

Ensayos de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del *ent*-kaureno

José Gregorio Baptista¹, Mariugenia Monsalve², Miguel Enrique Alonso³,
Jorge Luis Ávila³ y Alfredo Usubillaga^{4*}

¹Posgrado Interdisciplinario de Química Aplicada. ²Facultad de Farmacia.

³Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias. ⁴Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Recibido: 26-06-06 Aceptado: 26-04-07

Resumen

Bajo la premisa de la posible participación del grupo hidroximetileno con orientación ecuatorial sobre el carbono C4 y sus formas oxidadas carboximetilester y ácido carboxílico en la actividad antialimentaria de derivados del kaurenol, se estudiaron los efectos de fagodepresión causada por el ácido *ent*-kaurénico aislado de *Baccharis trinervis* y de cinco derivados esterificados y de los productos reducidos en C4 sobre dos especies de coleópteros, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum* que afectan severamente varios cereales almacenados y sus harinas en todo el mundo. El esqueleto *ent*-kaurano fue derivatizado por métodos sintéticos en las posiciones C15, C16, C17 y C19 a partir del kaurenol obtenido de *Espeletia semiglobulata*, o del ácido 15 α -acetoxi(-)-kaur-16-en-19-óico y de 15 α , 19 α -dihidroxi(-)-kaur-16-eno. A pesar de los efectos de fagoinhibición observados en larvas de *Spodoptera littoralis* y *S. frugiperda* en trabajos anteriores, no se detectó actividad sobre los coleópteros mencionados en los ensayos de alimentación de una vía, aunque sí hubo una fagodepresión moderada causada por el ácido *ent*-kaurénico en el ensayo de dos vías.

Palabras clave: Ácido *ent*-kaurénico; actividad antialimentaria; *Baccharis trinervis*; *Espeletia semiglobulata*; kaurenol; *Sitophilus oryzae*; *Tribolium castaneum*.

Anti-feeding activity on *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae* of some derivatives of *ent*-Kaurene

Abstract

It was of interest to determine the possible role of the equatorial hydroxymethylene group on C4 and its oxidized forms carboxymethyl ester and carboxylic acid of some kaurenol derivatives, on the phagoinhibition activity of these compounds. These effects were measured against *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum*, two worldwide stored grain coleopteran pests, using *ent*-kaurenic acid isolated from *Baccharis trinervis*, and five of its ester derivatives and C4-carbinols. *Ent*-kaurenic acid was chemically derivatized in carbons C15, C16, C17 and C19

* Autor para la correspondencia. Teléfono 0274-2440903, 0416-6748881. E-mail: usubillaga@intercable.net.ve

using kaurenol from *Espeletia semiglobulata*, or 15 α -acetoxy(-)-kaur-16-en-19-oic acid and 15 α , 19 α -dihydroxy(-)-kaur-16-ene. In spite of the phagoinhibitory effects detected earlier in larvae of *Spodoptera littoralis* and *S. frugiperda*, there was no such activity against the above coleopterans in one way feeding assays, except for a moderate phagodepression by *ent*-kaurenic acid in two way assays.

Key words: Anti-feedant effects; *Baccharis trinervis*; *ent*-kaurenic acid; *Espeletia semiglobulata*; kaurenol; *Sitophilus oryzae*; *Tribolium castaneum*.

Introducción

La actividad antialimentaria de algunos derivados del linearol (Figura 1) ante larvas de *Spodoptera littoralis* ha sido evaluada por Bruno *et al.* (1). Igualmente se ha descrito la potente actividad antialimentaria del sideroxol (2), diterpeno tipo *ent*-kaurano aislado de *Sideritis akmanii* y *S. rubiflora*, ante *Spodoptera frugiperda* (2). El linearol es un derivado del *ent*-kaureno que posee doble enlace exocíclico Δ 16, dos grupos hidroxilo 3 α , 7 β y un tercer grupo hidroxilo primario acetilado sobre C-18. El kaurenol (3a) es un alcohol diterpénico que se encuentra en la resina de todas las especies de frailejón que han sido examinadas fitoquímicamente. Solamente posee un grupo hidroxilo sobre el carbono C-19, carbono que tiene orientación α axial. Por consiguiente una diferencia importante entre el kaurenol y el linearol es que el hidroxilo primario de este último está ubicado sobre C-18, carbono que tiene orientación ecuatorial.

En el estudio realizado por Bruno *et al.* (1) se concluye que aquellos derivados del linearol que poseen un grupo cetónico o un grupo epoxídico, tienen actividad antialimentaria importante. Al cambiar los grupos acilo sobre los hidroxilos en C-3, C-7 y C-18, se altera la actividad antialimentaria pero sin mostrar una tendencia definida.

El objetivo de este trabajo es ensayar la actividad antialimentaria ante *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae*, dos insectos que se alimentan de granos comerciales almacenados como arroz, trigo y maíz o sus harinas y algunos productos procesados, de cuatro derivados del kaurenol: 19 α -hidroxi-

-16,17-epoxi(-)-kaurano (4a), 19 α -acetoxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (4b), 15 α ,19 α -dihidroxi(-)-kaureno (5), 15 α ,19 α -dihidroxi-16,17epoxi(-)-kaurano(6); del ácido kaurénico (7) y de dos de sus derivados: el éster metílico del ácido 15 α -hidroxi(-)-kaur-16-en-19-óico (8) y el éster metílico del ácido 15-ceto(-)-kaur-16.-en-19-óico (9). Interesa saber si la presencia de un hidroxilo primario ecuatorial sobre C-4 del esqueleto kaurénico es imprescindible para que un compuesto posea actividad antialimentaria sobre estos insectos. Con este propósito se utilizaron compuestos que además poseen un grupo epóxido ó un grupo cetónico.

El compuesto 7 se aisló de *Baccharis trinervis* mientras que los compuestos 4a y 4b se obtuvieron a partir de kaurenol aislado de la fracción neutra de la resina de *Espeletia semiglobulata*. Los compuestos 6, 8 y 9 se obtuvieron a partir de la fracción ácida de la resina de la *Espeletia schultzei*, tal como se describe en materiales y métodos.

Materiales y Métodos

Procedimientos generales

Los puntos de fusión se midieron en un equipo Fisher Johns y no están corregidos. Las rotaciones específicas se midieron en un electropolarímetro Rudolph Research modelo Autopol III utilizando la línea D del sodio, la concentración *c*, está dada en g/100 mL. Los espectros IR se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer FT-1720X como comprimidos de KBr. Los experimentos de resonancia magnética nuclear se realizaron en un espectrómetro Broker Avance DRX-400.

largo y 0,25 mm de diámetro a 250°C con un flujo de Helio de 0,9 mL / minuto. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} 3398, 3067, 1656, 1025, 876; M⁺ 288 (26%), 273 (M⁺- 15, 23%), 257 (100%), 207 (24%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

19 α -acetoxi-(-)-kaur-16-eno (3b)

Se disolvió 200 mg de 3a en 5 mL de piridina y se agregó 5 mL de anhídrido acético. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente toda la noche y a la mañana siguiente se agregó agua helada y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó varias veces con agua destilada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad en el rotavapor. Se agregó al residuo 5 mL de tolueno y se llevó a sequedad en el rotavapor. Se repitió la adición y evaporación del tolueno hasta eliminar el olor a piridina. Finalmente se purificó el producto sobre una columna de gel de sílice (5 g). Se eluyó con n-hexano y se obtuvo 165 mg de acetato de kaurenol, p.f. 114-115°C.; $[\alpha]_D^{22}$ - 59° (c 1,228 ; CHCl₃); IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} 3062, 1747, 1247; M⁺ 330 (74,0%), 315 (M⁺-CH₃, 31%), 287 (M⁺- COCH₃, 20,0%), 273 (M⁺-CH₂OCOCH₃, 100%), 271 (M⁺- OCOCH₃, 47%), 227 (72%); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

19 α -hidroxi-16,17-epoxi-(-)-kaurano (4a)

Se disolvió 250 mg (0,87 mmol) de 3a en 10 mL de acetona p.a. y se hizo reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con 40 mmoles de dimetiloxirano, obtenido según Adam *et al.* (6), disuelto en 10 mL de acetona. Se obtuvo 242 mg de 4a que cristalizó de acetona, p.f. 164-165°C; $[\alpha]_D^{22}$ -67,2% (c 0,744; CHCl₃); M⁺ 304 (C₂₀H₃₂O₂, 0,5%), 289 (M⁺-CH₃, 2%), 273 (M⁺- CH₂OH, 100%), 255 (8%), 207 (13%), 123 (23%), ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

19 α -acetoxi-16,17-epoxi-(-)-kaurano (4b)

Se disolvió 60 mg de 4a (0,17 mmol) en 10 mL de acetona p.a. y se hizo reaccionar

durante una hora a temperatura ambiente con 5 mmoles de dimetiloxirano, obtenido según Adam *et al.* (6) disuelto en 5 mL de acetona. Se obtuvo 55 mg de 4b que cristalizó de acetona con pf 159°C M⁺ 346 ((C₂₂H₃₄O₃, 2%), 331 (2%), 288 (18%), 286 (25%), 273 (100%), 255 (12%), (46%), 109; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

(-)-kaur-16-en-15 α ,19 α -diol (5)

El compuesto 5 se obtuvo mediante metilación del ácido 15 α -acetoxi-(-)-kaur-16-en19-óico con diazometano y posterior reducción con H₄LiAl. La reacción del éster del grupo ácido en C-19 con H₄LiAl conduce a la formación de un alcohol primario en dicha posición, en tanto que simultáneamente el grupo éster acetato es reducido a un grupo 15 α -OH. El ácido 15 α -acetoxi-(-)-kaur-16-en19-óico se obtuvo de la resina de *Espeletia schultzei*. Dicha resina es producida cuando la *E. schultzei* es atacada por una polilla de especie todavía no determinada. La fracción ácida de esta resina contiene como componente mayoritario ácido grandiflorénico (7) y como segundo componente más abundante el ácido 15 α -acetoxi-(-)-kaur-16-en19-óico, denominado ácido grandiflorólico por Piozzi *et al.* (8), que lo aislaron de la *Espeletia grandiflora*, frailejón nativo de Colombia. Se disolvió 1.5 g de ácido 15 α -acetoxi-(-)-kaur-16-en19-óico metilado en 50 mL de éter dietílico anhidro y se le agregó gota a gota una suspensión de H₄LiAl en éter anhidro bajo agitación continua a temperatura ambiente. Se estimó el progreso de la reacción mediante TLC. Cuando se observó que se había agotado el éster metílico del ácido 15 α -acetoxi-(-)-kaur-16-en19-óico, se agregó agua para hidrolizar el exceso de H₄LiAl y se filtró la solución etérea que contenía el di-alcohol 5 a través de una pequeña columna que contenía 10 g de gel de sílice. Se eluyó la columna repetidas veces con éter a fin de garantizar la recuperación total de 5 (1.08 g), que cristalizó de hexano, p.f. 156-157°C; $[\alpha]_D^{22}$ - 46,6° (c 0,558; CHCl₃); IR (KBr,

Tabla 1

Desplazamientos químicos de ^1H del kaurenol (3a), acetato de kaurenol (3b), 19α -hidroxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (4a), 19α -acetoxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (4b), $15\alpha,19\alpha$ -dihidroxi(-)-kaureno (5), $15\alpha,19\alpha$ -dihidroxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (6), éster metílico del ácido 15α -hidroxi(-)-kaur-16-en-19-óico (8) y éster metílico del ácido 15 -ceto(-)-kaur-16-en-19-óico

H	3a	3b	4a	4b	5	6	8	9
1 ^a	0,76 dt J=4,14 Hz	0,77 dt J=4,14Hz	0,78 dt J=4,14Hz	0,75 dt J=4,12 Hz	0,78 dt J=4,14Hz	0,80 dt J=4,14Hz	0,85 m	0,78dt J=4,14Hz
1b	1,84 td J=2;14Hz	1,85 m	1,85 m	1,84 m	1,88 m	1,82 m	1,80 m	1,84 m
2a	1,55 m	1,44 m	1,54 m	1,54 m	1,52 m	1,30 m	1,45 m	1,45 m
2b	1,62 m	1,56 m	1,60 m	1,60 m	1,54 m	1,70 m	1,39 m	1,40 m
3a	1,74 td J=3;2Hz	1,67 m	1,79 m	1,87 m	1,86 m	na	2,14 m	2,12 m
3b	0,93 m	1,01 sa	0,91 m	na	1,97 m	1,94 m	na	1,0 m
5	0,92 dd J=2;10Hz	0,96 dd J=3;9Hz	0,94 m	0,97 m	0,91 m	0,91 m	1,0 m	1,22 m
6a	1,60 m	1,60 m	1,68 m	1,60 m	1,68 m	1,63 m	1,44 m	1,44m
6b	1,65 m	1,66 m	1,70 m	1,70 m	1,70 m	na	1,78 m	1,80 m
7a	1,45 m	1,64 m	1,52 m	1,47 m	1,42 m	na	na	1,78 m
7b	1,48 m	1,47 m	1,64 m	1,22 m	na	na	na	1,32 m
9	1,02 d J=2 Hz	1,08 d J=5,6 Hz	1,06 m	1,04 dd J=4;8 Hz	1,04 m	1,10 m	1,06 m	1,17 m
11a	1,35 m	1,37 m	1,44 m	na	na	1,43 m	na	na
11b	1,51 m	1,45 m	1,54 m	na	1,54 m	1,60 m	1,65 m	1,65 m
12a	1,48 m	1,47 m	1,47 m	1,49 m	1,64 m	na	na	na
12b	1,10 m	1,09 m	1,50 m	na	1,70 m	na	na	1,63 m
13	2,63 s.a.	2,63 s.a.	1,78 s.a.	1,79s.a.	2,73 s.a.	1,77 s.a.	2,78 s.a.	3,02 s.a.
14a	1,92 dd J=2;11Hz	1,94 dd J=2;11Hz	2,00 dd J=2;11Hz	2,04 dd J=2;11Hz	2,02 dd J=2;12Hz	2,02 dd J=2;12Hz	2,18 d H=12Hz	2,37 d J=11,9Hz
14b	1,06 m	1,12 m	1,45 m	1,41 m	1,85 m	na	n.a.	1,38 m
15a	2,06 m	2,04 m	1,62 m	1,59 m	3,80 s.a.	3,42 s.a.	3,80 s	-----
15b	2,06 m	2,04 m	1,70 m	1,66 m	-----	-----	-----	-----
17a	4,73 s	4,73 s	2,76 d J=5 Hz	2,79 d J=5 Hz	5,06 s	2,81 d J=1,4 Hz	5,09 s	5,22 s
17b	4,78 s	4,78 s	2,85 d J=5 Hz	2,87 d J=5 Hz	5,30 s	3,21 d J=1,4 Hz	5,24 s	5,91 s
18	0,98 s	0,94 s	0,94 s	0,94 s	0,97 s	0,97 s	0,98 s	0,99 s
19a	3,44 d J= 11 Hz	3,87 d J= 11 Hz	3,44 d J= 11 Hz	3,89 d J= 11 Hz	3,44 d J= 11 Hz	3,48 d J= 11 Hz	-----	-----
19b	3,74 d J= 11 Hz	4,22 d J= 11 Hz	3,74 d J= 11 Hz	4,28 d J= 11 Hz	3,73 d J= 11Hz	3,73 d J= 11 Hz	-----	-----
20	1,00 s	1,03 s	1,01 s	1,04 s	1,01 s	1,06 s	1,22 s	1,22 s
OCH ₃	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,70 s	3,70 s
COOCH ₃	-----	2,04 s	-----	2,03	-----	-----	-----	-----

n.a.= no asignado; s.a.= singulete ancho.

Tabla 2
Desplazamientos químicos de ^{13}C del kaurenol (3a), acetato de kaurenol (3b),
 19α -hidroxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (4a), 19α -acetoxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (4b),
 $15\alpha,19\alpha$ -dihidroxi(-)-kaureno (5), $15\alpha,19\alpha$ -dihidroxi-16,17epoxi(-)-kaurano (6), éster metílico
del ácido 15α -hidroxi(-)-kaur-16-en-19-óico (8) y éster metílico del ácido
 15 -ceto(-)-kaur-16.-en-19-óico (9).

C	3a	3b	4a	4b	5	6	8	9
1	40,5	40,3	40,5	41,4	40,4	40,6	40,7	39,9
2	18,3	18,2	19,3	19,3	18,3	18,9	19,1	19,0
3	35,7	36,3	35,6	36,3	35,5	35,8	38,0	37,9
4	38,7	37,1	38,6	37,0	38,6	38,6	43,8	40,5
5	56,9	56,8	56,8	56,7	56,7	56,7	53,3	51,6
6	20,5	20,4	20,4	20,4	19,6	19,3	21,0	20,1
7	41,7	41,5	41,5	41,4	35,6	35,5	35,2	33,7
8	44,0	44,1	45,3	45,3	47,6	46,8	47,7	44,4
9	51,2	56,2	56,1	56,1	54,4	54,7	51,1	51,1
10	39,3	39,2	39,3	39,2	39,4	39,3	39,6	40,7
11	18,2	18,2	18,3	18,1	18,2	18,1	18,3	18,4
12	33,2	33,1	29,1	29,7	32,7	38,6	32,6	32,2
13	44,2	43,9	42,5	42,6	42,3	40,8	42,3	38,1
14	39,7	39,6	38,5	38,4	36,2	35,6	36,2	36,5
15	49,1	49,0	48,9	48,8	82,9	84,6	82,6	178,4
16	155,9	155,8	66,4	66,3	160,3	68,8	160,3	150,1
17	103,0	103,0	50,4	50,4	108,3	50,4	108,3	114,9
18	27,1	27,6	27,0	27,2	27,0	27,1	28,7	28,7
19	65,6	67,2	65,6	67,1	65,5	65,5	178,1	178,4
20	18,1	18,2	18,1	18,1	18,0	18,3	15,6	15,6
COOCH ₃		21,0		21,6				
COOCH ₃		171,4		171,4				
OCH ₃							57,0	56,1

cm^{-1}) ν_{max} 3350, 3042, 1050, 1000, 900; M^+ 304 (7%), 289 ($\text{M}^+\text{-CH}_3$, 15%), 286 ($\text{M}^+\text{-H}_2\text{O}$, 8%), 273 ($\text{M}^+\text{-31}$, 44%), 255 (100%), 109 (38%), 81 (38%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, Tabla 1); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, Tabla 2).

$15\alpha,19\alpha$ -dihidroxi-16,17-epoxi(-)-kaurano (6)

Se disolvió 0,25 g de $15\alpha, 19\alpha$ -dihidroxi(-)-kaur-16-eno (0,82 mmol) en 30 mL de acetona y se hizo reaccionar con 60 mmoles de dimetiloxirano disuelto en acetona, en forma similar a la descrita en la obtención de

4a. Se obtuvo 235 mg de 6 que no fue posible cristalizar. IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} 3420, 2925, 2860, 1070 cm^{-1} ; M^+ 320 (3%), 302 ($\text{M}^+\text{-H}_2\text{O}$, 16%), 289 ($\text{M}^+\text{-31}$, 52%), 271 ($\text{M}^+\text{-31-H}_2\text{O}$, 100%), 246 (32%), 123 (55%), 109 (52%) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, Tabla 1); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, Tabla 2).

Ester metílico del ácido

15α -hidroxi(-)-kaur-16-en-19-óico (8)

Se disolvió 0,5 g del éster metílico del ácido 15α -acetoxi(-)-kaur-16-en-19-óico en 50 mL de metanol y luego de agregar 50 mg

de KOH disuelto en una mínima cantidad de agua se calentó a reflujo durante una hora. Se enfrió la solución, añadió 150 mL de agua destilada y se agitó con 100 mL de cloroformo. La solución clorofórmica se lavó con agua, se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se cristalizó de hexano obteniéndose **8** (0.41g) con p.f. 104-5°C; $[\alpha]_D^{20}$ -62.3° (c 3,4; CHCl₃); IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} 3509; 3032, 2933, 2869, 1726, 1461, 1446; 1154, 790; M⁺ 332 (40%), 317 (M⁺-CH₃), 314 (M⁺-H₂O), 299 (69%), 274 (100%), 255 (95%), 239 (51%), 189 (40%), 121 (66%), 107 (54%); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

Ester metílico del ácido

15 α -ceto-(-)-kaur-16-en-19-óico (9)

Se disolvió 200 mg de **8** (0,63 mmol) en 5 mL de piridina y se trató con una solución de 250 mg de CrO₃ en piridina a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se trató luego con agua, se filtró y se extrajo tres veces con éter dietílico. La solución etérea se llevó a seco y el producto se purificó en una columna de gel de sílice (10 g) eluyendo con éter. El producto se obtuvo con un rendimiento del 95%, cristalizó de hexano con p.f. 130-131°C; IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} 3030, 1720, 1642, 935; M⁺ 330 (100%), 315 (M⁺-CH₃, 17%), 302 (8%), 298 (7%), 271 (38%), 255 (24%), 121 (30%); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, Tabla 1); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, Tabla 2).

Ensayos biológicos

Se prepararon discos circulares de 0,5 cm² compuestos de harina de trigo y agua conteniendo 2% de mantequilla para evitar su cuarteamiento. Su endurecimiento se alcanzó luego de calentar suavemente (40°C) por 1 h en un horno con ventilación. Cada disco pesó 17±2 mg, dosificándose con soluciones (10 μ L por cada lado= 20 μ L) de los compuestos de prueba en acetona mediante una microjeringa de modo de colocarse 250 g de soluto por cm² de disco. Dosis menores se

hicieron mediante la dilución de la solución madre pero colocando siempre 20 μ L sobre cada disco (9). Para los controles se adicionó esta misma cantidad de sólo solvente. Tanto discos controles como dosificados, el solvente se evaporó por calentamiento suave (35°C) y ventilación por 1 h. Se pesaron (±0,1 mg) discos e insectos antes y después de cada ensayo. Para los ensayos de selección de dos vías, se colocaron 10 adultos de *S. oryzae* o de *T. castaneum* de 7 a 12 días de emergidos en una cápsula de Petri de 8 cm conteniendo un disco control (C) y otro dosificado con el tratamiento (T). El ensayo se prolongó por 60 h sin perturbación en la oscuridad, después de lo cual los discos restantes se pesaron para determinar la relación T/C de consumo y de allí el índice de preferencia. Se realizaron cinco réplicas por experimento. Los ensayos de una vía se llevaron a cabo en forma similar salvo que se utilizó un disco T. A partir del cambio de peso de los insectos (*T. castaneum*) y de los discos se pudieron estimar los parámetros siguientes: (9): Índice de preferencia Fi, calculado como T/(T+C) siendo T el consumo de disco tratado y C el de control, consumo de compuesto de tratamiento ΔT , alteración del peso corporal del insecto vivo W durante las 60 h el experimento, y la eficiencia de conversión del alimento en biomasa (ECI) (9) suponiendo que no ocurren pérdidas de agua, como pudo comprobarse en experimentos independientes. Para el caso de *S. oryzae* no se determinó la variación del peso de los insectos pues estos no ingieren todo el material separado de los discos, como si es el caso con *T. castaneum*. De esta suerte, el ensayo de una vía con *S. oryzae* no permite calcular el ECI y el valor C representa la actividad alimentaria de los individuos sobre el disco mas no su ingestión (compárese las Tablas 3 y 4).

Extracción y separación cromatográfica con monitoreo biológico

Hojas intermedias desecadas al ambiente de *Baccharis trinervis* y molidas hasta polvo fino (220 g) se extrajeron exhaustivamente con éter de petróleo y diclorometano 3:1 (3 L) en tres tandas de 1 L. Tras evaporar

Tabla 3
Parámetro de alimentación de *T. castaneum* sobre discos de harina dosificados con cantidades variables de ácidos *ent*-kaurénico (7) en ensayo de no-selección o de una vía**

DOSIS (mg/disco)	C (mg/individuo)	ΔW (mg)	ECI rel al control	Dosis ingerida por insecto
Control	0,558 ± 0,018	0,09 ± 0,02	1	0,000
0,01	0,506 ± 0,075 ^a	0,05 ± 0,02 ^b	1,026	0,165 ± 0,041
0,1	0,492 ± 0,043 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	1,091	1,563 ± 0,351
0,25	0,486 ± 0,048 ^b	0,06 ± 0,02 ^a	1,088	3,473 ± 0,542
0,5	0,536 ± 0,031 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,971	8,035 ± 0,729

**Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Letras iguales denotan diferencia estadística no significativa respecto al control ($p < 0,05$).

Tabla 4
Parámetros de alimentación de *S. oryzae* sobre discos de harina dosificados con cantidades variables de ácido *ent*-kaurénico (7) en un ensayo de una vía**

DOSIS (mg/disco)	C* (mg/individuo)	% relativo al control
Control	0,659 ± 0,103	—
0,01	0,624 ± 0,046 ^a	95 ± 2 ^a
0,1	0,680 ± 0,119 ^a	103 ± 3 ^a
0,25	0,688 ± 0,032 ^a	104 ± 4 ^a
0,5	0,652 ± 0,065 ^a	99 ± 4 ^a

*Actividad de separación de fragmentos del disco, no necesariamente ingeridos.

**Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Letras iguales denotan diferencias estadísticas no significativas respecto al control ($p < 0,05$).

los solventes en un rotavapor se formó una cabeza de columna con el residuo gomoso (17 g) y se cromatografió sobre gel de sílice utilizando gradientes de hexano-diclorometano-acetato de etilo. El material semicrudo de las fracciones cromatográficas se sometió a ensayo de selección de doble vía con *T. castaneum* y *S. oryzae*. Las que resultaron positivas se examinaron adicionalmente con el ensayo de alimentación de una vía. Solamente se observó inhibición moderada de la alimentación en ambas especies de insectos en la fracción de la que resultó después, mayoritariamente, el ácido *ent*-kaurénico (7), punto

de fusión 175-178°C, idéntico (TLC, IR y 1H-RMN) al ácido kaurénico aislado de la *Espeletia semiglobulata* (2).

Resultados y Discusión

Se han reportado en la literatura muchos derivados del kaureno, sin embargo el epóxido del kaurenol (**4a**) y el epóxido de su acetato (**4b**) no han sido reportados, bien sea como productos naturales, o como productos de hemisíntesis. Tampoco el 15 α ,19 α -dihidroxi-kaureno (**5**), ni su epóxido (**6**), han sido descritos en la literatura. Por consi-

guiente estas cuatro sustancias son nuevos derivados del kaureno.

La sustitución del doble enlace exocíclico por un grupo epoxídico influye notablemente sobre el desplazamiento químico del protón H-13. Dicha señal se encuentra a δ 2,63 en el espectro de resonancia protónica de los kaurenos, pero se observa a δ 1,78 en los compuestos epoxidados. La epoxidación sin embargo no tiene una influencia tan grande sobre el desplazamiento químico de la señal del carbono C-13, señal que aparece en el kaurenol a 44,0 ppm y se desplaza en el compuesto epoxidado a 42,5 ppm. La presencia de un hidroxilo sobre C-15 también influye sobre la señal del carbono C-13 y produce un desplazamiento diamagnético adicional por lo que la señal de este carbono aparece en el derivado epoxidado 6 a 40,8 ppm.

Baccharis trinervis (Lam) Pers., planta relativamente común en el rastrojo de montaña de altitudes intermedias (1000-2000 m) en los Andes centrales de Venezuela, aunque puede encontrarse entre el nivel del mar y 3000 m de altitud desde el sur de México (Chiapas) hasta el Perú, muestra en forma característica que sus hojas juveniles e intermedias se hallan mayormente libres de actividad por parte de insectos masticadores, más no así sus hojas maduras y próximas a la senescencia. Un primer análisis (sin publicar) demostró que en esas últimas, la concentración de ácido *ent*-kaurénico (7) era muy reducida frente a la de hojas juveniles e intermedias. Esto concuerda con el hecho de ser el ácido *ent*-kaurénico un intermediario en la síntesis de giberelinas (10), que son hormonas de crecimiento en las plantas. Ello orientó la búsqueda hacia este compuesto al examinar la actividad antialimentaria de los extractos de éter de petróleo de las hojas de esta planta, revelándose este compuesto 7 en efecto como responsable de la moderada actividad fagoinhibidora de los componentes de baja polaridad (Figura 2). Como puede observarse, aun cuando ambas especies de insectos, *T. castaneum* como *S.*

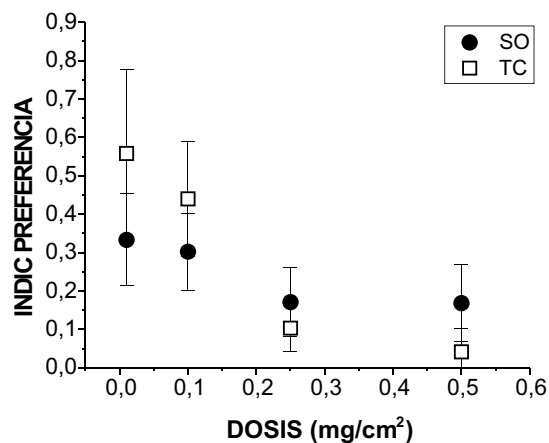


Figura 2. Comportamiento de fagodepresión causada por el ácido *ent*-kaurénico (7) sobre *S. oryzae* (cuadrados) y *T. castaneum* (círculos) a dosis entre 0,01 y 0,5 mg cm⁻² en discos de harina. Las barras de incertidumbre son una desviación estándar (N = 5).

oryzae, resultaron sensibles, el primero aparece como más afectado. No se observó mortalidad a pesar de que las dosis ingeridas alcanzaron $8 \pm 0,7$ μ g/individuo.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de que la actividad fagoinhibidora pudiera ampliarse en *T. castaneum* y *S. oryzae* a los niveles observados por Bruno et al. (2001) en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Sin embargo, al someter estos coleópteros al ensayo de una vía con ácido *ent*-kaurénico, no se observó actividad en términos absolutos (Tablas 3 y 4).

Esto puede interpretarse como que, si bien el ácido *ent*-kaurénico actúa como agente protector contra la herbivoría por insectos sobre la planta en su estado silvestre, en donde hay otras fuentes de alimentación, -como lo emularía el ensayo de dos vías- al verse forzados a ingerir alimento aun dosificado los insectos se adaptan a devorar el tratamiento.

Estos resultados preliminares indujeron a razonar que podría potenciarse la actividad antialimentaria derivatizando convenientemente el ácido *ent*-kaurénico en las secciones moleculares que normalmente presentan funcionalización, como son los carbonos C15, C16, C17 y C19. Bajo esta premisa se obtuvieron los derivados **3a,b**, **4a,b**, **5 y 6** del 19 α -hidroxikaurano así como los ésteres del ácido 19 α -kaurénico 8 y 9, y

se sometieron al ensayo de alimentación de una vía con *S. oryzae* y *T. castaneum*.

Los resultados de la Tabla 5 indicaron que no ocurre fagodepresión en *S. oryzae* salvo el compuesto **4b** que indujo 23% de reducción relativo al control externo al que las cohortes de las réplicas fueron sometidas. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

Tabla 5

Parámetros de alimentación de *S. oryzae* sobre discos de harina tratados con los derivados 4a, 4b, 5, 6 y 8 en un ensayo de una vía, bajo dosificación de 0,25 mg/disco. C rel corresponde al consumo de disco tratado en correspondencia con un control externo de la misma cohorte de insectos

Compuesto	C* \pm DS (mg)**	C rel
Control	1,25 \pm 0,13 ^a	100%
4 ^a	1,29 \pm 0,17 ^a	99%
4 ^b	1,03 \pm 0,27 ^a	79%
5	1,18 \pm 0,11 ^a	94%
6	1,19 \pm 0,24 ^a	92%
8	1,18 \pm 0,14 ^a	91%

*Actividad de separación de fragmentos del disco, no necesariamente ingeridos.

**Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Letras iguales denotan diferencias estadísticas no significativas respecto al control ($p < 0,05$)

Tabla 6

Parámetros de alimentación de *T. castaneum* sobre discos de harina tratados con los derivados 4a, 4b, 5, 6 y 8 en un ensayo de una vía, bajo dosificación de 0,25 mg/disco. Las incertidumbres son una desviación estándar. W= variación del peso corporal vivo de cada individuo. C= consumo de alimento por individuo. ECI = eficiencia de conversión del alimento ingerido**.

Compuesto	C \pm DS (mg)	W \pm DS (mg)	ECI \pm DS	ECI rel. al Control	Dosis ingerida por insecto (μ g)
Control	0,32 \pm 0,05	0,09 \pm 0,01	0,57 \pm 0,05	1,00	0,0
4 ^a	0,29 \pm 0,04 ^a	0,09 \pm 0,01 ^a	0,65 \pm 0,06 ^a	1,14	4,26 \pm 0,57
4 ^b	0,31 \pm 0,04 ^a	0,09 \pm 0,01 ^a	0,59 \pm 0,07 ^a	1,03	4,56 \pm 0,57
5	0,33 \pm 0,02 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,45 \pm 0,08 ^b	0,79	4,85 \pm 0,29
6	0,35 \pm 0,04 ^a	0,06 \pm 0,02 ^b	0,45 \pm 0,08 ^b	0,79	5,14 \pm 0,57
8	0,29 \pm 0,05 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,68 \pm 0,07 ^a	1,19	4,26 \pm 0,58

**Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Letras iguales denotan diferencias estadísticas no significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Solamente pudo verificarse una leve disminución del ECI sobre *T. castaneum* (Tabla 6) en los compuestos **5** y **6** pese a lo cual hubo todavía aumento del peso corporal de los individuos. No habiendo ocurrido mortalidad en el período de exposición de 60 h puede concluirse que el grado de toxicidad que estos valores implican es leve.

Concluimos que, sin descartar que los derivados del kaurenol y del ácido *ent*-kaurénico puedan afectar a otras especies de insectos herbívoros, estos compuestos no produjeron efectos negativos de importancia sobre dos de los más importantes coleópteros de los granos almacenados en el trópico, *S. oryzae* y *T. castaneum*.

Agradecimiento

Los autores agradecen el financiamiento recibido del CDCHT-ULA (Proyecto Fa-325-04-03-B). Igualmente agradecen a Alí Bahsas por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear y a Daniel Salcedo del Laboratorio de Servicios Analíticos (LARSA) por la medición de los valores de rotación óptica.

Referencias Bibliográficas

1. BRUNO M., ROSELLI S., PIBIRI I., PIOZZI F., BONDI M.L., SIMMONDS M.S.J. **Phytochemistry** 58: 463-474, 2001.
2. BONDI M.L., BRUNO M., PIOZZI F., BASER K.H.C., SIMMONDS M.S.J. **Biochem Syst Ecol** 28: 299-303, 2000.
3. ARISTEGUIETA L. **Flora de Venezuela** Vol. X (Compositae): 451-452, 1964.
4. USUBILLAGA A.N., CAPRA M.C. **Fitoterapia** LIX: 383-384, 1988.
5. PIOZZI F., PASSANNANTI S., PATERNOSTRO M.P. **Phytochemistry** 10: 1164-1166, 1971.
6. ADAM W., BIALAS J., Y HADJIARAPOGLOU L. **Chem Ber** 124: 2377, 1991.
7. BRIESKORN C.H., PÖHLMANN E. **Tetrahedron Letters** 54: 5661-5564, 1968.
8. PIOZZI F., SPRIO V., PASSANNANTI S., MONDELLI R. **Gazz Chim Ital** 98: 907-910, 1968.
9. ALONSO-AMELOT M.E., AVILA J.L., OTERO L.D., MORA F., WOLF, B. **J Chem Ecol** 20: 1161-1177, 1994.
10. FOSKET D.E. **Plant growth and Development. A Molecular Approach**. Academic Press, Nueva York (USA), p. 308, 1994.