

# Primer reporte de 3,4-dimetoxifenol, en secreciones defensivas de milípedos endémicos cubanos (Spirobolida, Rhinocricidae, *Rhinocricus*). Caso de estudio *Rhinocricus duvernoyi* Karch 1881, población de La Palma

**Juan Antonio Mesa Díaz, Juan Enrique Tacoronte Morales, Rodny Montes de Oca Porto,\* Jorge Tobellas Sabater\*\* y Raine Garrido Arteaga.\*\*\***

Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas, Vía Blanca sin número entre Infanta y Palatino, Cerro, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: tony2@ciiq.minbas.cu. \*Laboratorio de Antidoping, Calle 100 y Perla, Boyeros, Ciudad de La Habana. \*\*Laboratorio MEDSOL (QUIMEFA), Playa, Ciudad de La Habana \*\*\*Centro de Estudio Antígenos Sintéticos, Facultad Química, Universidad de la Habana.

Recibido: 15 de mayo de 2008. Aceptado: 17 de noviembre de 2008.

Palabras clave: dimetoxifenol, secreción defensiva, milípedos, *Rhinocricus*.  
Key words: dimethoxyphenol, defensive secretion, millipedes, *Rhinocricus*.

Los milípedos (Artrópoda, Dipolopoda), son invertebrados terrestres muy antiguos que comprenden 14 000 especies distribuidas en todas las zonas geográficas del planeta.<sup>1,2</sup> Estos organismos frente a un ataque de depredadores responden eyectando una secreción repugnatorial de color marrón y olor fenólico de acción repelente que puede provocar serias irritaciones epidérmicas para el atacante; siendo en ocasiones víctimas de estos ataques el propio ser humano que invade el hábitat de estos invertebrados. La composición química de estas secreciones varía de acuerdo con el orden taxonómico. Las especies de los órdenes: Julida, Spirobolida y Spirostreptida secretan *p*-benzoquinonas, las especies de Polydesmida descargan cianuro de hidrógeno y nitroalcanos, Glomerida y Polyzoniida eyectan alcaloides y también terpenoides tales como  $\beta$ -pineno y limoneno.<sup>3,8</sup>

Estas secreciones defensivas constituyen una fuente ecosostenible de metabolitos secundarios biológicamente activos con acción microbiocida potencial de amplio espectro.<sup>9,10</sup> El archipiélago cubano se caracteriza por una megaedafofauna donde a los milípedos endémicos del gen. *Rhinocricus* (*R. duvernoyi* y *R. maximus*) corresponde el mayor índice de biomasa. Estos milípedos pueden eyacular sus secreciones hasta distancias de 50 cm. El objetivo de la presente comunicación fue reportar la composición química mayoritaria de esta secreción en individuos de la especie *Rhinocricus duvernoyi* Karsch 1881 que habitan en la zona occidental de Cuba en formaciones eco-geográficas de mogotes, en La Palma ( $\lambda = 83^{\circ} 33' 15''$  W,  $\phi = 22^{\circ} 45' 24''$  N). Se colectó la secreción defensiva (650  $\mu$ L/individuo) de cinco individuos machos *in vivo* que posteriormente fueron puestos en libertad. La secreción eyectada se recogió en un papel de filtro Whatman-4 y se almacenó a  $-10^{\circ}$  C. Lue-

go se extrajo del papel de filtro con éter dietílico, se concentró con flujo de nitrógeno hasta sequedad (60 mg) y luego, se almacenó a  $-10^{\circ}$  C.

El análisis químico-estructural y composicional se orientó primeramente a buscar las señales inteligentes (FT-IR, RMN-<sup>1</sup>H) a partir del propio extracto crudo. Se determinó entonces el espectro FT-IR (2 mg de extracto seco, ATR-fase sólida JASCO 4 100-Japón,  $\text{cm}^{-1}$ ). En el espectro se observó una banda ancha en  $3\ 357\ \text{cm}^{-1}$  correspondiente a vibración de valencia  $\nu_{\text{OH}}$  y otra en la zona de los doblajes en el plano a  $1\ 244\ \text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{CO}}$ ), ambas señales son típicas de alcoholes y fenoles. Se apreciaron además, bandas características de aromáticos ( $\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$ ) en el intervalo de  $3\ 050$  a  $3\ 100\ \text{cm}^{-1}$  y  $1\ 450$  a  $1\ 665\ \text{cm}^{-1}$ . La existencia de señales entre  $2\ 928$  y  $2\ 857\ \text{cm}^{-1}$  y otra señal en  $1\ 103\ \text{cm}^{-1}$ , correspondientes a vibraciones de valencia  $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$  y  $\nu_{\text{C-O-C}}$ , respectivamente, sugieren la potencial existencia de fragmentos moleculares  $-\text{OCH}_3$  que pueden estar unidos al núcleo aromático. La ausencia de señales en la zona de las vibraciones de valencia  $\nu_{\text{CO}}$  ( $1\ 670$ , carbonilo) es de gran significación porque descarta la posibilidad de que existan quinonas como metabolitos mayoritarios en la secreción. Las quinonas sustituidas han sido descritas como componentes repelentes en las secreciones para especies del orden Spirobolida y familia Rhinocricidae. El análisis por RMN-<sup>1</sup>H (ACF-Brucker 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ -TMS,  $27^{\circ}$  C,  $\delta$ , ppm) de la secreción bruta presenta señales características aromáticas dada por un multiplete a 7,650 y 6,300 ppm y dos singletes a 3,780 y 4,020 ppm atribuibles a fragmentos  $-\text{OCH}_3$  que corrobora lo anteriormente considerado vía FT-IR. El análisis de los metabolitos mayoritarios no volátiles se desarrolló mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), con un detector de

tipo PDA (arreglo de diodo, intervalo espectral de medición: 190 a 505 nm, equipo Knauer, SMART LINE, columna Konik: Extrasil ODS2 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm, a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Fase móvil: gradiente de metanol (Lichrosolv, Merck): 100 a 60 % en 10 min, 60 a 50 % en 5 min mantenido 50 % por 2 min, 50 a 100 % en 9 min). Se pesó 1 mg del extracto seco, se disolvió en 1 mL de metanol (1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se inyectaron 10  $\mu\text{L}$ .

El perfil CLAR-PDA (Fig. 1A) reveló que la secreción defensiva presenta un pico cromatográfico mayoritario a  $t_{\text{R}} = 15,68$  min con un máximo de absorción en  $\lambda = 254$  nm característico de un derivado aromático (banda  $\beta$ ) (Fig. 1B). El análisis de los componentes volátiles vía Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas [GC-MS, Hewlett-Packard 6890 (Palo Alto, CA, USA), fuente de ionización: EI (impacto electrónico) a 70 eV; detector: 5 973 (cuadrupolo); columna: Ultra 2 (J & W Scientific, USA), 12 m x 0,22 mm diámetro interno; gas portador: He; flujo 1 mL/min. Rampa de temperatura: 60  $^{\circ}\text{C}$  con incrementos de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta 300  $^{\circ}\text{C}$  (isotérmico 5 min); split (1 : 10)].

Un miligramo de extracto seco se disolvió en 1 mL de cloroformo (1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se diluyó con cloroformo hasta 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  a 280  $^{\circ}\text{C}$ . Según el perfil GC (Fig. 2A), se detectó un pico cromatográfico mayoritario (100 %) a  $t_{\text{R}} = 3$  246 min. El espectro de masa (Fig. 2B) coincidió (en más de un 95 %) con el correspondiente al 3,4-dimetoxifenol, según base de datos espectrales de sustancias de referencia (NIST).<sup>11</sup> El análisis del espectro de masas y las correlaciones fragmentos estructurales-relación m/z permitió corroborar la estructura propuesta y el mecanismo de fragmentación (Fig. 2C).

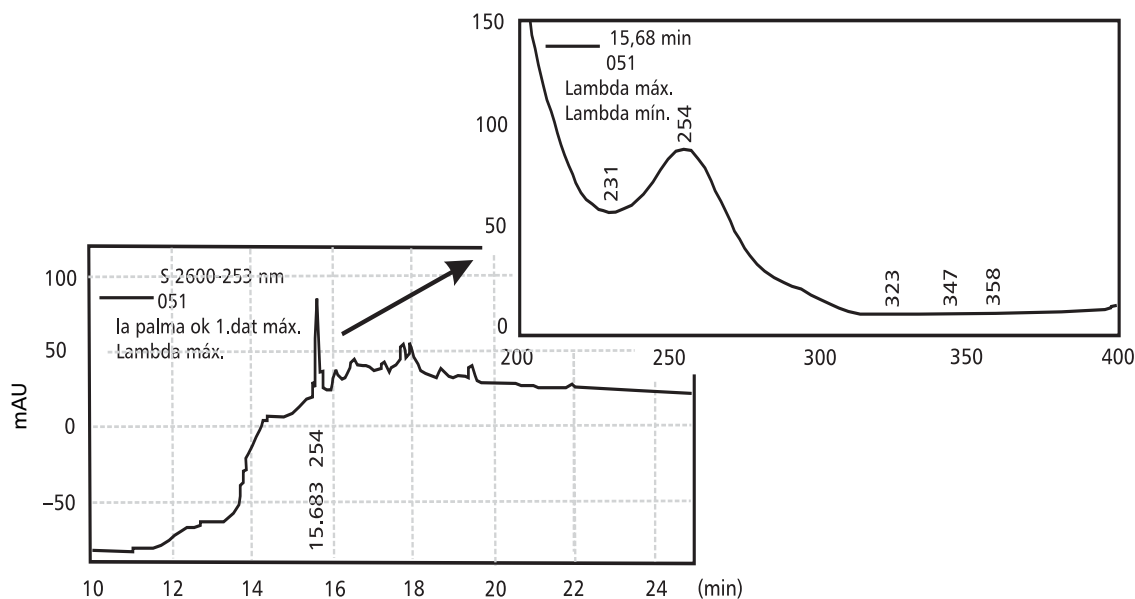
La estructura modelo reveló la presencia de sustituyentes metoxilos e hidroxilo (Fig. 3). Este tipo de derivados posee un ión molecular intenso con poca tendencia a la protonación que constituye el pico base del espectro de masas. Esto se aprecia en m/z 154. La función Ar-O-CH<sub>3</sub> quedó demostrada por la serie de fragmentación siguiente: pérdida de radical metilo seguida de la eliminación de una molécula neutra, CO. Los iones fragmentos que corroboraron este modelo fueron: m/z 139 y 111, siendo ambigua la estereoquímica. Una frag-

mentación característica resultó la eliminación de H<sub>2</sub>CO (metanal) que revelaron los iones fragmentos m/z 124, 81, 65, y 52. Otra posible fragmentación podría ser la eliminación del radical  $\cdot\text{OCH}_3$  (m/z 65, 51). La naturaleza fenólica se corrobora con la formación de los iones fragmentos m/z 95, 81, 65, 53, generados por el mecanismo clásico para fenoles.<sup>12</sup> El fragmento Ar fue corroborado por la presencia de la serie iónica m/z 51-53 y 65-67.

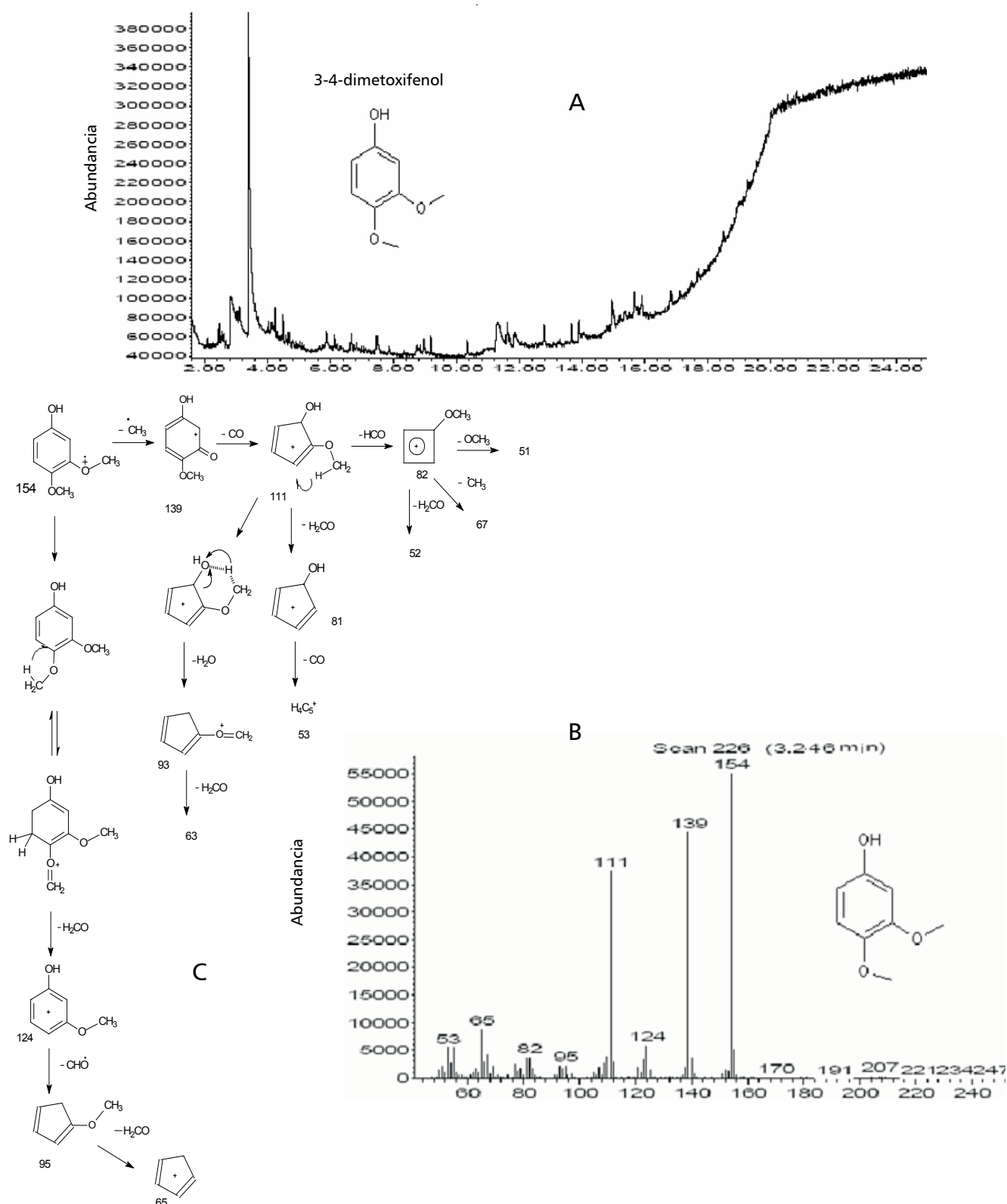
Se detectó un nuevo compuesto de naturaleza fenólica (3,4-dimetoxifenol), como metabolito mayoritario en la secreción defensiva del orden Spirobolida, familia Rhinocricidae y género *Rhinocricus*, perteneciente a una población de milípedos endémicos *Rhinocricus duvernoyi* Karch 1881, en la zona de La Palma (Pinar del Río).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

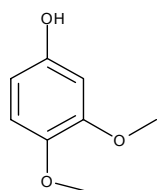
- Hoffman R., Golovatch S., Adis J. and De Morais J. Practical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diploda). **Amazonia**, **XIV**, 1-35, 1996.
- Hoffman R. In: Chapter 26. Soil Biology Guide Edition, 835-859, 1993.
- Arab A., Giuliano G. Zacarin G., Carmen S. Fontanetti C., Camargo M., Dos Santos M. and Cabrera A. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). **Entomotropica**, **8**, 79-82, 2003.
- Wood W., Hanke F., Kubo I., Carroll J. and Crews Ph. Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. **Biochem. Systematics and Ecology**, **28**, 305-312, 2000.
- Attygalle A., Xu S.C., Meinwald J., Eisner T. Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. **J. Nat. Prod.**, **56**, 10, 1700-1706, 1993.
- Kuwahara Y., Omura H. and Tanabe T. 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretions, **Naturwissenschaften**, **89**, 308-310, 2002.
- Tacoronte J.E., Chervas T., Prieto D., Rodríguez C., Díaz M. y González V. Una benzoquinona natural aislada de la secreción defensiva de un milípedo cubano endémico, *Rhinocricus duvernoyi* Karch, del Valle de Yumurí. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **36**, 115-116, 2005.
- Deml R. and Huth A. Benzoquinones and hydroquinones in Defensive Secretions of Tropical Millipedes. **Naturwissenschaften**, **87**, 80-82, 2000.
- Mesa J.A. Tesis en opción al grado de Máster en Química, Facultad de Química Universidad de la Habana, Julio, 2007.



**Fig. 1** Perfil de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de la secreción defensiva A y espectro ultravioleta (200 a 400 nm) del metabolito mayoritario B.



**Fig. 2.** A) Perfil GC. B) Espectro de masas. C) Mecanismo de fragmentación propuesto para el 3,4-dimetoxifenol.



**Fig. 3.** 3,4-dimetoxifenol, metabolito mayoritario en la secreción defensiva de los milípedos *Rhinocricus duvernoyi* perteneciente a una población localizada en La Palma, Pinar del Río.

10. Williams, L and Singh P. Biology and Biological Action of the defensive Secretions of Tropical Millipede, *Naturwissenschaften*, **84**, 143-144, 1997.
11. (consultado: 2006). Disponible en: [http://chemdata.nist.gov/mass-spc/Srch\\_v1.7/index.html](http://chemdata.nist.gov/mass-spc/Srch_v1.7/index.html).
12. Mass-Spectrometry in Medicinal Chemistry. Application in drug Discovery. Edited by Klaus Wanner & Georg. Hofner Wiley-VCH Verlag GbMH, Vol. 36, 2007.