hongo facilita a la

planta la absorción de agua y nutrientes como el nitrógeno, calcio, potasio, cobre, zinc, magnesio y especialmente fósforo, un nutriente limitante en muchos suelos (Genre *et al.*, 2005).

Esta simbiosis mejora también la tolerancia de las plantas a distintos tipos de estrés biótico o abiótico (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Read, 2008), mejora las características de los suelos y favorece la diversificación de especies vegetales en los ecosistemas (Smith y Read, 2008).

Los hongos formadores de micorrizas son algunos de los microorganismos beneficiosos más estudiados en la actualidad. El hombre ha logrado aislarlos y reproducirlos con el objetivo de emplearlos con fines productivos y ecológicos.

Los tipos más comunes y conocidos de micorrizas son las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Cada tipo se distingue en función de la relación de las hifas del hongo con las células radicales de la planta hospedante (Popoff, 2008). Las ectomicorrizas forman un micelio que invade la raíz por fuera de sus células, mientras que en las endomicorrizas el micelio invade la raíz, en primera instancia en forma intercelular y luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Las endomicorrizas son simbiosis obligados, no pudiendo ser desarrollados en cultivo puro, o sea en ausencia de su hospedante, contrariamente a los hongos ectomicorrízicos.

Las endomicorrizas son las más abundantes y dentro de éstas, las del tipo arbusculares (HMA) son las que forman la mayoría de las plantas de interés agrícola. Estos hongos se encuentran naturalmente en la rizósfera, pero ciertas prácticas agrícolas pueden disminuir su población haciéndose necesaria su incorporación mediante la inoculación de las plantas. La importancia de las micorrizas en la agricultura radica en que por su extenso micelio extra-radical se forma un vínculo entre la planta y el suelo aumentando el área de exploración de las raíces, favoreciendo la absorción de agua y nutrientes poco móviles.

Los hongos micorrízicos arbusculares constituyen un insumo microbiológico de importancia para el desarrollo de una agricultura sustentable. Debido a su papel en el funcionamiento de los ecosistemas y su potencial aplicación como

fertilizantes biológicos, pueden ser considerados como componentes importantes de la diversidad biológica del suelo (Guerra Sierra, 2008).

### 3.1.1. *Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares*

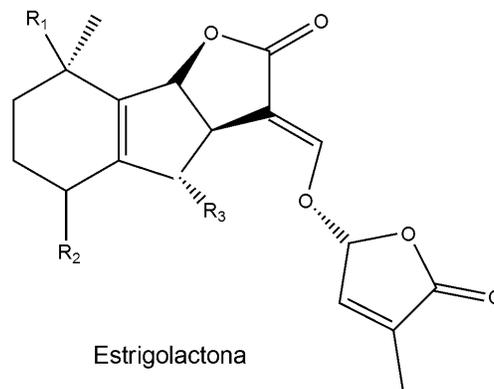
La invasión de estos hongos provoca en las plantas una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos específicos producidos por señales de reconocimiento emitidas por las plantas y el hongo. Las señales bioquímicas implicadas en la simbiosis están relacionadas con metabolitos secundarios exudados por las raíces de las plantas, los cuales estimulan el crecimiento de las hifas y la formación de las distintas estructuras del hongo. Las primeras señales habitualmente generan en las plantas respuestas defensivas débiles y localizadas, las cuales no impiden la colonización del hongo.

Los exudados radicales y los secretados por las HMA activan la expresión de genes que favorecen cambios a nivel celular y que posibilitan el desarrollo del hongo en la raíz. Las primeras señales bioquímicas están relacionadas con compuestos volátiles exudados por las raíces. El CO<sub>2</sub> es una molécula fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas (Bago *et al.*, 2000). Si bien la colonización de las raíces es controlada por la planta (Bonfante *et al.*, 2000), se ha determinado que la comunicación planta-hongo modifica la expresión de genes del hongo relacionados con señales de reconocimiento (Requena *et al.*, 2002).

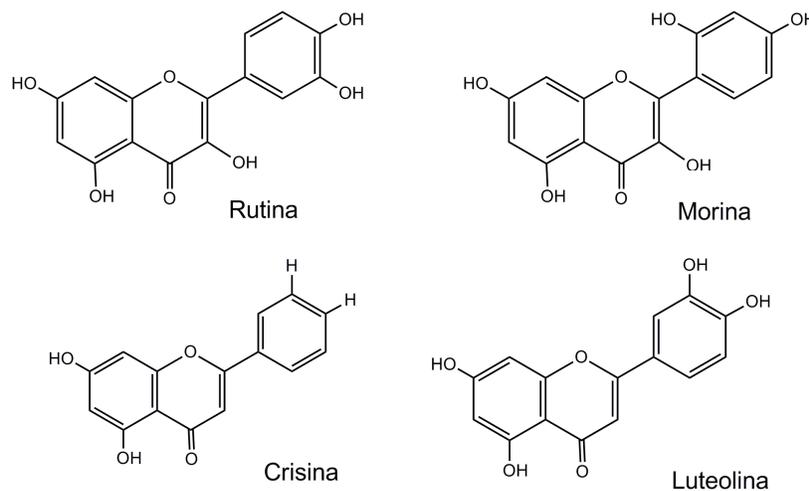
La ruta de biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides genera una amplia gama de metabolitos implicados en la señalización de los procesos de simbiosis, junto a otros compuestos como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares reductores y hormonas. Muchos de estos compuestos son exudados por raíces de plantas leguminosas y afectan la germinación de esporas, el crecimiento de las hifas y la colonización de las HMA.

Mandelbaun y Piche (2000) observaron un efecto sinérgico del CO<sub>2</sub> y los flavonoides exudados por las raíces de las plantas en el estímulo del crecimiento de las hifas de estos hongos. Las estrigolactonas (Figura 19) son lactonas terpénicas que derivan de los carotenoides, las cuales son exudadas

por las raíces, constituyendo un “factor de ramificación”. Fueron identificados en *Lotus japonicus* y luego aislados en un gran número de plantas demostrando ser de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.*, 2005). En papa, la formononetina (Figura 18) estimula la esporulación y la efectividad de hongos micorrícicos (Davies *et al.*, 2005). Scervino *et al.* (2005), determinaron que los flavonoides kaempferol, luteolina, rutina, morina y crisina (Figura 20) estimulaban la germinación de esporas y la elongación y ramificación de hifas de los hongos micorrícicos *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *G. intraradices*, asociados con trébol blanco.



**Figura 19.** Lactona terpénica que actúa como molécula de señalización celular endógena y en la rizosfera, con función hormonal



**Figura 20.** Compuestos fenólicos involucrados en la simbiosis planta-HMA

Las hormonas vegetales también están involucradas en las relaciones simbióticas que forman las HMA. Las citoquininas y auxinas muestran efectos positivos en el crecimiento del hongo, mientras que las giberelinas presentan respuestas tanto positivas como negativas en las HMA.

Los niveles de AJ y etileno se ven incrementados en las raíces de plantas micorrizadas durante el proceso de establecimiento de la asociación con HMA, relacionando esta respuesta con el aumento de la resistencia a algunas plagas, en plantas micorrizadas (Ramírez Gómez y Rodríguez, 2012).

Las señales de reconocimiento y la inducción de respuestas de defensa de la planta en la simbiosis con HMA han sido estudiadas comparándolas con las otras interacciones planta-microorganismo, como es el caso de la simbiosis leguminosa-rizobios, y de algunos hongos y nematodos patógenos. A pesar de ello aún no son claros los mecanismos de defensa que se activan bajo la simbiosis, pero se conoce que la alteración de la expresión de genes de defensa tiene un papel particular o funcional en el establecimiento de la misma.

### **3.2. Simbiosis Rizobios-Leguminosas**

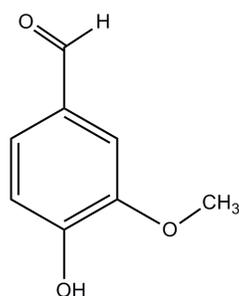
Los nódulos formados en las raíces de las plantas leguminosas constituyen una estructura altamente organizada que se desarrolla como resultado de la relación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias del suelo del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*. Dentro del nódulo radicular, las bacterias invasoras diferencian bacteroides fijadores de nitrógeno que proporcionan nitrógeno reducido a la planta a cambio de carbohidratos.

El establecimiento de la simbiosis requiere de mecanismos de señalización y reconocimiento por parte de ambos, en los que intervienen muchos metabolitos secundarios. Debido a la importancia que presenta esta simbiosis en la fijación de nitrógeno, muchas de las etapas del reconocimiento planta-bacteria, como la formación de nódulos y fijación de nitrógeno, han sido bien estudiadas.

Durante el proceso de establecimiento de nódulos, las semillas y raíces de las plantas sintetizan compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos y flavonoides, glicina-betaína (compuesto cuaternario presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales y varias familias de plantas y ausente en muchos cultivos de interés agrícola, relacionada con el estrés osmótico) y ácidos aldónicos como moléculas señales de la simbiosis. Estos compuestos actúan como quimio-atrayentes, guiando a las células de los rizobios hacia las raíces de las leguminosas.

Se ha demostrado que algunos flavonoides exudados por las raíces de las plantas pueden estimular o inhibir la expresión de genes *nod* que participan en esta simbiosis. Los genes *nod* son un grupo de genes de nodulación de las especies de Rizobios necesarios para la inducción de la división celular de las células corticales y la curvatura de los pelos radiculares en el inicio de la infección. Es posible que tanto los flavonoides como los ácidos fenólicos, por su función como antioxidantes, actúen como protectores de procesos oxidativos en las células en división.

Se comprobó que las raíces de *Vicia faba* secretan flavonas y flavonoles; las de soja, isoflavonas y las raíces de maní, vainillina (Figura 21) como reguladores de la expresión de genes *nod* en el simbiote. Los genes *nod* están implicados en la síntesis de lipo-quito-oligosacáridos (LCO), moléculas señales producidas por los rizobios que median el reconocimiento y la organogénesis del nódulo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa denominados factores *nod*, los que inducen también la acumulación de flavonoides y chalconas (Mandal *et al.*, 2010).



Vainillina

**Figura 21.** Compuesto fenólico regulador de la expresión de genes *nod* en *Arachis hypogaea*

Los ácidos fenólicos cinámico, gálico, *p*-cumárico, protocatéquico, también actúan como inductores de la simbiosis planta-microorganismos. La interacción entre los compuestos fenólicos y sus derivados y la ecología de la simbiosis planta-microorganismo es muy compleja y aún quedan muchas preguntas por responder en lo que respecta a sus efectos.

La incorporación de microorganismos benéficos en la agricultura constituye una práctica compatible con un manejo sustentable de los agroecosistemas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares, las bacterias fijadoras de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fósforo y bacterias promotoras del crecimiento son organismos amigables con el ambiente ya que se encuentran naturalmente en la rizósfera, pero debido al uso indiscriminado de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios, los suelos ven disminuida su población. Por lo tanto, la inclusión de estos microorganismos como potenciales fertilizantes biológicos o biofertilizantes permitiría aumentar los rendimientos de los cultivos sin causar daño al ambiente.

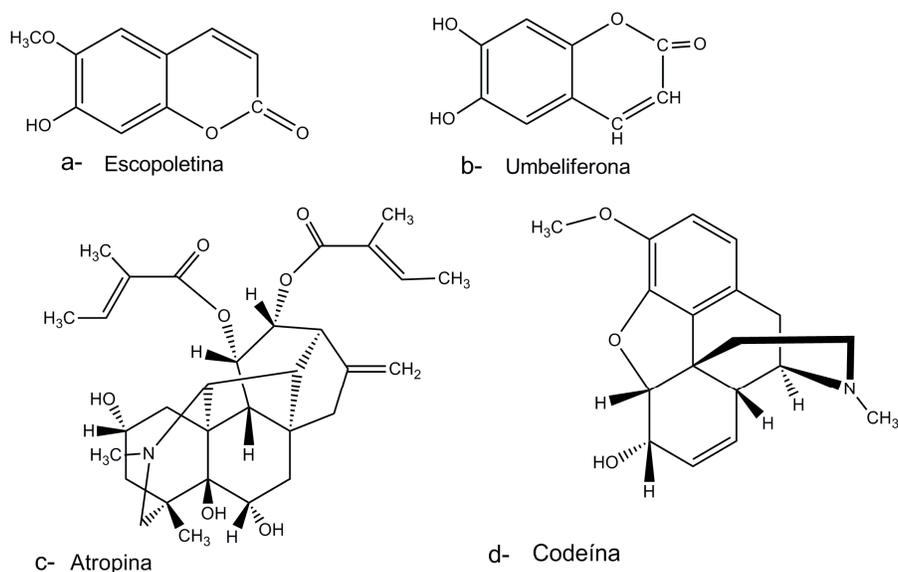
#### 4. Alelopatía

Algunas plantas poseen la capacidad de liberar compuestos químicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de otras especies vegetales. Este mecanismo se conoce como alelopatía. Por lo tanto la alelopatía representa el área de la Bioquímica Ecológica que estudia las interacciones entre plantas. La primera definición de dicho término (del griego *allelon* = uno al otro y *pathos* = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue la de Molish en 1937. En ella se incluían las interacciones bioquímicas ya sean benéficas o perjudiciales entre algas, hongos, bacterias y plantas superiores. Debido a la dificultad de discernir si el efecto que produce una planta sobre otra se debe a un compuesto químico en particular o a la competencia por recursos, en 1969 Muller introdujo el término de *interferencia*, para referirse al conjunto de los efectos alelopáticos y también los de competencia por espacio y recursos (agua, nutrientes, luz). Más tarde Rice (1974) la definió como el conjunto de efectos inhibitorios. La

International Allelopathy Society en el año 1996, define la alelopatía como: “Cualquier proceso que implica metabolitos secundarios producidos por especies exóticas que influyen en el crecimiento y desarrollo de las especies nativas (excluyendo los animales), comprendiendo efectos positivos y negativos”. Esta definición se amplió luego a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos.

Los compuestos alelopáticos que desencadenan este proceso se denominan agentes o sustancias alelopáticas. La acción fitotóxica de dichos metabolitos depende de su concentración, persistencia y destino en el medio donde son liberados. Muchas veces la actividad alelopática está originada por la acción conjunta de varios compuestos químicos, y no uno solo en particular. También puede deberse a un subproducto de la descomposición por microorganismos del suelo.

Entre los metabolitos con actividad alelopática se encuentran ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos y cetonas alifáticos; lactonas, quinonas (juglona, tetraciclina), terpenoides como cineol, alcanfor, limoneno; fenoles simples como el ácido gálico, vanílico, hidroquinonas, derivados del ácido cinámico como el ácido clorogénico y ferúlico, cumarinas como la escopoletina y umbeliferona (Figura 22 a, b), flavonoides como la catequina, quercetina; taninos condensados e hidrolizables; lignanos; antocianinas; aminoácidos y péptidos; alcaloides como atropina, codeína (Figura 22 c, d) y estricnina (Capítulo 2: Figura 4); aminas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. El grupo de los compuestos fenólicos comprende el mayor número de representantes.



**Figura 22.** Cumarinas y alcaloides con actividad alelopática

Estos compuestos se encuentran en todos los órganos vegetales tales como hojas, flores, frutos, tallos aéreos y subterráneos y en raíces de diversas especies, siendo las hojas y las raíces las fuentes más importantes de aleloquímicos. Se sintetizan y almacenan en distintos tipos de células en forma libre o conjugada con otras moléculas y son liberados al entorno en respuesta a distintas situaciones en las que comúnmente están involucradas condiciones de estrés biótico y/o abiótico.

Su concentración depende de la especie, edad, órgano e incluso del medioambiente. Algunos se encuentran compartimentalizados como se observa en *Mentha spicata*, que acumula el monoterpeno carvona en los tricomas. Otros compuestos pueden estar presentes en forma inactiva como ocurre con la juglona presente en el género *Juglans*. Este compuesto se sintetiza como precursor inactivo no tóxico (hidroquinona) en las partes verdes y frutos y cuando es arrastrado al suelo por las lluvias se hidroliza y oxida transformándose en juglona, altamente tóxica (Capítulo 4, Figura 6).

#### 4.1. Mecanismos de acción alelopática

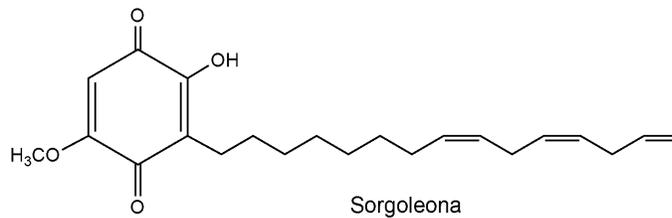
La diversidad de estructuras químicas con acción alelopática hace que no exista un único mecanismo de acción de estas sustancias. El estudio de dichos mecanismos es dificultoso debido a que estos metabolitos se presentan en la naturaleza en concentraciones muy pequeñas y, sumado a esto, se verifica la existencia de interacciones sinérgicas y aditivas con otros compuestos.

Estos metabolitos interfieren en distintas rutas metabólicas manifestando como principal respuesta visible la inhibición de la germinación de semillas y alteraciones en el crecimiento de las plantas.

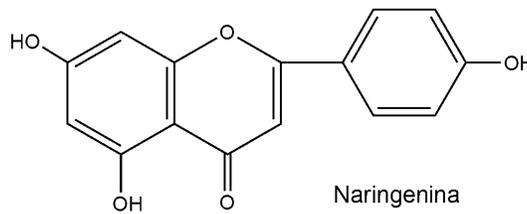
Entre los procesos metabólicos que se ven afectados se encuentran: la síntesis y actividad de enzimas tales como catalasa, peroxidasas, fenilalanina amonio liasa; enzimas hidrolíticas como amilasas, invertasas y proteasas; alteración de la actividad hormonal; respiración; fotosíntesis; alteración de la permeabilidad de las membranas plasmáticas; absorción de nutrientes y agua.

Por ejemplo, las plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico muestran un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasa) junto con un aumento de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenil alanina amonio liasa y la cinamil alcohol deshidrogenasa, involucradas en la vía de síntesis de fenilpropanoides.

Los ácidos benzoico y cinámico en bajas concentraciones pueden inhibir el transporte de electrones en la fase lumínica de la fotosíntesis. El kaempferol actúa inhibiendo la síntesis de ATP. La sorgoleona (Figura 23), una benzoquinona presente en exudados radiculares de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), actúa desacoplando el transporte de electrones en el fotosistema II. La juglona inhibe la respiración a bajas concentraciones, afectando la incorporación de oxígeno en la mitocondria. Los flavonoides como la quercetina y naringenina (Figura 24) inhiben la producción de ATP en la mitocondria. Algunos flavonoides inhiben la absorción de minerales esenciales como fósforo, potasio, magnesio, hierro y calcio.



**Figura 23.** Benzoquinona aislada en sorgo de Alepo con actividad alelopática



**Figura 24.** Flavonoide con actividad alelopática

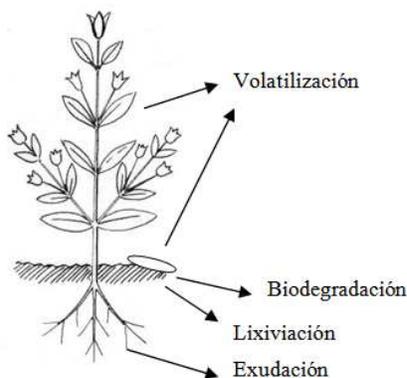
Las sustancias alelopáticas también pueden actuar sobre el metabolismo de las hormonas vegetales. Por ejemplo, pueden reducir o incrementar la concentración de ácido indol acético (AIA). Los ácidos *p*-hidroxibenzoicos, *p*-cumárico, vainillínico reducen la disponibilidad de AIA, e inhiben la acción de giberelinas, mientras que algunos di y polifenoles como los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y protocatéquico producen incrementos en el crecimiento inducidos por AIA. El flavonoide naringenina estimula enzimas del tipo AIA oxidasa, involucradas en la degradación de auxinas. La acción del ácido ferúlico y otros fenólicos inhibe el crecimiento de plántulas de pepino lo que se correlacionó con el aumento en los niveles de ABA.

De acuerdo a Einhellig (1995), los compuestos fenólicos pueden alterar distintas rutas metabólicas pero parece que el efecto más importante es sobre las membranas plasmáticas.

#### 4.2. Mecanismos de liberación

Las plantas pueden liberar los compuestos alelopáticos al entorno través de cuatro vías principales, dependiendo de la naturaleza química de dichos

compuestos. Dichas vías corresponden a: la *lixiviación* de sustancias solubles a partir de tallos y hojas o residuos de aquellos que caen al suelo; la *volatilización* desde los tejidos aéreos; la *exudación* por las raíces y la *descomposición* de residuos, tejidos muertos que quedan depositados en el suelo y sufren biodegradación, liberándose las sustancias producidas por la descomposición de dichos residuos a partir de la acción de microorganismos (Figura 25).



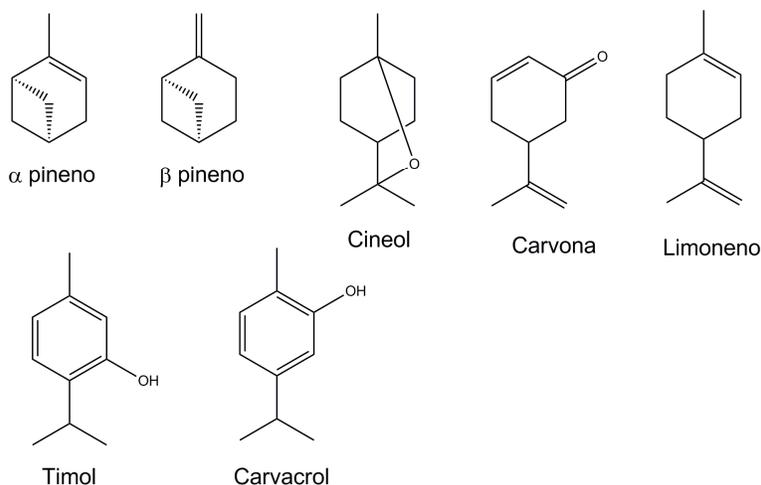
**Figura 25.** Vías de liberación de compuestos alelopáticos

#### 4.2.1. Volatilización

La *volatilización* es la vía por la que se liberan comúnmente compuestos con altos valores de tensión de vapor como los terpenoides, hidrocarburos de estructura lineal, fenilpropenos y compuestos sulfurados. En determinadas concentraciones estos compuestos volátiles actúan inhibiendo la germinación de semillas y el crecimiento de raíces de plántulas. Las condiciones ambientales de tiempo cálido y seco favorecen la volatilización de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropenos, los cuales se adsorben a las partículas del suelo.

Ejemplos: Los monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y cineol presentes en *Salvia reflexa* inhiben la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas; los glucosinolatos de *Brassica napus* y *Raphanus sativus* inhiben la germinación de lechuga y trigo; el cineol presente en *Eucalyptus globulus* inhibe la germinación y crecimiento de plantas de interés agrícola; el timol, carvacrol,

carvona y limoneno de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* y *Salvia officinalis* inhiben la germinación de semillas de alfalfa y *Lolium perenne* (Figura 26).



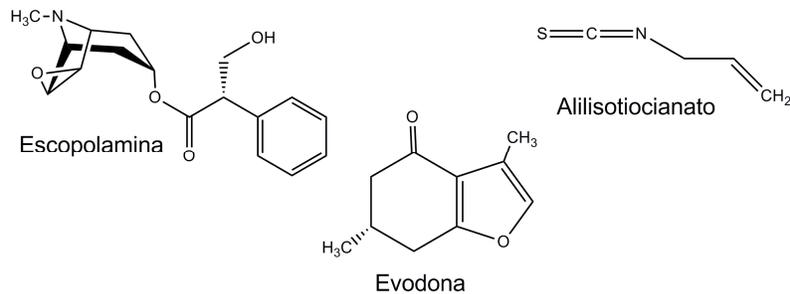
**Figura 26.** Terpenoides con actividad alelopática liberados por volatilización

#### 4.2.2. Lixiviación

La *lixiviación* consiste en la remoción de sustancias no volátiles acumuladas en las capas superficiales de los órganos vegetales por efecto de la lluvia, niebla, rocío o nieve. Estos compuestos suelen acumularse en estructuras epidérmicas especializadas como tricomas y pelos glandulares, aunque se ha demostrado que las semillas también pueden liberar estas sustancias al suelo. Los aleloquímicos pueden también ser lixiviados a partir de restos vegetales que caen al suelo. En general las sustancias liberadas por esta vía son solubles en agua como ocurre con los compuestos fenólicos, alcaloides, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, ácidos giberélicos. También se han encontrado algunos compuestos de estructura terpénica.

Ejemplos: *Datura stramonium* produce los compuestos escopolamina y atropina que inhiben el crecimiento de trigo y soja; el alilisotiocianato de *Brassica napus* inhibe el crecimiento de soja; la especie *Calamintha ashei* contiene (+) evodona

y desacetilcalamintona que inhiben la germinación y crecimiento de *Rudberkia hirta* y *Leptochloa dubia* (Figura 27).



**Figura 27.** Aleloquímicos liberados por lixiviación

#### 4.2.3. Exudación

Las plantas que liberan compuestos alelopáticos al suelo por *exudación* lo hacen generalmente a través de sus raíces. La composición y la concentración de los aleloquímicos liberados dependen de la edad de la planta, el estado de nutrición, irradiancia, humedad y composición del suelo. Los aleloquímicos exudados por las raíces tienen efectos inhibitorios sobre la germinación de semillas, crecimiento de raíces, nodulación y absorción de nutrientes. Entre los compuestos químicos exudados por las raíces se encuentran los ácidos cinámico, benzoico e hidroxicinámico, flavonoides, cumarinas, alcaloides como también metabolitos primarios como aminoácidos, azúcares.

Entre las especies cultivadas que presentan actividad alelopática se pueden citar: el centeno, la avena, la cebada, el maíz, el tomate y el pepino.

También las malezas pueden liberar toxinas y provocar la reducción del rendimiento de ciertos cultivos que crecen en forma conjunta. Ejemplos de malezas con estas características son *Setaria faberii* Herm (Pega-pega), *Sorghum halepense* L. (Sorgo de Alepo), que libera sorgoleona que inhibe el crecimiento de raíces, *Aristida spp* (coiron), *Bromus spp*, *Wedelia glauca* (sunchillo) cuyos diterpenos y esteroides inhiben la germinación y elongación de la radícula de tomate, pepino y rabanito.

Especies cultivadas como *Cucumis sativus* contienen ácidos benzoico, clorogénico, mirístico y palmítico que inhiben el crecimiento de lechuga; la *Avena spp* puede inhibir el crecimiento de la raíz y brote de la espiga de trigo por exudación de escopoletina y ácido vainillínico.

#### 4.2.4. *Descomposición de residuos vegetales. Biodegradación*

Otro mecanismo consiste en la liberación de sustancias producidas como resultado de la *descomposición de residuos vegetales*. Este proceso está influenciado por la naturaleza del residuo, el tipo de suelo y factores ambientales. Los microorganismos del suelo pueden producir la transformación de los compuestos no tóxicos liberados originando otros con efectos tóxicos. Este tipo de liberación suele causar inconvenientes en los sistemas de cultivo de siembra directa. La siembra sobre los rastrojos con toxinas que fueron liberadas por los cultivos antecesores podría provocar efectos nocivos sobre la emergencia, crecimiento y productividad del cultivo siguiente. Por otro lado los mismos residuos podrían ser beneficiosos al inhibir la germinación de ciertas malezas. Por este motivo, el conocimiento de los efectos alelopáticos de unas especies sobre otras permitiría determinar la compatibilidad entre ellas y poder llegar a establecer las asociaciones de cultivos más adecuadas con el objetivo de mejorar la producción.

Ejemplos: *Agropyron repens* inhibe el crecimiento de plantines de alfalfa, maíz y soja al liberar ácido 5-hidroxi indol 3-acético; en extractos de *Sorghum halepense* L. se han identificado ácidos clorogénico, cumárico, hidroxibenzoico y vainillínico con efectos inhibitorios sobre la germinación y crecimiento de girasol, tomate y rabanito; polifenoles y sesquiterpenos de *Cyperus rotundus* L. inhiben el crecimiento de tomate, arroz, caña de azúcar, pepino, soja y algodón; la escopolina, escopoletina y los ácidos benzoico, clorogénico, cumárico, gentísico y vainíllico presentes en extractos de *Imperata cylindrica* inhiben el crecimiento de maíz, centeno, sorgo y tomate; los ácidos benzoico,

cafeico, clorogénico y cumárico de *Xanthium spp* inhiben la germinación y crecimiento de trigo, maíz, tabaco, garbanzo, repollo y lechuga.

La acción alelopática de ciertos compuestos químicos liberados por las especies vegetales se evalúa generalmente en forma experimental en ensayos de laboratorio, analizando los efectos de extractos obtenidos a partir de distintas especies vegetales sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas, debido a su sencillez y rápida evaluación de la respuesta de la planta al agente alelopático. Estos estudios deberían en el futuro ser corroborados en condiciones de campo, lo que resulta ser mucho más engorroso debido a las múltiples interacciones que se dan a nivel de la rizósfera.

#### **4.3. Alelopatía y la aplicación en búsqueda de herbicidas**

Las malezas constituyen uno de los principales problemas que afectan en forma negativa los rendimientos de los cultivos. Es por este motivo que en las últimas décadas el uso excesivo de herbicidas sintéticos como práctica de manejo para su control ha alterado la biodiversidad de los agroecosistemas, lo que resulta en un riesgo potencial para los seres humanos y el medio ambiente.

El aumento de la resistencia de las malezas a los herbicidas junto con la búsqueda de alternativas de manejo sustentable ha impulsado el desarrollo de nuevos herbicidas que permitan controlar las malezas resistentes a los herbicidas tradicionales y de biocidas de bajo impacto ambiental que sustituyan a aquéllos de origen sintético.

Las sustancias liberadas por las malezas o por residuos de cultivos precedentes pueden provocar la caída del rendimiento de los cultivos.

El conocimiento de las propiedades alelopáticas de determinados compuestos liberados por algunas especies podría ser utilizado con fines agrícolas, ya sea para la obtención de variedades de plantas cultivadas tolerantes a las sustancias alelopáticas, programación de rotaciones de cultivos o la producción

de herbicidas de origen natural con el fin de mejorar el rendimiento de las plantas en producción.

Una práctica de manejo para el control de malezas es la de intercalar dos o más cultivos, donde uno de ellos presenta actividad alelopática sobre las malezas. Un ejemplo es el cultivo de maíz intercalado con zapallo, donde los aleloquímicos liberados por el zapallo controlan las malezas del cultivo de maíz. La identificación de especies vegetales con principios activos fitotóxicos junto con el mejoramiento de las técnicas de extracción, aislamiento e identificación de dichos compuestos permitiría la búsqueda de moléculas con aplicación agronómica.

Las industrias del sector agroquímico plantean el uso directo de estos compuestos en formulaciones de herbicidas, la mejora genética de plantas cultivadas que sintetizen naturalmente sustancias con potencial alelopático o la obtención de otros agroquímicos sintetizados a partir de productos naturales.

Si bien la investigación sobre la alelopatía data de varias décadas, aún queda mucho por estudiar. Una ventaja de estos compuestos es que la mayoría son solubles en agua lo que hace que sean activos a bajas concentraciones reduciendo su permanencia en el ambiente y resultando por lo tanto ecológicamente adecuados.

A pesar de ello, la búsqueda de compuestos con actividad herbicida potencial no es sencilla, presenta algunas dificultades como por ejemplo, la cantidad de principio activo presente en los vegetales es generalmente reducida, las rutas de biosíntesis son complejas y los costos de aislamiento son elevados. El uso de compuestos aislados de las plantas con propiedades alelopáticas requiere también de la realización de pruebas toxicológicas con el objetivo de garantizar su inocuidad para el ambiente y los animales.

Ejemplos de aplicación:

Se ha aumentado la fitotoxicidad del compuesto 1,8 cineol, con propiedades aleloquímicas, modificado su estructura molecular, comercializado bajo el nombre de "Cinmetileno".

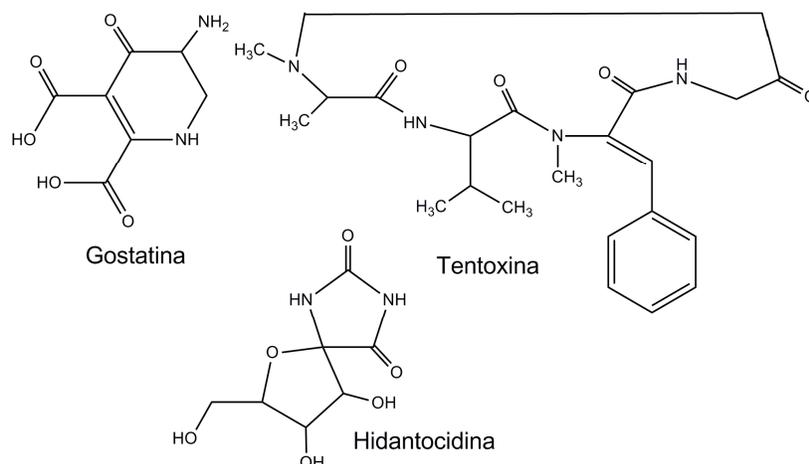
Se está investigando el incorporar las características alelopáticas en cultivares mejorados de arroz a partir de variedades de arroz con propiedades

alelopáticas, con el objetivo de reducir la necesidad de aplicar herbicidas al cultivo, pero hasta el momento no se han obtenido cultivares comerciales (Duke *et al.*, 2001).

Herbicidas comerciales formulados a partir de moléculas de origen natural:

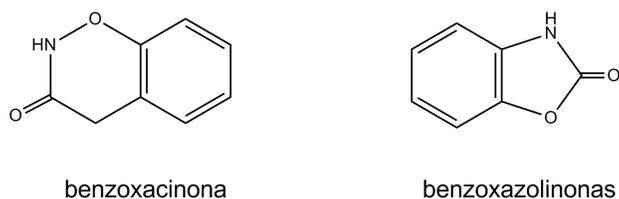
- Cinmetilina: ha sido aplicado para el control de malezas durante periodos corto de tiempo.
- Bialafos: es actualmente comercializado en Japón bajo el nombre de Herbace<sup>®</sup>.
- Mesotrione: es un derivado químico de la leptospermona, un componente de los aceites esenciales de *Leptospermum scoparium*, el ingrediente activo del herbicida comercial Callisto<sup>®</sup>, un herbicida sistémico, selectivo y de aplicación post emergente, que puede controlar malezas que han desarrollado resistencia a la atrazina, herbicida selectivo, principalmente aplicado en cultivos de maíz.
- Sulcortiona: derivado de la leptospermona. Este compuesto ha sido comercializado en Europa por la Bayer Crop Science bajo el nombre de Mikado<sup>®</sup>, siendo también un herbicida post emergente, utilizado ampliamente en los cultivos del maíz y caña de azúcar frente a una gran variedad de malezas.

Los compuestos microbianos poseen un elevado potencial fitotóxico. La tentoxina, la hidantocidina y la gostatina son herbicidas de origen microbiano (Figura 28).



**Figura 28.** Compuestos microbianos con actividad herbicida

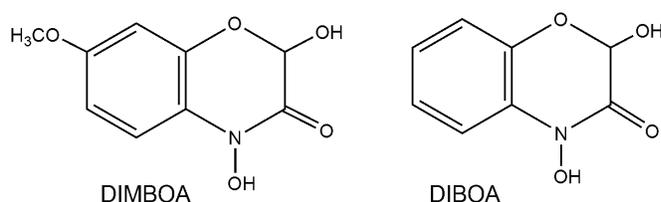
Los ácidos hidroxicinámicos derivados de la benzoxacinona presentan un potencial alelopático particularmente importante (Regnault *et al.*, 2004) ya que muestran una relativa selectividad, siendo algunos activos para dicotiledóneas o monocotiledóneas. La principal vía de liberación de estos compuestos es la exudación radicular. Al ser liberados al suelo sufren una degradación microbiana y química que los transforma en benzoxazolinonas (Figura 29).



**Figura 29.** Ácidos hidroxicinámicos con potencial alelopático

Estos compuestos se encuentran en muchas variedades de gramíneas como trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum spp*) o centeno (*Secale cereale*) actuando como sustancias alelopáticas para algunas plantas, detoxificando herbicidas y otorgando resistencia a insectos, hongos o bacterias patógenas. Extractos etéreos obtenidos a partir de centeno pueden inhibir el crecimiento de la raíz y los cotiledones de algunas malezas sin causar toxicidad a los cultivos de maíz, trigo y centeno, lo que los hace apropiados para ser utilizados como herbicidas naturales (Leicach, 2006).

Dentro de estos ácidos, dos son las moléculas cuantitativamente más importantes en estos cereales la DIBOA (2,4 dihidroxi-1,4 benzoxacin-3-ona) y DIMBOA (2,4 dihidroxi-7-metoxi-1,4 benzoxacin-3-ona) (Figura 30). Se pueden encontrar en todas las partes de la planta, presentando su máxima concentración en el estado de plántula (Regnault *et al.*, 2004). Se ha determinado que estos compuestos son los mayores factores de resistencia a áfidos en trigo, favoreciendo la presencia de insectos benéficos (Leicach, 2006).



**Figura 30.** Ácidos hidroxicinámicos derivados de la benzoxacinona con actividad alelopática

## 5. Adaptaciones bioquímicas frente a factores de estrés abiótico

Como ya se mencionó anteriormente las plantas no poseen la capacidad de trasladarse en busca de un ambiente adecuado para su crecimiento y desarrollo y es por ello que continuamente deben hacer frente a las distintas situaciones de estrés que les impone el entorno.

Cuando hablamos de estrés nos referimos a la presencia de un factor externo a la planta que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo (Azcon-Bieto, 1993). Las condiciones de estrés a las que se ven sometidas las plantas pueden ser de tipo biótico o abiótico. El estrés biótico se refiere a las adversidades causadas por acción de seres vivos, como animales, hongos, bacterias y otras plantas. El estrés de tipo abiótico es causado por sequía, anegamiento, salinidad, temperaturas extremas (calor, frío, congelamiento), disponibilidad de luz, presencia de metales pesados en el suelo, contaminantes ambientales como NO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, ozono, etc. Es importante destacar que en determinadas situaciones las plantas pueden estar sometidas simultáneamente

a distintas situaciones de estrés, como es el caso de las plantas que crecen en ambientes desérticos, donde la falta de precipitaciones está acompañada de temperaturas elevadas.

En el transcurso de la evolución, las situaciones de estrés a las que fueron sometidas las plantas han provocado una presión de selección que les permitió desarrollar diversos mecanismos de defensa para poder adaptarse, evitando o tolerando situaciones adversas, y así lograr sobrevivir. La tolerancia o sensibilidad a los distintos tipos de estrés depende del genotipo y del estado de desarrollo de la planta. Las estrategias que utilizan las plantas para adaptarse a dichas situaciones incluyen cambios anatómicos, estructurales y bioquímicos, muchos de los cuales son comunes a los distintos tipos de estrés, mientras que muy pocos son específicos para un tipo en particular.

Dentro de las respuestas comunes podemos citar la modificación del patrón de crecimiento, senescencia y abscisión de órganos, reparación de proteínas desnaturalizadas y activación de mecanismos antioxidantes. Debido a que muchas de las respuestas son comunes, las rutas de transmisión de señales que se activan también son idénticas o similares.

### **5.1. Señalización del estrés**

Cuando una planta está frente a una situación de estrés inicia una serie de acciones que culminan en la manifestación de una respuesta. Esta secuencia de acciones comienza con la percepción del estímulo estresante, continuando con el procesamiento y transmisión de la señal percibida a través de una cascada o rutas de transmisión hacia el núcleo de las células, donde se induce la activación o represión de la transcripción de genes que darán la respuesta adecuada.

Los llamados elicitores (previamente definidos) son los compuestos químicos encargados de sensar el estrés. Las fitohormonas son los principales metabolitos implicados en la transmisión intracelular de las señales de estrés, ya que presentan características que las hacen apropiadas para este fin, como

por ejemplo: pueden acumularse y desaparecer rápidamente, inducen la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en las respuestas y adaptaciones a condiciones adversas o en la recuperación posterior cuando desaparece la situación de estrés, o al incorporarlas en forma exógena en condiciones no estresantes incrementan la tolerancia de las plantas sometidas a situaciones desfavorables.

Entre las principales fitohormonas implicadas en respuestas a condiciones de estrés medioambiental se encuentran el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido jasmónico (AJ). Las auxinas, citoquininas o poliaminas también lo están, pero con menor frecuencia.

El ABA incrementa su síntesis en situaciones de estrés hídrico. Esta hormona detecta la señal de falta de agua en la raíz y transmite estímulos hacia la parte aérea generando respuestas fisiológicas típicas del estrés. Se sintetiza fundamentalmente en los cloroplastos. Uno de los mecanismos que inducen la biosíntesis de ABA se debe a los cambios de volumen y turgencia experimentados por la célula. El aumento en su concentración en la hoja como respuesta a un estrés hídrico causa el cierre de estomas, disminuye la transpiración e inhibe el crecimiento de la planta y el desarrollo de las semillas y los frutos. También participa en la transmisión de señales de estrés junto al etileno y el AJ.

La síntesis de etileno es inducida por la deficiencia de hierro, heridas, temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidad, hipoxia, acumulación de metales en el suelo y ataque de patógenos.

Las distintas situaciones adversas inducen la expresión de genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos, en especial los fenilpropanoides, dando lugar a cumarinas, ácido salicílico, ácidos cinámicos como el cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, entre otros compuestos.

Ejemplos de metabolitos secundarios implicados en procesos de estrés abiótico:

- *Radiación UV: Flavonoides (antocianinas, flavonas y flavonoles), ácido salicílico, ésteres de ácidos fenólicos.* Los flavonoides absorben las radiaciones

UV ejerciendo un importante efecto fotoprotector al actuar como filtro de las radiaciones dañinas. Estos pigmentos se localizan generalmente en las células epidérmicas protegiendo los tejidos internos. El espectro de radiación UV se divide en radiaciones UV-A de baja energía (320 a 400 nm), radiaciones de alta energía UV-B (280-320 nm) y UV-C (254-280 nm), siendo las radiaciones UV-B y UV-C las que provocan daños mayores. Este tipo de radiación afecta la fotosíntesis, transpiración, polinización y provoca daños en el ADN. Las radiaciones UV estimulan la síntesis no sólo de estos pigmentos sino también de los carotenoides (terpenoides).

Los fenilpropanoides también pueden actuar como filtros de radiación UV. Se determinó asimismo que una mezcla de flavanonas (tres hidroxiformas o dihidroflavonoles), flavonas y flavonoles ubicados dentro de la vacuola central de las células epidérmicas de las hojas actúan como filtros de radiaciones UV-B y UV-A.

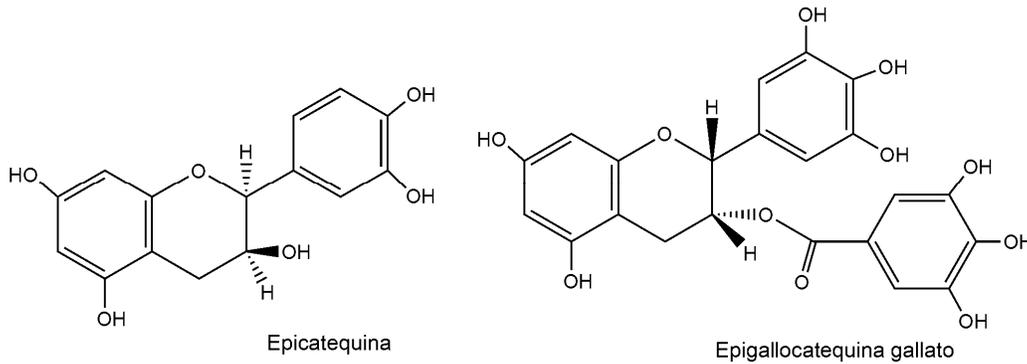
Las plantas superiores presentan fotorreceptores específicos, como por ejemplo los citocromos que también intervienen como protectores de la radiación UV-B. Estos fotorreceptores regulan la biosíntesis de pigmentos antociánicos.

- *Adaptación a cambios de temperaturas*: La aclimatación a la temperatura es un proceso que involucra cambios en la estructura y función de las membranas celulares, expresión de genes, contenido de agua de los tejidos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios.

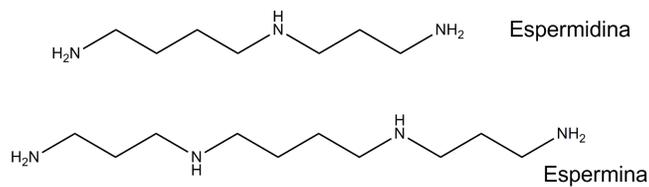
En *Brassica napus* L. var oleífera el estrés por bajas temperaturas aumenta la expresión de la enzima PAL, acumulándose compuestos fenólicos. Durante la aclimatación al frío la quercetina actúa como antioxidante, secuestrando especies reactivas del oxígeno. En condiciones de heladas, los flavonoides actúan como estabilizantes de las membranas celulares.

- *Sequía*: El estrés hídrico induce cambios en la composición de flavonoides. En hojas de *Citrus clusii* Dunal, se han identificado la epigallocatequina y epicatequina gallato (Figura 31). Estos flavonoides son responsables de

cambios morfológicos en las hojas y son eficientes antioxidantes ayudando a inhibir la peroxidación de lípidos de membrana y a prevenir el estrés oxidativo. Se acumulan también poliaminas como espermina y espermidina (Figura 32); carotenoides, antocianinas y betalaínas.



**Figura 31.** Estructura de algunos flavonoides inducidos por estrés hídrico



**Figura 32.** Poliaminas inducidas por estrés hídrico

- *Salinidad:* El estrés salino es producto de una concentración elevada de cloruro de sodio y sulfato de sodio en la solución del suelo que provoca en las plantas distintos efectos a través de mecanismos osmóticos e iónicos. La tolerancia de los cultivos a la salinidad es de carácter complejo. Las especies más tolerantes suelen acumular compuestos orgánicos con función osmoprotectora como prolina y glicina-betaína (Taiz y Zeiger, 2010).

Como respuesta a las altas concentraciones de sales en el suelo, las plantas pueden incrementar la concentración de alcaloides y flavonoides a fin de moderar el daño oxidativo. Un mecanismo de las plantas que crecen en hábitats ricos en sulfato es la síntesis de flavonoides, los cuales se unen a este anión.

- *Ozono*: Algunas especies pueden acumular ácido salicílico y ésteres de ácidos fenólicos.

- *Deficiencia de nutrientes*: Las plantas con deficiencias en fósforo suelen presentar hojas rojizas como resultado del aumento en la síntesis de antocianinas. Bajo deficiencia de hierro y nitrógeno se acumulan ácidos fenólicos y flavonoides, respectivamente.

- *Heridas*: como respuesta al estrés oxidativo se acumulan ésteres de ácidos fenólicos y cumarinas, mientras que compuestos como lignina y suberina actúan como barrera a la entrada de patógenos.

El uso de plantas tolerantes a distintos tipos de estrés abiótico podría permitir el aprovechamiento y la recuperación de tierras afectadas por salinidad, acidez, sequía, etc.

## 6. Estrategias de biocontrol de plagas y enfermedades basadas en el empleo de productos naturales vegetales

En los sistemas agrícolas más avanzados se utilizan pesticidas orgánicos sintéticos desde la década del '50, tanto para uso como insecticida, fungicida, bactericida y herbicida. La mayoría de los plaguicidas de origen químico se acumulan en los suelos causando contaminación, toxicidad para muchas formas de vida por su baja biodegradabilidad y dan origen a generaciones de insectos y microorganismos resistentes (Céspedes y Alarcón, 2011). Estos inconvenientes han obligado buscar nuevas alternativas que permitan controlar microorganismos patógenos e insectos de manera acorde a una agricultura sustentable.

El conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas, la identificación y determinación de las propiedades de los metabolitos secundarios junto con la mejora de las técnicas de extracción y aislamiento resulta de suma utilidad para el desarrollo de estrategias de biocontrol de plagas y enfermedades con biocidas de bajo impacto ambiental que sustituyan a aquéllos de origen sintético.

La búsqueda está orientada a la obtención de productos con actividad selectiva, que no generen resistencia y con adecuada biodegradabilidad, condición con la que cumplen la gran mayoría de los metabolitos secundarios vegetales. A estas condiciones debiera agregarse que el producto sea de disponibilidad asegurada o potencialmente capaz de ser producido a costos razonables para los sistemas agrícola-ganaderos a utilizarse.

A pesar de los avances logrados en la dilucidación de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios queda mucho por estudiar en relación a sus propiedades químicas y biológicas.

Como ya se ha visto en los capítulos anteriores, los compuestos químicos encontrados en las plantas pueden establecer distintas relaciones planta-planta, planta-microorganismo o planta-insecto, siendo las reacciones planta-insecto las que mejor han sido estudiadas.

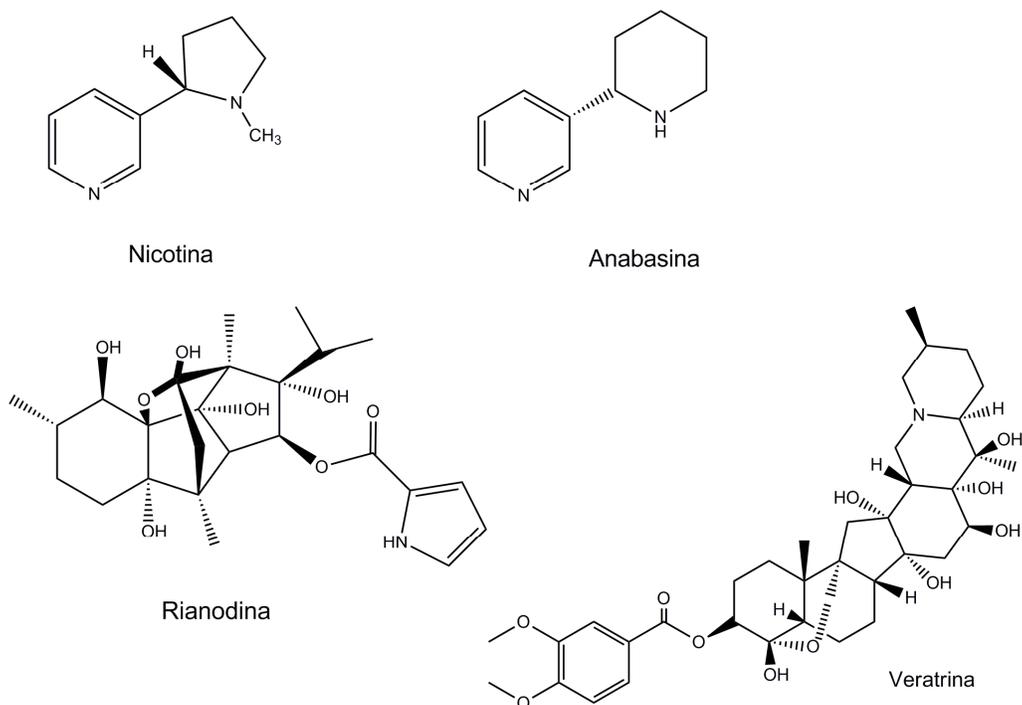
Dentro del área de la biotecnología agrícola las líneas de investigación más importantes acerca de estos temas son las siguientes: desarrollo de plantas genéticamente mejoradas con mayor resistencia a virus, bacterias, hongos, insectos y herbicidas; mapeos genómicos de los principales cultivos; obtención de plantas transgénicas para producción de metabolitos secundarios; reemplazo de agroquímicos por productos naturales como biofertilizantes, bioinsecticidas, bioherbicidas, control biológico de plagas y enfermedades. Estos últimos, a pesar de ser productos naturales, deben ser utilizados con la misma precaución que los pesticidas químicos, debiendo cumplir con las mismas exigencias en cuanto a normas de seguridad alimentaria y medioambiental que los pesticidas sintéticos.

Los primeros agroquímicos utilizados fueron polvos o extractos de plantas, los que a partir de la primera mitad del siglo XX fueron reemplazados por el surgimiento de los compuestos químicos de síntesis.

Durante el siglo XIX se identificaron algunos alcaloides como la nicotina (Figura 33), extraídos del tabaco (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica* y *N. glauca*: *Solanaceae*), aislada en 1828 por Posselt y Rotschy y sintetizada en 1904 por Pictet y Rotschy (Matsumura, 1975). Este compuesto era utilizado para el control de insectos masticadores y chupadores de plantas comestibles. Debido

a su efecto tóxico para mamíferos, su utilización como producto fitosanitario es limitada. Actualmente se utiliza en preparaciones complejas bajo la forma de sulfato, en soluciones alcalinas o con jabones y como fumigante en aerosol de contacto en invernaderos. Un alcaloide de estructura similar a la nicotina, la anabasina (Figura 33), presenta mayor sensibilidad de acuerdo a la especie. Para el pulgón *Aphis rumicis* es más tóxica que la nicotina mientras que las larvas de los mosquitos son menos sensibles.

Otro alcaloide, la rianodina (Figura 33) ( $C_{26}H_{37}NO_9$ ) aislada de la especie *Ryania* (*Liliaceae*) es más tóxico para mamíferos y su toxicidad para el barrenador del maíz y de la caña de azúcar (*Pyraustia nubilalis*) es comparable al DDT (Dicloro Dimetil Tricloroetano, insecticida organoclorado). La veratrina (Figura 33) extraída de *Veratrum album* se utilizaba para controlar pulgones del grosellero (*Pteronues ribedii*).

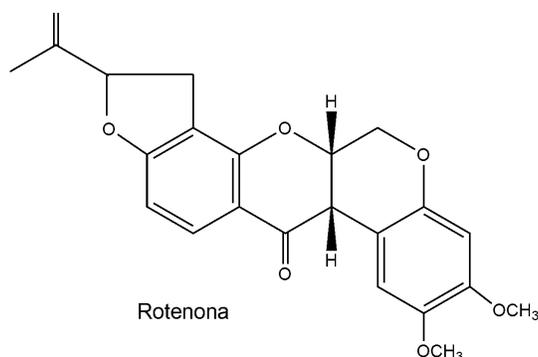


**Figura 33.** Alcaloides con actividad insecticida

Entre los compuestos fenólicos, los polifenoles son metabolitos con alto potencial de aplicación en la formulación de biopesticidas ya que además de

participar en diferentes procesos fisiológicos de las plantas juegan un papel importante en la protección vegetal. Como se mencionó anteriormente, se pueden oxidar enzimáticamente para producir quinonas tóxicas, refuerzan las paredes celulares actuando como barrera física para el parásito o impidiendo la difusión de sus toxinas. La mayoría de estos compuestos son solubles en agua reduciendo su permanencia en el ambiente.

Un derivado flavonoide, constituye el principio activo de la rotenona (Figura 34), un activo insecticida. Este compuesto se extrajo de las raíces de *Derris elliptica* (Matsumara, 1975). A diferencia de la nicotina, no sólo actúa sobre el sistema nervioso sino también sobre los mecanismos de respiración celular. Tiene la ventaja de ser inofensiva para animales de sangre caliente y altamente tóxica para los de sangre fría. En los últimos años ha ganado interés para su uso en agricultura biológica combinada con piretrinoides, sulfuros o cobre.

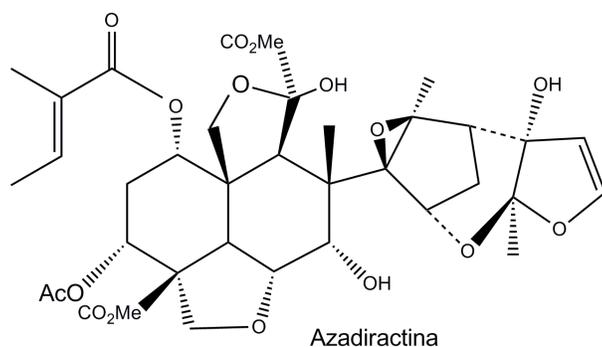


**Figura 34.** Insecticida derivado de flavonoides

La ingeniería genética estudia la inducción de genes que codifican la síntesis de fitoalexinas. Rüdiger Hain *et al.*, en 1993 junto con la empresa Bayer y universidades alemanas insertaron el gen de la estilbeno sintasa, proveniente de la vid, en plantas de tabaco transgénico, permitiendo que esta especie adquiriera una mayor resistencia a la infección producida por el hongo *Botrytis cinerea*. En el laboratorio de Brian McGonigle, de la compañía Du Pont, se logró la síntesis constitutiva de un glicósido del isoflavonoide “daidzeína”, un miembro de las fitoalexinas de leguminosas, en células de plantas de maíz, una monocotiledónea. El gen introducido, que codifica la síntesis de la enzima isoflavona sintasa, provenía de la soja, una dicotiledónea.

A pesar de las intensas investigaciones sobre productos naturales e interacciones químicas plantas-insecto, sólo dos nuevos tipos de insecticidas botánicos han sido comercializados en los últimos 15 años con cierto éxito. Son aquéllos basados en extractos de semillas de Nim (*neem* en inglés) (*Azadiracta indica*) y aquéllos basados en varios aceites esenciales (Isman *et al.*, 2011).

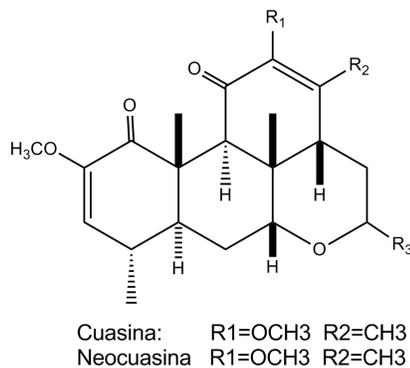
El *Nim* es uno de los insecticidas que ha tenido más éxito en los últimos años desde el punto de vista científico y comercial. Su principal principio activo es un triterpeno (limonoide) derivado de la azadiractina (Figura 35) aislado de las semillas y hojas del árbol *Azadiracta indica*, que actúa como repelente de plagas, afectando diferentes fases del crecimiento de los insectos. También existen informes de control en nematodos. El efecto ocurre a los 2 ó 3 días cuando los insectos se van o dejan de alimentarse y mueren. Su amplio espectro y elevada selectividad favorece a los enemigos naturales de los parásitos y a los polinizadores y resulta inocuo para mamíferos y el medio ambiente. La producción de extractos de Nim de calidad es costosa siendo la mayor parte de la producción de granos dedicada a la obtención de insecticidas. El aceite de Nim se puede utilizar en cultivos hortícolas, ornamentales y frutales para el control de larvas de lepidópteros, moscas blancas, áfidos y chinches.



**Figura 35.** Insecticida de origen vegetal. Principio activo del Nim

Asimismo se encuentran con un mercado incipiente otros insecticidas botánicos, como el producto comercial producido a partir de extractos de *Quassia amara* (“Hombre Grande”) (Fam. *Simaroubaceae*), que presenta varios

cuasinoides como principios activos con actividad insecticida (Ocampo y Díaz Rojas, 2006). Los cuasinoides, de los cuales los cuantitativamente más importantes son la cuasina y alfa y beta neocuasina (Figura 36), son moléculas triterpénicas modificadas.



**Figura 36.** Principios activos insecticidas aislados de *Quassia amara*

Los aceites esenciales han sido usados desde la antigüedad en aplicaciones medicinales, cosméticas, insecticidas, bactericidas, como antiparasitarios y en otras aplicaciones útiles al hombre. Actualmente son utilizados principalmente por las industrias farmacéuticas, cosméticas, perfumísticas y alimenticias, entre otras.

Ensayos físico-químicos *in vitro* caracterizan a varios de ellos como antioxidantes. Sin embargo, trabajos recientes sobre células eucariotas muestran que pueden actuar como pro-oxidantes afectando las membranas y organelas como las mitocondrias. Ejercen efectos citotóxicos para células vivas pero usualmente no genotóxicos (adjetivo aplicado a cualquier sustancia capaz de causar daños al ADN que pueden conducir a la transformación de células hasta formar un tumor maligno). En algunos casos, cambios en el potencial redox intracelular y disfunciones mitocondriales inducidos por los aceites esenciales pueden estar asociados con su capacidad de ejercer efectos antígenotóxicos. Un papel importante en estas funciones son atribuidas al sinergismo entre los componentes de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008).

Muchas investigaciones demuestran actividades biológicas de varios aceites esenciales como larvicidas, antialimentarios, repelentes, inhibidores del

crecimiento de insectos, de la fertilidad y oviposición, antifúngicos, antibacterianos y otras que los hacen ser considerados como una alternativa en el control de plagas y enfermedades. Además hay referencias sobre su rápida degradación en el ambiente lo que favorece a insectos benéficos (Tripathi *et al.*, 2009).

Jaensen *et al.* (2006) mencionan que la actividad repelente sobre varios insectos aparece asociada a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos de los aceites esenciales. La mencionada actividad ha sido demostrada con monoterpenos como el limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor,  $\alpha$ -pineno y timol (Ibrahim y Zaki, 1998; Yang *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005) y con sesquiterpenos como el  $\beta$ -cariofileno (Jaensen *et al.*, 2006).

En ensayos realizados en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP con aceites esenciales obtenidos a partir de materiales cultivados y procesados en la Institución, se han obtenido resultados alentadores sobre algunas actividades biológicas de interés agronómico.

Mezclas de aceite de laurel (*Laurus nobilis*) y lemongrass (*Cymbopogon citratus*) resultaron interesantes como herramienta para el control de mosca blanca en lechuga (Ringuelet *et al.*, 2010). Se obtuvieron mejores resultados con la mezcla que con el uso de los aceites en forma individual, lo que podría deberse al sinergismo observado en otros ensayos.

El *C. citratus* también resultó efectivo para el control de los pulgones *Brevicoryne brassicae* L. y *Myzus persicae* Sulz. en repollo (Ringuelet *et al.*, 2005a); el aceite de laurel (*Laurus nobilis*) para *M. persicae* (Padín *et al.*, 2006). El cineol, extraído del aceite esencial de laurel, mostró muy buena actividad repelente para los pulgones *M. persicae* y *B. brassicae* en repollo (Ricci *et al.*, 2010).

El aceite de *Lippia alba* mostró actividad sobre varios insectos plaga como *Haematobia irritans* (mosca de los cuernos en vacunos) (Ringuelet y Artiñano, 2013), gorgojos en granos almacenados, con actividades distintas según el quimiotipo ensayado (Ringuelet *et al.*, 2005b; Pesce, 2006).

Gorgojos como *Sitophilus oryzae* resultaron muy resistentes a la aplicación de varios aceites ensayados, mientras que *Tribolium castaneum* fue muy sensible al tratamiento con aceite de romero, *Rosmarinus officinalis* (Padín *et al.*, 2000). Actividades antimicrobianas interesantes de varios aceites esenciales fueron demostradas en trabajos *in vitro* e *in vivo*. Aceites de lemongrass (*C. citratus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) resultaron efectivos contra la bacteria *Paenibacillus larvae*, el agente causal de la enfermedad conocida como “loque americana” en abejas melíferas (Alippi *et al.*, 1996). Varios aceites fueron evaluados para el control de esta enfermedad, con resultados variables según dosis y formulaciones (Albo *et al.*, 2003). Para el control del hongo *Ascosphaera apis*, responsable de la enfermedad conocida como cría yesificada en abejas, se obtuvieron resultados alentadores con varios aceites esenciales, aunque con cierta toxicidad para la abeja adulta (Albo *et al.*, 2010).

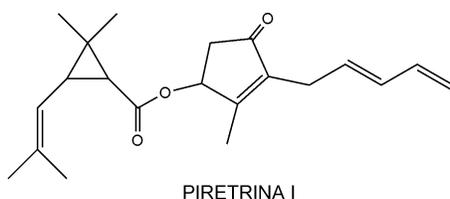
Debido a la insolubilidad en agua de los aceites esenciales, un problema en el desarrollo de plaguicidas basados en estos productos es conseguir una adecuada formulación, estable y de fácil aplicación. Otra característica a tener en cuenta de estos metabolitos, es que al ser productos naturales su composición es variable de acuerdo con todos los factores que influyen en ella, como material de origen, condiciones de cultivo, de postcosecha y de extracción. Por esta razón es importante desde el punto de vista industrial conseguir una estandarización y/o normalización del producto a utilizar.

La disponibilidad de materia prima para la extracción de los aceites es otro factor a tener en cuenta a la hora de promover su uso como agroquímicos. En el caso de especies silvestres deben realizarse paralelamente trabajos de domesticación de las mismas. Éstos comprenden ensayos sobre técnicas de cultivo para optimizar el rendimiento, lograr estandarización del producto, proteger el germoplasma y la especie, todas acciones compatibles con un desarrollo sostenible de los recursos.

Otros estudios iniciados en la Argentina investigan las propiedades insecticidas y nematocidas de extractos de *Melia azedarach*, *Meliaceae* (Mareggiani *et al.*, 1998), de lactonas sesquiterpénicas aisladas a partir de especies de *Asteraceae* (Sosa *et al.*, 1995) y de un grupo de lactonas esteroideas aisladas

de las *Solanaceae*, los salpicrólidos cuya actividad para el control de herbívoros era hasta el momento desconocida (Mareggiani *et al.*, 2000).

Otros compuestos químicos naturales con actividad insecticida son las piretrinas (Figura 37) (ésteres del ácido crisantémico) aislados de las flores de la especie *Crysanthemum cinerariaefolium* (piretro), familia *Asteraceae*, también aisladas de otras especies de *Crysanthemum*. El principio activo “piretro”, consiste en una mezcla de ésteres de piretrinas I y II, cinetrina I y II y jasmolina I y II, donde las piretrinas son las más abundantes. Es uno de los insecticidas botánicos más antiguos del mundo.



**Figura 37.** Estructura química de la piretrina I

La piretrina es activa aún en bajas concentraciones, es de amplio espectro, rápido efecto de choque, rápida degradación en el ambiente por radiación solar lo que limita su utilización en exteriores, mínima toxicidad para mamíferos, está homologada y aprobada para agricultura biológica. Es usada para combatir plagas en alimentos almacenados, contra insectos de cultivos industriales, dirigido a larvas adultas de lepidópteros y otros insectos fitófagos de vida libre, siempre y cuando parte de su ciclo biológico pueda estar expuesto a la acción de contacto del producto. Si bien se han detectado irritaciones y manifestaciones alérgicas en el hombre, su inestabilidad a la luz, aire y humedad reduce los riesgos en su utilización.

Tomando como base su estructura molecular, se desarrollaron los piretroides, insecticidas de síntesis con mayor estabilidad en el medio ambiente y mayor toxicidad para insectos y peces, los cuales son ampliamente utilizados en la agricultura y a nivel hogareño.

Los compuestos azufrados también suelen tener efecto insecticida. Entre las especies ensayadas se encuentran los extractos de *Allium*, que contienen

tiosulfatos, el arbusto *Boscia senegalensis* (*Capparidaceae*) cuyas hojas liberan isotiocianato de metilo. Estas moléculas han sido probadas como fumigantes en sistemas de almacenamiento de granos (Regnault *et al.*, 2004) a pesar de ello no se conoce con certeza su modo de acción. Algunos estudios han comprobado que actuarían a nivel del sistema nervioso, ya sea inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa o influyendo en los canales de potasio.

Los nematodos fitopatógenos ocasionan graves problemas en la agricultura a nivel mundial motivo por el cual se realizan numerosos estudios para su control. A gran escala se utilizan variedades resistentes, enmiendas orgánicas<sup>3</sup>, cultivos intercalares, rotaciones de cultivos con el objetivo de rebajar el potencial de infección del suelo. Entre las plantas utilizadas con estos fines se encuentran algunas variedades de mostaza blanca (*Sinapis alba* cv. Emergo) y rábano (*Raphanus sativus*) utilizados como abono verde. Distintas variedades de tagetes (*Tagetes patula* y *T. erecta*) son conocidas como eficaces nematicidas utilizadas como cultivos intercalares y como enmiendas. También se han probado el ricino (*Ricinus communis*), la albahaca (*Ocimum basilicum*), el Nim (*Azadirachta indica*), entre otras.

Los avances en el área de la química, fitoquímica y genética permitirán el aprovechamiento de las sustancias semioquímicas<sup>4</sup> en el manejo sustentable de la agricultura.

## Notas

<sup>1</sup> Rizósfera: volumen de suelo adyacente a las raíces en el que existen una amplia gama de sustancias exudadas al suelo que favorecen la actividad microbiana. Normalmente ocupa entre unos cuantos milímetros o algunos centímetros a partir de la raíz.

<sup>2</sup> Xenobióticos: compuestos químicos sintetizados por el hombre, ajenos o extraños a los organismos vivos. Su producción se ha incrementado en los últimos años y, dado que sus estructuras químicas no son reconocidas por las enzimas degradativas existentes, muchos se convierten en contaminantes que alcanzan niveles ambientales sumamente elevados.

<sup>3</sup> Enmienda orgánica: productos naturales aportados al suelo para mejorar las propiedades físico-químicas, que liberan nitrógeno y otros minerales que las plantas pueden utilizar.

<sup>4</sup> Semioquímicos: Los semioquímicos (del griego *semeon*, una señal) son productos químicos que sirven de intermediarios en las interacciones entre organismos.

## Bibliografía

- Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. (2005). "Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi". *Nature* 435:824-827.
- Albo, G.; Henning, C.; Ringuélet, J.; Reynaldi, F.; De Giusti, M.; Alippi, A. (2003). "Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees". *Apidologie* 34, 417-427.
- Albo, G.; Henning, C.; Reynaldi, F.; Ringuélet, J.; Cerimele, E. (2010). "Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L.". *REDVET. Revista electrónica de veterinaria*. 11(10).
- Alippi, A.; Ringuélet, J.; Cerimele, E.; Ré, M.S.; Henning, C. (1996). "Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease". *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 4 (2), 9-16.
- Attaran, E.; Zeier, T.E.; Griebel, T.; Zeier J. (2009). "Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*". *The Plant Cell*. 21: 954-971.
- Azcón, R. (2000). "Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola". In: *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-Prensa, Mexico. 15 pp.
- Azcon Bieto, J.; Talon, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: Interamericana.

- Bago, B.; Pfeffer, E.; Shachar-Hill, Y. (2000). "Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas". *Plant Physiology*. 124: 949-958.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). "Biological effects of Essentials oils – A review". *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Bonfante, P.; Genre, A.; Faccio, A.; Martini, I.; Schauser, L.; Stougaard, J.; Webb, J.; Parniske, M. (2000). "The *Lotus japonicus* LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells". *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 1109-1120.
- Boué, S.M.; Wiese, T.E.; Nehls, S.; Burow, M.E.; Elliott, S.; Wientjes, CH.; Shih, B.Y.; McLachlan, J.A.; Cleveland, T.E. (2003). "Evaluation of estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8): 2193-2199.
- Bryant, J.P.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P. (1992). "Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals". *J. Range Manage* 45: 18-24.
- Céspedes, C.; Alarcón, J. (2011). "Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de *Celastraceae*, *Rhamnaceae* y *Scrophulariaceae*". *BLACMA* 10 (3), 175-181.
- Collinge, D.B.; Gregersen, P.; Thordal-Christensen, H. (1994). "The induction of gene expression in response to pathogenic microbes". In *Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p 391-433.
- Cruickshank, I.A.M.; Perrin, D.R. (1960). "Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L.". *Nature*. 187: 799-800.
- Davies, F.; Calderón, C.; Huaman, Z. (2005). "Influence of flavonoid (Formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru". *Scientia Horticulturae*, 106 (3): 318-329.
- De la Vega, R.; Gutiérrez, M.; Sanz, P.C.; Calvo, R.; Robredo, L.; De la Cuadra, C.; Muzquiz, M. 1996. "Bactericide like effect of *Lupinus* alkaloids". *Industrial Crops and Products*. 5: 141-148.

- Duke, S.O.; Scheffler, B.E.; Dayan, F.E.; Weston, L.A.; Ota, E. (2001). "Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops". *Weed Technol.* 15: 826–834.
- Duncan, A.J.; J.A. Milne. (1989). "Glucosinolates". In: Association of Applied Biologists (Ed.) *Aspects of Applied Biology 19. Antinutritional factors, potentially toxic substances in plants*. Institute of Horticultural Research, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, U.K. pp. 75-92.
- Einhellig, F. A. (1995). "Mechanism of action of allelchemicals in allelopathy". In *Allelopathy: Organisms Processes, and Application*. Inderjit, Dakshini, K.M.M., and Einhellig, F. A. Eds., ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington, D.C. p: 96-116.
- Espinosa-García, F.J.; Langenheim, J.H. (1991). "Effects of some essential oil phenotypes in coastal redwood on the growth of several fungi with endophytic stages". *Biochemical Systematics and Ecology*. 19: 629-642.
- Garcia-Mateos, R.; Pérez-Leal, P. (2003). "Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas". *Revista Chapingo*. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Universidad Autónoma Chapingo. Mexico. 9: 5-10.
- Genre, A.; Chabaud, M.; Timmers, T.; Bonfante, P.; Barker, D. (2005). "Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *M. truncatula* root epidermal cells before infection". *Plant cell*. 17: 3489-3499.
- Gilchrist, D.G. (1998). "Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide". *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.
- Grayer, R.J.; Harborne, J.B. (1994). "A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993". *Phytochemistry* 37: 19-42.
- Guerra Sierra, B.E. (2008). "Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible". *Tecnología en marcha*. 21:191-201.
- Hammerschmidt, R. (1999). "Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens". *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84
- Harborne, J.B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry (Fourth Edition)*. Academic Press, London. 318 pp.

- IAS (Internacional Allelopathy Society). First World Congress on Allelopathy: A science for the future. Cádiz, Spain, 1996.
- Ibrahim, J.; Zaki, Z.M. (1998). "Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malasyan Plants". *ASEAN. Rev. Biod. Environ. Conserv. (ARBEC)*. 6: 1-7.
- Isman, M. B.; Miresmaillí, S.; Machial, C. (2011). "Comercial opportunities for pesticidas based on plant Essentials oils in agriculture, industry and consumer products". *Phytochem Rev.* 10: 197-204.
- Jaensen, T.; Palsson, K.; Borg-Karlson, A. (2006). "Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau". *J. Med. Entomol.* 43: 113-119.
- Leicach, S.R. (2006). "*Alelopatía: interacciones químicas en la comunidad y defensa de plantas*". 1.<sup>a</sup> ed. Bs. As. Eudeba. 208 pp.
- Mandal, S.M.; Chakraborty, D.; Dey, S. 2010. "Phenolic acid act as signaling in plant-microbe symbioses". *Plant Signal Behav.* 5(4): 359-368.
- Mandelbaum, C.I.; Piche, Y. (2000). "The role of root exudates in arbuscular mycorrhiza initiation". *Mycorrhizal Biology*. p 153-172.
- Mansfield, J.W. (1983). "Antimicrobial compounds". In: Callow (ed.). *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley and sons: N. Y. USA p 237-263.
- Mareggiani, G.; Leicach, S.; Laner, P. (1998). "Toxicidad de extractos que contienen metabolitos secundarios de distintos órganos de *Melia azedarach* al nematodo del nudo de la raíz". *Rev. Asoc. Latinoam. Fitopat.* 33 (2):122-126.
- Mareggiani, G.; Picollo, M.I.; Zerba, E.; Burton, G.; Tettamanzi, M.C.; Benedetti-Doctorovich, M.O.V.; Veleiro, A.S. (2000). "Antifeedant activity of withanolides from *Salpichroa origiganifolia* on *Musca domestica*". *Journal Nat.Prod.* 6 3(8): 1113-1116.
- Matsumura, F. (1975). "Botanical insecticides". In F. Matsumura. (ed.). *Toxicology of insecticides*. Plenum Press, New York. p 94-98.
- Mauch-Mani, B.; Métraux, J.P. (1998). "Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack". *Ann. Bot.* 82: 535-540.
- Molisch, H., Der (1937). "*Einfluss eine Pflanze auf die andere: Allelopathie*". Jena: Gustav Fischer, 106 pp.

- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2002) "*Microbiología e bioquímica do solo*". Lavras: Universidade Federal de Lavras, 625 pp.
- Muller, K. O.; Borger, H. (1941). Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*- Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biolog. Anstalt.* (Reichsanst) Berlin. 23: 189- 231 pp.
- Muller, C.H. (1969). "Allelopathy as a factor in ecological process". *Vegetatio* 18: 348-357.
- Ocampo Sanchez, R.; R. Díaz Rojas. (2006). "*Cultivo, conservación e industrialización del Hombre Grande (Quassia amara)*". San José de Costa Rica: Ed. Bougainvillea S.A.
- Ordeñana, K. M. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas.* Costa Rica. 63: 22-32.
- Padín, S.; Ringuelet, J.; Dal Bello, G.; Cerimele, E.; Ré, M. S.; Henning, C. (2000). "Effect of essential oils on mortality and repellence of stored-grain insects." *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.* 7 (4): 67-73.
- Padín, S.; Kahan, A.; Ricci, M.; Ringuelet, J.; Henning, C.; Catalano, P.; Sceglío, P. (2006). "Actividad biológica del aceite esencial de *Laurus nobilis* L. sobre *Myzus persicae* Sulz. (Hemíptera: *Aphididae*) en repollo". En Resúmenes de las XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, (pp. 413). Catamarca: Gobierno de Catamarca.
- Park, B.; Choi, W.; Kim, J.; Lee, S. (2005). "Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents". *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 21: 80-83.
- Paxton, J.D. (1981). "Phytoalexins: a working redefinition". *Phytopathology* Z.101:106-109.
- Pesce, G. (2006). "Estudio de *Lippia alba* como especie aromática". *Trabajo Final de carrera.* Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.
- Pieterse, C.M.; van Loon, L.C. (1999). "Salicylic acid-independent plant defence pathways". *Trends Plant Sci.* 4(2): 52-58.
- Popoff, O. (2008). *Beinofungi: Micorrizas*. En línea: <<http://www.fai.unnc.edu.ar>>.

- Powell, K. A.; Beardsom, A. J.; Naylor, T. W.; Corcoran, E. G. (1983). "The microbial treatment of cyanide waste". *I. Chem. E. Symposium Series N.º 77*: 305-313.
- Ramírez Gómez, M., Rodríguez, Alia. 2012. "Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 271-284.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekblom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B.; Meijer, J. (2000). "Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae". *Plant Mol. Biol.* 42: 93-113.
- Regnault-Roger, C.; Philogène, B.; Vincent, C. (2004). *Biopesticidas de origen vegetal*. 1ra ed., Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España, pp. 305-316.
- Requena, N.; Mann, P.; Hampp, R.; Franken, P. (2002). "Early Developmentally Regulated Genes in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*: Identification of GmGin1 a Novel Gene with Homology to the C-terminus of Metazoan Hedgehog Proteins". *Plant soil* 244: 129-139.
- Rhoades, D. F. (1979). "Evolution of plant chemical defense against herbivores". In: Rosenthal G.A., Janzen D.H (eds). *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp. 3-54.
- Ricci, M.; Padín, S.; Henning, C.; Ringuelet, J.; Kahan, A. (2010). "Cineol para el manejo integrado de *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae* en repollo". *Bol. San. Veg. Plagas*, 36: 37-43.
- Rice, E.L. (1974). *Allelopathy*. Academic Press: New York, 353 pp.
- Ringuelet, J.; Henning, C.; Kahan, A.; Ricci, M.; Padín, S.; Catalano, P. (2005a). "Actividad tóxica del aceite esencial de "lemongrass" *Cymbopogon citratus* Stapf. sobre *Brevicoryne brassicae* L. y *Myzus persicae* Sulz. en plantas de repollo". En SFL (eds), Resúmenes de la V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, (pp 51). Montevideo: SFL.
- Ringuelet, J.; Cicció, J.; Ocampo, R.; Henning, C.; Padín, S.; Cerimele, E.; Urrutia, M. (2005b). "Repelencia y mortalidad de la esencia de *Lippia alba* sobre *Tribolium castaneum*". En SFL (eds), Resúmenes de la V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, (pp 50). Montevideo: SFL.

- Ringuelet, J.; Urrutia, M. I.; Henning, C. (2010). "Biological activity of essential oils on *Bemisia tabaci*". En ALAEQ (eds.), Abstracts of 1<sup>st</sup>. Latin American Meeting of Chemical Ecology. (pp 147). Colonia del Sacramento, Uruguay: ALAEQ.
- Ringuelet, J.; Artiñano, E. (2013). "Efectos de *Lippia alba* sobre mosca de los cuernos en un modelo de experimentación". En Echeverri, F.; Rossini, C. (eds.). *Productos naturales contra parásitos externos del ganado bovino y ovino, tales como mosca de los cuernos y garrapatas* (pp 136-144). Chile: Universidad de Magallanes.
- Rüdiger Hain. (1993). Patent. Inventores: Hain; Rudiger (Langenfeld, DE), Reif; Hans-Jorg (Colonia, DE), Stenzel; Klaus (Duesseldorf, DE) APPL. N°: 08/127,097. Archivado: 24 De septiembre de 1993.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H-Y; Hunt, M.D. (1996). "Systemic acquired resistance". *The Plant Cell* 8: 1009-1819.
- Ryder, T. B.; Hedrick, S. A.; Bell, J. N.; Liang, X.; Clouse, S.D.; Lamb, C. J. (1987). "Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme CHS in *Phaseolus vulgaris*". *Mol. Gen. Genet.* 210: 219-233.
- Scervino J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassells, R.; Vierheling, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. (2005). "Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit a different effect on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover". *J. Plant Interact.* 15: 22-30.
- Senanayake, U. M.; Lee T. H.; Wills R. B. H. (1978). "Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils". *J. Agric. Food Chem.* 26: 822-824.
- Senevivatne, G.I.; Harbone, J.B. (1992). "Constitutive flavonoids and induced isoflavonoids as taxonomic markers in the genus *Vigna*". *Biochemical Systematics and Ecology.* 20: 459-467.
- Smith, S. D.; Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis.* (ed 3). Academic Press.

- Smith, S. E.; Gianinazzi-Pearson, V. (1988). "Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhiza plants". *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Sosa, M. E.; Tonn, C. E.; Guerreiro, E.; Giordano, O. S. 1995. "Toxicidad de lactonas sesquiterpénicas sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)". *Revista Soc. Entom. Arg.* 54: 83-88.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5<sup>th</sup> ed). Sunderland, USA. Sinauer Associates.
- Tripathi, A.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P. (2009). "A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management". *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5): 52-63.
- van Etten H. D; Mantthews, D. E.; Mantthews, P.S. (1989). "Phytoalexins Detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications". *Annual Review Phytopathology.* 27: 143-164.
- van Etten H. D.; Sandrock, R. W.; Wasman, C. C.; Sorby, S. D.; Mc Cluskey, K.; Wang, P. (1995). "Detoxification of phytoanticipins and phytoalexin by phytopathogenic fungi". *Canadian J. Bot.* 73: 518-525.
- van Loon, L. C.; van Kammen, R. T. (1970). "Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun NN'. Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus". *Virology* 40: 199-211.
- Yang, Y.; Lee, H.; Lee, D.; Ahn, Y. (2004). "Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*". *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 20: 146-149.

## LOS AUTORES

**Jorge A. Ringuelet.** Ingeniero agrónomo por la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (FCAyF, UNLP, año 1973). Profesor titular ordinario del Curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica y Forestal, UNLP. Docente-investigador en el área de Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAyF.

**Sonia Z. Viña.** Ingeniera agrónoma (FCAyF, UNLP, año 1992). Doctora por la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (año 2004). Profesora adjunta ordinaria del curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica e Ingeniería Forestal, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAyF-UNLP. Miembro de la Carrera de Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet), Cidca (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos-UNLP-Conicet La Plata). Áreas de investigación: tecnología de alimentos, biología y tecnología poscosecha de frutas y hortalizas.

**María Cecilia Arango.** Ingeniera agrónoma (FCAyF, UNLP, año 1986). Jefa de trabajos prácticos ordinaria del curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica y Forestal, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAyF, en el área de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Alumna de la Maestría en Protección Vegetal, FCAyF, UNLP.

**Cynthia Patricia Henning.** Ingeniera agrónoma (FCAyF, UNLP, año 1981). Jefa de trabajos prácticos ordinaria del curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica y Forestal, UNLP. Docente-investigadora

del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAYF, en el área Plantas Aromáticas y Aceites esenciales.

**Roxana Mariel Yordaz.** Ingeniera agrónoma (FCAYF, UNLP, año 1990). Ayudante diplomada ordinaria del Curso Bioquímica y Fitoquímica de las carreras de Ingeniería Agronómica y Forestal, UNLP. Docente-investigadora del Departamento de Ciencias Exactas de la FCAYF en el área Plantas Aromáticas. Docente preuniversitaria. Docente universitaria autorizada.