

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA ACTIVA PRODUCIDA POR *Espeletia killipii* COMO DEFENSA ANTE EL ATAQUE DE LARVAS DE LEPIDÓPTEROS

EXTRACTION, SEPARATION AND IDENTIFICATION OF THE ACTIVE SUBSTANCE PRODUCED BY *Espeletia killipii* AS DEFENSE AGAINST THE ATTACK OF LEPIDOPTERAN LARVAE

Gema Eunice Acosta Niño¹ • Rubén Darío Torrenegra Guerrero²

RESUMEN

Este artículo describe parte del trabajo realizado en uno de los Proyectos de Investigación del grupo de Fitoquímica de la Universidad Javeriana. El estudio se centró en el efecto que causa en las hojas de la especie *Espeletia killipii* el ataque del gusano proveniente de una especie de lepidóptera, Subclase Pterigota. El gusano activa con su mordedura la producción de un exudado blanquecino en las hojas de la planta, éste se caracterizó por medio de un análisis químico del mismo directamente y de su extracto, luego se realizó un ensayo comparativo y cuantitativo entre hojas de planta sana y planta atacada por el gusano, y como resultado se obtuvo un incremento en el contenido de compuestos kaurenicos (5,06%), específicamente ácido Kaur 9-(11) dien 19 oico en un 4,8% p/p con respecto al extracto, conocido también como ácido grandiflorenico, al cual se le adjudica el actuar como sustancia activa originando efecto *antialimentario* y en caso extremo la muerte del gusano. Es evidente entonces que las hojas infectadas en comparación con hojas de plantas sanas, presentan aumento de los compuestos mencionados, especialmente del ácido grandiflorenico, como respuesta ante el ataque del gusano.

Palabras clave: Actividad Antialimentaria, *Espeletia killipii*, diterpenos, kaurenico.

¹ Química, M.Sc., Docente y Directora del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada. Autor para correspondencia: gema.acosta@unimilitar.edu.co

² Químico. Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana.

ABSTRACT

This article describes some of the work in one of the Research Group of the Universidad Javeriana Phytochemistry. The study focused on the effect it has on the leaves of the species *Espeletia killipii* the onset of a worm from a species lepidopterous, of classification: Kingdom Animalia, Phylum Arthropoda, Class Insecta, subclass Pterigota, with mouthparts transformed into that sucker device coil is wound.

The worm activates with its bite the production of a white exudate on the leaves of the plant, this was characterized by chemical analysis the extract, then conducted a comparative and quantitative experiment which showed a high content of Kaurenics compounds (5,06%), specifically Kaur acid 9-(11) dien 19 in 4,8% w/w respect to the extract, also known as grandiflorenic acid, wich in turn acts as an active substance causing *antifeedant* effect and in extreme case the worm's death. Is evident that the infected leaves compared with leaves of the healthy plants, present an increase of the same mentioned, specially the grandiflorenic acid, as the response to the worm's attack.

Key words: Antifeedant activity, *Espeletia killipii*, diterpens, kaurene.

INTRODUCCIÓN

Se conoce como Páramo al ecosistema de montaña de los Andes tropicales, sobre los 2900 msnm aproximadamente, excluyendo de esta definición las alturas de Perú y Bolivia, por predominar la sequedad. En Colombia se caracteriza por el dominio en la vegetación del género *E. killipie*, conocido popularmente como frailejones; Colombia posee así el 60% de los páramos del mundo, el resto lo comparten Venezuela y Ecuador. Estos ecosistemas son de gran importancia como reservorio de agua. (Guhl, 1982, Chitiva, 2002). De allí que la importancia de esta investigación involucra directamente nuestra supervivencia y se enfoca en el efecto que tiene una plaga (larva de mariposa) al atacar la *E. killipii*.

Según (Díaz Piedrahita, 2004) en Colombia se encuentran presentes 45 especies de *Espeletia*, de las cuales el 58% se encuentra en amenaza,

específicamente la *E. Killipiii*, especie colombiana; presenta una preocupación menor, pues depende de la protección efectiva de los parques nacionales donde se encuentra, PNN Sumapaz y Chingaza.

Con este marco de ideas el presente documento exhibe parte de la temática desarrollada en el proyecto "Estudio Fitoquímico de Espeletias" propuesto dentro del Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. El interés fundamental para desarrollar esta investigación fue el determinar si se producía una sustancia activa que promovía el efecto antialimentario como defensa de la planta en contra del ataque de sus predadores (Saradha, Regina, S. Govindarajan, 1999), con el fin de encontrar vías de solución hacia la disminución de amenaza sobre la especie colombiana *E. killipii* en los páramos colombianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología desarrollada en el estudio se llevó a cabo en cuatro fases: 1) Ensayo biológico preliminar, 2) Análisis químico del extracto, 3) Ensayo comparativo y cuantitativo y 4) Ensayo biológico. (Fagua G, 1995).

El material vegetal empleado, corresponde a la especie *E. killipii*, colectado en el Páramo de Guasca a 3.200 msnm. Departamento de Cundinamarca, en noviembre de 1962. El espécimen fue identificado por Cuatrecasas J. y una muestra reposa en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número de colección 17550. Se utilizó la sustancia blanquecina en forma de cristales (exudado), encontrada en las hojas de la *E. Killipii* para realizar el primer ensayo

biológico: Para hacer este bioensayo, se utilizó el método de disco de papa reportado por Hostettmann. Se recolectó una cantidad de 20 gusanos, los cuales fueron puestos sobre hojas de *E. Killipii* previamente trituradas a las cuales se les adicionó el 1% del extracto para fabricarles la dieta artificial, en donde el gusano se coloca por varios días y es forzado a alimentarse de ella. (Hostettmann, 1998). Se examinan visualmente; y se les mantiene condiciones de humedad y temperatura similares a las de su hábitat. (3.200 msnm a temperatura entre 4 –8 °C).

Se colocaron 10 gusanos en preparado de hojas con extracto y 10 en las mismas condiciones en preparado de hojas sin extracto; se les hizo seguimiento (observación) de crecimiento y supervivencia durante 40 días.

Una vez recolectado el material, se seleccionaron 20 gramos de sustancia blanquecina a la cual se le hizo extracción empleando diclorometano (25°C), posteriormente se realizaron lavados con éter de petróleo, para desengrasar la muestra, seguidamente se llevó a sequedad y se pesó; obteniendo 6,7017 g de extracto. Para la separación de los componentes del extracto se empleó cromatografía por columna haciendo varios ensayos con diferentes solventes y mezclas de solventes hasta encontrar el más apropiado; se recogieron 70 fracciones, empezando con Petrol-CH₂Cl₂ 8:2, hasta la fracción 28 luego 6:4, hasta la fracción 55; CH₂Cl₂-MeOH 9:1 hasta la fracción 65, para terminar con sólo MeOH hasta la fracción 70.

Las diferentes fracciones recolectadas (Fase 2) se analizaron por C.C.D. en silica gel, revelándolos con Vainillina/ H₂SO₄. De las fracciones eluidas de la 10-17 se obtuvo 7,73 microgramos; y mediante comparación con patrones e identificación de los respectivos espectros se determinó la estructura y peso molecular de la sustancia llamada EK1, de las fracciones 18-29 se obtuvo un sólido blanco, 0,329 g que cristaliza en cloroformo, denominado EK2, y de las fracciones 30-46 se obtiene otro sólido blanco con 1,02 microgramos; se llamó EK3. Las demás fracciones cristalizan pero se obtienen en cantidades muy pequeñas y con gran contenido de mezclas de otras sustancias por tanto no se realizó para esta separación los diferentes componentes.

Para las sustancias que se lograron aislar y purificar, se tomaron espectros de resonancia magnética nuclear protónica RMN¹H empleando como solvente CDCl₃, a 90 MHz con Espectrómetro RMN¹H Multinuclear JEOL FX 90K A 90 MHz y como la mayoría de estos compuestos ya han sido estudiados, se identificaron por simple comparación con espectros RMN¹H de sustancias patrón. Para las demás sustancias que no fue posible aislar y separar, se les realizó cromatografía de gases acoplado a

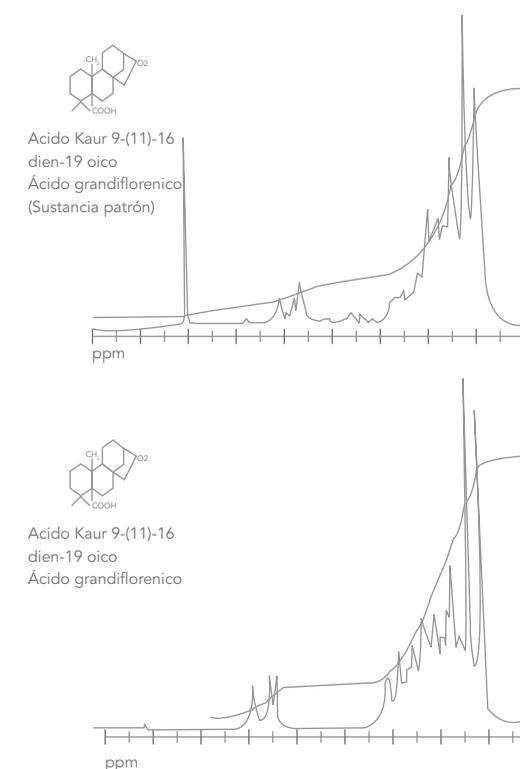


Figura 1. Comparación del Espectro RMN¹H de la sustancia Acido Kaur 9-(11)- 16 dien-19 oico, (ácido grandiflorenico), identificado en el extracto contra espectro patrón. Empleando como solvente CDCl₃, a 90 MHz

masas; empleando cromatografía de gases de flujo constante HEWLETT PACKARD 6990 con detector selectivo de masas H. P. 5973 con columna J & W 123-1062 temperatura máxima 250°C, tipo DV1 columna capilar 60 m x 320 μ x 0.25 μ nominal; y mediante la comparación con algunos patrones, tales como ácido Kaurenico, Kaurenol, Isokaurenol, se realizó la identificación de los respectivos espectros, se determinó su estructura y peso molecular.

Para la realización de la Fase 3 se pesaron cantidades iguales (1 kg) de hojas de material sano y material afectado. Del material seco y molido de hojas de *E. killipii* (sana y afectada, se peso respectivamente 20 gramos de material para realizarles extracción en un aparato soxhlet con diclorometano.

Estructura de las moléculas

NOMBRES

| | |
|---|---|
| (C ₁₉ H ₃₀), (C ₁₉ H ₂₈), (C ₂₀ H ₃₂), (C ₂₀ H ₃₄) | Bombiccito α-Dihroxifilocladeno, Ioseno. |
| (C ₂₀ H ₃₂ O) | Sofilocladenol |
| (C ₁₉ H ₃₂ O) | 4-β-hidroxi-18-Norhibaeno, o r 4α-hidroxi-19Norhibaeno. |
| (C ₁₉ H ₃₂ O) | Isofilocladenol. |
| C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | Maritimol, Estemodin o Estemodiol). |
| C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | Traccinodiol. |
| C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Ácido Ciliarico |
| C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Ácido 3-α-hidroxilobanoico |
| C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | Hidroximonoginol, Eritroxidiol, Benuol o Tobarrol |
| | Timol, ácido palmítico, dietil- ftalato, Hexilenglicol. |

TABLA 1. Compuestos minoritarios identificados en el extracto.

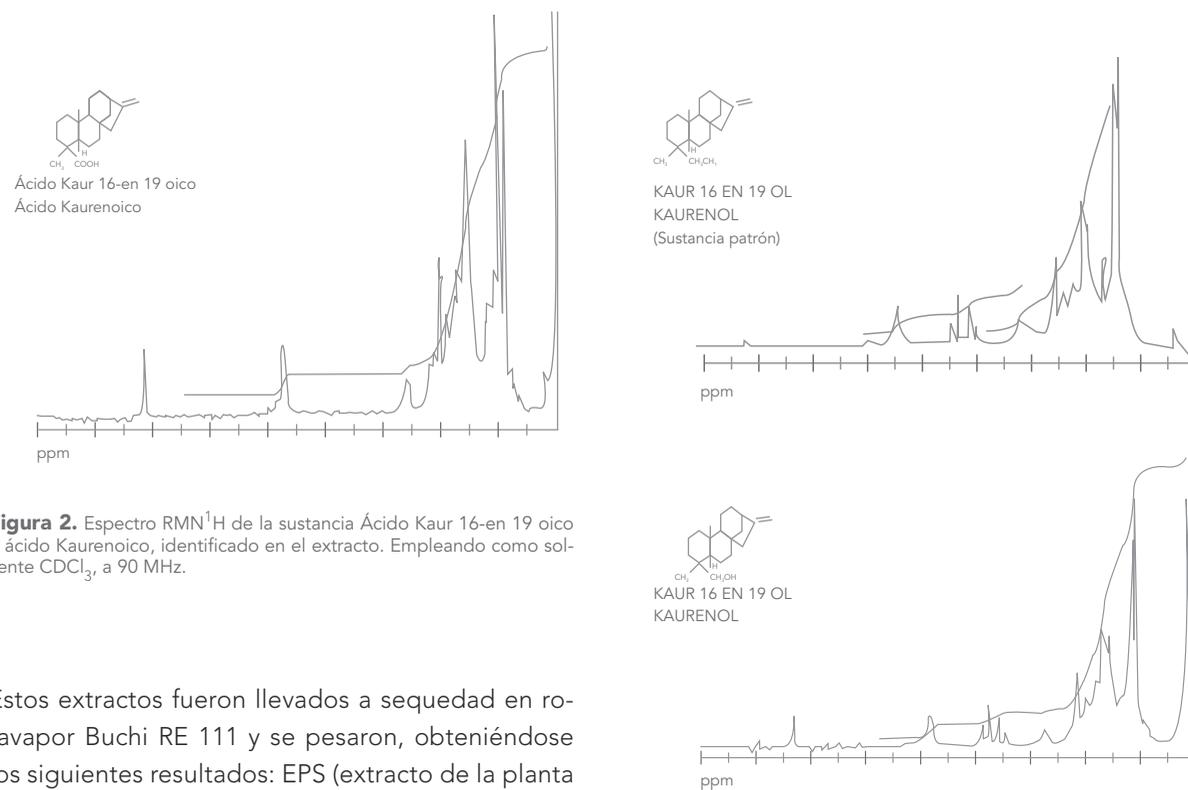


Figura 2. Espectro RMN¹H de la sustancia Ácido Kaur 16-en 19 oico ó ácido Kaurenoico, identificado en el extracto. Empleando como solvente CDCl₃, a 90 MHz.

Estos extractos fueron llevados a sequedad en rotavapor Buchi RE 111 y se pesaron, obteniéndose los siguientes resultados: EPS (extracto de la planta sana); 2,0722 g y EPA (extracto de la planta afectada) 2,6135 g.

Para realizar la comparación entre el material EPS Y EPA se hizo una cromatografía bidimensional, empleando como eluentes: Solvente 1; Petrol-AcOEt, Solvente 2; CHCl₃-Eter etílico 9:1, y como sustancias patrón se colocaron: 1. Cicloartano, 2. Kaurenal, 3. ácido Kaurenoico, 4. Kaurenol, 5. ácido grandiflorenico, 6. Sesquiterpenlactona, 8. Mezcla de patrones. 9. EPS 10, y EPA.

Una vez determinado el componente mayoritario se realizó la cuantificación del mismo realizando para ello una curva de calibración de sustancia patrón, en este caso se empleó el ácido grandiflorenico como patrón. En la cual se interpolan los valores de contenido de ácido grandiflorenico de las muestras de material sano y afectado. El método empleado para este procedimiento se conoce como densitometría óptica, en el cual se determina

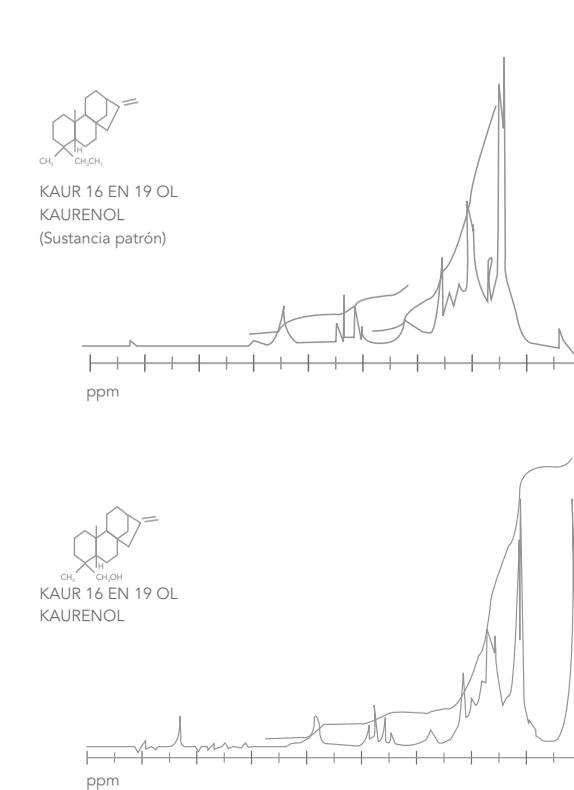


Figura 3. Comparación del Espectro RMN¹H de la sustancia Kaur-16-en-19-ol ó Kaurenol, identificado en el extracto contra espectro patrón. Empleando como solvente CDCl₃, a 90 MHz.

el área ocupada por la muestra, y se procede a graficar cantidad de sustancia con respecto a porcentaje de área.

De manera alterna se realizó el segundo ensayo biológico empleando hojas de la planta, y gusanos recolectados en el páramo de Guasca, estos fueron llevados a un lugar con las mismas condiciones de altura 3200 msnm, humedad y similares condiciones de temperatura (entre 4-8°C) (Fase 4) incluyendo en la dieta del gusano el componente del extracto cristalizado adicionándole sobre la superficie de la hoja un 1% aproximadamente. (Gilbert e P.H. Raven, 1978; Gilbert, 1975).

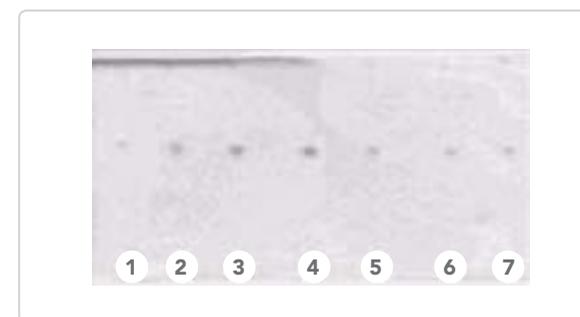


Figura 4. Diagrama por Densitometría Óptica para la comparación de concentración (ácido Grandiflorenico) en muestras control y muestras problema. 1, 2, 3 y 4, corresponden a las muestras control. 5, 6, y 7 son las muestras problema a razón de 200 nL por sitio. Empleando densitómetro óptico, con programa computacional AAB softwar internacional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer ensayo biológico se encontró que efectivamente el extracto produce un efecto negativo sobre el gusano de lepidóptera, debido a que los gusanos puestos en presencia de las hojas con extracto, perecieron en un tiempo menor que los no expuestos. Hay que anotar que el tiempo máximo de vida de los gusanos fue de 40 días.

Se determinó que el compuesto mayoritario en el extracto fue el ácido Kaur 9-(11)-16 dien (19) oico o ácido grandiflorenico por medio de la comparación según espectro RMN¹H de un patrón con el extracto (Fig.1), (Surch Dev. e Renuka M, 1986) el porcentaje de recuperación fue del 4,8%; además se obtuvieron diferentes sustancias con cantidades de recuperación diferentes. Estos fueron comparados con patrones de sustancias puras presentes en el laboratorio, como: el ácido Kaur 16-en 19 oico, ó ácido Kaurenoico, con un porcentaje de recuperación del 0,11%, (Fig. 2) y la sustancia Kaur-16-en 19-ol, ó Kaurenol, con un porcentaje de recuperación del 0,15%. (Fig. 3).

Una vez separadas las muestras del extracto de la sustancia blanquecina tomado de las plantas

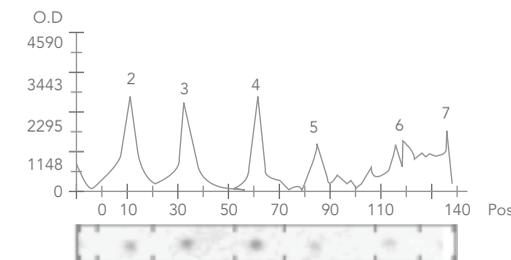


Figura 5. Representación del contenido de Acido Grandiflorenico por cantidad de área.

sanas y enfermas. Se encontró que el componente mayoritario es el ácido grandiflorenico (ácido kaur 9-(11)-16 dien 19 oico) según Espectro RMN¹H de un patrón obtenido e identificado por el grupo GI-FUJ y del extracto (Fig.1), (Surch Dev. e Renuka M, 1986) el porcentaje de recuperación fue del 4,8%; además se obtuvieron otras sustancias, las cuales fueron comparadas con patrones de sustancias puras presentes en el laboratorio, como: el ácido Kaur 16-en 19 oico, o ácido Kaurenoico, con un porcentaje de recuperación del 0,11%, (Fig. 2) y la sustancia Kaur-16-en 19-ol, ó Kaurenol, con un porcentaje de recuperación del 0,15%. (Fig. 3) y las otras sustancias que se encuentran en cantidades apreciables son el ácido kaurenoico (Kaur 16-en 19 oico) con 0,11% p/p y Kaurenol (kaur-16-en 19-ol) con un 0,15% p/p.

Se identificaron por espectrometría de masas algunas de las sustancias presentes en el extracto tales como: Kaureno, Kaurano, Kaurenal, Kaur 16-en 3-ol ó Kaurenol, que según (Viloria et al, 1997), puede llamarse Isofilocladenol, 4 α -hidroxi-18 Norhibaeno, o su isomero el 4 β -Hidroxi Norhibaeno o Kauranol, Isokauranol, ácido Kaurenoico o ácido kaur 16-en 19 oico. En la tabla 1 se presentan algunos de los compuestos minoritarios identificados a partir del extracto cristalizado.

El estudio comparativo se realizó con el fin de determinar la variación, en el extracto de la sustancia activa. La primera variación encontrada fue que se produjo mayor cantidad de extracto de las hojas de planta afectada, (13,1%) que de la planta sana, (10,3%), en una proporción aproximada del 3%. Se encontró con la cromatografía bidimensional que el componente mayoritario (ácido Kaur 9-(11)-16 dien-oico), ácido grandiflorenico en el extracto, presentó variación reportándose aumento considerable en la planta afectada con respecto a la planta sana, puesto que el porcentaje de extracto obtenido fue alrededor de 10%. (Fig. 4). (Harborne, 1978, Harborne, 1982). Con estos resultados se procedió a cuantificar la concentración por densitometría del ácido grandiflorenico, en comparación con un patrón, con relación al área de la misma. Se encontró que en el material afectado hay un aumento del 10% de ácido grandiflorenico. (Fig. 5). Obsérvese el área de cada muestra, con igual frente de corrida.

Finalmente en el ensayo biológico, (Primo Yufera, 1991), al adicionar a la dieta del gusano el 1% del ácido grandiflorenico, se encontró una menor supervivencia de los gusanos en presencia de la sustancia que incluía el ácido grandiflorenico en la dieta.

CONCLUSIONES

- Se encontró después de los procesos de extracción, separación e identificación un porcentaje de 5,06% en compuestos kaurenicos, en las hojas de la especie *Espeletia killipii*, donde el compuesto mayoritario fue el ácido Kaur 9(11)-dien 19 oico (ácido grandiflorenico), en una proporción del 4,8% p/p con respecto al extracto, el cual podría ser la sustancia responsable del cambio efectuado por la planta y podría considerarse como la sustancia activa ante el ataque del gusano de lepidóptera.

- De acuerdo con los resultados obtenidos, se dedujo que el exudado en las hojas de la *Espeletia killipii*, se genera como mecanismo de defensa ante el ataque del gusano de lepidóptera.

- Se comprobó que la cantidad de ácido Grandiflorenico aumenta, a medida que la planta es atacada por el gusano de lepidóptera, esto se demostró al realizar la cuantificación del extracto en hojas de plantas infectadas y al comparar con extractos realizados sobre hoja de planta sana.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación en Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Básicas de la Pontificia Universidad Javeriana, al Profesor Ph.D. Omar Fuentes, por su colaboración en la identificación y análisis de los espectros. A laboratorio Roche por la facilitación de equipos y patrones para la elucidación de las sustancias encontradas.

BIBLIOGRAFIA

1. Guhl E. Los páramos circundantes de la Sabana de Bogotá. 1982. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia.
2. Chitiva A, Torrenegra R, Cabrera C, Díaz N y Pineda V. 2002. Contribución al estudio de microhongos filamentosos en los ecosistemas páramo de Guasca y El Tablazo. Grupo de Investigación en Fitoquímica y Biotransformación, Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/gifuj/hongos_%20ecosistemas_%20paramo.pdf. 25. Ene.08.
3. Díaz-Piedrahita S, Pedraza P, García N, Calderón E y Galeano G. 2004. Frailejones (Espeletia). En Calderón E, Galeano G y García N (eds.). Libro Rojo de Plantas Fanerógamas de Colombia. Volumen 2: Palmas, Frailejones (Espeletia) y Zamias. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt – Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (in press.)
4. Sturm H y Rangel O. 1985. Ecología de los Páramos Andinos. Ed. Guadalupe Ltda. Bogotá.
5. Fagua Giovanny. 1995. Relaciones de Herbivoría entre Papilionidas (Lepidoptera) y especies de *Aristolochia* (Aristolochiaceae). Andrade C, García A y Fernández F. Insectos de Colombia, estudios escogidos. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Física y Naturales, 13: 473-541p.
6. Surch Dev. Renuka Misra. 1986. Handbook of terpenoids. Volúmen IIV.
7. Gilbert & P.H. Raven 1978. (Eds.) Co evolution of animals and plants, Pages 210-240.
8. Gilbert, L. E. 1975. Ecological Consequences of coevolved autualisa between butterflies and plants. In: L.E.
9. Saradha Vasanth, Regina Mary, S. Govindarajan, 1999. Antifeedant activity of vicolides from *Pentanema indicum* FITOTERAPIA, Volume LXVIII, N° 4. Pages 618-620.
10. Viloría Elysabeth, Rojas Luis, Usubillaga Alfredo, 1997. Analysis of Kaurenic Acids Methyl Esters by Gas Chromatography. Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia; Universidad de los Andes, Mérida Venezuela. Vol 20.
11. Harborne, J. B. (Ed). 1982. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press. London 275 pp.
12. Harborne, J. B. (Ed). 1978. Biochemical aspects of plants and animal coevolution. Academic press, New York.
13. Hostettmann K. 1998. Biologically active agents in nature. *Chimia*, 52: 1-2.
14. Primo Yufera E, 1991. Ecología Química "Nuevos Métodos de Lucha contra Insectos". Ed. Mundi-Prensa Castelló Madrid. 191 pp.
15. Sutherland I.A., Brown L., Forbes S., Games G., Hawes D., Hostettmann K., McKerrell E.H., Marston A., Wheatley D., Wood P. 1998. Countercurrent chromatography (CCC) and its versatile application as an industrial purification & production process. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 21: 279-298.
16. Baptista, José Gregorio, Monsalve, Mariugenia, Alonso, Miguel Enrique et al. 2007. Ensayos de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del ent-kaureno. *Ciencia*, jun. 2007, 15:248-258.