

Identificación de un compuesto alelopático de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) y su efecto en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae)

Ada Cazón¹, Marta de Viana² y José C. Gianello³
Cátedras de Química Orgánica¹ y de Ecología².

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires 177, 4400, Salta, Argentina.

³ Depto Química Orgánica, Universidad Nacional de San Luis. Pedernera y Chacabuco, 5700; San Luis, Argentina.
Fax (54-0387) 4255455; cazon@ciunsa.edu.ar.

Recibido 31-V-1999. Corregido 15-X-1999. Aceptado 21-X-1999.

Abstract: The genus *Baccharis* has a wide distribution in Northwestern arid regions of Argentina. Studies carried out on the spatial distribution of *T. pasacana* in relation to the available space, show that although beneath *B. boliviensis* canopy, cacti seeds are abundant, no adult plants are found growing in association to that species in spite of the requirement of a nurse plant for a successful cacti establishment. Hexane, chloroform and ethyl acetate extracts from *B. boliviensis* foliage inhibited *T. pasacana* germination completely. The bioassays were carried out in a germination chamber following a random design, with four replicates by treatment. The chloroform extract was the most effective solvent for extracting the phytotoxic material from the aqueous extracts. The ferulic acid structure was determined by ¹³C NMR, ¹H NMR spectra and TLC on silica gel.

Key words: allelochemicals, ferulic acid, *Baccharis boliviensis*, *Trichocereus pasacana*, germination.

Estudios realizados sobre la distribución espacial de *Trichocereus pasacana*, (Cactaceae; cardón) en relación con las especies arbustivas y con el banco de semillas, indican la existencia de un patrón diferencial en la abundancia de las semillas y de las plantas adultas. Esta cactácea columnar necesita de una relación de facilitación para el éxito en la germinación y establecimiento provisto por la copa de algunas especies como *Larrea divaricata*, *Aphyllocladus spartioides* y *Prosopis ferox*. Sin embargo, existen otras especies arbustivas como *Baccharis boliviensis*, *Plectrocarpa rousesii*, *Verbena* sp. y *Senna crassiramea*, entre otras, bajo cuyas copas se han detectado semillas de cardón, a pesar de que su abundancia como renuevos o adultos, sea muy ba-

ja. Además, en experimentos de germinación de semillas de cardón en suelo extraído bajo la copa de varias especies, el porcentaje de germinación fue menor en el suelo proveniente de *Baccharis boliviensis*, lo que podría sugerir un posible efecto alelopático (de Viana 1995, 1996-7, 1999).

Muchas plantas producen metabolitos secundarios que influyen en los procesos de germinación y crecimiento (Heisey 1990). Se ha sugerido que la alelopatía es un factor importante en la regulación de la estructura de las comunidades vegetales y de la velocidad de crecimiento de las plantas en campo (Wardle *et al.* 1996). Esta función alelopática ha sido atribuida a varios flavonoides, estructuras fenólicas y terpenoides (Withaker & Feeny 1971).

El género *Baccharis* (Asteraceae), consiste de aproximadamente 400 especies principalmente de origen americano. En el Noroeste Argentino, *B. boliviensis* presenta una amplia distribución en las Provincias fitogeográficas del Monte, Puna y Prepuna (Cabrera 1976). Se han realizado numerosos estudios acerca de la composición química de distintas especies del género (Bohlmann *et al.* 1985, Gianello & Giordano 1984, Hudson & Stiling 1997, Jarvis *et al.* 1991) revelando la presencia de numerosos metabolitos secundarios como diterpenoides y flavonoides. En el caso de *B. boliviensis*, se han informado ent-clerodanos y diterpenos (Zdero *et al.* 1989).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de diferentes extractos de *B. boliviensis* en la germinación de *T. pasacana*. Este estudio forma parte de un proyecto mayor, que incluye completar la separación, identificación y efecto inhibitor de los metabolitos presentes en todas las fracciones del extracto clorofórmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con la parte aérea (tallos, hojas y capítulos) de *B. boliviensis*, recolectada en el Parque Nacional Los Cardones (65° 51' - 66° 05' W, 25° 03' - 25° 23' S) en junio de 1997. El material vegetal (375 gr), se secó al aire, se molió y se le adicionó 3 l de agua destilada, dejándolo 12 h en reposo. Luego se agregaron 750 ml de agua destilada y 1875 ml de alcohol metílico (volúmenes suficientes para alcanzar una relación final 1:5:10, gr de tejido vegetal: metanol: agua), y se dejó en maceración a temperatura ambiente durante 48hs. Posteriormente se filtró y la solución hidroalcohólica se concentró en evaporador rotatorio al vacío para reducir el volumen inicial a aproximadamente 2 l.

Finalizada esta operación, el extracto acuoso se particionó repetidas veces con volúmenes suficientes de n-hexano, cloroformo y acetato de etilo, siguiendo un esquema modificado al propuesto por (Heisey 1996).

Cada uno de los extractos orgánicos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y concen-

trados a presión reducida. Paralelamente, cada uno de los extractos obtenidos fue analizado por cromatografía en capa fina (TLC), sobre gel de sílice, desarrollando la misma en los sistemas benceno: dioxano: ácido acético (90:25:4). El revelado de las cromatoplasmas se realizó con solución acuosa de permanganato de potasio concentrado y posterior lavado con agua para eliminar el exceso de agente oxidante. El cloroformo resultó ser el solvente de extracción más eficiente de los compuestos fitotóxicos, ya que las placas presentaron mayor cantidad de bandas.

El efecto de los distintos extractos orgánicos en la germinación de las semillas de *T. pasacana* se realizó con un bioensayo en cámara de cultivo con luz continua, a 25-28 °C de temperatura, siguiendo un diseño completamente al azar, con cuatro réplicas de 10 semillas por tratamiento, que fueron colocadas en cajas de petri de 3 cm de diámetro sobre papel de filtro (Watman #1) embebido en 0.2 ml de los extractos correspondientes. Los controles se prepararon embebiendo los papeles de filtro con los solventes puros (con el objeto de descartar posibles efectos inhibidores) y con agua destilada. Todos los papeles de filtro ya secos, se humedecieron y regaron posteriormente dos veces al día con 1 ml de agua destilada. Diariamente se registró la germinación de las semillas y a los 30 días, las plántulas se pesaron.

El extracto clorofórmico (9gr), por ser el que presentó mayor cantidad de metabolitos, se retomó con 300 ml de metanol caliente hasta disolución total y se absorbió sobre 20 gr de gel de sílice, eliminando posteriormente el solvente. El extracto absorbido se separó por cromatografía en columna sobre 100 gr de gel de sílice 60G (Merk, 70-230 mesh), recolectando fracciones de 100 ml cada una. Como eluyente se usaron mezclas de solventes constituidos por n-hexano, n-hexano: acetato de etilo y acetato de etilo.

Cada una de las fracciones obtenidas fue analizada en capa fina sobre gel de sílice, desarrollando la misma en el sistema benceno: dioxano: ácido acético (90:25:4). El revelado se realizó con solución alcohólica de bromofenol para detectar la presencia de ácidos. Resultaron de interés el grupo de fracciones 41-43, eluidas

con n-hexano:acetato de etilo (10%), que presentaron abundante material sólido de color blanco insoluble en metanol. La cromatografía en capa fina sobre gel de sílice mostró un único componente cuya naturaleza acídica fue inferida por su comportamiento frente al revelador azul de bromofenol. Estas fracciones fueron usadas para identificar el posible compuesto fitotóxico. Su identificación se basó en espectros ^1H RMN, ^{13}C RMN y TLC sobre gel de sílice. El espectro ^1H RMN fue corrido en CDCl_3 a 200 MHz con un espectrómetro Bruker A C - 200. El resto de las fracciones obtenidas presentaron residuos sólidos que por cromatografía en capa fina resultaron ser mezclas difíciles de separar y se reservan para ser recromatografiadas posteriormente. Los espectros y la cromatografía en capa fina de las fracciones 41-43, fueron comparados con una muestra estándar del compuesto.

RESULTADOS

En ninguno de los extractos probados (cloroformo, n-hexano, y acetato de etilo) se registró germinación de las semillas, mientras que en los controles (agua destilada y cada uno de los solventes), el porcentaje de germinación varió entre un 5 y un 20%. No se detectaron diferencias significativas en el peso de plántulas entre los distintos controles (Kruskal Wallis = 11, $P = 0.08$; gl 6), por lo que puede descartarse cualquier efecto inhibitor de los solventes empleados. En las cajas con los extractos de n-hexano se registró crecimiento de hongos, no así en el solvente control.

El espectro UV-Visible en metanol del metabolito presente en las fracciones 41-43 aisladas del extracto cloroformico, mostró las absorciones características para un cromóforo tipo cinaomilo con máximos a 211,5 y 320,5 nm. El espectro ^1H -RMN (CDCl_3), mostró los siguientes corrimientos (expresados en ppm a partir de TMS y los valores de las constantes de acoplamiento en Hz): H_β 7.8(d,18), H_α 6.2(d,18), H_2 7.1(d,3), H_6 7.0(dd,3-9), H_5 6.8(d,9) y $-\text{OCH}_3$ 3.8(s,3H). El espectro ^{13}C -RMN (CDCl_3), mos-

tró los siguientes corrimientos: C_1 168.3, C_2 147.4, C_3 , 145.5, C_6 144.7, C_4 126.2, C_9 121.6, C_2 114.9, C_8/C_5 113.6 y C_{10} 51.2.

Estos datos permitieron identificar a uno de los posibles compuestos fitotóxicos como ácido ferrúlico, presente en el extracto cloroformico, lo que se determinó por TLC corrido contra estándar de ese compuesto. Asimismo, los datos obtenidos del ^{13}C -RMN están de acuerdo con la estructura asignada y fueron coincidentes con el obtenido a partir del compuesto estándar.

CUADRO 1

Datos de ^1H RMN del compuesto fitotóxico

H_β	7.8 (d, 18)
H_α	6.2 (d, 18)
H_2	7.1 (d, 3)
H_6	7 (dd, 3-9)
H_5	6.8 (d, 9)
	5.8 (s, 3H)

En CDCl_3 , ppm a partir de TMS. (J valores en Hz)

CUADRO 2

Datos de ^{13}C RMN del compuesto fitotóxico

C_1	168.3
C_7	147.4
C_3	145.5
C_6	144.7
C_4	126.2
C_9	121.6
C_2	114.9
C_8/C_5	113.6
C_{10}	51.2

En CDCl_3 , ppm a partir de TMS

DISCUSIÓN

Los resultados del bioensayo nos permiten concluir que todos los extractos probados presentan un efecto aleopático, inhibitor de la germinación de *T. pasacana*. El ácido ferrúlico determinado en el extracto cloroformico, es un precursor de derivados fenólicos, presente en las paredes celulares (Turner *et al.* 1993) y es

uno de los metabolitos responsables de la inhibición de la germinación de *T. pasacana* en laboratorio lo que podría explicar la ausencia de esta especie en asociación con *B. boliviensis*, a pesar de la abundancia de semillas presentes bajo su copa (de Viana 1996-7, 1999).

El espectro de $^1\text{-H}$ -RMN en deuterocloroformo mostró dos dobletes centrados a 6.20 y 7.6 ppm que integran cada uno para un protón y fueron asignados a un sistema olefínico conjugado. El valor de la constante de acoplamiento $J=18$ Hz correspondió con el esperado para un doble enlace con un ordenamiento *trans*-disustituido de sus hidrógenos. En la zona aromática, una señal como doblete a 6.8 ppm que integra para un protón correspondió con una de las ramas de un sistema AB con un acoplamiento orto de dos protones, como lo demuestra el valor de la constante de acoplamiento $J=9$ Hz. La señal como doblete del otro protón del sistema a 7.0 ppm, claramente desprotegida por el sistema conjugado, apareció acoplada con la correspondiente a la del protón aromático restante. Finalmente la señal como doblete a 7.1 ppm con un débil acoplamiento meta de aproximadamente $J=3$ Hz fue consistente con el hidrógeno de C-6. La señal aguda a 3.8 ppm que integró para tres hidrógenos, es característica del grupo metoxilo sobre carbono C-3.

RESUMEN

El género *Baccharis* presenta una amplia distribución en regiones áridas del noroeste Argentino. Estudios realizados sobre la distribución espacial de *T. pasacana* con relación al espacio disponible, mostraron que a pesar de que las semillas del cardón son abundantes bajo la copa de *B. boliviensis*, no se detectan plantas de cardón creciendo en asociación, a pesar del requerimiento de plantas nodrizas para un establecimiento exitoso del cardón. Extractos acuosos del follaje de *B. boliviensis* particionado en hexano, cloroformo y acetato de etilo, inhibieron la germinación de *T. pasacana*. El cloroformo fue el solvente más efectivo para la extracción del material fitotóxico. La estructura del ácido ferrúlico fue determinada por métodos espectroscópicos y TLC sobre gel de sílice.

REFERENCIAS

- Bohlmann, F., S. Banerjee, J. Jakupovic, M. Grenz, L. Misra, G. Schmeda-Hirschmann, R. King & H. Robinson. 1985. Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 24: 511-515.
- Cabrera, A.L. 1976. Las regiones fitogeográficas Argentinas. *Enciclopedia de Agricultura y Jardinería*. Acmé, Buenos Aires, 1-85.
- de Viana, M.L. 1995. Distribución del cardón (*Trichocereus pasacana*): ¿Asociación positiva o dispersión? Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, 76p. Córdoba, Argentina.
- de Viana, M.L. 1996-7. Distribución del cardón en relación al espacio disponible y al banco de semillas. *Rev. Biol. Trop.* 44-45: 95-103.
- de Viana, M.L. 1999. Seed Production and seed bank of *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) in northwestern Argentina. *Trop. Ecol.* (en prensa).
- Gianello, J.C. & O.S. Giordano. 1984. Examen químico en seis especies del género *Baccharis*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 15: 84-86.
- Heisey R.M. 1990. Allelopathic and herbicidal effects of extracts from tree of heaven (*Ailanthus Altissima*). *Amer. J. Bot.* 77: 662-670.
- Heisey, R.M. 1996. Identification of an allelopathic compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and characterization of its herbicidal activity. *Amer. J. Bot.* 83: 192-200.
- Hudson, E.E. & P. Stiling. 1997. Exploitative competition strongly affects the herbivorous insect community on *Baccharis halimifolia*. *OIKOS* 79: 521-528.
- Jarvis, B.B., N. Mokhtari-Rejali, E.P. Schenkel, C.S. Barros & N.I. Matzenbacher. 1991. Trichothecene mycotoxins from brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 30: 789-797.
- Turner, L.B., I. Mueller-Harvey & A.B. McAllan. 1993. Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry*, 33: 791-796.
- Wardle, D.A., K.S. Nicholson & A. Rahman. 1996. Use of a comparative approach to identify allelopathic potential and relationship between allelopathy bioassays and competition experiments for ten grassland and plant species. *J. Chem. Ecol.* 22: 933-948.

Withaker, R.H. & P.P. Feeny. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770.

tuents from bolivian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 28: 531-542.

Zdero, C., F. Bohlmann, J.C. Solomon, R.M. King & H. Robinson. 1989. Ent-clerodanes and other consti-