

COMUNICACION CORTA

Una benzoquinona natural aislada de la secreción defensiva de un milípedo cubano endémico, *Rhinocricus duvernoyi* Karsch, del Valle de Yumurí

Juan Enrique Tacoronte Morales,* Tamara Chervas, Dania Prieto Trueba, Carlos Rodríguez Aragonés, Magaly Díaz Aspiazú y Vivian González Cairo.

Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y Calle G, El Vedado, Plaza de la Revolución, Código Postal 10400, Ciudad de La Habana. Lab. de Fauna Edáfica, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, El Vedado, Plaza de la Revolución, Código Postal 10400, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de febrero de 2003. Aceptado: 8 de septiembre de 2003.

Palabras clave: benzoquinonas, ecología química, secreciones defensivas, diplópodos, *Rhinocricus duvernoyi*.
Key words: benzoquinone, chemical ecology, defensive secretions, Diplopoda, *Rhinocricus duvernoyi*.

Los milípedos, artrópodos terrestres, pertenecientes a la clase Diplopoda, son un grupo de invertebrados muy antiguos que comprende unas 11 000 especies^{1,2} distribuidas en todas las zonas ecogeográficas del planeta. Las especies que habitan en la zona neotropical se caracterizan por su gran tamaño y poca conocida ecología química en comparación con el gran número de publicaciones en este campo para la clase Insecta y Arachnida.³ Estos invertebrados se caracterizan por una gran diversidad. Existen especies estratobióticas, edafobiontes y epifitobiontes cuya participación resulta importante en la formación, biodegradación y evolución orgánica de los suelos. Las secreciones defensivas de los milípedos, secretadas en glándulas especializadas, que se localizan en los segmentos del cuerpo y cuya composición varía según la familia y la especie del milípedo, constituyen una extraordinaria fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos,⁴ cuyo estudio y valoración ecoquimiotaaxonómica pueden facilitar la compleja tarea de identificación de las especies en sus hábitat y comprender el mecanismo de relaciones químico-conductuales interespecies en la fauna edáfica.^{7,8}

Este trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la secreción defensiva del milípedo endémico cubano *Rhinocricus duvernoyi* Karsch 1881 (Diplopoda, orden Spirobolida, fam. Rhinocricidae), que habita en la zona occidental del archipiélago cubano, (Pinar del Río-Matanzas) entre la hojarasca de bosques semidecuidos asociados a relieve cárstico.⁹

En la hojarasca de esos bosques predominan algunas especies botánicas como: *Nestandra coriacea*; *Bursera simaruba*; *Zuelania guidonia* y *Roystonea regia*. El referido milípedo es una de las especies de mayor tamaño en la fauna edáfica de Cuba y puede alcanzar de 13 a 18 cm de longitud y un diámetro de 1,4 cm y un peso promedio de 20 a 28 g. El número de segmentos varía desde 47 a 51.

Durante los meses de mayo a julio, se observan grandes aglomeraciones de esta singular especie, que por su gran sensibilidad a la humedad ambiental, tiende a enterrarse cuando sus valores resultan inferiores al 11 %. Un dato interesante para esta especie es la ausencia de depredadores en su hábitat, solo algunos ácaros que se localizan en la superficie de su cuerpo.

Individuos adultos fueron colectados en el Valle de Yumurí, Matanzas

y mantenidos en condiciones estándar de laboratorio (Chervas T., et al., Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2000-2002.). Para obtener la secreción defensiva, (eyectada por los ozóporos localizados en la parte dorso-lateral del cuerpo) y de coloración rojo-marrón intenso, con efecto irritante en epidermis y de penetrante olor "fenólico", los individuos son estimulados mediante presión. La secreción obtenida (650-800 µg/individuo) se absorbe sobre papel de filtro Whatman 40 y es refrigerada a -10°C. En condiciones naturales la secreción defensiva puede alcanzar hasta 30 cm.

El papel de filtro se extrae con éter dietílico frío (5 X 2 mL) y los extractos etéreos son concentrados con flujo de nitrógeno y utilizados para los análisis posteriores con o sin previa dilución en éter dietílico o n-hexano.

El estudio analítico inicial de esta secreción con la prueba de rodanina en amoníaco acuoso¹⁰ sugirió la existencia de p-quinonas, que fue corroborado al observarse una coloración azul violácea al tratar la disolución etérea de la secreción defensiva con cianoacetato de etilo-amoníaco.¹¹ Las p-quinonas di, tri y tetra-alquil, o alquilmetoxi-sustituidas han sido reportadas previa-

* Dirección actual: Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas, Ministerio de la Industria Básica, Vía Blanca entre Infanta y Palatino, Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba. correo electrónico: jetacoronte@yahoo.com

mente como sustancias defensivas en otras especies de diplópodos¹²⁻¹⁴ que ocasionan severos efectos alérgicos y residuales sobre las mucosas oculares y epidermis, así como efecto microbiocida. Estos resultados orientaron el estudio hacia el aislamiento e identificación de estos derivados en las secreciones defensivas de *Rhinocricus duvernoyi*.

La disolución etérea (10 mL) se percola por una columna de fosfato de calcio (CaHPO₄ con 2 % de AgNO₃) de 25 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro, utilizando como disolvente una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (85 : 15, v/v)(100 mL).

Los eluatos obtenidos, (110 mL) son concentrados a presión reducida y analizados mediante cromatografía de placa delgada (gel de sílice sobre poliéster con detector UV, Aldrich-USA, 5X5 cm, tiempo de corrida 15 min) revelaron la existencia de un compuesto con Rf 0,5, utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo 50 : 50 (v/v) y agente cromogénico amoníaco. Un segundo análisis, empleando cromatoplasmas de gel de sílice G impregnadas con una disolución acuosa 3 % de ácido oxálico y corriendo con benceno-acetato de etilo [10 : 2 (v/v)], reveló el mismo resultado: Rf 0,47. El residuo aceitoso obtenido, de color marrón, es sometido a análisis espectrofotométrico. El estudio del espectro FTIR (registrado en un espectrofotómetro Philips Analytical PU 9600 en el intervalo 450 a 4 500 cm⁻¹ en pastillas de KBr) evidencia la existencia de bandas intensas 1 665 a 1 590 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$ 1 654 y 1 665 cm⁻¹, $\nu_{C=C}$ 1 595 cm⁻¹) atribuibles a *p*-benzoquinonas sustituidas (1 654 cm⁻¹). En la zona 1 320 a 1 100 cm⁻¹ se observan bandas de intensidad media (1 315, 1 198 cm⁻¹) asignables a vibraciones de valencia y deformaciones en el grupo C-CO-C; en la región 1 200 a 1 020 se distingue una banda intensa en 1 103 cm⁻¹ que se atribuye a vibraciones de valencia asimétricas del grupo C-O-C típica para éteres, así como en 1 013 cm⁻¹ correspondiente a vibraciones de valencia simétricas de estos. Esta consideración se corrobora por la presencia de bandas en 2 993 y 2 930 cm⁻¹ características para vibraciones asimétricas de valencia de OCH₃ y 1 474 cm⁻¹ atribuible a vibraciones de deformación asimétricas y simétricas de OCH₃. En 1 379 cm⁻¹, se observa una señal correspondiente a vibraciones deformacionales simétricas de -CH₃ (C-H), y en 2 949 cm⁻¹ asignables a vibraciones de valencia del grupo (CH₃-).

Estos datos sugieren la existencia de una *p*-benzoquinona disustituida.

Los espectros RMN-¹H y ¹³C (registrados en un espectrómetro Bruker ACF-250, utilizando como referencia interna TMS a 25 °C y disoluciones 0,3 mol/L en CDCl₃) corroboran la estructura propuesta como una *p*-benzoquinona 2,3-disustituida.

Para el derivado *p*-benzoquinona 2,3-disustituida, en el espectro RMN-¹H se observan cuatro señales bien diferenciadas, una señal simple a 1,87 ppm (3H) típico para grupos metilo CH₃ (en el entorno molecular olefina-oxo-sustitución); una señal simple en 3,92 ppm (3H) atribuible a O-CH₃; una señal en forma de doblete a 6,53 ppm (1H) y una señal en forma de doblete en 6,75 (1H) atribuible a un sistema olefínico dicarbonílico α,β conjugado, característico de benzoquinonas 2,3-disustituidas. El espectro RMN-¹³C muestra ocho señales entre 11,22 ppm y 188,34 ppm que corroboran la existencia del sistema cíclico dicarbonílico α,β -insaturado conjugado propuesto (Fig. 1): 188,34 ppm (C-1); 129,40 (C-2); 156,15 ppm (C-3); 175,52 ppm (C-4); 136,45 ppm (C-5); 137,85 ppm (C-6); 11,22 ppm (C-7); 59,48 ppm (C-8).

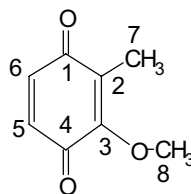


Fig. 1. Derivado aislado de la secreción defensiva: 2-metil-3-metoxi-*p*-benzoquinona.

El estudio preliminar de la secreción defensiva de *Rhinocricus duvernoyi* Krasch 1881, uno de los milípedos más importantes de la fauna edáfica endémica de Cuba, revela, de manera explícita, que está constituida, mayoritariamente, por 2-metil-3-metoxi-*p*-benzoquinona, una benzoquinona descrita para especies de diplópodos del continente africano de los géneros *Metiche* y *Archispirostreptus*,¹⁵⁻¹⁷ lo que amplía el conocimiento sobre quimiotaxonomía y ecología química de estos invertebrados terrestres cubanos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la fundación brasileña para el fomento de la ciencia, FAPESP por haber posibilita-

do desarrollar los análisis cromatográficos y espectrofotométricos necesarios durante una estancia de trabajo de marzo a junio de 2002.

BIBLIOGRAFIA

- Richard Hoffman Ed. Soil Biology Guide. Chpt. 26, 835-859, 1993.
- Hoffman R, Golovatch S.I, Adis J., de Morais J.W. Practical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (*Myriapoda: Diplopoda*). **Amazonia**, **XIV**, 1-35, 1996.
- Hopkin S.P. & Read H.J. The biology of Millipedes. Oxford University, 1992.
- Eisner T. & Meinwald J. Defensive Secretions of Arthropods. **Science**, **153**, 1341-1350, 1966.
- Bettini S. Ed. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 48, Chapter 3, Springer-Verlag, 41-72, 1978.
- Huth A. Defensive secretion of millipedes: more than just a product of melting point decrease? **Fragmenta Faunistica**, (Warsawa) Suppl., **42**, 24, 1999.
- Williams L.D.A & Singh P.D.A. Biology and Biological Action of the Defensive Secretions from a Jamaican Millipede. **Naturwissenschaften**, **84**, 143-144, 1997.
- Deml R. & Huth A. Benzoquinones and Hydroquinones in Defensive Secretions of Tropical Millipedes. **Naturwissenschaften**, **87**, 80-82, 2000.
- González R. Estudio comparativo de la macrofauna de la hojarasca y del suelo de dos ecosistemas forestales de la Sierra del Rosario. **Ser. Zool.**, **2**, 1-15, 1986.
- Feigl F. Spots test in Organic Analysis, 7th ed., 332. Elsevier, New York, 1966.
- Legradi L. **Analyst**, **95**, 590-593, 1970.
- Eisner T, Meinwald J., Xu S., Attygalle A.B Defensive secretion of the millipede *Floridobulus penneri*. **J. Natural Products**, **56**, 1700-1706, 1993.
- Eisner T, et al. Defense Mechanism of arthropods. XVI. Para-benzoquinones in the secretion of spirostreptoid millipedes. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **58**, 247-248, 1965.
- Thomson R.H. Naturally Occurring Quinones III. Chapman & Hill. New York, 1987.
- Wood W.F., Shepherd J., Chong B., Meinwald J. Ubiquinone-O in defensive spray of African Millipede. **Nature**, **253**, 625-626, 1975.
- Watherston J., Percy J.E., in *Chemical Controlling Insect Behaviour* edited by Beroza M. Academic N.Y., 107-108, 1970.
- De Bernardi M., et al. Quinones in the defensive secretions of African millipedes. **Naturwissenschaften**, **69**, 601-602, 1982.